



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

**Genética histórica del género *Leptonycteris*
(Mammalia: Chiroptera) en poblaciones del
centro de México**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**

PRESENTA:

JOSEFINA RAMOS-FRÍAS

Director: DR. ALBERTO ENRIQUE ROJAS MARTÍNEZ

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DIRECCIÓN

M. EN A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
DIR. ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE

Por este conducto le comunico que, después de revisar el trabajo titulado "Genética histórica del género *Leptonycteris* (Mammalia: Chiroptera) en poblaciones del centro de México" que presenta la alumna de la Maestría en Biodiversidad y Conservación, Biól. Josefina Ramos Frías, el Comité Revisor de tesis ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE: Dra. Norma L. Manríquez Morán

SECRETARIO: Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

VOCAL: Dr. Alberto E. Rojas Martínez

PRIMER SUPLENTE: Dr. Pablo Octavio Aguilar

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hgo., a 24 de Junio del 2013.

DR. ORLANDO ÁVILA POZOS
DIRECTOR I.C.B.I.



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts. 2230 y 2231, Fax 2109
avilap@uaeh.edu.mx



*A mi papá y a mi mamá,
por darme la vida....*

pero más que nada, por hacerla feliz.

*“Son nuestras elecciones, Harry,
las que demuestran quiénes somos,
mucho más que nuestras habilidades”*

A.P.W.B. Dumbledore

(HP y CA, J.K.R., pag 280)



*“Así como los ojos de los murciélagos se ofuscan a la luz del día,
de la misma manera a la inteligencia de nuestra alma
la ofuscan las cosas evidentes”*

Aristóteles

(Aunque Aristóteles no sabía que los murciélagos no se ofuscan con la luz del sol, el sentido de la frase es el mismo...)

Estimado lector:

Este escrito es producto de un trabajo que empezó hace ya varios años. La primera parte se inició alrededor del 2006, cuando propuse vagamente hacer una valoración de la diversidad genética de una colonia de murciélagos. En ese momento, ¡¡¡no tenía ni la más remota idea de en qué lío me estaba metiendo!!!. Desde aquel momento, este trabajo ha continuado por sinuosos caminos en diferentes etapas, con nuevos objetivos y por lo tanto, ha sufrido innumerables mutaciones (incluyendo transversiones, translocaciones, inserciones y deleciones en el sentido más literal que la citogenética permita).

Siendo así. Sea pues ésta una aclaración más que un agradecimiento de que las siguientes páginas que aquí se exponen son producto del esfuerzo, tiempo y trabajo de una gran cantidad de personas y jamás solamente propio.

Por lo tanto, si tuviera que escribir el nombre, apellidos y colaboraciones principales de todas las personas que han colaborado directa o indirectamente en alguna de las múltiples fases que este trabajo requirió, esta tesis resultaría más extensa que la enciclopedia temática Salvat. Por tal motivo y en aras de la practicidad tal cantidad ha sido severamente reducida, solicitando una disculpa anticipada a todas aquellas personas que no figuran directamente pero a quienes el agradecimiento y créditos pertinentes se les hará llegar de manera personal.

Para empezar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las dos personas que me han llevado de la mano a través de este largo, lastimoso y a la vez satisfactorio camino de la ciencia y que apoyaron mis locas ideas desde que desde que fueron solamente rayones sobre un papel. Quienes me dieron la oportunidad de crecer en total libertad y probar mis propios límites, quienes “adoptaron” desde sus diferentes trincheras y me dieron un segundo hogar (el laboratorio) y una segunda familia (mis compañeros). ¡Docs, Muchas gracias, trabajar con ustedes ha sido un honor y un privilegio!

A la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, quien me alentó a iniciar este trabajo y me proporcionó los medios para construirlo, pero que por causas de fuerza mayor y ajena a su voluntad no concluyó en el papel correspondiente. Gracias por otorgarme su confianza desde el primer momento, por darme la libertad necesaria para trabajar en lo que yo quería y dejarme cometer mis propios errores, por darme palabras de apoyo en los momentos de desesperación y por invertir en mí mucho de su tiempo, dinero y esfuerzo.

Al Dr. Alberto E. Rojas Martínez, le agradezco muchísimo el haberme considerado desde el principio como parte de su equipo (¡aunque oficialmente no lo era! ;), me otorgó toda su confianza, me abrió las puertas de su laboratorio, su oficina y su casa y me dejó trabajar con sus alumnos y con su familia. Eso me permitió crecer en un ambiente de total libertad y me brindó la posibilidad de abrir mis ojos y ver un panorama mucho más amplio de lo que me imaginé jamás. Muchas gracias Doc, por haberme enseñado tanto, por conducirme en el campo, el laboratorio y mi carrera, por compartir conmigo su experiencia y su conocimiento, por tenderme siempre su mano en los momentos difíciles.

A la Doctora Norma Manríquez Morán quien se integró a este equipo desde que se convirtió en un proyecto de maestría y quien me ha apoyado profundamente en todo momento. Me ha enseñado

mucho gracias a sus atinados comentarios y me ha permitido colaborar con ella en otras actividades.

Al Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún de quien siempre recibí ayuda en los momentos en que las cosas se complicaban y a quien le agradezco profundamente sus comentarios, consejos y charlas amenas que ayudaron mucho a mejorar este trabajo. Muchas gracias, Juan Carlos, por alentarme a tomar nuevos retos, y ayudarme a ser mejor profesionista, con aquellas charlas en las tardes en el lab, acompañadas con café, música y chocolates.

Al Dr. Pablo Aguilar quien se integrara más recientemente al equipo, pero que con sus comentarios me ha ayudado enormemente a mejorar el presente trabajo.

A mi mamá y mi papá, que me dieron vida, genes y todo su amor toda mi vida, que siempre me han apoyado en todas mis desiciones y me han acompañado, cuidado, ayudado y levantado en todas las empresas que me he propuesto. Gracias mamá por enseñarme el valor del trabajo, la paciencia y el compromiso conmigo misma. Gracias papá por transmitirme el carácter y el valor para enfrentar mis retos.

A mi “Agüe” Julián Ramos, que aunque no pudo ver este resultado, siempre sembró en mí el primordio de la ciencia: la semilla de la observación meticulosa, propia de la gente de campo...

A la maestra Magdalena Meza, quien también me ha ayudado muchísimo con consejos y asesorías profesionales y personales. Con quien he compartido tanto charlas, café y chistes como el pan y la sal. Muchas gracias Magda, por toda tu ayuda y tu confianza, porque más que maestra eres una gran amiga con quien sé que puedo contar.

A todo mi equipo de campo que se aventó conmigo las noches, cálidas, frías, apacibles o tormentosas, que la naturaleza decide a capricho. Pero que no se rindió hasta que obtuve las últimas muestras: Los chicos del verano de la ciencia 2010, las boxitas Lorena y Genny (que se morían de frío) y los poblanitos Azucena y Ricardo. Al equipo local: Lalo (el cuasicolega), Nalle (la vecina) y mi primito-carnalito Aaron (Aroncio). Y a mis padawanes, Bilma Angelina Martínez (UMAR-Pto Escondido) y Mónica Contreras Torres (BUAP) quienes también me ayudaron muchísimo en el laboratorio para procesar las muestras, hacer geles, soluciones, los infinitos PCR's y las bases de datos.

Al programa “verano de la ciencia”, de la Academia Mexicana de Ciencias que me ayudó a consolidar mi vocación científica durante la licenciatura, a encontrar mis áreas de interés y fortaleció mi formación profesional por medio de dos estancias de verano. A mis anfitriones de los veranos, de quienes aprendí tantas cosas, el Dr. Cornelio Sánchez y la Dra. María de Lourdes Romero (IB-UNAM) y el Dr. Omar Chassin Noria (CMEB-UMSNH).

A mi amiguita la M. en C. Melany Aguilar López por haberme enseñado siempre a superar mis propios límites, porque las fronteras sólo están en la mente. Los cerros, los ríos, los barrancos, el frío, el lodo, el hambre, la lluvia, la obscuridad, los insectos, los golpes, las mordidas y anexas, son sólo insignificancias; pero jamás obstáculos suficientes para impedirme alcanzar mis metas. Gracias por haberme permitido vivir contigo tantas y tan valiosas aventuras.... ¡y las que faltan!

Al M. en C. Antonio Álvarez Delgadillo, con quien pasé muchísimas horas amenas en el laboratorio oyendo “complots” cuando llegué, quien para desgracia suya se convirtió en mi gran maestro Jedi y me enseñó muchas de las más indispensable técnicas de biología molecular, siempre con una sonrisa y mucha dedicación.

A todos mis compañeros del laboratorio de Ecología de Poblaciones, de quienes he aprendido tanto, de quienes he recibido ayuda invaluable y regaños necesarios, y a quienes les agradezco con todo el corazón, por apoyarme en mis trabajos, por impulsarme en mi debilidad y por haberme permitido aprender e involucrarme en cada uno de sus proyectos siempre dejándome un gran sabor de boca. Gracias a “la primera generación” Jorgito, Sergio, Víctor, Paty Milo, Brenda y Jonathan (Arenita). Gracias a la “nueva generación”, David Gómez, Luis, David Cervantes, Maricela, Génesis, Karolina, Elinor y Shirley (Chirly). Y a los “atemporales” Mel, Cristian y Gabriel.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética, quienes también me permitieron involucrarme en sus proyectos y aprender mucho. Que definitivamente hicieron mucho más llevaderas las largas horas en el laboratorio y que se han convertido en más en amigos que sólo compañeros. Gracias a los que me recibieron con los brazos abiertos y abrieron brecha: Diana, Carmelita, Jacqueline y Toño . Gracias a los que yo recibí y me dejaron acompañarlos precediéndoles el camino: Mara, Zaira y Mayra. Y por supuesto gracias a aquellos que llegaron para caminar conmigo: Ernesto (Doc), Mario (“Marito”) y mi amiguirri Rosita. Porque a lo largo de ese camino descubrí en ellos personas extraordinarias que me ayudaron incansablemente, que me enseñaron un montón de cosas y con quienes compartí alegrías, frustraciones, risas, desvelos, trabajo y música en el lab... pero más que todo eso, se convirtieron en más que solo compañeros, si no en hermanos y cómplices de mil y una aventuras.

Al maestro Mario Segura Almaraz quien fue mi tutor en la licenciatura y lo sigue siendo... porque siempre encuentro en su oficina un lugar para charlar y hallar consejo cuando mi brújula pierde el norte.

A mi colega compañera y amiga la M. en C. Esmeralda Salgado, por las largas horas de consejos, terapia psicológica, asesoría técnica y ayuda especializada en Biología Molecular, pero sobre todo por la confianza que en todo momento me ha brindado. Miss!!! Muchas gracias por toda su ayuda, amistad y complicidad!! Gracias por llenarme de luz en los días nublados.

A la vecina, M. en C. Griselda Nallely Hernández Rico quien ha brindado un profundo apoyo moral en los peores momentos de desesperación, logrando sacarme siempre una sonrisa. Y quien también ha contribuido en la necesaria creación de palabras técnicas que la ciencia demanda (popito, mamiferito, cafito, duendecilo etc).

A Laura y Lidia del laboratorio de docencia... por todas las veces que me han sacado de apuros en un segundo y se han convertido en mis ángeles salvadores!!! Mil gracias chicas! Por las charlas, la confianza y su apoyo.

A mis amigas de la licenciatura, co-fundadoras y miembros activos de la UVA. Dianamonnita Areniscas IslasArc (Diana Arenas), quien me enseñó que no existen los retos imposibles, que para superarlos hay que hacerles frente con “tejones y ardillas” y aplicar una dosis suficiente de “paciencia y salivita”. A Pingüily, Pingus, Pingüino, Pinguícola moranensis, Pingüica, Areloca, Mamá Lucha, Bon Ice, etc. que aunque son todas la misma persona (Arely Pengüilly) es tan fuera de lo común que se necesita todo eso para nombrarla, porque me ha demostrado que los verdaderos amigos te apoyan superando las fronteras del tiempo y la distancia.

A mi amigo y profesor Ulises Iturbe, quien me convenció de estudiar biología y todavía hoy sigue pagando las consecuencias.

A todos los mueganitos de la familia Frías, a mis tíos y a mi bola de primos que siempre han estado apoyándome y echándome muchas porras para seguir adelante, gracias carnalitos, por estar allí ¿quién necesita hermanos teniéndolos a ustedes?. A mi tía Chata, que incluso me “adoptó” durante mis visitas a la UNAM, y siempre me apoya con una cálida sonrisa aunque no termina de entender qué le veo a esas “ratas con alas”.

Agradecimientos para Lupita y Vianey, a quienes les gustaban las historias... para Lalo Bustos a quien también le gustaban, y para Nelly, que oyó esta primero. Muchas gracias amigos, porque han llenado de magia mi mundo, porque siempre me han ayudado a salir de mi alacena bajo las escaleras y porque han seguido mis pasos y los seguirán hasta el final.

A Valentina Zavaleta, que siempre está llena de una chispa contagiosa de optimismo que derrocha por doquier.

A Beto del Valle, que progresivamente se convirtió de en asesor y un excelente terapeuta de traumas “tesistenciales”, que resuelve con grandes dosis de paciencia y café.

A toda la banda de mi rancho y de la compañía de teatro que fueron testigos de todo este proceso: Ceciringa (y el respectivo Ratón), Leo, Paty, Mayra, Sandy, Irma, Jessy, Frede, Rigo, Raque y Juan.

*A todos, ¡muchas gracias!
Atentamente,*



Jose Beto

Chepis

(Josefina Ramos-Frías)

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
El concepto de Genética Histórica.....	4
Aplicaciones de la ecología molecular en el estudio de poblaciones naturales de murciélagos ..	5
Importancia ecológica y relevancia de la conservación de murciélagos del género <i>Leptonycteris</i>	6
.....	6
Uso de marcadores moleculares en la cuantificación de la variación genética.....	7
La estimación del flujo génico	10
Inferencia de la dinámica del flujo genético.....	11
Inferencia y representación gráfica de las relaciones genealógicas	13
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	16
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares:	16
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	17
Áreas de Estudio	17
1.- Túneles de Ahuacatitla	18
2.- Parque Ecológico Cubitos	20
3.-Cueva del Guano	21
4.-Cueva del Obispo	23
5.-Gruta de Xoxafi	25
El género <i>Leptonycteris</i>	26
<i>Leptonycteris nivalis</i> (Saussure, 1860)	27
<i>Leptonycteris yerbabuena</i> (Martínez y Villa-Ramírez, 1940)	29
Trabajo de campo.....	32
Trabajo de laboratorio.....	34
Estimación del Flujo Génico	37
Relaciones de parentesco y genética histórica	37
RESULTADOS	38
Trabajo de campo.....	38
Trabajo de laboratorio.....	38
Análisis de diversidad y estructura genética	39
Parámetros generales de diversidad genética	39
Parámetros de estructura genética	42
Aislamiento por distancia	43
Flujo genético.....	44
Relaciones de parentesco y genética histórica.....	47
DISCUSIÓN	47
Diversidad genética.....	47
Estructura genética	49
Aislamiento por distancia	52

Flujo genético.....	53
Relaciones de parentesco y genética histórica.....	57
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXO I: Clave para la identificación de las especies de murciélagos del género <i>Leptonycteris</i> (Cole y Wilson, 2006)	71
ANEXO II.- Protocolos estandarizados	71
Protocolo de Extracción de Muestras de DNA de tejido.	71
Protocolo de preparación y corrimiento de electroforesis	72
Condiciones de amplificación de PCR utilizadas	72
Preparación y corrimiento de electroforesis en geles verticales de acrilamida para separación y visualización en alta resolución de productos amplificados.	74
Preparación de soluciones estándar para biología molecular	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Medidas derivadas de F_{ST} , principales parámetros propuestos para mejorar las aproximaciones en la cuantificación de la diferenciación genética.	9
Cuadro 2.- Cuadro comparativo de las medidas somáticas generales de las dos especies de murciélagos del género <i>Leptonycteris</i> en México (Arita 2005a, 2005b).....	27
Cuadro 3 .- Microsatélites seleccionados (Ramírez, <i>et al.</i> , 2011)	34
Cuadro 4.- Proporción de polimorfismos detectados por <i>locus</i>	39
Cuadro 5.- Alelos detectados por <i>locus</i> por población.	39
Cuadro 6 .- Parámetros generales de diversidad genética en <i>L. nivalis</i>	40
Cuadro 7.- Parámetros generales de diversidad genética en <i>L. yerbabuena</i>	41
Cuadro 8 .- Índices de Shannon, por especie.....	41
Cuadro 9.- Distancias (<i>L. yerbabuena</i>). Distancia genética de Nei (bajo la diagonal); distancia geográfica lineal, en km (sobre la diagonal).	43
Cuadro 10.- Formulación de la mezcla maestra por juego de oligonucleótidos.	73
Cuadro 11.- Condiciones de amplificación estandarizadas	73
Cuadro 12.- Fórmula para preparar 100ml de Búffer de digestión, mezclar los reactivos en las cantidades indicadas y aforar a 100ml.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. - Representación esquemática de los cinco tipos posibles de estructura de población y migración entre subpoblaciones (Tomado y modificado de Tero, <i>et al.</i> , 2003).	12
Figura 2 .- Ubicación de las cinco localidades de colecta.....	18
Figura 3. - Zona donde se ubica la barranca de Ahuacatitla.	20
Figura 4. -Jardín botánico “Ollintépetl” del parque Ecológico Cubitos (Pachuca).	21
Figura 5. - Paisaje que rodea a la cueva del guano.....	23
Figura 6. - La Cueva del Obispo se ubica en la pared de una ladera formada por la erosión de un arroyo temporal.	24
Figura 7. -Paisaje que se observa alrededor de las Grutas de Xoxafi.....	25
Figura 8. - <i>Leptonycteris nivalis</i> . a) Ejemplar hembra capturado en el Parque Ecológico Cubitos. Fotografía Ramos-Frías, J. b) Mapa que muestra la distribución de la especie en México. Tomado y modificado de Pfrimmer y Wilkins, 1988.	28
Figura 9. - <i>Leptonycteris yerbabuena</i> e. a) Hembra de las Grutas de Xoxafi. b) distribución de la especie en México. Tomado y modificado de Medellín, 2007.	30
Figura 10. - Resumen visual de los métodos utilizados.	33
Figura 11. - Individuos capturados por localidad. Se muestra número total y composición por sexo. .	38
Figura 12 .-Fuentes de variación por especie, promediados y ponderados para todos los <i>loci</i> . Las dos columnas de la izquierda, representan las fuentes de variación con relación a los parámetros F_{ST} obtenidas por medio de la AMOVA (Excoffier, 2006). Las dos columnas de la derecha, representan las fuentes de variación con relación a los parámetros R_{ST} obtenidos por medio de la AMOVA (Slatkin, 1995).	42
Figura 13. - Estadísticos de estructura basados en parámetros F (Wright, 1951; Excoffier, 2006) y R (Slatkin, 1995), totales por especie. Método de distancia R_{ST} , suma de las diferencias al cuadrado (9,999 permutaciones). Método de distancia F_{ST} , suma de las diferencias al cuadrado (10,100 permutaciones).....	43
Figura 14. - Dinámica del flujo Genético en <i>Leptonycteris nivalis</i>	45
Figura 15. - Dinámica de flujo genético en <i>Leptonycteris yerbabuena</i> e	46



RESUMEN

Los murciélagos nectarívoros del género *Leptonycteris* son polinizadores y dispersores de semillas de una gran variedad de plantas en ecosistemas áridos y tienen una amplia distribución en México. Se consideran como migratorios, sin embargo, recientemente, su movilidad ha sido puesta en duda, para las dos especies que conforman el género (*Leptonycteris nivalis* y *Leptonycteris yerbabuena*) en el centro de México. Ambas especies están consideradas como en peligro de extinción en EUA y amenazadas en México. El objetivo de este trabajo es documentar la estructura genética de las especies para determinar la dinámica del flujo genético en tres colonias de *L. yerbabuena* y dos de *L. nivalis* en el centro del país, utilizando marcadores genéticos (microsatélites). Para ello, fueron recolectadas muestras de tejido cutáneo (Cueva del Guano, municipio de Metztlán; Gruta de Xoxafi, municipio de Santiago de Anaya; Ahuacatitla, municipio de Huasca de Ocampo y Parque Ecológico de Cubitos, municipio de Pachuca en el estado de Hidalgo y la Cueva del Obispo, municipio de San Juan Nochixtlán, en el estado de Oaxaca). De cada muestra se extrajo el DNA para posteriormente amplificar los microsatélites seleccionados y visualizarlos en geles de acrilamida, teñidos con nitrato de plata. Fueron evaluados los parámetros de polimorfismo, heterocigosidad, riqueza alélica y estructura genética, a nivel genotípico, así como las relaciones de los haplotipos más frecuentes y compartidos entre las poblaciones. Los resultados muestran que las poblaciones son altamente polimórficas y en ellas existe una elevada diversidad genética. El flujo genético resultó ser más abundante en *L. nivalis*, lo que le confiere una menor diferenciación con respecto a *L. yerbabuena*, donde la estructura general estuvo determinada por los machos. No se demostró aislamiento por distancia. Con respecto a las relaciones haplotípicas, *L. nivalis* muestra una red altamente centralizada, con elevada conectividad, compatible con el flujo genético más abundante. En *L. yerbabuena*, se encontró una red de topología excéntrica en cascada, con baja conectividad, por lo que los patrones de flujo genético son complejos y derivan en una mayor diferenciación.



INTRODUCCIÓN

El género *Leptonycteris* en México, está representado por dos especies de murciélagos de tamaño mediano; *Leptonycteris nivalis* y *Leptonycteris yerbabuenae*, se alimentan de néctar y polen; son polinizadores específicos de una gran variedad de plantas de ecosistemas xéricos, entre las que destacan los agaves, las cactáceas y las convolvuláceas, entre otras (Arita, 2005a y 2005b).

Ambas especies son similares en morfología y por varios años fueron confundidas o clasificadas como una misma especie, usándose diversos nombres: *L. sanborni*, *L. curasoe*, *L. nivalis* y *L. yerbabuenae* (Hayward y Cockrum 1991; Hensley y Wilkins, 1988; Cockrum, 1991).

La taxonomía de estos murciélagos no fue totalmente clara hasta finales de la década de los 80's del siglo XX, cuando se reconoció la existencia de dos especies dentro del género *Leptonycteris* (Arita y Humprey, 1988; Anexo I).

Leptonycteris nivalis, designa a la especie más grande y tiene una distribución prácticamente restringida al territorio mexicano.

Leptonycteris curasoe, designa a la especie más pequeña, que está dividida con dos subespecies con distribución geográficamente disyunta: *L. curasoe yerbabuenae* que habita en la porción norte del continente americano desde el suroeste de Estados Unidos hasta Honduras y *L. curasoe curasoe* que habita la costa norte de Colombia y Venezuela y las islas del Caribe de Aruba, Bonaire, Curazao y Margarita.

Posteriormente, Cole y Wilson (2006) propusieron elevar a las subespecies de *L. curasoe* al nivel de especie, por lo que el género quedó constituido por tres especies (*L. nivalis*, *L. curasoe* y *L. yerbabuenae*).

Aunque el murciélago de hocico mayor (*L. nivalis*) es ligeramente más grande que su especie hermana (*L. yerbabuenae*) en Norteamérica, y pese a que es una especie relativamente común, existen pocos trabajos sobre la ecología, la alimentación y el comportamiento reproductivo.



Por otra parte, las publicaciones sobre diversos aspectos de la biología y ecología del murciélago menor (*L. yerbabuena*), son mucho más numerosas. Se han documentado aspectos reproductivos de particular importancia desde el punto de vista genético (Torres y Rojas-Martínez 2001, 2002). Se ha documentado la existencia de dos poblaciones reproductivas en las hembras: una que se reproduce en primavera-verano y otra que se reproduce en el otoño-invierno (Arita, 2005a), con dos periodos reproductivos en los machos (Torres y Rojas-Martínez, 2002). Esta especie ha sido considerada históricamente como migratoria y se ha propuesto que siguen un “corredor de néctar” formado por el florecimiento secuencial de diversas especies de plantas a lo largo de su ruta migratoria, que inicia en el centro de México y que termina en el sureste de Estados Unidos (Cockrum, 1991; Ceballos, *et al.*, 1998; Stoner, *et al.*, 2003; Galindo, *et al.*, 2004; Cole y Wilson, 2006).

El seguimiento de este tipo de eventos migratorios por métodos directos de ecología clásica (tales como telemetría, captura-marcaje-recaptura, observación del comportamiento, etc.) requieren un seguimiento complejo y continuo de las poblaciones en escalas muy grandes de tiempo y área de distribución. Mismos que requieren de un considerable esfuerzo de captura, tomando en cuenta la cantidad de individuos que suelen componer a las poblaciones, adicionalmente, sólo permiten medir la vagilidad de los organismos, pero no el éxito reproductivo de los migrantes (Eguiarte y Souza, 2007).

Sin embargo, el uso de métodos de ecología molecular, que pretenden resolver preguntas de carácter ecológico, por medio de la aplicación de las técnicas de biología molecular, son herramientas útiles que permiten dar respuesta a este tipo de preguntas en escalas de tiempo y espacio determinadas. Adicionalmente, es posible abordar los problemas ecológicos desde distintos niveles simultáneamente, y permiten evaluar el éxito reproductivo de los migrantes en las generaciones sucesivas (Burland y Worthington, 2001; Eguiarte y Souza, 2007; Ríos, *et al.*, 2009).



ANTECEDENTES

El concepto de Genética Histórica

La estructura genética contemporánea de una población es resultado de los eventos históricos de hibridación, flujo, deriva y selección natural en generaciones previas. Así, la genética histórica permite crear interpretaciones sobre eventos pasados con base en la información obtenida a partir de las frecuencias genotípicas contemporáneas. Estos fenómenos pueden rastrearse con mayor o menor precisión a partir de las genealogías, frecuencias genéticas y/o documentos históricos (Morton, *et al.*, 1972).

Las relaciones evolutivas dentro y entre poblaciones, involucran generalmente a los procesos históricos a los que se han sometido los genes y la estructura genética actual de dichos grupos. Sin embargo, en poblaciones grandes, la estructura genética suele ser resultado de los procesos determinísticos de hibridación y selección ascendentes; mientras que en poblaciones aisladas son importantes los procesos de deriva genética, el número de individuos fundadores y el efecto de los cuellos de botella (Morton, *et al.*, 1972; Sans, *et al.*, 1997; Shiang-Fan, *et al.*, 2006).

Uno de los objetivos más importantes de la genética histórica ha sido determinar la contribución de los principales fundadores a la poza genética actual. Definiendo como individuos fundadores, a todos aquéllos miembros de la población que en ciertas generaciones previas tuvieron padres que llegaron de otros grupos o que son desconocidos. De esta manera, los genes de un grupo particular de alelos son derivados de un pequeño número de fundadores (Morton, *et al.*, 1972).

Los procesos evolutivos pueden ser deducidos tanto de los estudios intrapoblacionales como interpoblacionales y una de las aproximaciones más focalizadas es el análisis del flujo génico entre grupos (Sans, *et al.*, 1997), por lo tanto, es una herramienta eficiente en la elucidación de los procesos pasados que afectaron la configuración genética de una o más poblaciones de individuos de grupos contemporáneos (Epp, *et al.*, 2010). Bajo ésta definición, el uso de la expresión “genética histórica” como tal, puede rastrearse desde



la década de los 70's del siglo pasado, aunque este concepto ha sido escasamente utilizado (Morton, *et al.*, 1972).

En 1972, Morton y colaboradores estudiaron la desproporción contemporánea de la pirámide de edades en poblaciones humanas de un par de islotes en Micronesia. Para rastrear la causa, se emplearon datos históricos y contemporáneos que incluyeron genealogías ancestrales, frecuencias de grupos sanguíneos, inmunoglobulinas, isoenzimas y datos de pacientes con patologías genéticas para identificar a los ancestros portadores. El resultado, apuntó como responsable al cuello de botella provocado por una hambruna que azotó a las islas en 1775, diezmando la población. En plantas, la genética histórica ha sido una herramienta para evaluar el origen de algunas uvas rojas, usadas en Francia para la fabricación de vino, usando secuencias de microsatélites altamente polimórficas se logró rastrear el parentesco hasta dos variedades cultivadas en la edad media (Bowers, *et al.*, 1999). Más recientemente, Shiang-Fan (2006) empleó datos genéticos para inferir la historia demográfica y elucidar los procesos que han moldeado la evolución y estructura genética del murciélago *Rhinolophus monoceros*, endémico de la isla de Taiwán.

Los polimorfismos *Short Tandem Repeats* (STR), también han sido utilizados en estudios de genética histórica que pretenden identificar y entender la historia, demografía y la evolución de poblaciones modernas. Por ejemplo, en seres humanos, los movimientos poblacionales pasados y las interrelaciones entre poblaciones se pueden inferir a través de marcadores genéticos específicos (Sans, *et al.*, 1997; Callegari-Jacques, *et al.*, 2003).

Aplicaciones de la ecología molecular en el estudio de poblaciones naturales de murciélagos

Los murciélagos son modelos útiles en el campo de la biología evolutiva debido a su gran capacidad de dispersión a través del vuelo, que se relaciona frecuentemente con una estructura poblacional baja y elevados niveles de flujo genético interpoblacional (Miller-Butterworth, *et al.*, 2003; Moreira y Morielle-Versute, 2006). Usualmente, las poblaciones de mamíferos con subestructura poblacional fuerte están separadas por barreras no



transgredibles o pertenecen a especies terrestres con habilidades de dispersión bajas o nulas (Miller-Butterworth, *et al.*, 2003).

El grado de diferenciación genética puede ser el resultado de factores históricos, evolutivos y ecológicos, por lo tanto, es importante para entender cómo se distribuye la diversidad en las poblaciones de mamíferos. Las diferencias entre especies filogenéticamente relacionadas normalmente se han interpretado como resultado de capacidades diferenciales de vagilidad y de flujo génico (Moreira y Morielle-Versute, 2006).

Importancia ecológica y relevancia de la conservación de murciélagos del género *Leptonycteris*

Las adaptaciones ecológicas de los murciélagos nectarívoros, pueden hacerlos más susceptibles a la extinción, en comparación con otros quirópteros neotropicales, ya que en general, los grupos más especializados tienden a ser más vulnerables que los generalistas (Arita y Santos del Prado, 1999). Los hábitos de percha gregarios los hacen mucho más vulnerables a los disturbios humanos en los refugios (Ceballos, *et al.*, 1997), aunado a esto, el comportamiento migratorio los hace más sensibles aún, porque los hace dependientes de los recursos y a las condiciones ambientales a lo largo de las rutas de migración. Por ejemplo, los disturbios que pudieran reducir las poblaciones de plantas de las que se alimentan tendrían consecuencias severas en la conectividad de las poblaciones (Ceballos, *et al.*, 1997; Arita y Santos del Prado, 1999).

Al considerar la importancia ecológica de éstas especies como polinizadoras de varias especies de plantas, es evidente que el descenso en las poblaciones de murciélagos provocaría efectos negativos en la eficiencia reproductiva de tales plantas (Stoner, *et al.*, 2003).

Entre las estrategias sugeridas la conservación de estas especies, se encuentran la identificación, protección y monitoreo continuo de los refugios de maternidad en el sureste



de Estados Unidos, así como en los refugios clave de las colonias residentes del trópico que proveen de sitios de apareamiento y de los animales que migran (sitios de refugio dentro de corredores biológicos; Fleming, *et al.*, 1993; Ceballos, *et al.*, 1997, 1998; Stoner, *et al.*, 2003).

Uso de marcadores moleculares en la cuantificación de la variación genética

Para cuantificar la variación genética en una población, la fracción de los *loci* que son polimórficos o la riqueza y las frecuencias alélicas presentes, es necesario contar tanto con loci monomórficos (invariantes) como polimórficos en una muestra aleatoria de los alelos de una población. Los caracteres fenotípicos ordinarios no pueden proporcionar esa información, porque no es posible determinar el número de genes que contribuyen para construir rasgos fenotípicos (Hartl, 2000). Por eso, es necesario utilizar biomoléculas conocidas como marcadores moleculares, que pueden ser proteínas (que son la expresión de los genes) o fragmentos de DNA, para detectar la presencia de caracteres relacionados con los rasgos hereditarios (Futuyma, 1998; Selkoe y Toonen, 2006; García-Dávila, 2007).

El estudio de la diversidad y de la estructura genética de las poblaciones

Dentro de la teoría de la genética de poblaciones (que estudia los patrones y las causas de la diversidad genética en las poblaciones), existen una gran variedad de métodos que estiman la diferenciación y la estructura genética, en su mayoría descomponen la variación genética en diferentes factores (Piñero, *et al.*, 2008).

La estructura genética refleja el número de alelos compartidos y exclusivos dentro y entre poblaciones y que puede homogeneizar las frecuencias alélicas entre ellas, en función del flujo génico o que pueden diferenciarse por los efectos relativos de la selección y de la deriva génica. El flujo alto de genes descarta una adaptación local y por lo tanto también impide los procesos de especiación (Domínguez-Olmedo, 2009).



Las distintas medidas de estructura genética están relacionadas entre sí y se basan en analizar las diferencias en las frecuencias alélicas. Las pruebas más sencillas simplemente las comparan. Otros métodos, se basan en estimar la proporción de la variación genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones, tal es el caso de los estadísticos “F” (Índices de fijación), que se dividen en tres niveles: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , propuestos originalmente por Wrigth en 1951 (Wrigth, 1951,1965; Nei 1977).

Los estadísticos F son coeficientes de correlación que se usan para partir la variación genética de una población subdividida. Son coeficientes de correlación que localizan la variabilidad a diferentes niveles: entre poblaciones totales (T), subpoblaciones (S) e individuos (I).

Los estadísticos F_{IS} y F_{IT} son medidas de la desviación de las proporciones esperadas bajo el equilibrio Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones y dentro de la población total respectivamente, donde los valores positivos indican deficiencia de heterocigotos y los negativos, el exceso (Meirmans y Hedrick, 2011).

Particularmente, el estadístico F_{IS} describe el nivel de endogamia o apareamiento entre individuos con relaciones cercanas, los valores para este índice van de -1 a 1, donde los valores aproximados a -1 indicarían niveles importantes de exogamia con superabundancia de heterocigotos, los valores cercanos a 0 muestran una población panmíctica y los cercanos a 1, altas tasas de endogamia.

F_{IT} es un coeficiente de endogamia en poblaciones subdivididas, puede interpretarse como el total de individuos heterocigotos en el Equilibrio Hardy-Weinberg, comparando entre F_{IS} y F_{ST} , es decir, representa un balance entre deriva y flujo génico de los individuos dentro y entre poblaciones. Este parámetro toma valores entre -1 y 1, donde los valores negativos indicarían deriva genética y los positivos, flujo genético.

Finalmente, F_{ST} es la proporción de la desviación del equilibrio contenida dentro de las poblaciones y representa una medida de diferenciación entre poblaciones. Este



parámetro toma valores de 0 a 1, en el que los valores cercanos a 0 indican la similitud total (que es posible interpretar como la presencia de flujo genético elevado) y los valores cercanos a 1, la diferenciación total como resultado de la fijación de alelos distintos en cada población debidos a la deriva génica (Álvarez , 2006; Meirmans y Hedrick, 2011).

Si bien, los estadísticos F han sido ampliamente utilizados, se han detectado limitaciones, tal es el caso del F_{ST} original, que fuera descrito únicamente para un locus y dos alelos. Por lo que posteriormente se han propuesto modificaciones que se ajustan a requerimientos más especializados y que han derivado en medidas comparables que en general, se basan en frecuencias alélicas y proporciones de heterocigotos por lo que también pueden tomar valores entre 0 y 1 (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Medidas derivadas de F_{ST} , principales parámetros propuestos para mejorar las aproximaciones en la cuantificación de la diferenciación genética.

Parámetro	Autor	Características
F_{ST} (original)	Wright, 1951	Se basa en proporciones alélicas y de heterocigóticas. Sólo evalúa sistemas de un locus con dos alelos
G_{ST}	Nei, 1973	Definición ampliada para incluir un número ilimitado de alelos y de loci, en términos de comparación de heterocigosis.
Theta Θ (Coeficiente de coancestría)	Weir & Cockerham, 1984	Partición de la varianza, por lo que se supone que está menos sesgado a las proporciones heterocigóticas, permite manejar diferencias en el número de individuos entre loci y entre poblaciones
F_{ST} (obtenido por AMOVA)	Excoffier, 2006	El Análisis molecular de la varianza (AMOVA) estima F_{ST} con menos requerimientos estadísticos por lo que está menos sesgado a las proporciones heterocigóticas. Permite estimaciones a varios niveles (dentro y entre poblaciones). Específicamente recomendado para datos de marcadores moleculares
R_{ST}	Slatkin, 1995	Estimación basada en sumas de diferencias al cuadrado. Corregido para seguir el modelo de mutación de sitios infinitos (step-wise mutation model; recomendado para datos de marcadores codominantes, como microsatélites)
N_{ST}	Lynch y Crease, 1990	Estimación corregida para datos obtenidos a partir de secuencias. Basada en la tasa de sustitución molecular.
D "Diferenciación genética verdadera"	Jost, 2008	Estimación basada en número de alelos efectivos por población. Tiene comportamiento lineal que cumple con el principio de duplicación y replicación.



Estudios de genética de poblaciones en especies voladoras y migratorias, como murciélagos y aves, han mostrado tradicionalmente estructuras mínimas de población caracterizadas por altos niveles de flujo génico (Miller-Butterworth, *et al.*, 2003).

La estimación del flujo génico

El flujo génico se refiere a aquellos mecanismos que participan en el transporte de genes de una población a otra, tales como el movimiento de gametos, semillas, individuos jóvenes y adultos, y eventos ecológicos como extinción y recolonización de poblaciones completas. Generalmente, los niveles de flujo génico son altos en la mayoría de las especies, actuando como una fuerza integradora que permite que todas las poblaciones evolucionen de manera conjunta, si por el contrario, los niveles de flujo génico son bajos, las poblaciones empezarán a divergir, contribuyendo al aislamiento reproductivo y la formación de linajes evolutivos independientes (Aguirre, 2007).

Es posible realizar estimaciones del flujo génico por medio de tres tipos de métodos, cuya elección dependerá de los objetivos de cada caso de estudio en particular:

DIRECTOS.- por medio de observaciones y experimentos que midan el grado de dispersión de gametos o individuos como captura y recaptura de individuos marcados, y como análisis de parentesco. Este tipo de métodos detectan el flujo génico en una escala ecológica fina.

INDIRECTOS.- se basan en técnicas moleculares, observan la distribución espacial de alelos en las poblaciones para inferir los niveles y patrones del flujo, bajo dos modelos: 1.- que los organismos están formando poblaciones discretas (modelo de islas) que se diferencian por mutación y deriva génica, o 2.- que forman poblaciones con una distribución continua (modelos de aislamiento por distancia) donde la probabilidad de flujo génico disminuye al incrementarse la distancia espacial. Estos métodos tienen la ventaja de incorporar los efectos de todos los componentes



históricos de dispersión y generar un promedio de la variación en la dispersión a través del tiempo, y por lo tanto, reflejar el flujo génico histórico.

GENEALÓGICOS.- que consiste en trazar genealogías entre haplotipos o alelos para reconstruir los procesos evolutivos con los principios de coalescencia hasta hallar un ancestro común.

Inferencia de la dinámica del flujo genético

La teoría de las metapoblaciones fue propuesta en la década de los 70's, por Richard Levine. Una metapoblación consiste en una población compuesta por varias poblaciones locales (subpoblaciones o "demes"; Futuyma, 1998). Según esta definición, tales subpoblaciones pueden tener distintos grados de diferenciación genética local, que estarán condicionados por la cantidad de migrantes intercambiados y el éxito reproductivo de los mismos. Así, el flujo genético influencia fuertemente la escala espacial en la cual la diferenciación genética puede observarse (Hansi, 2001).

La estructura genética y la distribución de la variabilidad de una población dependen de distintos factores tales como el número de fundadores, la probabilidad de que exista un origen común y del tipo de estructura (Futuyma, 1998).

En el caso de los grupos jerárquicos de las poblaciones en el paisaje, Tero y colaboradores (2003) propusieron cinco hipótesis, relacionadas con los patrones de migración que determinarían el origen, distribución y estructura de la variabilidad genética, basándose en los modelos "básicos" de Levine (Hansi, 2001) y el modelo de *Stepping-stone* de Kimura (1953). Éstos modelos proveen diferentes hipótesis susceptibles de probarse acerca de la distribución de la variación genética dentro y entre subpoblaciones

En los tres primeros, las subpoblaciones son aparentemente permanentes mientras que en los últimos dos, las poblaciones pueden ser temporales (Figura 1):

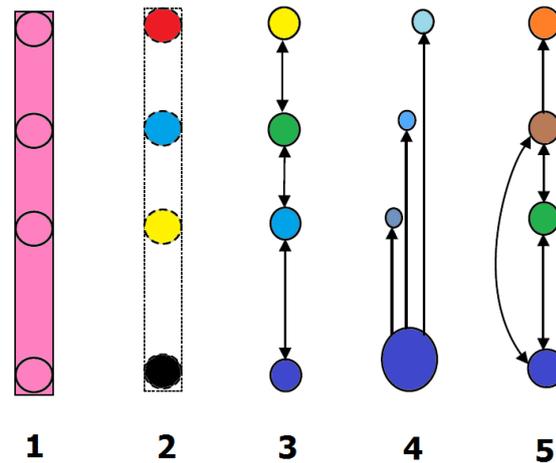


Figura 1.- Representación esquemática de los cinco tipos posibles de estructura de población y migración entre subpoblaciones (Tomado y modificado de Tero, *et al.*, 2003).

1.- Las subpoblaciones forman una sola unidad panmíctica. El flujo génico se distribuye libremente a través de una población genéticamente uniforme (no hay estructura genética), a pesar de la aparente estructura poblacional que pudiera observarse.

2.- Las subpoblaciones representan fragmentos de una población continua sin migración actual entre las poblaciones. El flujo génico es nulo y las fracciones estarían completamente diferenciadas.

3.- El modelo clásico de *Stepping-stone*: la migración solamente ocurre entre poblaciones adyacentes temporalmente persistentes. En este caso, la diferenciación genética depende directamente de la distancia geográfica que guardan las poblaciones, donde la cantidad de flujo génico disminuye progresivamente. Además, la cantidad de la variación genética en las subpoblaciones está también determinada por el equilibrio entre mutación y deriva génica.

4.- Las subpoblaciones forman una metapoblación tipo fuente-resumidero. Bajo esta hipótesis, las subpoblaciones más grandes, diversas y permanentes (poblaciones fuente) son exportadoras de migrantes hacia subpoblaciones menores (poblaciones resumidero). Las subpoblaciones resumidero pueden extinguirse si la migración desde las poblaciones fuente se detiene o se dificulta. Las poblaciones fuente exhibirían mayores parámetros



demográficos y de diversidad genética, mientras que la estructura de las poblaciones sería determinada por la migración de las “fuentes” hacia los “resumideros”.

5.- Todas las subpoblaciones son efímeras y las fuentes de individuos migrantes pueden ser más diversas. En este caso, la distribución de la diversidad y la estructura están determinadas por factores múltiples, posiblemente sin mostrar patrones claros.

La información genética aporta evidencias acerca de cuáles fuerzas evolutivas moldean la estructura de las poblaciones, lo que permite hacer inferencias acerca de cómo han interactuado a través de la historia de las subpoblaciones y de la cantidad de flujo génico que ha ocurrido entre ellas (Tero, *et al.*, 2003).

La pérdida de heterocigosidad por deriva genética en las subpoblaciones bajo el modelo de *Stepping-stone*, está relacionada inversamente con el tamaño efectivo de las subpoblaciones, así podrían encontrarse asociaciones significativas entre el tamaño de la subpoblaciones y la cantidad de la diversidad genética (Futuyma, 1998).

El modelo de fuente resumidero y el de *Stepping-stone* predicen diferencias significativas en la diversidad genética dentro de las poblaciones. En el modelo de fuente-resumidero, la heterocigosidad dentro de la población resumidero podría estar muy reducida, ya que la variación genética sólo puede mantenerse a través del flujo continuo de genes. También se sugiere que la existencia de cuellos de botella poblacionales recientes y la extinción o reemplazo de algunas poblaciones resumidero son factores que pueden incrementar el desequilibrio de ligamiento entre *loci*, de manera considerable dentro de la población completa (Tero, *et al.*, 2003).

En una adaptación posterior al modelo de *Stepping-stone*, es posible predecir que los parámetros de diversidad genética esperada serán mayores cerca del centro del hábitat, en comparación con los bordes de la distribución (Gaggiotti y Smouse, 1996).

Inferencia y representación gráfica de las relaciones genealógicas

La asignación del parentesco por medio de análisis moleculares es necesaria cuando es imposible identificarlo por la vía etológica. El uso de marcadores genéticos moleculares



puede proveer información sobre los sistemas de apareamiento, patrones de cortejo, selección sexual, organización social y grado de adecuación en los individuos (Goodnight y Queller, 1999; Ortega *et al.*, 2002).

La cuantificación e identificación del parentesco aporta información directa sobre el esfuerzo reproductivo, transmisión de atributos fenotípicos heredables y puede combinarse con información demográfica y conductual para generar un enfoque más general que permita diseñar estrategias de manejo para su aplicación en la biología de la conservación (Golubov y Ortega, 2007).

Las relaciones genealógicas se pueden determinar a partir del patrón de alelos que son heredados a la progenie. Dependiendo del uso de diversos marcadores moleculares, se identifican y comparan similitudes y diferencias en los caracteres evaluados (que pueden ser genotipos, haplotipos o nucleótidos; Golubov y Ortega, 2007) por lo tanto la asignación del parentesco será más robusta mientras un mayor número de *loci* sean evaluados (Goodnight y Queller, 1999).

El parentesco conlleva la ramificación evolutiva de los linajes a través de las generaciones y puede representarse de manera esquemática en forma de red. Una red es una representación gráfica que contiene uno o más ciclos, es decir un conjunto de nodos entre los cuales es posible trazar una línea secuencial que los una sin cruzar cada uno más de una vez. En otras palabras, una red es un esquema en el que para al menos un par de nodos, existe más de una vía que los una (Martínez-Castilla, 2007).

De esta manera, la construcción de redes como herramienta gráfica para entender la relación entre la estructura poblacional, la distribución geográfica y la historia evolutiva de las poblaciones es fundamental, porque facilitan una interpretación clara y al mismo tiempo permiten la realización de análisis posteriores (Hernández-Baños, 2007).

Los métodos más frecuentes para la construcción de las redes son (Martínez Castilla, 2007):



- **MÉTODOS DE DISTANCIA.**- Comparan proporciones de las identidades observadas entre los nodos terminales, se considera que tales identidades son consecuencia de mutaciones múltiples. Las comparaciones se llevan a cabo por pares, de acuerdo a criterios preestablecidos y se eliminan los datos diferenciales (incluyen los algoritmos *neighbor joinig*, cuadrados mínimos, evolución mínima y agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética-UPGMA).
- **MÉTODOS DE PARSIMONIA.**- Buscan la topología que optimice la distribución de los patrones observados para cada carácter. De esta forma, se busca disminuir al mínimo el número de pasos evolutivos requeridos para explicar un conjunto de datos.
- **MÉTODOS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.**- Buscan escoger la topología que maximice la probabilidad de observar los datos. Considera el ajuste entre un modelo evolutivo, los datos y cada uno de las topologías posibles.
- **MÉTODOS DE INFERENCIA BAYESIANA.**- Se basa en “la probabilidad posterior” de cada topología probable, es decir, cuál es la probabilidad de que tales arreglos sean ciertos, bajo una probabilidad previa.

Una vez que se han obtenido las redes de las diferentes poblaciones, pueden utilizarse para conocer las relaciones evolutivas, frecuencias y la distribución espacial de los caracteres (Templeton, *et al.*, 1992).

Cuando el tamaño de muestra lo permite, se pueden inferir aspectos de la historia reciente de las poblaciones al llevar a cabo análisis basados en la teoría de coalescencia, que proporciona métodos para determinar eventos en el pasado de las poblaciones (como cambios demográficos, por ejemplo) e inferir el momento en el que ocurrieron (Hernández-Baños, 2007).

La representación de las relaciones genealógicas a través de redes en lugar de los métodos filogenéticos tradicionales tiene la ventaja de tomar en cuenta muchas características asociadas con la evolución intraespecífica de los genes, incluyendo la



presencia de haplotipos ancestrales, la existencia de haplotipos descendientes múltiples y ocasionalmente, los bajos niveles de variación (en el caso de marcadores haploides; Shiang-Fan, *et al.*, 2006).

JUSTIFICACIÓN

Analizar los patrones de diversidad genética interpoblacional en murciélagos, puede proporcionar información valiosa sobre los procesos evolutivos históricos y actuales que afectan a una especie. Se considera que los murciélagos del género *Leptonycteris* son especies clave en los ecosistemas áridos y vectores del flujo genético entre las plantas, al ser polinizadores altamente eficientes y dispersores de semillas, mantienen la conectividad de los ecosistemas. Por este motivo, la valoración de la diversidad genética y de su distribución, aunado a la cuantificación y direccionamiento del flujo genético que guardan las poblaciones (parámetros que se desconocían hasta este momento en una escala local), son de fundamental importancia para comprender los procesos ecológicos, históricos y evolutivos que los determinan. Lo anterior permitirá conocer la forma en cómo el parentesco estructura las poblaciones.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar las relaciones genéticas de parentesco en cinco poblaciones de murciélagos del género *Leptonycteris* (*Leptonycteris yerbabuena* y *Leptonycteris nivalis*), para dilucidar procesos microevolutivos históricos, asociados esencialmente al flujo genético dentro y entre poblaciones, usando marcadores moleculares altamente polimórficos (microsatélites).

Objetivos particulares:

- Medir y comparar los parámetros de diversidad genética y de riqueza alélica en dos poblaciones de *L. nivalis* en el estado de Hidalgo y tres poblaciones de *L. yerbabuena*



en el centro de México, usando cuatro *loci* de microsatélites, para verificar los parámetros microevolutivos de ambas especies.

- Determinar los patrones de estructura y flujo genético entre las poblaciones seleccionadas, para inferir la dinámica del flujo genético dentro y entre las mismas, en ambas especies.
- Medir la distancia genética y compararla con la distancia geográfica entre las poblaciones analizadas, por medio de una prueba de Mantel, para determinar si existe un modelo genético de aislamiento por distancia.
- Conocer las relaciones de parentesco por medio de la construcción de redes de haplotipos, con el fin de elucidar los probables eventos históricos y recientes que han condicionado el patrón genético contemporáneo en ambas especies analizadas.

Hipótesis de trabajo:

Si la cercanía geográfica determina el flujo génico entre poblaciones, entonces se espera que el flujo sea mayor entre poblaciones próximas y que los niveles de diferenciación sean menores, por el contrario, la mayor diferenciación ocurriría entre poblaciones remotas, como resultado del flujo genético restringido.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Áreas de Estudio

Fueron seleccionados cinco sitios en el centro de México (Figura 2), donde se ha registrado la presencia de colonias de estas especies. Los dos primeros corresponden a la especie *L. nivalis*. El primero, es un refugio estacional de maternidad de la especie (Túneles de Ahuacatitla), y el segundo es un sitio de alimentación, también estacional.

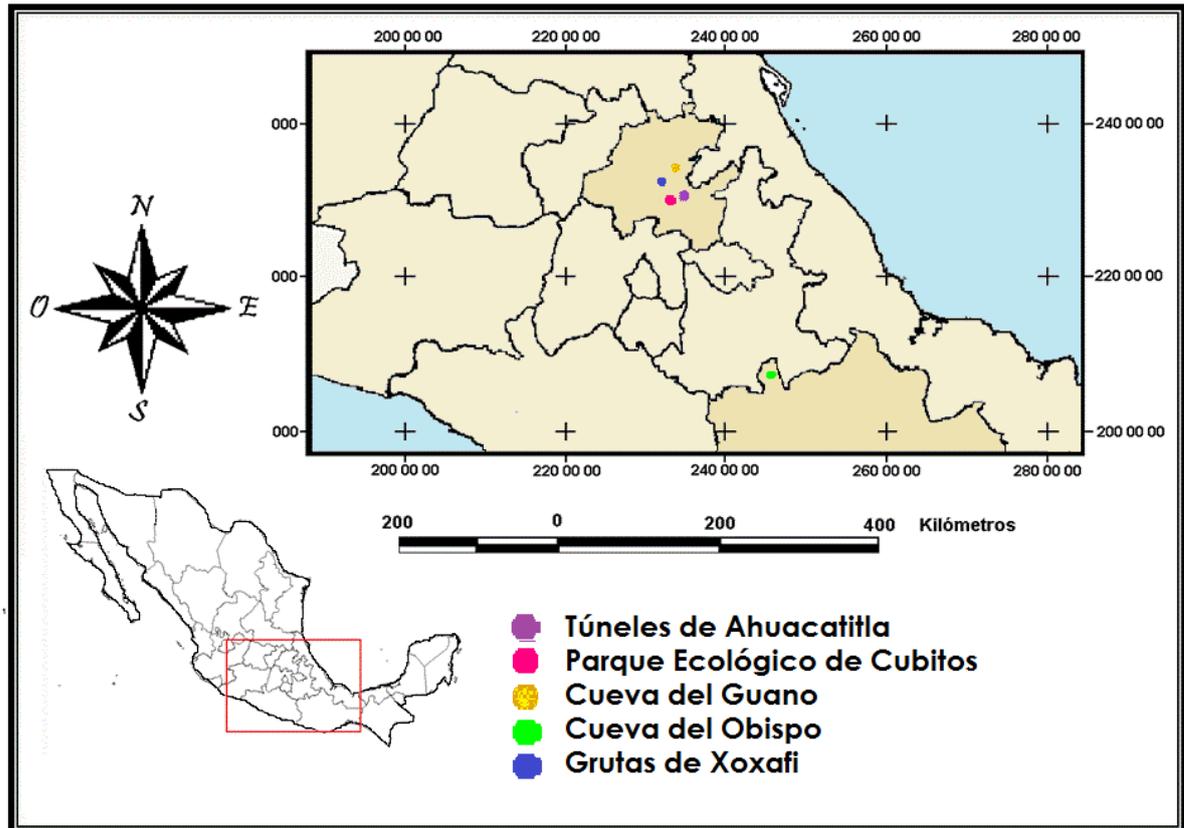


Figura 2.- Ubicación de las cinco localidades de colecta.

Los últimos tres, corresponden a la especie *L. yerbabuena*. Dos de ellos presentan colonias permanentes (el tercero, la Cueva del Guano y el cuarto, la Cueva del Obispo), con fluctuaciones a lo largo del año. Finalmente, el quinto punto es una población estacional (Gruta de Xoxafi).

Los sitios de muestreo se encuentran ubicados dentro de las zonas prioritarias principales propuestas como importantes para la conservación de murciélagos glosófagos (zona I.- Sierra Madre Occidental y zona III.- Sierra Madre del Sur; Arita y Santos del Prado, 1999; Stoner, *et al.*, 2003).

1.- Túneles de Ahuacatitla

PARQUE ECOTURÍSTICO AHUACATITLA, HUASCA DE OCAMPO, HGO (Figuras 2, 3).- Sitio ubicado a 2.3 km al noroeste de la comunidad de Santa María Regla ($20^{\circ}15'52.91''N$ y $98^{\circ}32'55.68''W$, 2405 msnm). Este sitio es el menos estudiado, la colonia se



ubica en un túnel que fue construido para conducir agua a través de una red que alimentaba una planta hidroeléctrica, ahora en desuso. Tales instalaciones han sido remodeladas para proporcionar servicios ecoturísticos.

La localidad se ubica en una pequeña barranca al límite sur oriental de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán (RBBM). Presenta clima de tipo semiseco templado (Bsk) con régimen de lluvias de verano. Como producto de la topografía, la vegetación es mixta. Se compone de un bosque de galería en la parte más baja, aledaña al río; bosque tropical caducifolio (Juárez-Castillo, 2006), selva mediana y matorral xerófilo en las laderas con vegetación introducida en las proximidades de las instalaciones de servicios.

Este sitio provee refugio temporal a la única colonia de maternidad de *L. nivalis* conocida en México (Rojas-Martínez *Com. Pers.*). La colonia se forma aproximadamente a mediados de marzo cuando arriban las hembras antes de parir, la mayor parte de nacimientos ocurre entre mayo-julio y se desintegra a mediados de agosto cuando las últimas crías son destetadas. El túnel mide 4.5 m de alto por 1.75 de ancho y es una ramificación accesoria que conduce agua desde la presa de Santa María Regla. La temperatura interior oscila alrededor de los 16-19°C dependiendo de las condiciones meteorológicas externas, la hora del día y la cantidad de murciélagos. Cuenta con una entrada principal y un boquete producto del colapso parcial del túnel en el otro extremo. La colonia suele ocupar un tramo de 79 m de largo en el túnel principal y 32 m adicionales en una ramificación. El tamaño de la población es variable, según cálculos preliminares, hechos a partir de fotografías, podrían existir más de 10,000 individuos en el punto máximo de ocupación (Bolaños-García, 2013 *Com.Pers.*).



Figura 3.- Zona donde se ubica la barranca de Ahuacatitla.

2.- Parque Ecológico Cubitos

PACHUCA, HGO (Figuras 2, 4).- Sitio ubicado al sureste de la ciudad, entre los municipios de Pachuca y Mineral de la Reforma colindando en todas direcciones con áreas urbanas altamente pobladas ($20^{\circ}06' 33''N$ y $98^{\circ}45'00''O$, la altitud varía de los 2,245 a los 2,495 msnm).

Este sitio, es un área natural protegida de categoría estatal que cuenta con 90.4 ha, de extensión y se halla completamente inmersa en la ciudad. El parque contiene edificaciones que albergan oficinas gubernamentales, áreas verdes recreativas y con fines de educación ambiental y finalmente, una zona de reserva ecológica con mediano grado de perturbación que protege un matorral xerófilo. El uso del suelo en el Parque es forestal y en la zona de influencia es urbano y forestal. Este lugar presenta problemática ambiental relacionada con la perturbación e involucra aspectos como: erosión de suelos, residuos sólidos, presión demográfica e invasión por fauna nociva.

La localidad presenta clima templado-frío con lluvias en verano (Bw), la vegetación es mixta como resultado de las diferentes estrategias de reforestación que se han implementado de acuerdo con los períodos de administración y va del matorral xerófilo y rosetófilo con diferentes grados de perturbación, hasta el pastizal inducido. Los parches con vegetación original incluyen *Agave lechuguilla*, *Mamillaria magnimama*, *Yucca filífera*, *Opuntia streptacantha*, *Dalea verisicolor*, *Zaluzamia augusta* y *Mimosa biuncífera*, entre otras plantas. La vegetación introducida es un mosaico complejo que incluye un bosque de



coníferas (*Pinus sp.*, *Cupressus sp.*), y diferentes plantas sembradas con fines de recreación: yucas (*Yucca filífera*), nopales (*Opuntia spp*) y diferentes especies de cactáceas y agaves procedentes de diversas regiones del centro de México sembradas como parte de la colección del “Jardín Botánico Ollintépetl”. Tales condiciones proveen de recursos alimenticios (florales) para diversas especies de murciélagos nectarívoras, por lo tanto, la cantidad de murciélagos visitantes es muy variable y depende de la cantidad de recursos disponibles dentro y fuera del parque (Milo, 2008; Tirado, 2009).



Figura 4.-Jardín botánico “Ollintépetl” del parque Ecológico Cubitos (Pachuca).

3.-Cueva del Guano

SAN PABLO TETLAPAYAC, METZTITLÁN, HIDALGO. RESERVA DE LA BIOSFERA “BARRANCA DE METZTITLÁN” (RBBM, Figuras 2, 5).-La cueva se encuentra al noroeste de la Reserva, en las cercanías de la comunidad de San Pablo Tetlapayac ($20^{\circ}37'32.62''N$ y $98^{\circ}54'39.33''W$, 1,041 msnm) enclavada en la base de la ladera oriental al fondo de una cañada, por donde corre un río permanente, afluente del Río Amajac-Teconco.



Cuenta con una entrada única, de forma triangular de tres m por lado, que permite el acceso a un túnel irregular de 30 m de largo (aunque no ha sido explorado en su totalidad) y aproximadamente 4 m de alto, con una inclinación de cerca de 45° en la entrada y que baja cerca de 15 m del nivel de la misma. El túnel concluye en una cámara de aproximadamente 15 m de altura donde se refugian la mayor parte de los individuos de la colonia (Escorcía, 2008).

La localidad presenta clima predominantemente seco semicálido, (BS0hw) con régimen de lluvias en verano. La precipitación media anual es de 437.1 mm, y la temperatura anual fluctúa de 16 a 23°C con un promedio de 20.2°C (INEGI, 1995; CONANP, 2003), estas condiciones favorecen la presencia de un bosque tropical caducifolio con predominancia de *Isolatocereus dumortieri*, *Pachycereus weberi*, *Prosopis laevigata* y *Bursera morelensis* (Juárez-Castillo, 2006) que contrasta con el bosque de galería, mezclado con tierras de cultivo, huertos frutales y vegetación arbórea tropical inducida de *Musa sp.* y *Mangifera sp.*, etc. La cueva alberga una población permanente de *L. yerbabuena*, que presenta fluctuaciones anuales importantes, variando desde 48,023 individuos en julio, hasta 7304 en marzo, además de proporcionar refugio a cinco especies adicionales de murciélagos insectívoros (Escorcía, 2008).



Figura 5.- Paisaje que rodea a la cueva del guano.

4.-Cueva del Obispo

SAN JUAN NOCHIXTLÁN, SANTIAGO CHAZUMBA, OAXACA. RESERVA DE LA BIOSFERA “TEHUACAN-CUICATLÁN” (RBTC; Figuras 2, 6).- Este refugio se localiza al norte de la reserva, a dos kilómetros y medio al noroeste de la comunidad de San Juan Nochixtlán ($18^{\circ} 00' 5.94''$ N y $97^{\circ}30'7.95''$ W, 1,890 msnm), sobre una ladera erosionada por arroyos temporales.

Cuenta con una entrada principal y por lo menos otra accesoria de 8 m de largo y 6 de alto, en forma de cruz que desemboca en una cámara de 15 m de alto y abre el acceso a dos túneles, de los cuales el primero es de 2 m de ancho, 15 de altura y 50 de largo, sirve de refugio permanente para *L. yerbabuena* (Rojas–Martínez, 2001). El segundo sigue por un tiro vertical de 8 m, que baja hasta un túnel irregular de 8 m de ancho por 70 de longitud, cuya parte más distante es ocupada sólo cuando la colonia es muy numerosa (Ángeles, 2008).



Figura 6.- La Cueva del Obispo se ubica en la pared de una ladera formada por la erosión de un arroyo temporal.

La localidad presenta en general, un clima semicálido sub-húmedo (AcW), con régimen de lluvias en verano. La precipitación media anual es de 680 mm y la temperatura anual fluctúa de 17 a 23°C con un promedio de 19.8°C (INEGI, 2004), que favorecen el establecimiento de vegetación tipo matorral xerófilo y selva baja caducifolia. Es importante mencionar que por su diversidad, particularmente de cactáceas columnares y su alto grado de endemismos, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán es considerado como el centro de diversidad biológica de las cactáceas en México, por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN; CONANP, 2003).

La Cueva del Obispo alberga una población permanente, que oscila entre 22,128 animales en marzo y 1,719 en mayo (Ángeles, 2008), pero se supone mucho mayor (Rojas-Martínez, 2009, com. pers).



5.-Gruta de Xoxafi

EL PALMAR, SANTIAGO DE ANAYA, HIDALGO (Figuras 2, 7).- Está ubicado en el Valle del Mezquital, a 1.5 km de la comunidad de El Palmar ($20^{\circ} 23'17''$ N y $99^{\circ}01'37.62''$ W, 2,022 msnm). La gruta es un boquete circular en la cima de una pequeña loma, convertido actualmente en un centro ecoturístico.

La abertura de la entrada principal es vertical y abre paso a varios túneles y cámaras, de los cuales sólo uno es ocupado por murciélagos de la especie *L. yerbabuena* durante su permanencia en el sitio; los túneles restantes son utilizados para las actividades ecoturísticas. La parte donde se realizó el muestreo es una bóveda de cerca de ocho metros de largo y seis de ancho, con una entrada reducida (de dos metros de diámetro) que conduce al fondo, a 13 m aproximadamente de la entrada hacia una cámara accesoria con una entrada triangular de 1.20 m y luego a un sistema de cámaras más pequeñas de dos a tres metros de altura, que son los principales sitios de percha.



Figura 7.-Paisaje que se observa alrededor de las Grutas de Xoxafi.



La localidad presenta clima semiseco templado (BSk) con régimen de lluvias en verano. La precipitación media anual es de 234.3 mm y la temperatura puede variar de 11 a 19°C con promedio anual de 16.58°C (INEGI, 2000). La vegetación es de matorral desértico calcícola, con vegetación micrófila de *Agave spp.*, *Acacia spp*, *Bouvardia ternifolia*, *Condalia mexicana*, *Decatropis bicolor*, *Flourensia resinosa*, *Fraxinus greggii* y *Salvia regia*, entre otros- En el lugar son comunes *Myrtillocactus geometrizans*, *Opuntia streptacantha* y *Prosopis juliflora* (Villalpando, 2006; Vizcaíno, 2006).

Se calcula que la población alberga a una colonia importante que presenta fluctuaciones sobresalientes aún en los pocos meses que la ocupan: de 17,142 en mayo a 6,171 en junio del mismo año (Villalpando, 2006).

El género *Leptonycteris*

El género *Leptonycteris* agrupa murciélagos nectarívoro-palinófagos de tamaño grande (en comparación con el resto de los glosófagos) con una longitud del antebrazo >48mm), el uropatagio está reducido y ligeramente cubierto con pelaje (Medellín, *et al.*, 2007). Debido a sus hábitos alimenticios, estos murciélagos son de fundamental importancia en el mantenimiento y conservación de los ecosistemas semisecos, ya que actúan como polinizadores y dispersores de semillas de las plantas con las que se alimentan, algunas de las cuales son incluso de importancia económica (Arita y Santos del Prado, 1999; Arita, 1991; Arita, 2005a, 2005b; Gutiérrez-Pardo, 2008; Stoner, *et al.*, 2003; Cuadro 2).



Cuadro 2.- Cuadro comparativo de las medidas somáticas generales de las dos especies de murciélagos del género *Leptonycteris* en México (Arita 2005a, 2005b).

Característica	<i>L. nivalis</i>	<i>L. yerbabuena</i>
Longitud total	76-85 mm	75-85 mm
Cola vertebral	0 mm	0 mm
Longitud de la pata	13-19 mm	12-15 mm
Longitud de la oreja	17-19 mm	14-17 mm
Longitud del antebrazo	53-59 mm	47-56 mm
Peso	18-30 g	15-25 g
Fórmula dentaria	I 2/2, C1/1, PM2/3, M2/2=30	I 2/2, C1/1, PM2/3, M2/2=30
Longitud del tercer dedo	>100 mm	<100 mm

***Leptonycteris nivalis* (Saussure, 1860)**

Esta especie ha sido poco estudiada, por lo que existe poca información referente a su ecología e historia natural. En parte, por la falta de información sobre sus refugios (tanto permanentes como temporales), sus movimientos, distribución y por las controversias históricas sobre su taxonomía. Hasta la revisión taxonómica de Arita y Humprey (1988), *L. nivalis* fue frecuentemente confundida con *L. yerbabuena*, dado su parecido morfológico y el hecho de que existan en simpatría en algunas localidades (Anexo I).

Descripción.-*L. nivalis* es una especie monotípica. Comparada con *L. yerbabuena*, es más grande (entre 18 y 30 g), considerándose la especie de mayor talla de la familia glosofaginae en México (Cuadro 1). Al igual que en otros murciélagos nectarívoros, las orejas y la hoja nasal son pequeñas y el rostro y la lengua son alargados. El color general es pardo con aspecto más grisáceo que en *Leptonycteris yerbabuena*; además el pelaje dorsal es más largo. La membrana interfemoral del uropatagio está reducida a una banda muy angosta cubierta de pelo abundante en el borde. La cola está formada por tres vertebras diminutas que no se aprecian externamente (Pfrimmer y Wilkins, 1988; Arita y Humprey, 1988; Arita, 2005b; Figura 8a; Anexo I).

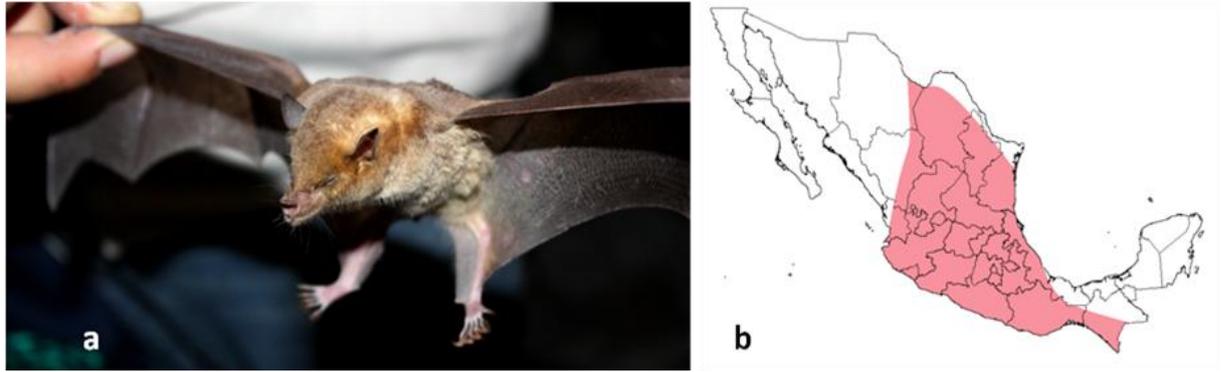


Figura 8.- *Leptonycteris nivalis*. a) Ejemplar hembra capturado en el Parque Ecológico Cubitos. Fotografía Ramos-Frías, J. b) Mapa que muestra la distribución de la especie en México. Tomado y modificado de Pfrimmer y Wilkins, 1988.

Reproducción.- Se conoce un refugio de cópula para *L. nivalis*, en la Cueva del Diablo en Morelos, y la información disponible sobre los patrones de reproducción están basados en observaciones ocasionales. Easterla (1972), menciona la presencia de hembras lactantes en junio, en la cueva de Monte Emory en el Parque Nacional Big Bend en Texas, USA. Para julio, la mayoría de las hembras adultas son ya postlactantes y los jóvenes están cerca de alcanzar la madurez, por lo que se ha sugerido el nacimiento de las crías ocurre en México entre abril y junio, antes de que la colonia arribe a la cueva del Monte Emory.

Ecología.- *L. nivalis* usualmente habita cavernas profundas aunque también puede ser encontrado en minas, árboles huecos y edificios abandonados, tales refugios son habitualmente fríos. El tamaño de la colonia puede llegar a ser muy grande (superando los 10,000 individuos) e inestable. Se conoce que los machos adultos son segregados geográficamente por las hembras en el verano y cuando no ocupan la parte norte de su área de distribución. Es probable que esta especie lleve a cabo migraciones largas para asegurar el suministro de recursos alimentarios que necesita. Se ha observado que en el verano, *Leptonycteris nivalis* ocurre en elevaciones altas del parque nacional Big Bend (el único refugio grande y semi permanente conocido para la especie, en Texas, USA) y en algunas pocas localidades incidentales del norte de México. Por lo tanto, es probable que en el



invierno migre hacia el sur de México, a lugares tan lejos como Jalisco y Morelos (Easterla, 1972; Pfrimmer y Wilkins, 1988).

Distribución: es una especie prácticamente endémica de México, pues sólo se encuentra en dos regiones pequeñas del sur de Estados Unidos en la primavera y el verano (Nuevo México y Texas). Se encuentra principalmente en matorrales xerófilos, en bosques de pino-encino y en la transición entre este último tipo de vegetación y el bosque tropical caducifolio. La mayoría de las localidades se encuentran entre 1,000 y 2,000 msnm (Arita, 2005b), por lo que frecuentemente habita en zonas más frías que *L. yerbabuena* (Figura 8b).

Status de conservación.- Se le ha incluido como una especie amenazada en la lista de especies en peligro de extinción de los Estados Unidos y México. Aparentemente, las poblaciones han declinado en los últimos años, si bien faltan más estudios para entender su situación (SEMARNAT, 2010).

***Leptonycteris yerbabuena* (Martínez y Villa-Ramírez, 1940)**

Descripción: Es una especie monotípica, de tamaño mediano (Ceballos, *et al.*, 1997; Galindo, *et al.*, 2004; Arita, 2005a; Cuadro 1; Figura 9a) la hoja nasal es pequeña y de forma triangular. El rostro es alargado, las orejas pequeñas, el pelaje es corto color pardo claro y el uropatagio está reducido, carece de cola (Arita, 1991).

Reproducción.-Con base en observaciones en el norte de México y el suroeste de Estados Unidos, se ha sugerido que el patrón reproductivo es monoéstrico, estacional y monotoco. Por lo tanto, la reproducción ocurre a finales de la primavera y principios del verano. En el sur de México, el patrón de reproducción ha sido poco estudiado. Martínez-Coronel y colaboradores (2004) registraron nacimientos a finales de octubre y principios de diciembre en la Cueva de los Laguitos, en Chiapas.

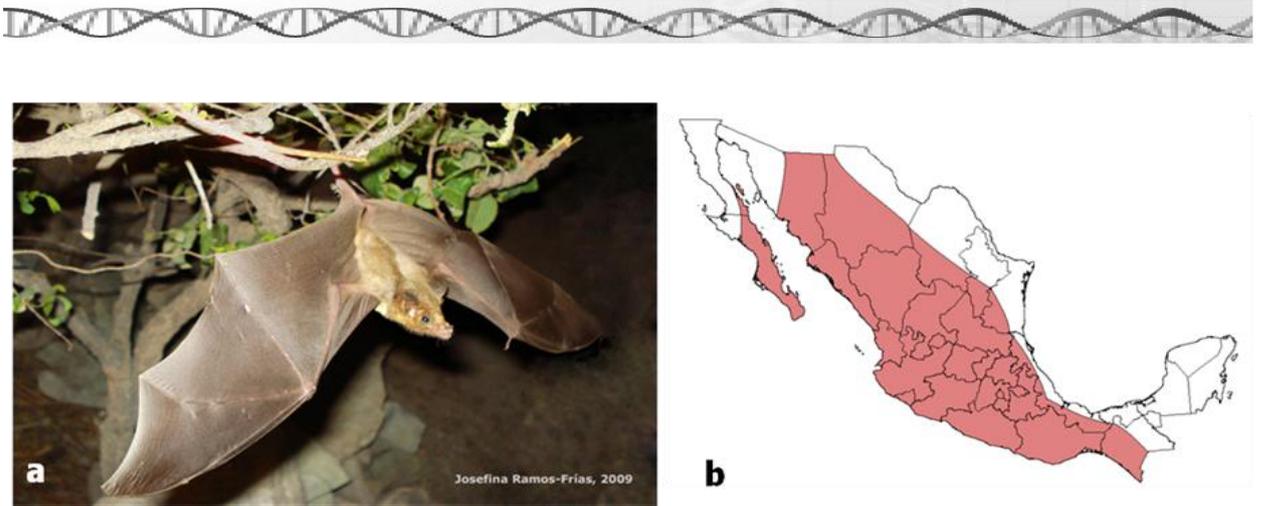


Figura 9.-*Leptonycteris yerbabuena*. a) Hembra de las Grutas de Xoxafi. b) distribución de la especie en México. Tomado y modificado de Medellín, 2007.

Otros autores han descrito el patrón reproductivo como poliéstrico bimodal, que indicaría varios periodos de apareamiento por año, pero concentrados en dos momentos. Este patrón es frecuente en otras especies de filostómidos (Rojas-Martínez, 1995; Escorcía, 2008). Torres y Rojas (2001) demostraron que los machos del Valle de Tehuacán presentan desarrollo testicular (indicativo de fertilidad) durante la primavera y el verano, e incluso una actividad moderada en invierno, por lo que consideraron un período de reproducción continuo, en el que la actividad sexual se presenta todo el año.

En el caso de las hembras, Ceballos y colaboradores (1997) señalan la existencia de dos poblaciones reproductivas: por una parte, las que paren en primavera y forman colonias de maternidad en el sureste de Arizona y por la otra, las del sur de México que paren entre diciembre y enero, sin embargo, debido al gasto energético que conlleva la gestación, se descarta que las hembras de *L. yerbabuena* puedan parir dos veces por año.

Ecología.- *Leptonycteris yerbabuena*, se ha considerado como una especie obligadamente migratoria, que por su alta dependencia de los productos florales (néctar y polen), se desplazaba cada año en busca de recursos, durante la primavera, desde el trópico mexicano al suroeste de Estados Unidos, siguiendo un “corredor de néctar” formado por la fenología secuencial de la floración de algunas agaváceas y cactáceas, regresando a México en el otoño, cuando la abundancia de los recursos florales declina en aquellas regiones (Cockrum, 1991). La hipótesis de esta migración latitudinal generalizada, se ha



visto contrastada por los reportes de la presencia de colonias permanentes en los trópicos, pero que sufren fluctuaciones anuales importantes (Ceballos, *et al.*, 1997; Stoner, *et al.*, 2003; Villalpando, 2006; Cornejo, 2007; Ángeles, 2008; Escorcia, 2008)

En general, Téllez-Zenteno (2001) propone que las poblaciones se segregan en tres grupos: el primero que exhibe un flujo de murciélagos entre los hábitats de cactáceas columnares del norte de México y la Cuenca del Balsas, el segundo implicaría un movimiento latitudinal en dirección norte a sur desplazándose al menos 500 Km entre el centro de México, adicional a los movimientos altitudinales y el tercero, que implica movimiento del centro hacia refugios desconocidos en el bosque tropical caducifolio de Oaxaca.

Por su parte, Wilkinson y Fleming (1996) proponen la existencia de dos poblaciones migratorias latitudinales: una, la continental, que seguiría la topografía de la Sierra Madre Occidental, y la otra, que viajaría a través de la llanura costera del Pacífico y que utilizaría los “corredores de néctar” producidos por la fenología de la floración de agaves y cactáceas columnares.

En cuanto al ámbito hogareño, se tienen datos que sustentan que *L. yerbabuena* puede volar hasta cinco horas continuas y logra desplazarse hasta 100 km en un sola noche (Stoner, *et al.*, 2003). Esta especie no presenta dimorfismo sexual (Cole y Wilson, 2006; Figura 9a, Anexo I).

Distribución.-La especie encuentra su límite norte desde el sur de Arizona y el suroeste de Nuevo México (Arita, 1991; Cockrum, 1991; Fleming y Nassar, 2002) y se extiende hacia el sur hasta llegar al límite en El Salvador y Honduras (Arita y Humprey, 1988). Habita principalmente en bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, bosques espinosos, bosques de pino-encino, bosques mesófilos y matorrales xerófilos. Las localidades se encuentran desde el nivel del mar hasta los 2,400 metros (Arita, 2005a), pero la mayoría de los registros, se ubican entre los 300 y los 1,800 msnm (Arita, 1991; Figura 9b).



Status de conservación.- Esta especie se encuentra en la lista de especies amenazadas en México y Estados Unidos, (SEMARNAT, 2001; U.S. Fish and Wildlife Service, 1997) y está considerada como vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Hutson, *et al.*, 2001). Diversas fuentes (Howell, 1974; Howell y Roth, 1981; Shull, 1988; Arita y Santos del Prado, 1999), han sugerido la declinación acelerada de las poblaciones de esta especie.

Es posible que debido a su complejidad, la migración de los murciélagos de la especie *L. yerbabuenae* sea considerada como un “fenómeno en peligro” como ha sido definido en el caso de las mariposas monarcas (Arita y Santos del Prado, 1999). Sin embargo, otros autores han calificado su inclusión en la lista de especies amenazadas como prematura y precipitada, tomando como referencia, los registros recientes de poblaciones abundantes (Quiroz, *et al.*, 1986; Ceballos, *et al.*, 1997; Stoner, *et al.*, 2003; Villalpando, 2006; Ángeles, 2008; Escorcia, 2008;) y argumentando que las fluctuaciones reportadas para aquéllas colonias e incluso, la total ausencia, puede explicarse por la falta de conocimiento de los movimientos cíclicos estacionales de la especie dentro de su área de distribución (Cockrum y Petryszyn, 1991).

Trabajo de campo

Los especímenes se capturaron mediante la instalación de redes de niebla, de mayo de 2008 hasta agosto de 2010. A cada ejemplar capturado se le tomaron los siguientes datos: longitud del antebrazo, peso y la longitud del tercer dedo (para confirmar la especie; <100 mm se considera *L. yerbabuenae* y >100 mm se considera *L. nivalis*); además fue determinado el sexo, la edad y la condición reproductiva, según la metodología habitual para el trabajo de ecología con quirópteros (Romero-Almaraz, *et al.*, 2006).

Posteriormente, de cada espécimen se tomó una muestra (Figura 10) de tejido, efectuando un pequeño corte (previa limpieza con etanol 70%) de aproximadamente 4 mm de largo, del borde exterior de la membrana del uropatagio y aplicando cloruro de benzalcolnio para evitar una infección posterior a la toma de la muestra.



Figura 10.- Resumen visual de los métodos utilizados.



Los fragmentos de tejido se colocaron en microtubos de 1.6 ml, con 500 µl de buffer de digestión (Anexo II) y se mantuvieron en frío durante su transporte al Laboratorio de Genética Evolutiva y Ambiental CIB-UAEH, donde fueron almacenadas en refrigeración (4°C), hasta la extracción del DNA (por convención internacional, IUPAC-IUB,1974; Figura 10).

Trabajo de laboratorio

EXTRACCIÓN DE DNA.-La extracción del DNA se realizó con el método de solventes orgánicos y precipitación etanólica, siguiendo el protocolo de Higuchi (1989) con modificaciones (Anexo II; Figura 10), la extracción fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1.4 %.

SELECCIÓN DE MICROSATÉLITES Y OBTENCIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS.- Los cuatro microsatélites (Leye 11, Leye 23, Leye 71 y Leye 17), fueron seleccionados por ser aquéllos que exhibieron la mayor cantidad de alelos según la cita original y los que mostraron resultados mejores en la amplificación cruzada con otras especies de murciélagos glossofaginos (Ramírez, *et al.*, 2011; Cuadro 3).

Cuadro 3 .-Microsatélites seleccionados (Ramírez, *et al.*, 2011). P=primer, Sec=Secuencia 5´-3´, AR=Arreglo de repetición, NAR= Número alelos reportados, TR= tamaño reportado.

P	Sec	AR	NAR	TR
LEYE 11	F GCT TGA ACA AAC TGC CTG C	(GT) ₂ AT(GT) ₁₇ GCA CT(CATT) ₆	12	235-300
	R GCA TTG GGC TAT GGA GAC TG TCA GAT CCT CCC CTT TTA GG			
LEYE 17	F GTA TAG AAA TGG TGG CAC ATG C	(GT) ₄ GCCT(GT) ₂ TGG(GT) ₁₆	7	200-240
	R CAC AAC TGG AAT CCG AAT GTA G			
LEYE 23	F GCA GAC TGA CAG ACA GAT TCA CC	(GT) ₂₃	12	200-255
	R CTG TAA AGA CTT GCG AAC AAG TG			
LEYE L71	F CAA TGG CTC CAC AGC AAT CTG	(CA) ₁₃	7	130-180
	R			



Tras el proceso de estandarización específica para ambas especies, la amplificación de las muestras se llevó a cabo mediante la técnica estándar de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*), con condiciones modificadas a las que se usó Ramírez (2011; 2012; Anexo II).

SEPARACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS.- Posteriormente, se verificó la amplificación por electroforesis en geles verticales de poliacrilamida al 40%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador estándar a 302 nm.

La separación final de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-urea de alta resolución (Benbouza, *et al.*, 2006; Anexo II), que se visualizaron con tinción estándar de nitrato de plata (Figura 10).

Tras la separación de los alelos, se llevó a cabo la lectura de los geles, digitalizándolos con un escáner convencional a por lo menos 600 dpi y determinando el peso molecular por medio del software *GelAnalyzer* versión 2010a *freeware* (Lazar, 2010; Figura 10). Fue tomada como base la escala del marcador del peso molecular, que fue incluido durante el corrimiento del gel y normalizando la migración de los fragmentos por medio de una función cuadrática. Esta técnica permite evaluar de manera indirecta las diferencias en el tamaño de los fragmentos amplificados.

Análisis de diversidad y estructura genética

Los parámetros de diversidad genética se obtuvieron con base en las frecuencias alélicas, grado de polimorfismo de los *loci* y niveles de heterocigosidad (esperada y observada), que fueron obtenidos con software de genética de poblaciones TFGA versión 1.3 (Miller, 2000) y la paquetería accesoria de Excel MS TOOLS (Park, 2001) y GenAIEx 6 (Peakall y Smouse, 2006).



Los parámetros de estructura genética F , *sensu* Wright (1951) fueron calculados por medio de las fórmulas originales, con fines de comparación:

$$F_{IS} = \frac{(H_E - H_O)}{H_E}$$

Donde H_O representa la frecuencia de individuos heterocigotos observados en la población, y H_E es la frecuencia esperada de individuos heterocigotos.

$$F_{IT} = \frac{(H_T - H_I)}{H_T}$$

Donde H_T representa la frecuencia esperada de individuos heterocigotos en una población con reproducción panmíctica y H_I , la frecuencia de los individuos heterocigotos observados en la población.

$$F_{ST} = \frac{(H_T - H_S)}{H_S}$$

Donde H_T representa la frecuencia total de individuos heterocigotos en una población con reproducción al azar y H_S , la frecuencia esperada de individuos heterocigotos en una población con reproducción al azar.

Adicionalmente, se obtuvieron parámetros modificados de estructura genética F_{ST} , R_{ST} y Theta (Wright, 1965; Weir & Cockerham, 1984; Slatkin, 1995; Excoffier, 2006), promediados para todos los *loci*. El análisis molecular de la varianza (F_{ST} por AMOVA), se obtuvo con el programa ARLEQUÍN versión 3.01 (Excoffier, 2006) por medio del método de distancia de número de alelos diferentes (F_{ST} ; $p < 0.05$; 10,100 permutaciones), para obtener las fuentes de variación, tanto de los parámetros absolutos como los ponderados, para conocer diferencias dentro y entre grupos.

Se usó el programa GENEALLEX (Peakall, 2006) para calcular los parámetros R equivalentes usando el método de distancia de número de alelos diferentes (R_{ST} ; $p < 0.05$; 9999 permutaciones) para obtener las fuentes de variación, tanto de los parámetros absolutos como los ponderados (Slatkin, 1995).



Estimación del Flujo Génico

La dinámica del flujo genético se estimó por métodos indirectos y genealógicos, usando el software STRUCTURE versión 2.2 (Pritchard, *et al.*, 2000; Falush, *et al.*, 2003 y Pritchard *et al.*, 2007), con el modelo de ancestría “mezclado” y frecuencias alélicas correlacionadas.

Las estimaciones se hicieron inicialmente con el total de las muestras y posteriormente se segregaron por sexo para observar si hembras y machos contribuyen de manera distinta en la estructura genética.

Se obtuvieron las medidas de la distancia genética de Nei (1978) entre pares de poblaciones de *L. yerbabuena* y se correlacionaron con las distancias geográficas por pares para poner a prueba el modelo de aislamiento por distancia (Prueba de Mantel). Este análisis se realizó con GENALEX 6 (Peakall y Smouse, 2006).

Relaciones de parentesco y genética histórica

Se infirió el número mínimo de haplotipos posibles en cada especie, por medio del programa ARLEQUIN v3.11 (Excoffier, 2006; Gametic phase=1). En total, se obtuvieron 218 haplotipos para *L. yerbabuena* y 131 para *L. nivalis*. De cada grupo, se integró a su vez una matriz triangular de distancias euclidianas usando el mismo *software*. La matriz fue depurada seleccionando únicamente aquellos haplotipos que: 1.- estuvieran siendo compartidos en ambas especies en al menos dos marcadores (50%), o bien 2.- que tuvieran al menos tres repeticiones de por lo menos dos marcadores (50%) en una sola especie. De esta forma, fueron seleccionados 64 haplotipos para *L. nivalis* y 70 haplotipos para *L. yerbabuena*, después, las matrices depuradas fueron integradas nuevamente en el formato triangular. La genealogía de grupos de genes se construyó por medio del software TCS v 1.21 (Clement, *et al.*, 2000). Esta genealogía fue estimada por medio del método de parsimonia estadística (95%; Templeton, *et al.*, 1992), y se representó por medio de una red de haplotipos. Finalmente, la red ya construida fue trasladada al software CYTOSCAPE v 2.8.3 (Shannon, *et al.*, 2003) para editarla y analizarla. En ambos casos se seleccionó el



método de ordenación jerárquico. Este método permite representar una dirección principal o “niveles de flujo” de información dentro de la red. Los nodos se ubican en capas ordenadas jerárquicamente y el orden de los nodos dentro de cada capa se sitúa minimizando el número de líneas cruzadas.

RESULTADOS

Trabajo de campo

Se llevaron a cabo 12 salidas al campo y se recolectaron un total de 175 muestras útiles para ambas especies. De cada localidad se recolectaron entre 29 y 40 muestras (35 en promedio). En las localidades de Ahuacatitla, El Obispo y Xoxafi la proporción de sexos es cercana al equilibrio. A diferencia de las localidades de Cubitos, donde tres cuartas partes son hembras y El Guano de la que dos terceras partes son machos (Gráfica 1).

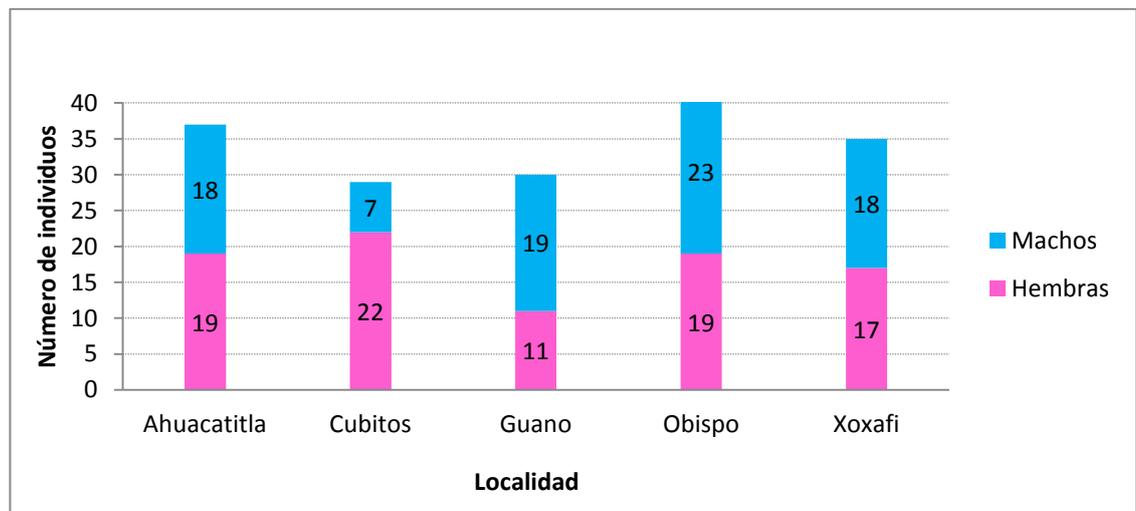


Figura 11.- Individuos capturados por localidad. Se muestra número total y composición por sexo.

Trabajo de laboratorio

Los cuatro microsatélites seleccionados fueron polimórficos, en total, se detectaron 137 alelos distintos., Los marcadores fueron más sensibles de lo que se había encontrado inicialmente y también se amplió el intervalo observado de amplificación (Cuadro 4).

**Cuadro 4.- Proporción de polimorfismos detectados por locus**

<i>Locus</i>	No. De alelos reportados	No. de alelos observados	Tamaño reportado	Tamaño observado
LEYE 11	12	33	235-300	225-313
LEYE 17	7	34	200-240	152-288
LEYE 23	12	35	200-255	200-292
LEYE L71	7	35	130-180	124-204

Análisis de diversidad y estructura genética

Las poblaciones con mayor número de alelos detectados fueron las del Obispo y la de Ahuacatitla (Cuadro 5), siendo los microsatélites Leye 23 y Leye L71 los más polimórficos detectando 35 alelos cada uno.

Cuadro 5.- Alelos detectados por locus por población.

Población	Leye 11	Leye 17	Leye 23	Leye 71	Total
Ahuacatitla	24	22	29	21	96
Cubitos	22	15	22	18	77
Guano	24	11	25	24	84
Obispo	27	24	25	20	96
Xoxafi	26	12	22	17	77

Parámetros generales de diversidad genética

Se obtuvieron los parámetros generales de diversidad genética para ambas especies, mismos que se exponen en los cuadros 6 y 7.

En el caso de *L. nivalis* (Cuadro 6) aunque los resultados muestran parámetros comparables, la localidad de Ahuacatitla es más diversa, en número de alelos distintos, alelos efectivos e índice de Shannon. En ambos sitios, la heterocigosidad observada es menor que la esperada, aunque la diferencia es mucho mayor en Cubitos.



Cuadro 6 .-Parámetros generales de diversidad genética en *L. nivalis*. N=tamaño de la muestra, Na= Número de alelos diferentes, Ne= número de alelos efectivos, I=índice de Shannon, Ho=Heterocigosidad observada, He=Heterocigosidad esperada, FIS=Índice de fijación de Wright general por población.

Población	Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	FIS
Ahuacatitla	Leye 11	35	24	17.254	2.995	0.743	0.942	
	Leye 17	37	22	17.22	2.942	0.892	0.942	
	Leye 23	37	29	23.203	3.25	0.919	0.957	
	Leye L71	37	21	15.646	2.871	0.703	0.936	
	Promedio	36.5	24	18.331	3.015	0.814	0.944	0.137832
	SE	0.5	1.78	1.667	0.083	0.054	0.004	
Cubitos	Leye 11	29	22	17.521	2.97	0.862	0.943	
	Leye 17	28	15	11.529	2.563	0.857	0.913	
	Leye 23	26	22	15.191	2.891	0.346	0.934	
	Leye L71	29	18	15.153	2.804	0.448	0.934	
	Promedio	28.000	19.25	14.849	2.807	0.628	0.931	0.325083
	SE	0.707	1.702	1.237	0.088	0.135	0.006	
TOTAL	Promedio	32.250	21.625	16.590	2.911	0.721	0.938	0.230801
	SE	1.656	1.451	1.165	0.068	0.076	0.004	

En el caso de *L. yerbabuena* (Cuadro 7), la localidad más diversa es el Obispo, que ostenta el mayor número de alelos diferentes, efectivos e índice de Shannon. Las poblaciones de El Guano y Xoxafi, se observan valores muy similares en alelos efectivos e índice de Shannon, a excepción del número de alelos diferentes que es ligeramente mayor en El Guano.

En las tres localidades, se reconoce que la heterocigosidad observada es menor a la heterocigosidad esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg.



Cuadro 7.- Parámetros generales de diversidad genética en *L. yerbabuenae*. N=tamaño de la muestra, Na= Número de alelos diferentes, Ne= número de alelos efectivos, I=índice de Shannon, Ho=Heterocigosidad observada, He=Heterocigosidad esperada, FIS=índice de fijación de Wright general por población.

Población	Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	FIS
Guano	Leye 11	30	24	15	2.931	1	0.933	
	Leye 17	30	11	5.405	1.974	0.367	0.815	
	Leye 23	28	25	18.447	3.051	1	0.946	
	Leye L71	30	24	17.647	3.014	0.8	0.943	
	Promedio	29.5	21	14.125	2.743	0.792	0.909	0.129429
	SE	0.5	3.342	2.998	0.257	0.149	0.032	
Obispo	Leye 11	39	27	16.9	3.043	0.897	0.941	
	Leye 17	42	24	18.28	3.028	0.905	0.945	
	Leye 23	42	25	16.183	2.976	0.881	0.938	
	Leye L71	42	20	15.611	2.836	0.667	0.936	
	Promedio	41.25	24	16.743	2.971	0.837	0.940	0.109156
	SE	0.75	1.472	0.576	0.047	0.057	0.002	
Xoxafi	Leye 11	37	26	17.665	3.056	1	0.943	
	Leye 17	36	12	9.969	2.357	0.917	0.9	
	Leye 23	30	22	17.822	2.975	0.667	0.944	
	Leye L71	37	17	11.802	2.596	0.784	0.915	
	Promedio	35	19.25	14.314	2.746	0.842	0.926	0.090518
	SE	1.683	3.038	2.015	0.164	0.073	0.011	
TOTAL	Promedio	35.25	21.42	15.061	2.820	0.824	0.925	0.109583
	SE	1.558	1.549	1.16	0.098	0.053	0.011	

Comparando los valores generales del índice de Shannon (Cuadro 8) por *locus*, los microsatélites Leye 11 y Leye 23 resultaron ser los más diversos. Las poblaciones más diversas son Ahuacatitla y El Obispo en segundo lugar. La población menos diversa es Cubitos. Finalmente, en promedio general, *L. nivalis* es la especie más diversa, aunque la diferencia es mínima.

Cuadro 8 .-Índices de Shannon, por especie.

Especie	Población	Leye 11	Leye 17	Leye 23	Leye L71	Promedio
<i>L. nivalis</i>	Ahuacatitla	4.321	4.245	4.689	4.142	4.349
	Cubitos	4.285	3.697	4.171	4.045	4.049
	Promedio	4.303	3.971	4.430	4.094	4.199
<i>L. yerbabuenae</i>	Guano	4.229	2.849	4.401	4.348	3.957
	Obispo	4.391	4.369	4.293	4.091	4.286
	Xoxafi	4.409	3.401	4.292	3.745	3.962
	Promedio	4.343	3.539	4.328	4.061	4.068



Parámetros de Estructura Genética

Los índices de fijación de cada especie (F_{ST} y R_{ST}) por AMOVA, en general, mostraron que la mayor parte de la variación está contenida dentro de los individuos, por lo que no hay una diferenciación. A excepción del caso de *L. yerbabuena*, con R_{ST} , que evidenció mayor cantidad de variación entre las poblaciones y registró variabilidad nula entre los individuos (Gráfica 2).

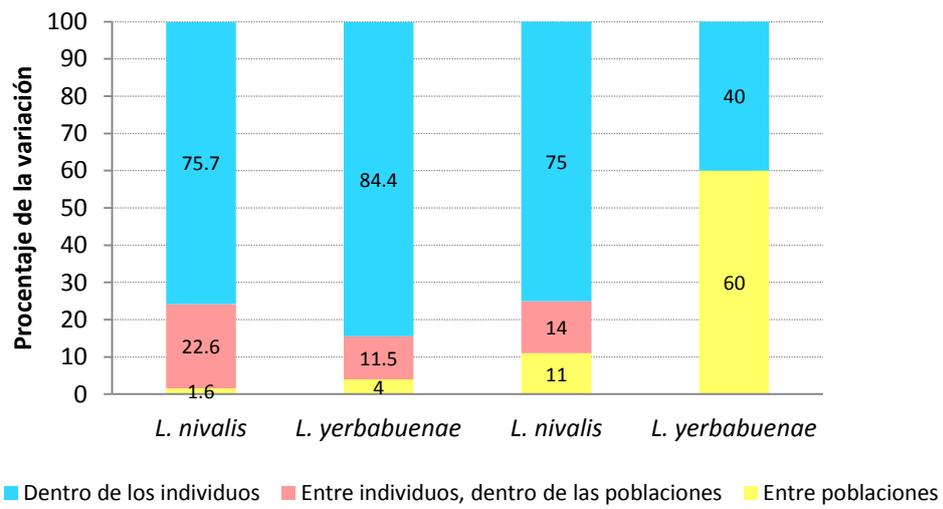


Figura 12 .-Fuentes de variación por especie, promediados y ponderados para todos los loci. Las dos columnas de la izquierda, representan las fuentes de variación con relación a los parámetros F_{ST} obtenidas por medio de la AMOVA (Excoffier, 2006). Las dos columnas de la derecha, representan las fuentes de variación con relación a los parámetros R_{ST} obtenidos por medio de la AMOVA (Slatkin, 1995).

El promedio general para todos los loci, también mostraron mayor diferenciación en *L. yerbabuena* en comparación con *L. nivalis*, fue mucho más evidente en R_{ST} , en comparación con F_{ST} . La diferenciación fue más (Gráfica 3).

Con respecto a los valores de F_{IS} y R_{IS} , que describe los niveles de endogamia en las subpoblaciones, en ambos casos *L. nivalis* reveló mayores parámetros en comparación con *L. yerbabuena* y esta diferencia fue mayor en R_{IS} (cuantificándose una cifra negativa). Sin embargo, en todos los casos, los resultados finales fueron cercanos a cero.

Por su parte F_{IT} y R_{IT} , los parámetros que describen los niveles de endogamia en la población total presentaron información aparentemente ambigua: *L. nivalis* presenta la cifra



más elevada en F_{IT} y *L. yerbabuena* presenta la cifra más alta con R_{IT} . No obstante, en ambos casos son positivas.

Por su parte, el Nm (Número de migrantes por generación) muestra valores más altos en *L. nivalis* en comparación con *L. yerbabuena* (Gráfica 3).

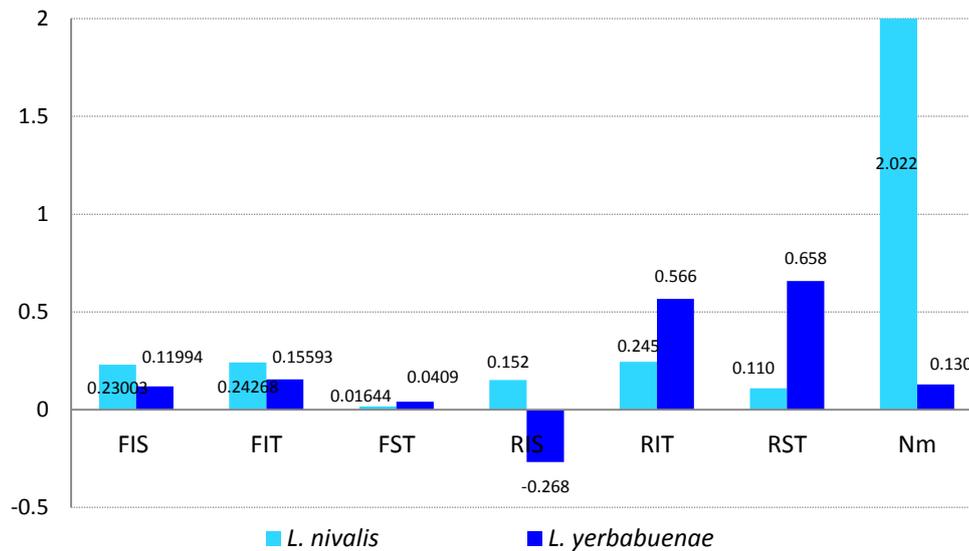


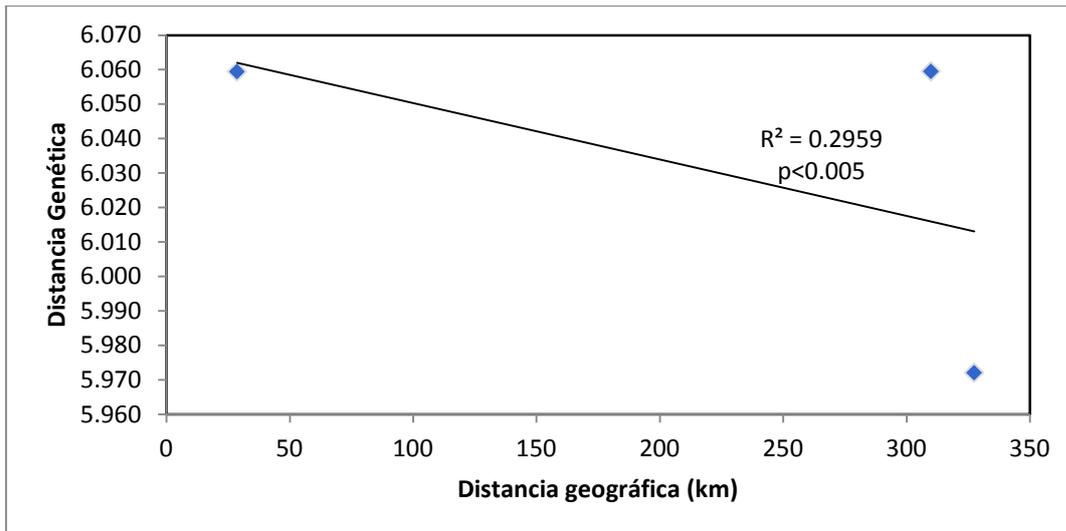
Figura 13.- Estadísticos de estructura basados en parámetros F (Wright, 1951; Excoffier, 2006) y R (Slatkin, 1995), totales por especie. Método de distancia R_{ST} , suma de las diferencias al cuadrado (9,999 permutaciones). Método de distancia F_{ST} , suma de las diferencias al cuadrado (10,100 permutaciones).

Aislamiento por distancia

La prueba de Mantel, que relaciona las distancias geográficas lineales entre los refugios con la distancia genética de Nei, no mostró correlación alguna (Cuadro 9).

Cuadro 9.-Distancias (*L. yerbabuena*). Distancia genética de Nei (bajo la diagonal); distancia geográfica lineal, en km (sobre la diagonal).

Guano	Obispo	Xoxafi	
0	327.446	28.615	Guano
5.972	0	309.927	Obispo
6.059	6.060	0	Xoxafi



Gráfica 1.- Correlación entre las distancias genéticas y geográficas.

Flujo genético

La dinámica del flujo genético, estimado en *L. nivalis* (Figura 11), muestra que tanto Ahuacatitla como Cubitos resultaron ser poblaciones muy homogéneas y similares. El análisis por sexo también reveló que tanto hembras como machos tienen una estructura muy similar.

En el caso de *L. yerbabuena* (Figura 12), en el análisis total, las poblaciones muestran una estructura moderadamente diferenciada, aunque con algunos alelos compartidos. Particularmente, el Guano y el Obispo muestran mayor similitud entre sí que con respecto a Xoxafi, que se muestra distinta. El análisis por sexos mostró que las hembras mantienen en general una estructura similar. Por el contrario, los machos muestran una estructura mucho más diferenciada, con mayor similitud entre el Guano y el Obispo, en comparación con Xoxafi.

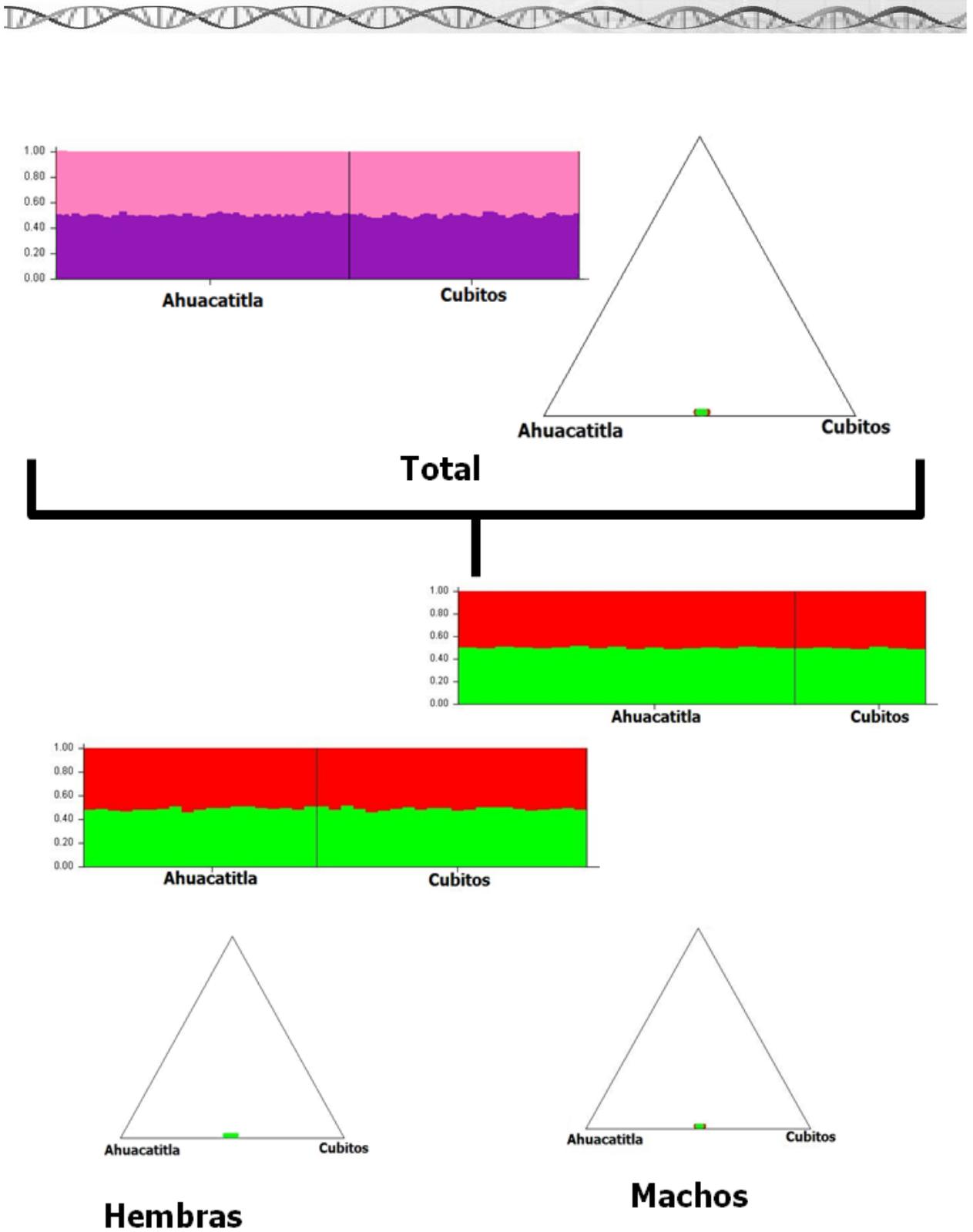


Figura 14.- Dinámica del flujo Genético en *Leptonycteris nivalis*

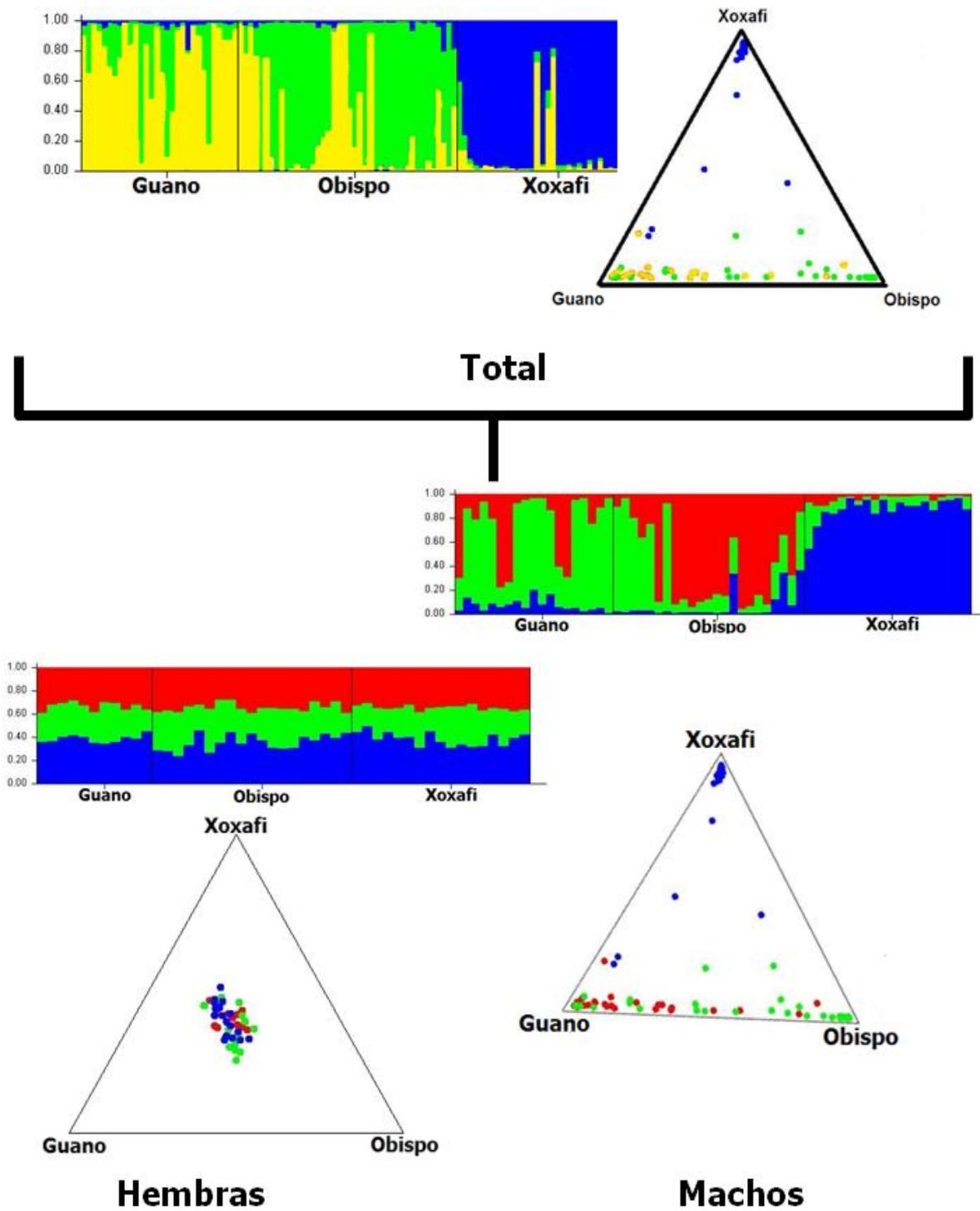


Figura 15.- Dinámica de flujo genético en *Leptonycteris yerbabuena*



Relaciones de parentesco y genética histórica

Se obtuvo una red que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de cada especie (Anexos III y IV). Cada haplotipo se relaciona con otro por un solo cambio; los círculos pequeños infieren haplotipos perdidos que pudieron no haber sido muestreados o bien, que existieron en algún momento y que desaparecieron. La topología de la red de cada especie es claramente distinta.

En el caso de *L. nivalis*, la mayoría de los haplotipos útiles e informativos proceden del refugio de Ahuacatitla. La topología del árbol muestra una red fuertemente centralizada alrededor del haplotipo ancestral inferido (h125, marcado con un símbolo cuadrado en la red), que funge como haplotipo clave (Anexo III). El origen de este haplotipo es el sitio de Cubitos.

En el caso de *L. yerbabuena*, la topología del árbol (Anexo IV) muestra una red excéntrica en cascada, sin centralización. El haplotipo ancestral inferido se halla en la localidad del Obispo. La mayoría de los nodos están interconectados por una gran cantidad de pasos y están ausentes los haplotipos clave, que muestren conexiones importantes que unan diferentes fracciones de la red.

DISCUSION

Diversidad genética

Los cuatro microsatélites seleccionados resultaron ser altamente polimórficos, detectando entre 34 y 35 alelos cada uno. Lo anterior resulta ser uno de los polimorfismos más elevados registrados en quirópteros migratorios.

Ortega y Maldonado (2007), compararon 113 microsatélites descritos para 12 especies de murciélagos en trabajos previamente publicados, en ellas encontraron que el nivel de polimorfismo fue muy elevado, principalmente entre especies de la familia Vespertilionidae, detectando en promedio 11.1 alelos por especie (el mínimo fue de 5 en *Hipposideros turpis* y el máximo de 18 en *Miniopterus schreibersii*). Por su parte, Petit y



Mayer (1999) encontraron que en *Nictalus noctula*, un microquiróptero europeo, existen de 10 a 25 alelos en ocho marcadores de microsatélites nucleares.

Asimismo, se ha propuesto (Petit y Mayer, 1999; Ortega y Maldonado, 2007) la existencia de una correlación positiva entre el tamaño de los microsatélites (determinados por la longitud y la complejidad de los oligonucleótidos) y el nivel del polimorfismo que detectan (determinados por el número de alelos identificados), encontrando que microsatélites con mayor número de bases, presentan más adiciones y esto se refleja en el número de alelos que son capaces de detectar. En este trabajo, no fue hallada esta correlación, puesto que en general, los microsatélites detectaron un número de alelos comparable, aunque la longitud de los mismos fue ampliamente variable (de 26 a 69 bases).

Los valores de diversidad encontrados mediante el índice de Shannon oscilaron entre 2.743 en el Guano y 3.015 en Ahuacatitla. En general el índice de Shannon muestra mayor diversidad en *L. nivalis* (2.911) que en *L. yerbabuena* (2.820), aunque la diferencia es pequeña. Sin embargo, en todos los parámetros, resultan mayores a los valores encontrados por otros autores para otras especies de murciélagos, obtenidos con diferentes métodos. Urbiola (2009) evaluó la diversidad genética de *Myotis velifer* en la cuenca de Cuitzeo, Michoacán con ISSR's, encontrando índices de Shannon de 0.34 a 0.43, que son comparables a los 0.35 a 0.37 de *Sturnira ludovici* y *Artibeus toltecus* respectivamente, obtenidos con ISSR's (Asher, 2009).

A diferencia de los trabajos realizados anteriormente, los microsatélites permiten tipificar genéticamente a los individuos diferenciando heterocigotos y homocigotos, gracias a su mecanismo de herencia codominante (Selkoe y Toonen, 2006).

En este trabajo, se obtuvieron valores elevados de heterocigosidad observada (H_o) de 0.721 para *L. nivalis* y 0.824 para *L. yerbabuena*, estos resultados son mayores a los parámetros equivalentes reportados por Ramírez (2011), obtenidos con 12 microsatélites (entre los que se hallan los utilizados aquí) en 16 localidades de la costa occidental de México y el suroeste de Estados Unidos ($H_o=0.581$, $H_e=0.691$). Sin embargo, al igual que en este trabajo, los valores de H_o son menores a los valores de H_e , (de 0.938 y 0.925



respectivamente), mostrando un déficit del 23.1 al 11% de los heterocigotos en todas las poblaciones. Este déficit podría ser el resultado de la endogamia, que puede ocasionar la pérdida de heterocigotos.

De la misma manera, en *Myotis bechsteinii* (Durrant, *et al.*, 2009) se encontró un exceso de homocigotos en relación a los esperados bajo la hipótesis del equilibrio de Hardy-Weinberg, los autores proponen que los valores positivos de F_{IS} ($F_{IS}=0.129-0.289$, $p<0.05$) podrían revelar efectos de poblaciones endogámicas.

En general, destaca que las poblaciones de Ahuacatitla y el Obispo son las más ricas y diversas para todos los parámetros evaluados (alelos observados, alelos efectivos, alelos exclusivos, índice de Shannon y heterocigosidad esperada), en *L. nivalis* y *L. yerbabuena*, respectivamente, probablemente porque las colonias son muy numerosas en el caso del Obispo, o bien porque podrían revelar un origen múltiple (Ahuacatitla).

Del total de alelos encontrados, los alelos exclusivos representan en promedio del 0.01 al 0.93% (con 9 en Ahuacatitla, 4 en Cubitos, 1.25 en Guano, 5 en Obispo y 4 en Xoxafi). En todos los casos, la frecuencia de los alelos exclusivos fue muy baja. Ninguno de estos alelos se ha fijado significativamente en la población, probablemente por efectos de endogamia, mutación, deriva o podrían revelar un origen reciente que en el futuro pueden conducir a la diferenciación local. Domínguez-Olmedo (2009) mostró la presencia de alelos exclusivos en una población de lagartijas (*Sceloporus grammicus*) y propone este resultado como probable evidencia de la existencia de patrones de mutación-selección a escala local, que estarían actuando para lograr la diferenciación genética local como resultado de la deriva génica y que se ha acentuado por la restricción progresiva del flujo genético a consecuencia de la fragmentación. Es posible que los murciélagos tengan un patrón similar.

Estructura genética

La estructura genética refleja el número de alelos compartidos dentro y entre poblaciones, el flujo génico homogeniza las frecuencias alélicas entre ellas. Así, las diferencias pueden estar determinadas por selección, deriva génica, endogamia y



aislamiento. El alto flujo de genes descarta una adaptación local y por lo tanto impide los procesos de especiación (Balloux y Lugon, 2002; Domínguez-Olmedo, 2009).

Estudios de genética de poblaciones en especies voladoras y migratorias como murciélagos y aves han mostrado estructura de poblacional mínima, caracterizada por altos niveles de flujo génico (Miller-Butterworth, *et al.*, 2003; Moussy, *et al.*, 2012).

En el caso del género *Leptonycteris*, los valores de F_{IS} son positivos y cercanos a 0 en todos los casos (de 0.230 en *L. nivalis* y 0.119 en *L. yerbabuena*, en promedio). Estos resultados indican desde panmixia hasta niveles de endogamia moderadamente altos. El valor más bajo corresponde a Xoxafi ($F_{IS}=0.090$; *L.yerbabuena*), la cual puede considerarse una población casi panmíctica. Por otra parte, el valor más elevado corresponde a la población de Cubitos ($F_{IS}=0.325$; *L. nivalis*) a la que se consideraría como moderadamente endogámica, paradójicamente corresponde a un sitio de alimentación, donde se esperaría que la convergencia de animales procedentes de distintos sitios incrementara la panmixia y bajara considerablemente los parámetros de F_{IS} . Es posible que estos resultados estén siendo condicionados por el comportamiento y que las áreas de alimentación sean visitadas simultáneamente por grupos de murciélagos emparentados.

El parámetro equivalente promedio R_{IS} muestra un comportamiento comparable en *L. nivalis* y apunta hacia endogamia baja ($R_{IS}=0.152$, $p<0.013$). Sin embargo en *L. yerbabuena* muestra un valor negativo ($R_{IS}=-0.268$, $p<0.005$), proponiendo exogamia, probablemente, esto se debe a las condiciones del refugio y al tamaño de la población.

Con relación a los parámetros generales de F_{IT} y R_{IT} , que miden el equilibrio entre deriva y flujo genético, entre cada individuo con respecto al total medido en las poblaciones, resultaron positivos, similares y superiores en *L. nivalis* en todos los casos, indicando que esta especie tiene tasas de flujo génico mayores. Este comportamiento podría estar condicionado por una capacidad de dispersión mayor en comparación con *L. yerbabuena* probablemente como resultado adaptativo de la búsqueda de sitios más especializados o con mayores requerimientos.



Debido a su capacidad de vuelo, podría esperarse que la estructuración de las poblaciones en especies de murciélagos migratorios fuera siempre baja, e incluso, que las especies fueran casi panmícticas a lo largo de su área de distribución (Burland y Worthington, 2001; Moussy, *et al.* 2012), a diferencia de las especies sedentarias y/o insulares que podrían exhibir un enorme grado de diferenciación genética entre poblaciones (Moussy, *et al.* 2012). Sin embargo, existen diversos factores, tales como el comportamiento migratorio, reproductivo y filopátrico, el sistema de apareamiento, la presencia de barreras geográficas entre otras características del paisaje, que dificultan el flujo genético. También los patrones históricos de colonización pueden ejercer influencia en la definición de las fronteras en las poblaciones, y por consiguiente en su estructura (Burland y Worthington, 2001; Newton, *et al.*, 2003; Coulon, *et al.*, 2006; Moussy, *et al.*, 2012). En *Nyctalus noctula*, (murciélagos migratorios) se han registrado valores bajos de F_{ST} ($F_{ST}=0.006$, $p<0001$) en poblaciones continentales europeas, obtenidos con marcadores nucleares de microsatélites. La estructura genética de las colonias, difiere significativamente de la panmixia, posiblemente explicada por dispersión no aleatoria de los machos (Petit y Mayer, 1999). Para *L. curasoae*, Newton, *et al.*, (2003) hallaron valores de estructura de población significativamente bajas de ($F_{ST} = 0.167$, $p<0.001$), calculadas por medio de marcadores mitocondriales. En *L. yerbabuena*, Wilkinson y Fleming (1996) evidenciaron flujo genético muy elevado en poblaciones geográficamente disyuntas hasta por 1,800 km, identificando haplotipos mitocondriales casi idénticos. Finalmente, Ramírez (2011) encontró valores de diferenciación genética de $F_{ST}=0.028$ ($p<0.005$) para *L. yerbabuena*, usando 12 microsatélites (incluyendo los cuatro utilizados en este estudio) en 16 localidades de la costa del occidente de México y el sureste de Estados Unidos.

Por su parte, las poblaciones de *Leptonycteris* presentaron niveles bajos de estructura genética ($F_{ST} =0.01644$ en *L. nivalis*, $p=0.234$ y $F_{ST}=0.0409$ en *L. yerbabuena*, $p<0.005$), comparables con los resultados obtenidos por Ramírez en 2011. Al llevar a cabo los análisis con el parámetro equivalente corregido para marcadores codominantes (microsatélites) R_{ST} (Slatkin, 1995), se encontró evidencia de una estructura mejor



diferenciada para *L. nivalis* ($R_{ST}=0.110$) y elevada para *L. yerbabuena* ($R_{ST}= 0.658$). R_{ST} es una estimación basada en las sumas de diferencias al cuadrado y está corregida según el modelo de sitios infinitos (*step-wise mutation model*) por lo que se recomienda para datos de marcadores codominantes, altamente variables con alelos múltiples neutros como los microsatélites.

Según los resultados del AMOVA y a diferencia de otros trabajos donde la mayor parte de la variación se halla dentro de las poblaciones (Petit y Mayer, 2000; Morales-Garza, *et al.*, 2007; Bilgin, *et al.*, 2008; Ruedi, *et al.*, 2009), en las dos especies utilizadas en este estudio se observa que la mayor parte de la variación está contenida dentro de los individuos, en los datos obtenidos por medio de F_{ST} . En el caso de R_{ST} , en *L. yerbabuena* se observa que la mayor parte de la variación ocurre entre poblaciones (60%) a diferencia del mismo parámetro obtenido con F_{ST} donde se observa una proporción de 84.4% de diferencia entre los individuos. Indicando que en general, los individuos son muy distintos genéticamente entre sí.

En todos los casos, la cantidad de varianza contenida dentro de los organismos es importante, indicando que los individuos son muy diferentes entre sí.

Aislamiento por distancia

El modelo de aislamiento por distancia es el mecanismo de flujo génico más común en especies con distribución continua, bajo este supuesto, los individuos o gametos se mueven de su sitio de origen, a otros sitios con una probabilidad que es progresivamente menor mientras se incrementa la distancia (Futuyma, 1998).

Desde el punto de vista de la genética de poblaciones, el modelo de aislamiento por distancia frecuentemente se obtiene de una correlación positiva en la comparación de la distancia genética (Nei, 1978) y la distancia geográfica. Este modelo se ha podido identificar en varias especies de murciélagos a escalas microgeográficas (Burland, *et al.*, 1999; Rivers, *et al.*, 2005; Shiang-Fan, *et al.*, 2006; Durrant, *et al.*, 2009; Muscarella, *et al.*, 2011)



incluyendo murciélagos del género *Leptonycteris* (Morales-Garza, *et al.*, 2007; Newton, *et al.*, 2003).

El modelo de aislamiento por distancia se puso a prueba, sólo para las muestras de *L. yerbabuena* y no se encontró correlación. *Leptonycteris yerbabuena* es la especie que presenta mayor grado de estructuración, por lo que es probable que la falta de correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética se deba a condiciones ecológicas y biológicas adicionales, tales como la conectividad, la migración, eventos históricos o el comportamiento reproductivo (Petit y Mayer, 1999; Miller-Butterworth, *et al.*, 2003; Russel y McCracken, 2005; Bilgin, *et al.*, 2007; Ruedi y McCracken, 2008; Durrant *et al.*, 2009).

Flujo genético

El flujo genético puede ser una fuerza homogeneizadora muy poderosa en escalas geográficas extensas, en comparación con el movimiento demográfico. El movimiento de los organismos condiciona directamente la dirección del intercambio de genes. El grado de aislamiento geográfico parece estar correlacionado con la capacidad de dispersión de las especies (Burland y Worthington, 2001; Moussy, *et al.* 2012). El flujo genético influye en procesos ecológicos, determinando la persistencia y adaptación de las poblaciones locales, las tasas de extinción de las especies, la evolución de los rangos de distribución de las especies y otras propiedades ecológicas (Aguirre, 2007).

La migración implica el movimiento de individuos hacia poblaciones nuevas y la consecuente introducción de alelos nuevos en la población (Domínguez-Olmedo, 2009).

La diferenciación poblacional es el resultado de la restricción del flujo genético entre grupos reproductivamente aislados (total o parcialmente), por acumulación progresiva de diferencias genéticas por mutación, deriva o selección (Domínguez-Olmedo, 2009).

En este trabajo se demostró que el flujo genético, entre poblaciones de murciélagos del género *Leptonycteris* existe y es moderado, reflejado en el valor positivo de F_{IT} . El flujo genético es mayor en *L. nivalis* ($F_{IT}=0.24$) con respecto a *L. yerbabuena* ($F_{IT}=0.15$). Respecto de los parámetros equivalentes para R_{IT} , son mayores a los reportados por F_{IT}



siendo *L. yerbabuena* el que presenta mayor flujo genético ($R_{IT}=0.56$) en comparación con *L. nivalis* ($R_{IT}= 0.24$). Estos resultados pueden explicarse debido a que los murciélagos usualmente no tienen requerimientos de alta especificidad en cuanto a la elección del refugio (en general son adaptables y oportunistas; Ávila-Flores, 2000) y a su enorme capacidad de vagilidad total a través del vuelo.

En ambos casos, *L. nivalis* presentó menor grado de estructuración que *L. yerbabuena* indicando que las poblaciones son más parecidas. Considerando que los parámetros que miden el flujo genético (F_{IT} , R_{IT} , Nm) son menores en *L. nivalis* con respecto a *L. yerbabuena*, es posible proponer que ésta especie posee mayor cantidad de flujo genético, probablemente originado por una mejor y más efectiva conectividad entre los grupos.

Esta hipótesis es muy probable, puesto que los sitios de Ahuacatitla y Cubitos se encuentran geográficamente cercanos (26.904 km lineales) y por lo tanto se esperaría que la mayoría de los individuos pudieran desplazarse entre los dos sitios, a pesar de la compleja topografía del terreno (Burland y Worthington, 2001).

Considerando que Ahuacatitla presenta mayores índices de diversidad y que esta localidad funciona como refugio de maternidad, es probable que la mayoría de las hembras y los jóvenes se dirijan al sitio de Cubitos para alimentarse. Sin embargo, la presencia de alelos exclusivos en ambas poblaciones permite suponer la existencia de otros refugios y otros sitios de alimentación no identificados.

Los resultados del flujo genético también indicaron un sistema de dispersión parcial. En el caso de *L. nivalis*, probablemente se deben a la cercanía geográfica, la alta tasa de alelos compartidos hace que las poblaciones tengan una estructura bastante homogénea, que es evidente tanto en las hembras, como en los machos, por lo que el flujo genético es intenso en ambos sexos a escala local.

Contrariamente, en el caso de *L. yerbabuena* los resultados indican una población mayormente estructurada, con niveles moderados de flujo genético entre los refugios de El Guano y el Obispo (a pesar de la separación geográfica de 327 km), mientras que el de



Xoxafi está bastante diferenciado y casi completamente aislado. Sin embargo, la estructura por sexos muestra que las hembras mantienen una población muy homogénea con elevados niveles de intercambio genético, mientras que los machos describen un grado de diferenciación importante, con cierto intercambio entre las poblaciones de El Guano y el Obispo y un fuerte aislamiento de Xoxafi, salvo por un bajo intercambio ocasional con el Guano.

La dispersión parcial de los sexos (donde los individuos de un sexo permanecen filopátricos mientras que los otros son dispersores) es un patrón común en vertebrados, en especial en mamíferos donde comúnmente los machos son dispersores, mientras que las hembras son filopátricas (Petit y Mayer, 1999; Prugnolle y Meeus, 2002).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar tales movimientos diferenciales entre sexos y pueden ser clasificados en tres categorías: 1) Hipótesis de competencia por los recursos, 2) Hipótesis del apareamiento competitivo y 3) Hipótesis de la evasión de la endogamia. Las tres predicen la dispersión masculina en sistemas de apareamiento poligínico (el más común en mamíferos). Sin embargo, las consecuencias genéticas de la dispersión basada en un sexo dentro de una subpoblación y sus niveles metapoblacionales, está todavía pobremente documentada.

Prout (1981) demostró en un modelo de islas, dispersión diferencial entre machos y hembras que condujo a un exceso de heterocigotos en la progenie. En este trabajo, se aprecia que la dispersión basada en un sexo puede actuar como fuerza determinística contrarrestando los efectos de la endogamia. Tales observaciones subrayan la importancia de las características de las historias de vida en la ecogenética de las especies. Durrant y colaboradores (2009) proponen que la dispersión basada en el sexo puede llegar a incrementar el F_{IS} en el sexo que es migrante.

Como la dispersión acarrea flujo genético, es posible observar la dispersión estudiando las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones (Petit y Mayer, 1999). La filopatría femenina, por incremento de heterocigosidad local, también puede generar efectos en la diversidad genética dentro de los linajes sociales (Storz, 1999, Storz *et*



al., 2001; Durrant, et.al., 2009). El flujo genético mediado por machos a través de la dispersión parcial, ha sido documentado para varias especies de murciélagos como *Nyctalus noctula* (Petit y Mayer, 1999; 2000) *Myotis myotis* (Castella et al., 2001), *M. bechstenii* (Durrant et.al., 2001; Kerth et al., 2002) y *Plecotus auritus* (Burland et. al, 1999). Sin embargo el mecanismo en que se lleva a cabo este tipo de transporte de genes varía fuertemente dependiendo de la ecología y las características conductuales de cada especie. En *Nyctalus noctula*, la estructura genética depende del origen geográfico de los machos, que las hembras conocen a lo largo de las rutas de migración (las hembras son filopátricas natales y fieles al refugio de maternidad; Petit y Mayer, 1999). En *Myotis bechstenii* el flujo genético se mantiene a través de refugios de apareamiento (en el que convergen individuos de varias colonias) que están geográficamente separados de los refugios de maternidad (Durrant et al., 2009). En *Plecotus auritus* (Burland et al., 1999) el flujo genético ocurre vía dispersión natal de los machos y por cópulas extra coloniales.

En *L. yerbabuena* es posible que el flujo esté siendo condicionado de manera temporal, puesto que se han sugerido dos períodos anuales de maduración testicular (indicativos de actividad reproductiva) en los machos (Torres y Rojas, 2001, 2002), mientras que para las hembras, por el costo energético de la gestación y lactancia, el periodo reproductivo es único en el año, por lo que se segregan en dos poblaciones reproductivas asincrónicas, una que pare en primavera y otra en invierno (Ceballos et.al.,1997). Por tal motivo, es probable que la estructuración alta en los machos sea determinada por la presencia de individuos de regiones distintas (algunas de las cuales no fueron muestreadas en este estudio), pero que convergen en el centro del país y permiten el transporte de los genes a grandes escalas. Mientras tanto, las hembras exhiben comportamiento semi-filopátrico, manteniendo la conectividad y el flujo genético a escalas espacialmente más cortas.

Se sugiere que el comportamiento altruista en la mayoría de los organismos en que se ha estudiado, está determinado por relaciones de parentesco cercano y en colonias que forman redes sociales estables y de largo plazo (Fleming, et al., 1998; Burland y



Worthington, 2001). En *Leptonycteris yerbabuena* este tipo de comportamiento no ha sido observado, posiblemente por el tamaño grande y la fluctuación estacional de las poblaciones (Fleming, *et al.*, 1998), lo que refuerza la importancia y las implicaciones del flujo genético a nivel regional observado en esta especie.

Relaciones de parentesco y genética histórica

Como se mencionó antes, en el caso de *L. nivalis* la red de haplotipos muestra una topología centralizada contra una topología excéntrica en cascada en *L. yerbabuena*. Las relaciones mostradas en la red pueden aportar aproximaciones sobre la dinámica del flujo genético entre los sitios de muestreo.

En *L. nivalis* (Anexo III), los parámetros de estructura a nivel genotípico, mostraron altos niveles de flujo genético formando una sola unidad panmíctica, entre un refugio de maternidad (Ahuacatitla) y un sitio de alimentación cercano (Cubitos), aunque la presencia de alelos exclusivos en ambas poblaciones, permiten suponer la existencia de sitios alternativos de crianza y alimentación.

La red de haplotipos muestra una topología altamente centralizada alrededor del haplotipo H125, procedente de Cubitos. Estas características hacen que la conectividad entre los haplotipos sea elevada y esté mediada por una cantidad reducida de nodos, evidenciando una vez más el flujo genético elevado entre los sitios. Sin embargo, la centralización de la red permite, observar que existen diferencias entre los sitios a nivel haplotípico y que la población de Cubitos podría fungir como una población “fuente” bajo el modelo de metapoblaciones (Tero *et.al.*, 2003). Sin embargo, considerando que Ahuacatitla contiene la mayoría de haplotipos útiles y una diversidad genética importante, es más probable que esta población pudiera ser una población “fuente” de diversidad y que Cubitos pudiera actuar como mediadora, distribuyendo simultáneamente el flujo genético hacia Ahuacatitla, y otros refugios alternativos no identificados durante la temporada de crianza.

La topología de la red también permite observar la composición y estructura de las interconexiones en los sitios. En el lado derecho, se muestran mayoritariamente haplotipos



procedentes de Ahuacatitla, con fuertes interconexiones entre sí y con haplotipos procedentes de Cubitos de manera aislada. Por otra parte, en el lado izquierdo, prevalecen los haplotipos de Cubitos, pero con una representación importante de haplotipos de Ahuacatitla. Esta distribución permite inferir dos procesos: 1.- Pocos de los individuos de Ahuacatitla se alimentan en Cubitos, aunque la mayoría se dirige hacia sitios de alimentación alternos. 2.- De los individuos que Cubitos recibe, una parte importante proceden de Ahuacatitla, pero otros proceden de diversos refugios desconocidos.

En el caso de *L. yerbabuena* (Anexo IV), los parámetros de estructura basados en genotipos, mostraron una estructura general moderada, muy baja en hembras y más diferenciada en machos, principalmente de Xoxafi.

La red de haplotipos muestra una topología excéntrica en cascada y nula centralización, también es observable que la mayoría de los haplotipos son originarios del Obispo y en segundo lugar, del Guano y que ambas poblaciones se interconectan moderadamente. En contraste, los haplotipos de Xoxafi son escasos, aislados y están moderadamente conectados con los del Obispo, más que con el Guano. Por lo tanto, la conectividad entre los haplotipos es baja y se encuentran unidos entre sí por numerosos nodos.

El haplotipo ancestral inferido procede de el Obispo, que representa la colonia más grande (en términos demográficos) y la población más diversa (en términos de diversidad genética) de las estudiadas. Esta localidad, es el origen de la mayoría de los haplotipos útiles incluidos en el análisis. Por este motivo, esta población podría llevar a cabo las funciones de una población “fuente” de alelos según el modelo de metapoblaciones (Tero, *et.al.*, 2003). Sin embargo, la baja conectividad del haplotipo ancestral y el resto de los haplotipos procedentes de esa población, imposibilitan la exportación de migrantes hacia distintas direcciones.

Por otro lado, la topología en cascada, es frecuente en poblaciones que exhiben flujo genético según el modelo de *stepping-stone* (de aislamiento por distancia) ya encontrado para ésta y otras especies de murciélagos (Burland, *et al.*, 1999; Miller-Butterworth, *et al.*,



2003; Newton, *et al.*, 2003; Morales-Garza, 2007). Sin embargo, en este caso, las poblaciones adyacentes más próximas (Guano y Xoxafi), exhiben los parámetros de diferenciación más elevados y la prueba de Mantel no mostró correlación alguna. Xoxafi se mostró como sitio casi aislado y Guano+Obispo presentaron un gran número de alelos compartidos.

Finalmente, es posible que la red resultante muestre una combinación compleja de tales modelos, aunque sin exhibir un patrón claro (Tero *et al.*, 2003; Moussy *et al.*, 2012). Donde la población del Obispo funcionaría como una población fuente (pero no única), en el centro de un sistema de subpoblaciones interconectadas en diferentes niveles en forma de cascada (piedra-rodante; Gaggiotti y Smouse, 1996), pero determinados más por factores ecológicos (como la disponibilidad de recursos) y biológicos (como los sistemas reproductivos), antes que por simple distancia geográfica. El origen de tales oscilaciones podría ser explicado por las variaciones demográficas anuales, que presentan las colonias permanentes del Guano y el Obispo.

Por el otro lado, Xoxafi, es una colonia de carácter estacional, que cuando se dispersa podría enviar algunos ejemplares a las otras dos poblaciones, pero donde la mayoría de los murciélagos se moverían hacia otros sistemas metapoblacionales fuera del área de estudio, lo que explicaría la baja pero presente, conectividad haplotípica compartida con los refugios del Guano y el Obispo.

CONCLUSIONES

1. Los murciélagos del género *Leptonycteris* de las poblaciones estudiadas presentan índices de diversidad genética elevados, con respecto a los parámetros esperados.



En ambas especies, los parámetros de diversidad son comparables, aunque ligeramente mayores en *L. nivalis*.

2. *Leptonycteris nivalis* presenta parámetros de flujo genético muy elevados, los sitios de Ahuacatitla y Cubitos son sumamente parecidos y la diferenciación es mínima a nivel genotípico, sin embargo a nivel haplotípico la diferenciación es más notoria y se evidencia la existencia de refugios y sitios de alimentación alternos no identificados, pero que forman parte del sistema.
3. *Leptonycteris yerbabuena* presenta estructuración genética moderada, con base en datos genotípicos. La estructura resultó ser diferencial por sexos y estar determinada por los machos, ya que la estructuración en hembras fue muy baja.



BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE, P. E. 2007. Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares, pp. 49-62. En L. E. Eguiarte, V. Souza and X. Aguirre [eds.], Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.
- ÁLVAREZ, D. A. 2006. Análisis de la estructura morfológico foliar de *Quercus crassifolia* asociada a diferentes microambientes dentro del parque nacional El Chico, Hidalgo, 85p. Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto. Hidalgo.
- ÁNGELES, E. J. I. 2008. Fluctuación temporal anual de la colonia de *Leptonycteris curasoae* en la Cueva del Obispo, Oaxaca México, 48p. Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo..
- ARITA, H.T., AND S. R. HUMPREY. 1988. Revisión taxonómica de los murciélagos magueyeros del género *Leptonycteris* (Chiróptera: Phyllostomidae). Acta Zoológica Mexicana 29: 1-60.
- ARITA, H. T. 1991. Spatial segregation in long-nosed bats, *Leptonycteris nivalis* and *Leptonycteris curasoae*, in México. Journal of Mammalogy 72: 706-714.
- ARITA, H.T., AND K. SANTOS DEL PRADO. 1999. Conservation biology of the nectar-feeding bats in México. Journal of Mammalogy 80: 31-41.
- ARITA, H. T. 2005a. *Leptonycteris curasoae* (Miller, 1900), pp. 221-222. En G. Ceballos y G. Oliva [eds.], Los mamíferos silvestres de México. 121pp Fondo de Cultura Económica, Comisión Nacional Para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad, México, D.F.
- ARITA, H. T. 2005b. *Leptonycteris nivalis* (Saussure, 1860), pp. 223-224. En G. Ceballos y G. Oliva [eds.], Los mamíferos silvestres de México. Fondo de Cultura Económica, Comisión Nacional Para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad, México, D.F.
- ASHER, C. 2009. Patterns of genetic diversity in populations of two bat species (*Sturnira ludovici* and *Artibeus toltecus*) in Cusco National Park, Honduras. Bioscience Horizons 0: 1-8.
- ÁVILA, F. R. 2000. Patrones de uso de cuevas en murciélagos del centro de México pp. 121, Campus Iztacala. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- BALLOUX, F., y N. LUGON-MOULIN. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.
- BENBOUZA, H., J. JAQUELIM, J. P. BAUDOIN, y G. MERGEAI. 2006. Optimization of a reliable, cheap and sensitive silver staining method to detected SSR markers in polyacrilamide gel. Biotechnology, Agronomy Society and Environment 10: 77-81.



- BILGIN, R., A. KARATHAS, E. CORAMAN, y J. C. MORALES. 2008. The mitochondrial and nuclear genetic structure of *Myotis capaccinii* (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Eurasian transition, and its taxonomic implications. *Zoologica Scripta* 37: 253–262.
- BOLAÑOS-GARCÍA, Z. G. 2013. Estimación del tamaño poblacional de un refugio de maternidad de *Leptonycteris nivalis* en Huasca de Ocampo, Hidalgo, México, pp. El tamaño poblacional de la colonia supera los 10,000 individuos en julio. In J. Ramos-Frías [ed.]. Comunicación personal. Trabajo no publicado, Pachuca de Soto, Hidalgo.
- BOWERS, J., J.-M. BOURSQUOT, P. THIS, K. CHU, H. JOHANSSON, y C. MEREDITH. 1999. Historical genetics: the parentage of Chardonnay, gamay, and other wine grapes of northeastern France. *Science* 285: 1562-1565.
- BURLAND, T. M., E. M. BARRATT, M. A. BEAUMONT, y P. A. RACEY. 1999. Population genetic structure and gene flow in a gleaning bat, *Plecotus auritus*. *Proceedings of the Royal Society of London* 266: 975-980.
- BURLAND, T. M., Y W. J. WORTHINGTON. 2001. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 76: 389-409.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M., D. GRATTAPAGLIA, F. M. SALZANO, S. P. SALAMONI, S. G. CROSSETTI, M. E. FERRERIA, Y M. H. HUTZ. 2003. Historical genetics: spatio-temporal analysis of the formation of the brazilian population. *American Journal of Human Biology* 15: 824-834.
- CASTELLA, V., M. RUEDI, Y L. EXCOFFIER. 2001. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 708-720.
- CEBALLOS, G., T. H. FLEMING, C. CHÁVEZ, Y J. NASSAR. 1997. Population dynamics of *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae) in Jalisco, México. *Journal of Mammalogy* 78: 1220-1230.
- CEBALLOS, G., G. P. RODRÍGUEZ, AND R. A. MEDELLÍN. 1998. Assessing priorities in megadiverse Mexico: mammalian diversity endemism and endangerment *Ecological applications* 8: 8-17.
- CLEMENT, M., D. POSADA, Y K. A. CRANDALL. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.
- COCKRUM, L. E. 1991. Seasonal distribution of northwestern populations of the long-nosed bats, *Leptonycteris sanborni* family Phyllostomidae. *Anales del Instituto De Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoologica* 62: 131-202.
- COCKRUM, L. E., Y Y. PETRYSZYN. 1991. The long-nosed bat, *Leptonycteris*: an endangered species in the southwest? *Occasional Papers of the Museum Texas Tech University*: 1-32.
- COLE, R. F., Y D. E. WILSON. 2006. *Leptonycteris yerbabuena*. *Mammalian Species* 797: 1-7.



- CONANP. 2003. Plan de manejo. Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México, D. F.
- CORNEJO, L. C. 2007. Fluctuación de la abundancia anual de los murciélagos herbívoros en dos tipos de vegetación de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo., pp. 57, Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo.
- COULON, A., G. GUILLOT, J. F. COSSON, A. M. A. ANGIBAULT, S. AULAGNIER, B. CARGNELUTTI, N. GALAN, Y A. J. M. HEWISON. 2006. Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology*: 1669-1679.
- DOMÍNGUEZ-OLMEDO, J. 2009. Estructura genética del citotipo FM2 de *Sceloporus grammicus* en dos poblaciones del Estado de Hidalgo, pp. 56, Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo.
- DURRAND, C. J., T. J. C. BEEBEE, F. GREENAWAY, Y D. A. HILL. 2009. Evidence of recent population bottlenecks and inbreeding in British populations of Bechstein's bat *Myotis bechsteinii*. *Conservation Genetics* 10: 489-496.
- EASTERLA, D. A. 1972. Status of *Leptonycteris nivalis* (Phillostomidae) in Big Bend National Park, Texas. *The Southwestern Naturalist* 17: 287- 292.
- EGUIARTE, L. E., Y A. BÚRQUEZ. 1988. Reducción en la fecundidad en *Manfreda brachystachya* (Cav.) rose una agavácea polinizada por murciélagos : los riesgos de la especialización en la polinización. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 48: 147-149.
- EGUIARTE, L. E., Y V. SOUZA. 2007. Introducción a la ecología molecular, pp. 1-6. En L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre [eds.], *Ecología Molecular*, Primera Edición ed. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D.F.
- EPP, L. S., K. R. STOOF, Y R. TIEDERMANN. 2010. Historical genetics on a sediment core from a Kenyan lake: intraspecific genotype turnover in a tropical rotifer is related to past environmental changes. *Journal of Paleolimnology* 43: 939-954.
- ESCORCIA, M. V. 2008. Fluctuación poblacional anual de *Leptonycteris curasoae* en la Cueva del Guano, en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, pp. 48, Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo.
- EXCOFFIER, L. 2006. Arlequin version 3.01 computer program, version 3.01. By Excoffier, L., Berne.
- FALUSH, D., M. STEPHENS, Y J. PRITCHARD. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.



- FLEMING, T. H., R. A. NUÑEZ, Y L. S. L. STERNBERG. 1993. Seasonal changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia* 94: 72-75.
- FLEMING, T. H., A. A. NELSON, Y V. M. DALTON. 1998. Roosting behavior of the lesser long-nosed bat, *Leptonycteris curasoae*. *Journal of Mammalogy* 79: 147-155.
- FLEMING, T. H., Y J. NASSAR. 2002. Population Biology of the lesser long-nosed bat *Leptonycteris curasoae* in México and northern South America., pp. 283-305. En T. H. Fleming and A. Valiente-Banuet [eds.], *Columnar cacti and their mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. University of Arizona Press, Tucson.
- FUTUYMA, D. J. 1998. *Evolutionary biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. EUA
- GAGGIOTTI, O. E., Y P. E. SMOUSE. 1996. Stochastic migration and maintenance of genetic variation in sink populations. *American Naturalist*: 919-945.
- GALINDO, C. G., A. Q. SÁNCHEZ, Y R. H. QUIJANO. 2004. Population dynamics of a resident colony of *Leptonycteris curasoae* (Chiróptera:Phyllostomidae) in Central México. *Biotropica* 36: 382-391.
- GARCÍA-DÁVILA, D. A. 2007. Polimorfismos genéticos y su aplicación al estudio de las relaciones intra e interespecíficas en aves, pp. 77, Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma.
- GOUDET, J. 2002. Fstat version 2.9.3.2 computer program, version version 2.9.3. By Goudet, J.
- GUTIÉRREZ-PARDO, A. 2008. Biología Floral de *Agave celsii* (Agavaceae: subgénero *Littaea*) en La Encarnación, municipio de Zimapán, Hidalgo, México, pp. 43, Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo.
- HANSI, I. 2001. *Metapopulation Ecology*. Oxford University Press, United States of America.
- HARTL, D. L. L. 2000. *A primer of population genetics* Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. EUA.
- HAYWARD, B., Y L. E. COCKRUM. 1971. The natural History of the western long-nosed bat *Leptonycteris sanborni*. *WRI-SCI Western New Mexico University* 1: 75-123.
- HENSLEY, P., Y K. T. WILKINS. 1988. *Leptonycteris nivalis* *Mammalian Species*: 1-4.
- HIGUCHI, R. 1989. DNA from biopses. *Amplifications* 2: 1-3.
- HOFMEISTER, D. F. 1957. Review of the long-nosed bats of the genus *Leptonycteris*. *Journal of Mammalogy* 38: 454-461.



- HORNER, M. A., T. H. FLEMING, Y C. T. SAHLEY. 1998. Foraging behaviour and energetics of a nectar-feeding bat, *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Journal of Zoological Society of London* 244, : 575-586.
- HOWELL, D. J. 1974. Acoustic behaviour and feeding in glossophaginae bats. *Journal of Mammalogy* 55: 293-308.
- HOWELL, D. J., Y B. S. ROTH. 1981. Sexual reproduction in Agaves: the benefits of bats: cost of semelparous advertising. *Ecology* 62: 3-7.
- HUTSON, A. M., S. P. MICKLEBURGH, Y P. A. RACEY. 2001. Microchiropteran bats: global status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Chiroptera Specialists Group. IUCN. Gland, Suiza y Reino Unido
- INEGI. 1995. Metztitlán , Estado de Hidalgo, Cuaderno Estadístico Municipal., pp. 152. En G. e. I. Instituto Nacional De Estadística [ed.]. INEGI, Gobierno del Estado de Hidalgo, H. Ayuntamiento de Metztitlán.
- INEGI. 2000. Santiago de Anaya, Estado de Hidalgo, Cuaderno Estadístico Municipal., pp. 152. En G. e. I. Instituto Nacional De Estadística [ed.]. INEGI, Gobierno del Estado de Hidalgo, H. Ayuntamiento de Santiago de Anaya.
- INEGI. 2004. Oaxaca, Anuario Estadístico, pp. 792. En G. e. I. Instituto Nacional De Estadística [ed.]. INEGI, Gobierno del Estado de Oaxaca.
- IUPAC-IUB. 1974. Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents. BUTTER WORTHS, Londres.
- JOST, L. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17: 4015-4026.
- JUÁREZ-CASTILLO, L. G. 2006. Comparación del ensamblaje de murciélagos de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México, con otras regiones áridas de Norteamérica, pp. 97, Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo.
- KERTH, G., F. MAYER, Y E. PETIT. 2002. Extreme sex-biased dispersal in the communally breeding, nonmigratory Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Molecular Ecology* 11: 1491–1498.
- KIMURA, M. 1953. 'Stepping-stone' model of population. *Annual Report of the National Institute of Genetics, Japón*: 62-63.
- LAZAR, I. 2010. Gel Analyzer 2010a Freeware computer program, version By Lazar, I., <http://www.gelanalyzer.com/index.html>.
- LYNCH, M., Y T. CREASE. 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution* 7: 377-394.
- MARTÍNEZ, L., Y B. VILLA-RAMÍREZ. 1940. Segunda contribución al conocimiento de los murciélagos mexicanos II Estado de Guerrero. *Anales del Instituto De Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 11: 291-361.



- MARTÍNEZ-CORONEL, M., A. X. HERNÁNDEZ-CRUZ, MÜDESPACHER-ZIEHL, Y G. SALVADOR. 2004. Desarrollo y crecimiento posnatal de *Leptonycteris curasoae* (Phyllostomidae: Glossophaginae) de Chiapas, México, pp. 135-148. En C. A. Castro y R. J. Ortega [eds.], Homenaje a la trayectoria mastozoológica de José Ramírez Pulido. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, México, D. F. 234pp.
- MEDELLÍN, R. A., H. T. ARITA, AND O. H. SÁNCHEZ. 2007. Identificación de los murciélagos de México, Clave de Campo. Instituto de Ecología UNAM, BIO CONCIENCIA, PCMM, CONACYT, Wildlife Trust Alliance México, D.F.
- MEIRMANS, P. G., Y P. W. HEDRICK. 2011. Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology*: 5-18.
- MILLER, M. 2000. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3 computer program, version 1.3. By Miller, M.
- MILLER-BUTTERWORTH, C. M., D. S. JACOBS, Y E. H. HARLEY. 2002. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in Schreibers' long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Molecular Ecology Notes* 2: 139–141.
- MILLER-BUTTERWORTH, C. M., D. S. JACOBS, Y E. H. HARLEY. 2003. Strong population substructure is correlated with morphology and ecology in a migratory bat. *Nature* 424: 187-191.
- MILO, A. P. 2008. Determinación de la variación anual alimentaria de la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) dentro del Parque Ecológico Cubitos en Hidalgo., pp. 57, Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo.
- MORALES-GARZA, M. R., M. D. C. ARIZMENDI, C. J. E., M. MARTÍNEZ-GARCÍA, Y A. VALIENTE-BANUET. 2007. Evidences on the migratory movements of the nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* in Mexico using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Arid Environments* 68: 248-259.
- MOREIRA, P. R. L., Y E. MORIELLE-VERSUTE. 2006. Genetic variability in species of bats revealed by RAPD analysis. *Genetics and Molecular Research* 5: 804-815.
- MORTON, N. E., R. LEW, I. E. HUSSELS, Y G. F. LITTLE. 1972. Pingelap and Mokil Atolls: Historical Genetics. *American Journal of Human Genetics* 24: 277-289.
- MOUSSY, C., D. J. HOSKEN, F. MATHEWS, G. C. SMITH, J. N. AEGERTER, Y S. BEARHOP. 2012. Migration and dispersal patterns of bats and their influence on genetic structure. *Mammal Review*: 1-13.
- MUSCARELLA, R. A., K. L. MURRAY, D. ORTT, A. L. RUSSELL, Y T. H. FLEMING. 2011. Exploring demographic, physical, and historical explanations for the genetic structure of two lineages of greater antillean bats. *Plos One* 6: 1-13.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 3321-3323.



- NEI, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations *Annals of Human Genetics*, Londres 41: 225-233.
- NEI, M. 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races *Japanese Journal of Human Genetics* 23: 341-369.
- NEWTON, L. R., J. NASSAR, Y T. H. FLEMING. 2003. Genetic population structure and mobility of two nectarfeeding bats from Venezuelan deserts: inferences from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 12: 3191–3198.
- ORTEGA, J., Y J. E. MALDONADO. 2007. Caracterización y evolución de microsatélites en murciélagos (Orden:Chiróptera), pp. 71-79.} En G. Sánchez-Rojas y A. E. Rojas-Martínez [eds.], *Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo.
- PARK, S. 2001. MS TOOLS computer program, version By Park, S.
- PEAKALL, R., Y P. E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- PETIT, E., Y F. MAYER. 1999. Male dispersal in the noctule bat (*Nyctalus noctula*) where are the limits? *Proceedings of the Royal Society of London* 266: 1717-1722.
- PETIT, E., Y F. MAYER. 2000. A population genetic analysis of migration:the case of the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Molecular Ecology* 9: 683–690.
- PFRIMMER, H. A., Y K. T. WILKINS. 1988. *Leptonycteris nivalis*. *Mammalian species*: 1-4.
- PIÑERO, D., A. BARAHONA, L. EGUIARTE, A. R. OLIVARES, Y R. S. LIZANA. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, pp. 415-435, *Capital natural de México* . CONABIO, Mexico, D.F. México.
- PRITCHARD, J., M. STEPHENS, Y P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- PRITCHARD, J. K., X. WEN, Y D. FALUSH 2007. STRUCTURE version 2.2 computer program, version By Pritchard, J. K., X. Wen, and D. Falush.
- PROUT, T. 1981. A note on the island model with sex dependent migration. *Theoretical Applied Genetics* 59: 327-332.
- PRUGNOLLE, F., Y T. D. MEEUS. 2002. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity* 88: 161-165.
- QUIROZ, D. L., M. S. XELTZUANTZI, Y M. C. ZAMORA. 1986. Análisis polinófago del contenido gastrointestinal de los murciélagos *Glossophaga soricina* y *Leptonycteris yerbabuena* de las grutas de Juxtlahuaca, Guerrero. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Serie Prehistórica: 62.



- RAMÍREZ, J. 2011. Population Genetic structure of the lesser long-nosed bat (*Leptonycteris yerbabuenae*) in Arizona and México, School of natural resources and the environment. Tesis de Maestría. The University of Arizona.
- RAMÍREZ, J., A. MUNGUÍA-VEGA, Y M. CULVER. 2011. Isolation of microsatellite loci from the lesser long-nosed bat (*Leptonycteris yerbabuenae*) Conservation Genetics Resources 3: 327-329.
- RÍOS, E., H. MEJÍA-RUÍZ, AND S. T. ÁLVAREZ-CASTAÑEDA. 2009. Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias 60: 5-13.
- RIVERS, N. M., R. K. BUTLIN, AND J. D. ALTRINGHAM. 2005. Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. Molecular Ecology 14: 4299–4312.
- ROJAS-MARTÍNEZ, A. E. 1995. Estudio poblacional de tres especies de murciélagos nectarívoros considerados como migratorios y su relación con la presencia estacional de los recursos florales, en el Valle de Tehuacán y la Cuenca de Balsas, pp. 88, Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, División de Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- ROJAS-MARTÍNEZ, A. E. 2001. Determinación de los movimientos altitudinales estacionales de tres especies de murciélagos nectarívoros (Phyllostomidae:Glossophaginae), en el Valle de Tehuacán y la Cuenca del Balsas, México., Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, División de Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F.
- ROJAS-MARTÍNEZ, A. E. 2013. Descripción de las variaciones poblacionales de murciélagos en cuevas de México. In J. R. Frías [ed.] Comunicación Personal, Mineral de la Reforma, Hidalgo.
- ROMERO-ALMARAZ, M. D. L., C. SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, Y Á. AGUILAR-SETIÉN. 2006. Murciélagos Benéficos y Vampiros. Características, importancia, rabia, control y conservación. AGT Editor S. A., Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.
- RUEDI, M., Y G. F. MCCRACKEN. 2009. Phylogeographic analysis of bats, pp. 739-756. En T. Kunz and S. Parsons [eds.], Ecological and behavioral methods for the study of bats. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- RUSSELL, A. L., y G. F. MCCRACKEN. 2005. Population genetic structuring of very large populations: the Brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). En Z. Akbar, G. F. McCracken and T. Kunz [eds.], Functional and evolutionary ecology of bats. Oxford University Press, Nueva York.
- SANS, M., F. M. SALZANO, Y R. CHAKRABORTY. 1997. Historical Genetics in Uruguay: Estimates of Biological Origins and Their Problems. Human Biology 69: 161-170.
- SAUSSURE, M. H. 1860. Note sur quelques mamíferes du Mexique. Revue et Mag de Zool Paris Ser 12: 479-494.



- SELKOE, K. A., Y R. J. TOONEN. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 1-15.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, 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., pp. 1-78. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Diario Oficial de la Federación, Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos.
- SHANNON, P., A. MARKIEL, O. OZIER, N. S. BALIGA, J. T. WANG, D. RAMAGE, N. AMIN, B. SCHWIKOWSKI, Y T. IDEKER. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13: 2498-504.
- SHIANG-FAN, C., S. J. ROSSITER, C. G. FAULKES, Y J. GARETH. 2006. Population genetic structure and demographic history of the endemic Formosan lesser horseshoe bat (*Rhinolophus monoceros*). *Molecular Ecology* 15: 1643–1656.
- SHULL, A. M. 1988. Endangered and threatened wildlife and plants; determination of endangered status for two long-nosed bats. . Federal Register 53: 38456-38460.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- STONER, K., K. O. SALAZAR, R. C. R. FERNÁNDEZ, Y M. QUESADA. 2003. Populations dynamics, reproduction, and diet of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in Jalisco, México: implications for conservation. *Journal of Mammalogy* 12: 357-373.
- STORZ, J. F. 1999. Genetic consequences of mammalian social structure. *Journal of Mammalogy* 80: 553-569.
- STORZ, J. F., H. R. BHAT, Y T. KUNZ. 2001. Genetic consequences of polygyny and social structure in an indian fruit bat, *Cynopterus sphinx*. I. Inbreeding, outbreeding and population subdivision. *Evolution* 55: 1215–1223.
- TELLEZ-ZENTENO, J. G. 2001. Migración de los murciélagos hocicudos (*Leptonycteris*) en el trópico mexicano, pp. 146, Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- TEMPLETON, A. R., K. A. CRANDALL, Y C. F. SING. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics*: 619-633.
- TERO, N., J. ASPI, P. SIIKAMÄKI, A. JÄKÄLÄNIEMI, Y J. TUOMI. 2003. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Molecular Ecology*: 2073-2085.
- TIRADO, A. A. V. 2009. Patrones de depredación de nidos artificiales en una reserva ecológica inmersa en la zona urbana de Pachuca, Hidalgo., pp. 63, Tesis de Licenciatura. Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo.



- TORRES, C. K., Y A. E. ROJAS-MARTÍNEZ. 2001. Descripción histológica estacional del epitelio seminífero de *Leptonycteris curasoae* (Chiróptera Phyllostomidae). Imagen, Revista de la Universidad Simón Bolívar 54: 18-25.
- TORRES, C. K., Y A. E. ROJAS-MARTÍNEZ. 2002. Determinación del periodo reproductivo de *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera Phyllostomidae) por medio de la relación entre la morfología macroscópica y microscópica del testículo y epidídimo. Investigación Universitaria Multidisciplinaria 1: 7-13.
- U. S. FISH Y WILDLIFE SERVICE. 1997. Lesser Long-nosed bat recovery plan. U. S. Fish and Wildlife Service, Albuquerque, New Mexico.
- URBIOLA, R. E. 2009. Mecanismos de evolución y genética de la conservación de *Myotis velifer* en la cuenca del Lago de Cuitzeo, Michoacán, pp. 63, Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- VILLALPANDO, R. J. A. 2006. Dinámica poblacional de *Leptonycteris yerbabuena* en el Centro de México, pp. 77, Tesis de Licenciatura. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- VIZCAÍNO, R. N. M. 2006. Hábitos alimentarios de *Leptonycteris curasoae* (Chiróptera: Phyllostomidae) en Xoxafi, Hidalgo, México pp. 66, Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- WEIR, B. S., Y C. C. COCKERHAM. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution: 1358-1370.
- 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. 1979. Reproductive patterns, pp. 317-378. En R. J. Baker, J. K. Jones and D. C. Carter [eds.], Biology of bats of the new world family phyllostomidae Part III. Special publications of the museum Texas Tech University
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15 323-354.
- WRIGTH, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19: 395-420.



ANEXOS

ANEXO I: Clave para la identificación de las especies de murciélagos del género *Leptonycteris* (Cole y Wilson, 2006)

El género *Leptonycteris*

Este género agrupa murciélagos nectarívoro-palinófagos de tamaño grande (en comparación con el resto de los glosófaginos; antebrazo > 48 mm), con uropatagio reducido y ligeramente cubierto con pelaje (Medellín, 2008).

Características diagnósticas de la clave propuesta por Hoffmeister (1957)

1.-

Las tres falanges del tercer dedo son mayores que el tercer metacarpo; la longitud del antebrazo es usualmente de 55 mm o superior (57 mm en promedio), uropatagio moderadamente peludo con un borde y conspicuo de pelos de 3 a 4 mm de longitud..... *Leptonycteris nivalis*

Las tres falanges del tercer dedo son iguales o menor a la longitud del tercer metacarpo; la longitud del brazo usualmente es de 55 mm o menos (54 mm en promedio), pelaje es corto y denso; uropatagio poco poblado o desnudo con ausencia de pelos en el borde..... 2

2.-

Longitud de la línea de dientes superior (del canino al último molar) mayor o igual a nueve milímetros; dientes superiores e inferiores especialmente incisivos y premolares más grandes y eventualmente espaciados; uropatagio poco poblado con pelos dispersos y un ligero fleco..... *Leptonycteris curasoae*

Longitud de la línea superior de dientes (del canino al último molar) usualmente menor a nueve milímetros; dientes superiores e inferiores especialmente incisivos y premolares pequeños y poco espaciados; incisivos superiores en dos pares separados por un diastema; uropatagio desnudo..... *Leptonycteris yerbabuena*

ANEXO II.- Protocolos estandarizados

Protocolo de Extracción de Muestras de DNA de tejido, modificado de Higuchi, 1989

1. El fragmento de tejido se coloca en un tubo de 1.6 ml con 500 µl de buffer de digestión y se transporta en fresco.
2. El contenido del tubo se macera finamente en un mortero estéril con 15 µl de proteinasa K (50 mg/ml) y 15 µl de RNasa (50 mg/ml).
3. La muestra se regresa al tubo para incubarse a 55°C por una hora en baño maría.
4. Adicionar al tubo 700 µl de solventes orgánicos (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25:24:1) y homogeneizar por inversión hasta obtener una solución blanco-lechosa.
5. Centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos.
6. Se recupera la totalidad de la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo y se efectúa un segundo lavado (adicionar 700 µl de solventes y centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos).
7. Se recuperan 500 µl de la fase acuosa (debe ser totalmente traslúcida, de lo contrario puede hacerse un tercer lavado) a un nuevo tubo y se agregan 1000 µl de



etanol absoluto (grado molecular) frío (debe almacenarse en refrigeración) y mezclar cuidadosamente por inversión.

8. Dejar reposar la muestra durante 20 minutos en hielo para facilitar la precipitación del DNA.

9. Centrifugar a 13 000rpm durante 5 minutos

10. Decantar la muestra por inversión muy cuidadosamente. Se recomienda pasar el borde del tubo por una servilleta de papel ó extraer con mucho cuidado con una pipeta la mayor cantidad posible del sobrenadante.

11. Agregar al tubo 700 μ l de etanol 70% frío y mezclar vigorosamente para homogeneizar.

12. Dejar reposar en hielo por 10 minutos.

13. Centrifugar a 13 000rpm durante 5 minutos.

14. Decantar el sobrenadante nuevamente, atiéndose las recomendaciones del punto 11.

15. Agregar al tubo 100 μ l de agua estéril doblemente destilada (preferentemente grado molecular), mezclar vigorosamente y dejarlo reposar cerrado por espacio de media hora a temperatura ambiente para resuspender. Por medio de este protocolo se obtienen concentraciones aproximadas de DNA de 20-50ng/ μ l.

16. La muestra, para evitar su degradación, debe ser almacenada en refrigeración a -20°C a corto y mediano plazo y a -80°C para almacenamiento de largo plazo.

Protocolo de preparación y corrimiento de electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1.4% para visualización de muestras de DNA.

1. Preparación del gel : se diluyen 3g de agarosa para electroforesis en 288ml de buffer TBE al 0.5x, calentar y remover cuidadosamente hasta obtener una solución totalmente traslúcida y líquida.

2. Enfriar el gel en baño maría removiendo constantemente hasta equilibrar casi a temperatura ambiente.

3. Verter el gel en la charola de la cámara, previamente nivelada, instalarle los peines y dejar polimerizar en reposo por veinte minutos.

4. Armar la cámara según el modelo, llenarle con Buffer TBE 0.5x y retirar los peines con cuidado.

5. Cargar los pozos con las muestras de DNA, previamente teñidas (3 μ l de loading buffer LB con 7.5 μ l de muestra).

6. Correr a 174 volts, 150miliamperes, 25 watts por hora y media.

7. Teñir el gel durante 15 minutos en bromuro de etidio.

8. Lavar el gel sumergiéndolo durante 10 minutos en agua destilada.

9. Visualizar en transluminador estándar a 320nm.

Condiciones de amplificación de PCR utilizadas, estandarizadas a partir de las condiciones reportadas originalmente (Ramírez *et.al.*, 2011)



Cuadro 10.- Formulación de la mezcla maestra por juego de oligonucleótidos. CF: Concentración final. VF: Volumen final por reacción de PCR.

Reactivos	CF		VF	
	(Ley 11 y Ley 23)		(Ley 17 y Ley L71)	
DNA genómico	20-50ng/ μ l	2 μ l	20-50ng/ μ l	2 μ l
Agua bidestilada estéril	----	16.8 μ l	----	16.3 μ l
Buffer PCR 10x	1x	2.5 μ l	1x	2.5 μ l
MgCl ₂	2.5mM	2.5 μ l	3mM	3 μ l
Primer F	0.4 μ M	0.25 μ l	0.4 μ l	0.25 μ l
Primer R	0.4 μ M	0.25 μ l	0.4 μ M	0.25 μ l
dNTP's Mix	0.2mM	0.5 μ l	0.2mM	0.5 μ l
Taq. DNA Polimerasa	1U	0.2 μ l	1U	0.2 μ l
TOTAL		25 μ l		25 μ l

Cuadro 11.- Condiciones de amplificación estandarizadas

Paso		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		94 °C	5 minutos
40 ciclos	Desnaturalización	94°C	45 segundos
	Alineación	Ley 11: 54°C	45 segundos
		Ley 23: 59°C	45 segundos
		Ley 17: 57°C	57 segundos
Ley L71: 61°C		45 segundos	
Extensión		72°C	45 segundos
Extensión final		72°C	7 minutos
En Espera (Hold)		4°C	-----

Preparación y corrimiento de electroforesis en geles verticales de acrilamida al 7.5% para visualización de productos amplificados.

1. Preparación del gel para un volumen final de 12.5 ml: diluir 2.35ml de acrilamida al 40% y 1.25ml de buffer TBE 10x en 8.9ml de agua destilada estéril y refrigerar a 4°C por diez minutos (para retardar la reacción de polimerización). Añadir 20 μ l de TEMED y 240 μ l de APS al 10% justo antes de vaciar en la cámara.
2. Armar la cámara según el modelo y verter el gel dejándolo escurrir lentamente por las paredes para evitar que queden burbujas de aire atrapadas.
3. Introducir los peines, cuidando de no dejar burbujas de aire.
4. Dejar polimerizar por diez minutos.
5. Llenar la cámara con buffer TBE 1x.
6. Cargar con 10 μ l de muestra teñida (3.5 μ l de Loading buffer Sb por cada 25 μ l totales de producto de amplificado).
7. Correr a 150volts, 100miliamperes por media hora.
8. Teñir el gel por inmersión durante 15 minutos en solución de Bromuro de Etidio.
9. Lavar el gel sumergiéndolo 10 minutos en agua.
10. Visualizar en transiluminador estándar a 320nm.



Preparación y corrimiento de electroforesis en geles verticales de acrilamida al 15% y condiciones desnaturalizantes de urea 7M; para separación y visualización en alta resolución de productos amplificados.

Preparación del gel (70ml)

1. Mezclar con calor y agitación constante 29.4 g de urea para electroforesis, 3.5ml de buffer TBE 10x y 13.1ml de acrilamida al 40% hasta obtener una mezcla homogénea, líquida y completamente transparente. Aforar la solución a 70ml dejarle reposar sellada, por veinte minutos en refrigeración a 4°C (la temperatura baja retarda la reacción de polimerización). Agregar 285 μ l de APS al 10% y 28.5 μ l de TEMED justo antes de vaciar el gel, remover suavemente.
2. Armar y nivelar la base donde se coloca el gel (usualmente de vidrio), según el modelo y verterlo cuidadosamente, para evitar que queden burbujas de aire atrapadas en el interior.
3. Colocar en posición los peines que formarán los pozos, cubrirlo con película plástica para evitar que se deshidrate, y dejar polimerizar por 3 horas.
4. Retirar los peines, armar la cámara según el modelo, montar el gel y llenar la cámara con buffer TBE 1x.
5. Precorrer el gel a 2 500 volts, 250miliamperes y 250watts por una hora.

Corrimiento

6. Teñir las muestras con 3.5 μ l de loading buffer SB por cada 25 μ l totales de producto de amplificación.
7. Desnaturalizar las muestras en termociclador por 2 minutos a 94°C y pasar bruscamente a hielo.
8. Cargar los pozos con 10 μ l de muestra (productos amplificados y desnaturalizados).
9. Correr a 1920 volts, 192miliamperes y 192 watts por cuatro horas y media.

Tinción y visualización

10. Retirar la superficie de vidrio que lleva adherido el gel y sumergirlo por 30minutos en solución ácido acético al 10% (fijador).
11. Sumergirlo en agua destilada por unos segundos para lavar el exceso de fijador.
12. Sumergir por 30 minutos en solución de tinción de nitrato de plata a 37°C para impregnar. Remover con cuidado y continuamente.
13. Lavar por inmersión en agua destilada.
14. Sumergir en solución de revelado con 3ml de formaldehído al 100% y 200 μ l de tiosulfato de sodio al 1x, durante 3-10minutos ó hasta ver identificar con claridad las bandas.
15. Escurrir el gel y cubrirlo con película plástica para evitar su deshidratación.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR PARA BIOLOGÍA MOLECULAR

Buffer de digestión para toma y transporte de muestras de DNA

Cuadro 12.- Fórmula para preparar 100ml de Búffer de digestión, mezclar los reactivos en las cantidades indicadas y aforar a 100ml.

Sustancia	Concentración Final	Concentración de Soluciones Stock	Volumen
Tris-HCL pH 8.0	50 mM	1M	5 ml
EDTA pH 8.0	100 mM	0.5 M	10 ml
NaCl	100 mM	5 M	2 ml
SDS	1%	20 %	5 ml

**Buffer TBE 10x**

Tris base	54g
Ácido bórico	27.5g
EDTA 0.5M	20ml (pH 8.0)

Disolver los reactivos por agitación y calor. Aforar a 500ml. Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

Acrilamida al 40%

Acrilamida (grado molecular)	380g
N,N'-metilbisacrilamida	20g
Agua destilada	600ml

Calentar la solución a 37°C para disolver y aforar a 1litro con agua destilada. Esterilizar por filtración (0.45 microporo) al vacío. Amortiguar pH a 7.0 ó menor. Almacenar en botellas oscuras en refrigeración a 4°C.

Solución fijadora para tinción (ácido acético 10%)

Medir 100ml de ácido acético glacial y aforar a un litro con agua destilada.

Solución de tinción de nitrato de plata (1.5g/l NH₃Ag, 0.056% formaldehído)

Disolver 1.5g de nitrato de plata (NH₃Ag) en aproximadamente 300ml de agua destilada y agregar 1.5ml de formaldehído al 37%. Aforar a un litro.

Solución de revelado para tinción

Disolver 30g de hidróxido de sodio (NaOH) en un litro de volumen final de agua destilada.

Tiosulfato de Sodio 1x.

Disolver 0.05g de tiosulfato de sodio en 5ml de volumen final de agua destilada.