



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
ECOLOGÍA EVOLUTIVA

**"Tiempos de Divergencia de la Familia Phyllostomidae
(Chiroptera): Origen de la Nectarivoría"**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

PRESENTA:

ROBERTO EMILIANO TREJO SALAZAR

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
INSTITUTO DE ECOLOGIA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. BLANCA ESTELA HERNANDEZ BAÑOS
FACULTAD DE CIENCIAS
DR. HECTOR TAKESHI ARITA WATANABE
CIECO, UNAM.**

MÉXICO, D.F. MAYO, 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA
ECOLOGÍA EVOLUTIVA

**"Tiempos de Divergencia de la Familia Phyllostomidae
(Chiroptera): Origen de la Nectarivoría"**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

PRESENTA:

ROBERTO EMILIANO TREJO SALAZAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
INSTITUTO DE ECOLOGIA

COMITÉ TUTOR: DRA. BLANCA ESTELA HERNANDEZ BAÑOS
FACULTAD DE CIENCIAS
DR. HECTOR TAKESHI ARITA WATANABE
CIECO, UNAM.

MÉXICO, D.F. MAYO, 2013.

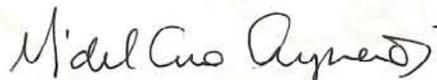
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de enero de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del alumno **TREJO SALAZAR ROBERTO EMILIANO** con número de cuenta **97132750** con la tesis titulada: **"TIEMPOS DE DIVERGENCIA DE LA FAMILIA PHYLLOSTOMIDAE (CHIROPTERA): ORIGEN DE LA NECTARIVORÍA"**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS**:

Presidente: DRA. LIVIA LEÓN PANIAGUA
Vocal: DRA. SUSANA AURORA MAGALLÓN PUEBLA
Secretario: DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS
Suplente: DR. JORGE ERNESTO SCHONDUBE FRIEDEWOLD
Suplente: DR. HÉCTOR TAKESHI ARITA WATANABE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de abril de 2013.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

(UNAM), por mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la elaboración del proyecto de Maestría.

Al programa de becas complementarias de DEGEP, UNAM

Al Proyecto Conacyt SEP-2004-CO1-46475-Q (Conacyt – Fondo sectorial de investigación para la educación) “Diversificación de angiospermas de México: relojes moleculares, tasas de especiación, biomecánica y espacios ecológicos”

A mi comité tutorial:

Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, Instituto de Ecología, UNAM.

Dra. Blanca Estela Hernández Baños, Facultad de Ciencias, UNAM

Dr. Héctor Arita Watanabe, CIECO-UNAM

A los miembros del jurado:

Dra. Livia León Paniagua

Dra. Susana Aurora Magallón Puebla

Dra. Blanca Estela Hernández Baños

Dr. Jorge Ernesto Schondube Friedewold

Dr. Héctor Takeshi Arita Watanabe

A la Dra. Livia León Paniagua quién amablemente aportó material del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Al Museo Americano de Historia Natural en Nueva York, EUA, por las aportaciones de tejido de murciélagos utilizadas en el presente trabajo.

Al Museo de Historia Natural, Smithsonian Institution, de Washington, EUA, por las aportaciones de tejido de murciélagos utilizadas en el presente trabajo.

Al Dr. José Ramírez Pulido, encargado de la colección mastozoológica de la UAM-Iztapalapa. Así como al Biólogo Técnico en la misma colección.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, que forma parte del departamento de Ecología Evolutiva del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo de los proyectos:

Proyecto PAPIIT-UNAM, IN202310 " Estudio evolutivo de importantes diversificaciones vegetales mexicanas: Fouquieriaceae (Ericales); Bombacoideae (Malvaceae, Malvales); y Cactaceae y Pachycereae (Cactaceae, Caryophyllales). Bajo la dirección de la Dra. Susana Aurora Magallón Puebla.

Así como:

Proyecto PAPIIT IN224309-3 "Genética de poblaciones molecular y filogeografía de plantas mexicanas"

Proyecto CONACYT Investigación Científica Básica 2011. 167826. Genómica de poblaciones: estudios en el maíz silvestre, el teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *mexicana*).

Proyecto PAPIIT (Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica), UNAM. Clave: IN202712 "Evolución molecular y conservación en helechos arborescentes (Cyatheaceae): filogenia, filogeografía y genética de poblaciones".

Bajo la dirección del Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, quien es el responsable del laboratorio.

Agradecimientos Personales

Se agrade a mi comité tutorial Dra. Blanca Estela Hernández Baños, Dr. Héctor Arita Watanabe y Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, por su asesoría, contribuciones y correcciones durante mi estancia en el programa de maestría.

Al Dr. Luis E. Eguiarte Fruns por aceptarme como parte del grupo de trabajo del laboratorio de evolución molecular y experimental, su asesoría, paciencia y en general por toda la ayuda que me brindó.

A los doctores Sandra Luz Gómez Acevedo, Jaime Gasca Pineda y Enrique Scheinvar Gottdiener por sus aportaciones en cuanto a ideas, así como la ayuda con los programas de cómputo y pruebas realizadas para concluir el proyecto.

A Luna Luisa Sanchez Reyes y Antonio Barba, quienes de manera muy amable aportaron para resolver dudas.

Al M. V. Z. Manuel Gabriel Rosas Barrera, ya que sin su ayuda en el laboratorio durante el proceso de extracción de ADN, la elaboración de PCR y su apoyo en general no se hubiera podido realizar el presente trabajo.

No olvido mencionar a los amigos que me han apoyado en el laboratorio de distintas formas con dudas, sugerencias y con su presencia para hacer las cosas más ligeras, muchas veces divertidas, Jorge Antonio Valdivia Anistro, Marco A. Rodríguez, Jaime Gasca, Manuel Rosas, Ricardo Colín, Enrique Scheinvar, Sandra Góme, Rafa, Jonás y Alexander.

Agradezco a los compañeros del laboratorio de evolución molecular y experimental que con su compañerismo hicieron las cosas más fáciles, especialmente Santiago Barahona, por todas las ideas que podía discutir contigo.

Quisiera agradecer de manera muy especial a las personas que me han acompañado durante toda mi vida y que han brindado su apoyo incondicional, sin ellos no hubiera logrado nada: mis padres, José Luis y María Lilia, de igual forma a mi hermano, José Luis, su esposa Maribel y su hija Sofía quienes me dibujan una sonrisa cuando los veo.

A aquellos que se han presentado por azar y que por gusto siguen compartiendo un poco de su ser conmigo, con quien además se puede recordar aquellos momentos de tanta alegría: Renata, gracias por esas cortas tardes de reflexión, que tanta tranquilidad me generan. Ernesto, porque el camino sigue y también las ambiciones. Israel, por esos

momentos en los que volvemos a vernos como hace 13 años y sigues siendo el mismo.

Edén por tu compañía y tus ocurrencias, gracias por tus palabras y apoyo.

Irma, a ti te agradezco tu amistad, esas formas que tienes de hacer ver las cosas más chistosas de lo que son y más en los momentos en que todo parece muy pesado.

También le quiero agradecer a los amigos que encontré en el proceso formativo y que han sido parte de mi vida desde la Facultad de Ciencias hasta ahora: Jesús Armando, Isabel, Memo, Mónica, Bety, Javier, Sandra, Daniela.

En la maestría también recibí algo de ayuda y mucho apoyo, gracias: Xoe, Pili, Mariana, José, Yislem, Diana, Memo.

Otro grupo de amigos que no puedo dejar de mencionar, aquellos que encontré en la ENAH: Diana, Eduardo, Ismael, Janis, Richard, Mauri, Carolina.

A los amigos que me apoyaron durante año y medio: Gabriel Emilio, Lucero, Claudia, Pablo, Andrés, Marco Antonio, Tanis, Armando, Lupita.

Por último quisiera mencionar a un grupo que me ha abierto las puertas, me ha regresado gran parte de mi salud y seguridad como persona y que, sin ellos, no hubiera tenido la energía para concluir el presente trabajo, al grupo del sífú Hector Rojo Gómez y el sífú Jorge Lopez García, quienes me han impulsado y apoyado de manera increíble.

A mis padres, a mi hermano y su familia
A mis amigos que me levantan cuando quiero dejar todo.

"Mi trabajo consiste en enseñar a mis aspiraciones a acomodarse a la realidad, no intentar hacer que los hechos armonicen con mis aspiraciones. Sentaros ante los hechos como un niño pequeño, estad preparados para abandonar cualquier idea preconcebida, id humildemente donde quiera y a cualesquiera abismos a los que os guíe la naturaleza o no aprenderás nada".

Thomas Henry Huxley

La ciencia es una parte integral de la cultura.
No es esta cosa extranjera,
realizada por un arcano sacerdocio.
Es una de las glorias
de la tradición intelectual humana.

Stephen Jay Gould

Índice

Resumen.....	iii
I. Introducción	1
1. Orden Chiroptera.....	1
1.1 Papel de los murciélagos en los ecosistemas.....	2
1.2 Murciélagos nectarívoros.....	2
1.2.1 Murciélagos en América.....	4
1.2.2 Murciélagos en México.....	5
1.3 Historia evolutiva de los murciélagos.....	5
1.4 Estudios filogenéticos y evolutivos en Chiroptera.....	8
2. Inferencias Filogenéticas Moleculares.....	9
2.1 Métodos probabilísticos con modelos de sustitución.....	10
2.2 Inferencia bayesiana.....	12
2.3 Marcadores moleculares.....	13
2.4 Estimación de los tiempos de divergencia en filogenias moleculares.....	15
2.5 Tasas de diversificación.....	16
2.6 Filogenias moleculares y radiaciones.....	17
2.7 Nicho conservado.....	18
II. Justificación.....	19
III. Hipótesis.....	20
IV. Objetivos.....	20
V. Materiales y Métodos.....	21
1. Obtención de secuencias.....	21
2. Extracción de ADN.....	22
3. Amplificación de los genes <i>Citocromo-b</i> y <i>RAG2</i>	23
4. Alineación de las secuencias de ADN.....	25
5. Selección del modelo de evolución molecular.....	25
6. Estimación de filogenias.....	26
7. Prueba de hipótesis de reloj molecular.....	27
8. Estimación de los tiempos de divergencia y origen de clados.....	27

9. Inferencia de las tasas de diversificación.....	28
10. Análisis de datos climáticos.....	29
11. Mapeo de caracteres.....	30
VI. Resultados.....	32
1. Muestreo y secuenciación.....	32
2. Modelo de sustitución.....	34
3. Filogenias.....	35
4. Prueba de hipótesis de reloj molecular.....	42
5. Estimación de los tiempos de divergencia.....	43
6. Cálculo de las tasas de diversificación.....	46
7. Análisis de condiciones climáticas.....	48
8. Mapeo de hábitos alimenticios.....	51
VII. Discusión.....	54
1. Muestreo.....	56
2. Estimación de las filogenias.....	57
2.1 Hábitos alimenticios.....	60
3. Tiempos de divergencia.....	62
4. Radiación, tasas de diversificación, coevolución y climas.....	65
5. Coincidencias con eventos geológicos.....	69
VIII. Conclusiones.....	72
IX. Bibliografía.....	74
X. Apéndices.....	94

Índice de Figuras

Figura 1. Filogenia Bayesiana de la Familia Phyllostomidae basada en el gen nuclear RAG2, los números asociados a cada nodo corresponden a la probabilidad posterior.....	36
Fig 2. Filogenia Bayesiana de la familia Phyllostomidea basada en el gen mitocondrial Citocromo-b. El valor asociado a cada nodo representa la probabilidad posterior.....	38
Fig 3. Filogenia Bayesiana de la familia Phyllostomidea basada en los genes <i>Citocromo-b</i> y <i>RAG2</i>	39
Figura 4. Cronograma de la familia Phyllostomidae basada en los genes citocromo-b y RAG2, obtenido con Beast. Los números asociados al nodo representan la edad de los lados.....	44
Figura 5. Tasa de diversificación de la familia Phyllostomidae. Se muestra el logaritmo del número de linajes a través del tiempo en millones de años, se aprecia el punto en el que hay un cambio en la tasa hace 1.39 millones de años.....	46
Figura 6. Gráfica de codo de la varianza explicada por cada componente principal, la inflexión más marcada se encuentra en la componente sexta, sin embargo con los tres primeros componentes se explica el 69.79 % de la variación.....	47
Figura 7. Gráficas de dispersión de las tres componentes principales. En la figura 7a se proyecta a la PC 1 contra la PC2; la figura 7b muestra a la PC1 contra la PC3 y; en la figura 7c se grafica la PC2 contra la PC3.....	49
Figura 8. Filogenia Bayesiana de la familia Phyllostomidae, basada en la base de datos concatenada de los genes <i>cyt-b</i> y <i>RAG2</i> . Se observan los estados de carácter de hábitos alimenticios en cada nodo calculados con el programa Mesquite.....	52
Figura 9. Diagrama temporal de calentamiento global con diversos eventos climáticos, tectónicos y biológicos. Modificado de Zachos <i>et al.</i> , (2001).....	70
Figura 10. Filogenia Bayesiana del gen RAG2, los números asociados a cada nodo corresponden con el orden en el que se muestran en la tabla 11.....	98
Figura 11. Filogenia Bayesiana del gen Cyt-b, los números asociados a cada nodo corresponden con el orden en el que se muestran en la tabla 12.....	99
Figura 12. Filogenia Bayesiana con dos genes concatenados en una misma base de datos, los números asociados a cada nodo corresponden con el orden en el que se muestran en la Tabla 13.....	100
Figura 13. Cronograma de la familia Phyllostomidae basada en el gen RAG2, obtenido con Beast. Los números asociados al nodo representan la edad de los clados.....	103
Figura 14. Cronograma de la familia Phyllostomidae basada en el gen citocromo-b, obtenido con Beast. Los números asociados al nodo representan la edad de los clados.....	104

Índice de Tablas

Tabla 1. Ejemplares de museo a partir de los cuales se realizó extracción de ADN.....	20
Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación y secuenciación del gen <i>Citocromo-b</i>	22
Tabla 3. Condiciones de programa en termociclador para la PCR, para el marcador <i>Cyt-b</i>	23
Tabla 4. Primers utilizados para la amplificación y secuenciación del gen <i>RAG2</i>	23
Tabla 5. Condiciones de programa en termociclador <para la PCR, para el marcador <i>RAG2</i>	24
Tabla 6. Lista de referencias de las cuales se consultaron los hábitos alimenticios de los murciélagos Phyllostomidae.....	29
Tabla 7. Clasificación taxonómica y muestreo de los murciélagos nectarívoros de la familia Phyllostomidae.....	31
Tabla 8. Parámetros de Diversidad Nucleotídica de la familia Phyllostomidae.....	33
Tabla 9. Valores de verosimilitud utilizados para probar reloj molecular en las bases de datos.....	41
Tabla 10. Modelos de diversificación seleccionados para las tres filogenias construidas.....	45
Tabla 11. Promedio de las tasas de diversificación de grupos monofiléticos dentro de la familia Phyllostomidae.....	46
Tabla 12. Tiempos de divergencia (millones de años) calculados para la familia Phyllostomidae por diferentes autores y el presente trabajo.....	63
Tabla 13. Número de catálogo en el sitio web NCBI_Gen Bank de las secuencias utilizadas para la construcción de la filogenia de los marcadores <i>Citocromo-b</i> y <i>RAG2</i> , en total se utilizaron 117 secuencias de ambos marcadores de 119 especies, de las cuales tres pertenecen a la familia Noctilionidae.....	90
Tabla 14. Edades e intervalos (95% HPD) obtenidos en BEAST, para la filogenia construida con el marcador nuclear <i>RAG2</i>	98
Tabla 15. Edades e intervalos (95% HPD) obtenidos en BEAST, para la filogenia construida con el marcador mitocondrial <i>Cyt-b</i>	99
Tabla 16. Edades e intervalos (95% HPD) obtenidos en BEAST, para la filogenia construida a partir de la base de datos de los marcadores mitocondrial y nuclear concatenados.....	100

Resumen

En este trabajo se analiza la filogenia y la aparición de la nectarivoría en la familia Phyllostomidae. Esta familia de murciélagos incluye miembros que se alimentan de sangre, frutos, néctar, insectos e incluso de carne. Existen relativamente pocos trabajos que profundicen en el estudio de la evolución en el consumo de néctar y se pretende contribuir al estudio de la evolución de los murciélagos, en particular de la subfamilia Glossophaginae en México (a través de las relaciones ancestría-descendencia). Un aporte más del presente trabajo consta de la inclusión de 17 nuevas secuencias de marcadores genéticos (de mitocondria, *Citocromo-b* y nuclear, *RAG2*) de especies de ésta subfamilia.

Basado en una matriz de datos de 120 especies con los dos genes mencionados, un total de 2503 caracteres, se obtuvo la filogenia con métodos bayesianos y se calcularon los tiempos de divergencia para las especies de la familia Phyllostomidae. La fecha de origen para la familia fue de 27.67 millones de años (m. a.), y de 21.11 m. a. para la subfamilia Glossophaginae (murciélagos nectarívoros). Éstos tiempos son similares a los calculados anteriormente con otros métodos, además coinciden con eventos geológicos y ecológicos, ocurridos principalmente durante el Mioceno. Cabe mencionar que también éstos resultados son congruentes con resultados de trabajos anteriores en los que se pretendió determinar la relación coevolutiva entre los murciélagos nectarívoros y miembros del género *Agave* y de la familia Cactaceae. En estos trabajos se sugiere que la condición ancestral de alimentación en Phyllostomidae es la insectívora. A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se piensa que los murciélagos filostómidos y particularmente aquellos que se relacionan ecológicamente con especies de plantas a las que polinizan se han diversificado como parte de un proceso de coevolución difusa junto con esos grupos vegetales.

Abstract

This study aims to solve the phylogeny and the emergence of the nectar-feeding strategy in the family Phyllostomidae. This family includes species that feed on blood, fruit, nectar, insects and meat. There are relatively few works that deepen into the study of the evolution of nectar consumption and some aim to contribute to the study of the evolution of bats, particularly the subfamily Glossophaginae in Mexico (through ancestry-offspring relationships). A further contribution of this paper consists in the inclusion of 17 new sequences of genetic markers (from mitochondria, *cytochrome-b* and nuclear *RAG2*) of species of this subfamily.

Based on a data matrix of 120 species with the two mentioned genes, a total of 2503 characters, a phylogeny was obtained and divergence times were calculated with Bayesian methods for species of the family Phyllostomidae. The time of origin (origin date) of the family was 27.67 million years ago, and for the subfamily Glossophaginae (nectar bats) the age was 21.11 million years ago. These times are similar to those previously calculated by other methods and also coincide with geological and ecological events that occurred mainly during the Miocene. Also worth noting, is that these results are consistent with results of previous works in which it was intended to determine the coevolutionary relationship between nectar bats and members of the genus *Agave* and the family Cactaceae. In these studies it is suggested that the ancestral condition in Phyllostomidae feeding strategy is insectivorous. From the results, it is thought that phyllostomid bats and particularly those ecologically related to species of plants they pollinate have diversified as part of a process of diffuse coevolution with these groups of plants.

I. Introducción

1. Orden Chiroptera

Los murciélagos son los únicos mamíferos con la capacidad real de volar y se encuentran agrupados en el Orden Chiroptera, el cual es uno de los taxa más diversos de la Clase Mammalia, ocupando la quinta parte de las especies de esta clase (Neuweiler, 2000; Jones *et al.*, 2005). Se tienen registradas alrededor de 1,100 especies en 200 géneros, sin contar las ya extintas (Gunell y Simmons, 2005; Teeling *et al.*, 2005). Sus características más notorias son el vuelo, la estructura de sus alas, las cuales consisten de una membrana de piel (patagio) apoyada en dedos elongados, y sus hábitos nocturnos (Neuweiler, 2000).

El Orden Chiroptera tradicionalmente se ha dividido en dos subórdenes: 1) Microchiroptera, con 782 especies conocidas como murciélagos verdaderos, y 2) Megachiroptera con 175 especies conocidas como zorros voladores, los cuales son endémicos al Viejo Mundo (Neuweiler, 2000; Wetterer *et al.*, 2000). Posteriormente se ha utilizado una nueva clasificación debido a que con análisis genéticos se han encontrado nuevas relaciones (Teeling *et al.*, 2005). Los dos subórdenes propuestos como alternativa son Yangochiroptera y Yinpterochiroptera. La principal diferencia entre ambos subórdenes es la capacidad de la ecolocalización, presente únicamente en el suborden Yangochiroptera, que se da gracias a la forma y estructuras que componen la laringe y tráquea (Kunz, 1982; Neuweiler, 2000; Teeling *et al.*, 2002, 2005).

En cuanto a su distribución, tan solo cinco géneros de Chiroptera (*Myotis*, *Pipistrellus*, *Eptesicus* y *Nycticeius* de la Familia Vespertilionidae, y *Tadaridase* de la Familia Molosidae) se encuentran en las seis regiones zoogeográficas (Paleártica, Neártica, Neotropical, Indomalasia (región Oriental), Etiope (región Etiope) y Australiana (Australia y Nueva Guinea). Las regiones Neotropical y Australiana comparten una similitud genérica de 7.6%, la región Etiope y la Oriental comparten el 47%; y la Neártica y Paleártica el 40 % (Koopman, 1981; Gunell y Simmons, 2005).

Los hábitos alimenticios de los murciélagos son muy variados. Se pueden alimentar de insectos, pequeños vertebrados, peces, otros murciélagos, sangre de algunos mamíferos y aves, productos vegetales, tales como frutos, néctar y polen (Neuweiler, 2000).

1.1 Papel de los murciélagos en los ecosistemas

Los quirópteros han colonizado una variedad importante de nichos alrededor del mundo. Tienen la capacidad de forrajear en distintos niveles de vegetación o incluso en el suelo, además se han observado ejemplos de pesca, carnivoría y hematofagia (Neuweiler, 2000).

Los miembros de este Orden cumplen un papel importante en los ecosistemas que habitan. Algunas especies de murciélagos controlan poblaciones de insectos, evitando la propagación de plagas (Kunz, 1982; Neuweiler, 2000). Asimismo, los murciélagos nectarívoros constituyen un vector importante de transmisión de polen y/o fertilización para muchas plantas con flores, transportando el polen entre individuos y/o poblaciones (Fleming, 1982; Kunz, 1982; Godínez-Alvarez y Valiente-Banuet, 2000; Tschapka y Dressler, 2002; Lobo *et al.*, 2005). Las especies que se alimentan principalmente o en su totalidad de frutos ayudan a la dispersión de semillas y por ende ayudan a la exploración y potencial colonización de nuevos espacios o nichos por parte de las plantas (Valiente-Banuet *et al.*, 1996; Godínez-Alvarez *et al.*, 2002).

Los murciélagos piscívoros o pescadores se consideran un grupo especial. Algunos forrajean artrópodos en la superficie del agua (Lewis-Oritt *et al.*, 2001), otros capturan peces y anfibios. Las especies carnívoras se encuentran en regiones tropicales y pueden alimentarse de pequeños reptiles, aves o incluso otros murciélagos (Ceballos y Giselle, 2005). Respecto de los murciélagos hematófagos, sólo se conocen tres especies que actualmente se encuentran confinadas a la región Neotropical y para las cuales se ha inferido que evolucionaron en Sudamérica (Neuweiler, 2000).

Las migraciones anuales son otra característica de muchas especies de murciélagos. Estas se explican por tres factores: 1) Clima, implicando un menor gasto energético en termorregulación; 2) Falta de alimento en ciertas épocas del año, debido a floraciones locales y asociación de insectos con especies caducifolias y; 3) Reproducción, lo cual se asocia con los dos factores anteriores (Gunell y Simmons, 2005; Jones *et al.*, 2005).

1.2 Murciélagos nectarívoros

Solo tres de 18 familias de murciélagos tropicales (Pteropodidae, Phyllostomidae y Mysticinidae -familia de un solo género, *Mysticina*, endémico de Nueva Zelanda-) tienen

miembros que visitan flores y que se consideran morfológicamente especializados en consumo de néctar (Fleming *et al.*, 2008). Entre las angiospermas se han registrado 750 especies agrupadas en 270 géneros y 64 familias que dependen de la polinización por murciélagos. De ellas, cerca de 600 especies habitan en el neotrópico, y alrededor de 160 en el paleotrópico. Las familias de plantas con más altos porcentajes de quiropterofilia son Cactaceae, Bignoniaceae y Agavaceae (Arizmendi *et al.*, 2002).

Los murciélagos que se alimentan de néctar generalmente presentan pocos y pequeños dientes -como respuesta a su dieta principal (Freeman, 2002)-, lengua y hocico elongados. La lengua está cubierta por papilas con pelos finos, los cuales crean un efecto de esponja que absorbe el néctar por capilaridad (Koopman, 1981; Kunz, 1982; Proctor *et al.*, 1996; Neuweiler, 2000; Tschapka y Dressler, 2002).

Los quirópteros nectarívoros tienen tasas metabólicas muy altas y un gasto energético elevado debido a sus hábitos voladores (Kunz, 1982; Tschapka y Dressler, 2002). En condiciones áridas, obtienen el agua que necesitan gracias al néctar que consumen (Tschapka y Dressler, 2002). El nitrógeno y aminoácidos los obtienen de polen y de insectos (Cole y Wilson, 2006).

El comportamiento de las especies nectarívoras determina los patrones de dispersión del polen (Godínez-Alvarez y Valiente-Banuet, 2000). Son capaces de transportarlo hasta aproximadamente 30 km por noche y proveer una gran distancia del movimiento del material genético de las plantas (Tschapka y Dressler, 2002). Algunas especies (como las del género *Leptonycteris*) visitan las plantas en grupos, supuestamente de esta forma pueden explorar mas eficientemente un área (Fleming, 1982). Forrajean durante algunos minutos hasta que su estómago está lleno, descansan para digerir, y posteriormente visitan otras flores (un individuo aproximadamente puede visitar, en promedio, hasta 1000 flores en una noche; Tschapka y Dressler, 2002). Un murciélago de 11.5 g de peso puede tomar alrededor de 15.5 ml de néctar por noche (von Helversen y Reyer, 1984).

El sistema de polinización nocturno, visto como un proceso de coevolución entre las plantas y los murciélagos, implica que ambos “se benefician”, es decir, la planta ofrece el recurso para cualquier especie de murciélago (u otros visitantes nocturnos como esfíngidos) que pueda llegar a ella, y por otro lado los murciélagos visitarán las plantas que ofrezcan algún recurso durante su horario de actividad y mueven su polen. Sin embargo, este sistema

tiene una historia que no es fácil descifrar, ya que hay pocos datos de fósiles que iluminen el origen y desarrollo de esta interacción (Heithaus, 1998; Tschapka y Dressler, 2002).

Las flores especializadas para la polinización por vertebrados son, generalmente, más grandes, fuertes, y con una recompensa energética mayor que las flores con otros polinizadores. Debido al costo para las plantas, este tipo de polinización puede ser más benéfica en condiciones que limitan a los insectos (Fleming et al., 2009). Comparado con los insectos, la polinización por aves y murciélagos aumenta las tasas de entre cruzamiento de las plantas y el movimiento de polen a lugares más lejanos (Fleming et al., 2009).

1.2.1 Murciélagos nectarívoros en América.

En América sólo se encuentran murciélagos del suborden Microchiroptera (Kunz, 1982; Neuweiler, 2000). Este grupo ha colonizado varios nichos, incluso hay especies que anidan en construcciones abandonadas o aún habitadas (Neuweiler, 2000).

La familia Phyllostomidae, que alberga a las especies nectarívoras del nuevo mundo, es muy diversa e importante. Se distribuye principalmente en el Neotrópico e incluye 46 géneros y alrededor de 160 especies (Wilson y Reeder, 2005). Sus miembros se alimentan de productos vegetales como néctar, polen, frutos, insectos, peces, pequeños vertebrados y sangre de mamíferos (Kunz, 1982; Ober, 2004; Neuweiler, 2000; Van de Bussche y Hooper, 2004).

Dentro de esta familia, los murciélagos considerados estrictamente nectarívoros se han agrupado en la subfamilia Glossophaginae, sin embargo hay otras especies que también contribuyen de manera eficiente a la polinización de algunos grupos de plantas en Centroamérica y el Caribe, las cuales se encuentran agrupadas en las subfamilias Phyllonycterinae y Brachyphyllinae (Fleming *et al.*, 2009). Los murciélagos nectarívoros son nocturnos y cuentan con la capacidad de dirigir su vuelo y su forrajeo por medio de los sonidos que emiten (Kunz, 1982; Neuweiler, 2000).

Al igual que el resto del grupo de los murciélagos, las relaciones de ancestría-descendencia para los filostómidos no están del todo claras, incluso hay poblaciones que todavía no quedan bien definidas como especies, subespecies o variedades, como *Leptonycteris curasoae* y *L. yerbabuena* (Cole y Wilson, 2006).

1.2.2 Murciélagos en México

México cuenta con 137 especies de murciélagos agrupadas en nueve familias (Emballonuridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae, Natalidae, Thyropteridae, Vespertilionidae, Antrozoides y Molossidae; Ceballos y Giselle, 2005). De éstas, sólo 12 especies son nectarívoras y pertenecen a ocho géneros de la subfamilia Glossophaginae (Arita y Santos Del Prado, 1999; Ceballos y Giselle, 2005). Generalmente se encuentran en zonas secas y tropicales, en las que hay temperaturas altas y precipitación baja, en bosques caducifolios o subcaducifolios y zonas desérticas y/o de arbustos espinosos.

Musonycteris harrisoni y *Glossophaga morenoi* son endémicas del país. *Hylonycteris underwoodi* y *Glossophaga leachii* son endémicas de América Central incluyendo la zona sur del país. *Choeronycteris mexicana* y *Leptonycteris nivalis* cuentan con una distribución restringida, sin embargo abarcan gran parte del territorio nacional incluyendo adicionalmente un par de localidades al sur de los Estados Unidos y en Centroamérica. Las especies *Anoura geoffroyi*, *Choeroniscus godmani*, *Glossophaga commissarisi*, *G. soricina*, *Leptonycteris yerbabuena* (*curasoe*) y *Lichonycteris obscura* se distribuyen desde México hasta Brasil (Arita y Santos Del Prado, 1999).

De las especies de murciélagos mencionadas anteriormente, *Leptonycteris yerbabuena*, *L. nivalis*, *Choeronycteris mexicana*, así como especies del género *Glossophaga* han sido reportadas como polinizadores de agaves (Álvarez y González-Quintero, 1970; Easterla, 1972; Howell, 1979; Howell y Hart, 1980; Howell y Roth, 1981; Arizaga *et al.*, 2000; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; Scott, 2004; Rocha *et al.*, 2005). Por tanto, se ha sugerido que la pérdida o disminución de las poblaciones de murciélagos nectarívoros puede ocasionar un impacto negativo para algunas especies de plantas importantes en la agricultura así como en comunidades de plantas silvestres (Allen-Wardell *et al.*, 1998).

1.3 Historia evolutiva de los murciélagos

La historia evolutiva del orden ha sido muy discutida. Se ha propuesto un origen distinto de los subórdenes que lo componen, sin embargo la mayoría de los autores aceptan la monofilia del grupo (Baker *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 2001; Neuweiler, 2000; Lim y

Penny, 2001; Teeling *et al.*, 2001; Springer *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002; Teeling *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005; Jones y Teeling, 2006).

La edad de origen y diversificación no han sido determinados, aunque se ha propuesto un aproximado de 58 millones de años (m. a.) para el origen de los cuatro grandes linajes de murciélagos que cuentan con capacidad de ecolocalización (Teeling *et al.*, 2009), tiempo que corresponde al Eoceno Temprano, periodo que coincide con eventos de diversificación de algunos grupos de angiospermas e insectos, así como un aumento en la temperatura global (Neuweiler, 2000; Teeling *et al.*, 2005). El fósil más antiguo considerado como un murciélagos verdadero es *Onychonycteris finneyi* (Simmons *et al.*, 2008), el cual cuenta con estructuras de ecolocalización al igual que los microquirópteros y ha sido encontrado en el Eoceno Temprano en Norteamérica (Simmons *et al.*, 2008). Su morfología indica que era capaz de volar, implicando que la transición entre su ancestro no-volador y los primeros murciélagos voladores, ocurrió hace 40 y 55 m. a. atrás. Sin embargo no se cuenta con el registro de sus ancestros. Hasta ahora, el registro fósil más antiguo en Sudamérica corresponde al Eoceno Medio o Tardío en Santa Rosa, Perú y Laguna Fría, Patagonia (Tejedor *et al.*, 2005).

Los hábitos nocturnos del Orden también han sido analizados, se presume que los murciélagos forrajean en la noche, debido a su fisiología y sus respuestas al calor, a la competencia con las aves y la depredación que podrían sufrir, aunque la mayoría de los frutos presentan condiciones más favorables durante lapsos con mayor luz de sol y los insectos se encuentren en mayores cantidades por la mañana y al atardecer (Rydell y Speakman, 1995). Se ha propuesto que la estrategia original de forrajeo en Microchiroptera fue cazar insectos en vuelo (Koopman, 1981). Acorde con esto, 80 de los 186 géneros se alimentan principal o exclusivamente de insectos que capturan de esta forma (Rydell and Speakman, 1995; Wetterer *et al.*, 2000).

Actualmente, el origen de cada uno de los dos grandes subórdenes de quirópteros (Megachiropteros y Microchiropteros) no se ha aclarado del todo, ya que como se mencionó anteriormente, el fósil de *Onychonycteris finneyi* cuenta con caracteres propios de los microquirópteros y la primera especie considerada como megaquiróptero se encontró en África, *Prototto leakeyi*, ubicada en el Mioceno, hace aproximadamente 25 m. a. (Kirsch y Lapointe, 1997; Gunell y Simmons, 2005), debido a que *Onychonycteris finneyi* cuenta

con características de los dos subórdenes antes mencionados, se han propuesto nuevas formas para explicar la evolución del grupo. Es así que Teeling y colaboradores (2005) ofrecen una propuesta que agrupa a las familias en dos subordenes nuevos Yangochiroptera y Yinpterochiroptera.

Al igual que otros mamíferos (Alroy *et al.*, 2000), la diversificación de los murciélagos filostómidos se considera una “radiación adaptativa”, basados en su diversidad de hábitos alimenticios y en los distintos hábitats que han colonizado de manera exitosa (Jones *et al.*, 2002; Teeling *et al.*, 2005). Cumplen así con las características planteadas por autores que mencionan que una radiación adaptativa es la diversificación de un linaje en especies que explotan una variedad de diferentes tipos de recursos y que difieren en sus características morfológicas y fisiológicas usadas para la explotación de esos recursos (Givnish y Sytsma, 1997).

El origen de la familia Phyllostomidae (endémica de América) se puede establecer en Norteamérica hace 31 a 25 m. a. (Teeling *et al.*, 2005; Dávalos, 2006), ya que se cuenta con un registro fósil en el Oligoceno temprano (Gunell y Simmons, 2005). Sin embargo, con base en información del registro fósil, biogeografía histórica y relaciones de ancestría-descendencia de las familias Noctilionidae, Moormopidae y Phyllostomidae, se considera que estas tres familias surgieron a partir de la superfamilia Noctilionidae (Dávalos, 2006).

Basados en el superárbol de Jones *et al.*, (2002), Teeling *et al.*, (2005) estimaron el tiempo de divergencia en el nodo basal del orden, calculando un intervalo de 57.9-61.7 m.a. para Chiroptera y 27.4-28.1 m. a. para la familia Phyllostomidae. El nodo basal entre mormópidos y filostómidos va de 37.1-38.8 m. a., dichos grupos se han clasificado dentro de la superfamilia Noctilionidae y parte de su distribución se traslapa en Centroamérica.

Se cree que los filostómidos nectarívoros evolucionaron a partir de los filostómidos insectívoros en el Mioceno tardío, cuando los mamíferos terrestres pequeños ya se habían establecido. Por otra parte, su coevolución con plantas se considera amplia y difusa (Wetterer, 2000; Flores, 2007; Simmons *et al.*, 2007).

Una característica de esta familia que llama la atención es que entre las especies agrupadas en este taxón se encuentran todos los hábitos alimenticios (como son el consumo de insectos, vertebrados pequeños, néctar, frutos, polen y sangre) que se conocen para todo el orden Chiroptera. El hábito de alimentación a base de néctar ha aparecido más de una

vez en la historia evolutiva del orden y establecer el origen de este tipo de alimentación se ha complicado conforme el avance en la reconstrucción de nuevas filogenias. Algunos autores plantean que el hábito ha pasado de frugivoría a nectarivoría y de regreso nuevamente al consumo de frutos (Kirsh y Lapointe, 1997). En este sentido, diferentes autores han planteado que el carácter ancestral del hábito alimenticio en la familia Phyllostomidae es el consumo de insectos (Gillete, 1975; Ferrarezi y Gimenez, 1996; Wetterer *et al.*, 2000).

1.4 Estudios filogenéticos y evolutivos en Chiroptera

El estudio de los murciélagos ha sido abordado desde distintas áreas de la biología. Se cuenta con trabajos referentes a su fisiología, ecología e historia evolutiva. Este último enfoque ha tenido como objetivo primordial resolver el origen y diversificación del orden Chiroptera (Baker *et al.*, 1989; Rydell y Speakman, 1995; Kirsh y Lapointe, 1997; Wetterer *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2001; Lewis-Oritt *et al.*, 2001; Springer *et al.*, 2001; Cartens *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2002; Teeling *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003; Overton y Rhoads, 2004; Eick *et al.*, 2005; Gunell y Simmons, 2005; Jones *et al.*, 2005; Teeling *et al.*, 2005; Hoffer y Baker, 2006; Dávalos, 2006; Lin y Penny, 2006; Jones y Teeling, 2006; Dávalos, 2007; Lim, 2007; Porter *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2008; Fleming *et al.*, 2009).

Actualmente se considera que el orden Chiroptera está relacionado con los primates, musarañas y lémures voladores (*flying lemurs*), en el taxón Archonta (Adkins y Honeycutt, 1991). A partir del registro fósil, se puede inferir que los murciélagos sufrieron cambios muy rápidos relacionados con eventos de diversificación de grupos de angiospermas y sus insectos asociados (Lin y Penny, 2006). Con base en las relaciones filogenéticas de los murciélagos, tal como ocurre con el grupo de lémures, se asume que el ancestro común fue un insectívoro (Kirsh y Lapointe, 1997; Lin y Penny, 2006). A partir de este ancestro la diversificación en formas de alimentación ha sido muy marcada.

En general, se considera que las relaciones filogenéticas del Orden Chiroptera a niveles superiores están bien resueltas y que es un grupo monofilético (Baker *et al.*, 1989; Neuweiler, 2000; Teeling *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando se va profundizando en la relación que existe entre las diferentes subfamilias, familias y géneros, la situación

comienza a complicarse.

Se han propuesto diferentes fechas de origen y/o divergencia para algunos grupos dentro de la familia Phyllostomidae (Gillete, 1975; Baker *et al.*, 1989; Heithaus, 1998; Baker *et al.*, 2000; Hoffman y Baker, 2001; Cartens *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003; Dávalos y Jansa, 2004; Dávalos, 2005; Eick *et al.*, 2005; Gunell y Simmons, 2005; Jones *et al.*, 2005; Jones y Teeling, 2006; Dávalos, 2007; Hoffman *et al.*, 2008). En esta familia se encuentran los miembros del grupo Glossophaginae y especies relacionadas, considerados especialistas en visitar flores (Gillete, 1975; Howell, 1979; Howell y Hart, 1980; Heithaus, 1998).

En los últimos años se ha dado mayor énfasis al estudio de las relaciones que los murciélagos mantienen con otros organismos, tales como los insectos (Rydell *et al.*, 1996; Williams-Gullén *et al.*, 2008; Schnitzler y Kalko, 2009) y las plantas a las que polinizan (Fleming, 1988; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003). A pesar de que son pocas las especies de murciélagos que se consideran polinizadores especializados, son de suma importancia para la polinización de flores de varias especies de plantas (Howell, 1979; Howell y Hart, 1980; Koopman, 1981; Kunz, 1982; Lobo *et al.*, 2005; Martén-Rodríguez y Fenster, 2008).

Entre las relaciones más estrechas que se conocen de murciélagos nectarívoros y plantas, se encuentra la polinización de los agaves, la cual ha sido abordada desde una perspectiva filogenética encontrando evidencias de procesos coevolutivos entre estos grupos (Flores, 2007; Munguía-Rosas *et al.*, 2009). Además se conocen otras relaciones ecológicas con plantas polinizadas por murciélagos (Kunz, 1982; Lobo *et al.*, 2005; Martén-Rodríguez y Fenster, 2008), las cuales bien podrían ser resultado de procesos similares.

2. Inferencias Filogenéticas Moleculares

La inferencia filogenética estudia las relaciones ancestría-descendencia entre las especies a partir de diferentes fuentes de información. En sus comienzos, el estudio filogenético se basaba en la comparación de características morfológicas definiendo el carácter ancestral a partir del cual se derivaban los demás estados de carácter, para finalmente asumir que divergieron de un ancestro común (Morrone, 2001; Llorente, 2003).

Con el desarrollo de las técnicas moleculares que permitieron usar el ADN para estudios evolutivos, se abrió otra ventana en la inferencia de las relaciones entre especies, complementando el estudio con caracteres ecológicos, fisiológicos y de comportamiento.

En los estudios filogenéticos se utilizan datos homólogos, es decir caracteres que provienen del mismo carácter ancestral. Para decidir si los nucleótidos son homólogos, se requiere conocimiento de las relaciones evolutivas entre las secuencias que son comparadas (Page y Holmes, 1998). La homología significa "equivalencia de partes", siendo el procedimiento empleado para establecer comparaciones taxonómicas válidas. A partir del concepto de homología se desprenden la idea de la "homología primaria" (generación de hipótesis), la cual es una conjetura sobre la correspondencia entre partes de distintos organismos y; la homología secundaria (legitimación de hipótesis) representa la contrastación de dicha conjetura, a través de la congruencia en el cladograma (Hawkins *et al.*, 1997).

Realizar un muestreo para un estudio molecular puede ser difícil por el costo de la secuenciación, la necesidad de material relativamente fresco, la inaccesibilidad de las áreas donde se distribuyen algunas de las especies, y que además no se cuenta con ADN fósil (Rentería, 2005). Sin embargo, la información obtenida a partir de estos análisis puede ser relacionada con eventos de especiación o cladogénesis, distribuciones históricas y/o "ritmo de cambio" en las especies (Givnish and Sytsma, 1997; Page y Holmes, 1998).

2.1 Métodos probabilísticos con Modelos de Sustitución

Los métodos que se han desarrollado para construir filogenias a partir de datos moleculares pueden ser clasificados en dos grandes grupos: los de distancia y los de caracteres discretos (Page y Holmes, 1998; Nei y Kumar, 2000). La diferencia entre ambos grupos de métodos radica en el tratamiento de los datos. Los métodos de distancia (UPGMA, "minimum evolution" y "neighbor joining") convierten las secuencias previamente alineadas, en matrices de distancias pareadas, es decir en diferencias de bases nucleotídicas. Los métodos basados en caracteres discretos consideran cada sitio directamente (Page y Holmes, 1998; Nei y Kumar, 2000). En este grupo de métodos encontramos el de parsimonia (el cual no considera modelos de sustitución), máxima verosimilitud (maximum likelihood) y los métodos Bayesianos (Page y Holmes, 1998; Nei

y Kumar, 2000; Huelsenbeck *et al.*, 2001).

Los modelos de evolución de secuencias incorporados a los métodos de inferencia filogenética molecular han sido desarrollados para explicar el patrón de cambio de nucleótidos o aminoácidos a través del tiempo. Ayudan a estimar parámetros como la longitud de rama, la cual más adelante puede ser utilizada para hacer un estimado de los tiempos de divergencia (Goldman, 1993).

Las sustituciones o mutaciones que ocurren en el ADN se consideran azarosas, sin embargo, se han localizado regiones que son más susceptibles a éstos cambios (hot spots) y también se han detectado diferencias en las frecuencias de transiciones y transversiones (Hedrick, 2005), por lo que la distribución de probabilidad se aleja del modelo Poisson (propuesto por Kimura en la teoría neutral). Actualmente el modelo que se utiliza con mayor frecuencia es la distribución gamma (Γ), debido a la flexibilidad de formas que ésta presenta (Sanderson, 1997). La fórmula que representa ésta distribución es:

$$f(t) = \int_0^t e^{-t} t^{a-1} dt$$

La distribución gamma dependerá del parámetro a . Cuando $a = 1$, r es el mismo para todos los sitios. Cuando $a = 1$, r se asemeja a una distribución exponencial, indicando que r varía extensivamente de un sitio a otro. Cuando $a < 1$, la distribución r se parece a una distribución logarítmica y una proporción sustancial de sitios muestra un valor de r cercano a 0 y prácticamente invariable (Nei y Kumar, 2000). Cuando r varía siguiendo la distribución gamma, es posible estimar el número de sustituciones por sitio. Para hacer esto, consideramos la probabilidad de aminoácidos idénticos en un sitio dado entre dos secuencias en un tiempo t (Nei y Kumar, 2000).

Debido a que pueden ocurrir seis diferentes tipos de sustituciones de nucleótidos en un mismo sitio, se desarrollaron los modelos de sustitución. Los tres modelos más usados son Jukes-Cantor (JC), el cual asume que las cuatro bases o nucleótidos tienen la misma frecuencia y por ende la misma probabilidad de cambio, Kimura 2 parámetros (K2P), que considera que las transversiones y transiciones tienen una probabilidad desigual de ocurrir, Felsenstein (F81), el cual asume que hay diferencias en las frecuencias de nucleótidos en las secuencias, y el modelo general de tiempo-reversible (GTR), siendo éste último el que permite distintas probabilidades de cambio entre las diferentes bases nucleotídicas, por tal motivo se considera uno de los más complejos. Se han desarrollado

otros modelos que consideran a más de uno de los modelos descritos anteriormente, tales como el HKY85, el cual incorpora el K2P y el F81 (Page y Holmes, 1998; Posada y Crandall, 2001), entre otros.

2.2 Inferencia Bayesiana.

Los métodos bayesianos aplicados al análisis filogenético buscan obtener lo que conocemos como “probabilidad posterior o distribución posterior”, la cual es la distribución de probabilidad de los parámetros en el espacio, dados los datos y el *prior* bajo un modelo elegido (Ronquist *et al.*, 2010). El teorema bayesiano se explica como la probabilidad posterior proporcional al producto de la probabilidad *a priori* y de la verosimilitud. La probabilidad posterior de un árbol *i*, incluyendo las longitudes de sus ramas y un modelo de sustitución, (todo lo cual ponemos como $\text{Pr}[\text{árbol } i|\text{datos}]$) estará dada a partir de la probabilidad que le asignamos antes de hacer cualquier observación (Martínez, 2007).

La inferencia bayesiana aplicada a al cálculo de filogenias arroja como resultado la probabilidad posterior de un parámetro, un árbol filogenético y un modelo evolutivo, basándose en una probabilidad anterior y la función de verosimilitud de los datos. En un análisis bayesiano se consideran varias historias posibles de sustitución, ponderadas por su probabilidad de ocurrencia bajo un modelo específico de evolución (Huelsenbeck *et al.*, 2001; Drummond y Rambaut, 2007). Sin embargo, los tiempos computacionales son muy largos debido a que se tendrían que explorar un universo de posibilidades que aumenta en función de los datos dados, por lo que los programas no resuelven el algoritmo bayesiano, si no que exploran el universo de árboles mediante cadenas de Markov (MCMC: Markov Chain Monte Carlo), con lo cual se optimiza el tiempo computacional (Huelsenbeck *et al.*, 2001; Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Drummond y Rambaut, 2007).

La probabilidad posterior más alta es la considerada como el mejor estimado. Usualmente todos los árboles son considerados *a priori* como igualmente probables y la verosimilitud es calculada bajo uno de un número de modelos estándar de Markov de evolución de carácter (Martínez, 2007).

La búsqueda mediante MCMC consiste en dos pasos básicos:

1. Comienza la cadena de Markov con un árbol, que puede ser propuesto al azar.

2. Este árbol es aceptado o rechazado con una probabilidad.
3. El nuevo árbol es aceptado con una probabilidad determinada por el algoritmo Metropolis-Hastings.
4. Un número uniforme al azar es generado en un intervalo de 0,1. Si éste número es menor al cálculo de R (cálculo del algoritmo Metropolis-Hastings) entonces el nuevo estado es aceptado. De otra forma la cadena se mantiene con el primer árbol.
5. Se regresa al paso 2, este ciclo se repite miles de millones de veces (Huelsenbeck *et al.*, 2002).

En el análisis bayesiano se calcula la verosimilitud de las filogenias obtenidas incluyendo topología, longitudes de ramas y demás parámetros del modelo elegido; estos se mantienen como posibilidades, por un lado las filogenias estimadas y por otro los valores de los parámetros estimados con su verosimilitud asociada. El número de puntos de inicio de búsqueda depende del número de generaciones que se soliciten, mientras que el número de árboles incluidos en el archivo de salida depende de la frecuencia de muestreo (Ronquist y Huelsenbeck, 2003; Drummond y Rambaut, 2007).

2.3 Marcadores Moleculares

Actualmente, los estudios evolutivos se pueden realizar usando caracteres morfológicos y/o moleculares para establecer hipótesis filogenéticas entre los organismos y para poner a prueba hipótesis de adaptaciones ecológicas. Existe controversia por el uso de uno u otro tipo de caracteres, sin embargo, en trabajos donde se pretende obtener información referente al pasado de un grupo, y que además no cuenta con registro fósil, se tienen que usar herramientas moleculares (Magallón, 2004).

Algunas de las ventajas que nos dan los caracteres moleculares es que se consideran universales, y a diferencia de los caracteres morfológicos, no se consideran arbitrarios (Rentería, 2005) puesto que no se pondera el carácter a criterio del investigador. Los datos moleculares también tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación, mientras que ésta es asumida en la mayoría de los caracteres morfológicos (Rentería, 2005). En contraparte, se ha criticado el uso de estos marcadores, principalmente por la diferencia en las tasas de mutación. En respuesta a las críticas se han desarrollado modelos que relajan los supuestos del reloj molecular, en donde diferentes estados de

carácter pueden ser marcados por secuencias de varias regiones de ADN tan bien como por genes en arreglos y la presencia de indels (Grechko, 2002). Una forma de saber si un marcador molecular es óptimo para la reconstrucción filogenética es comparando la congruencia con otras filogenias basados en otros caracteres ya sean moleculares y/o morfológicos (Farias *et al.*, 2001).

Entre los marcadores más utilizados para establecer relaciones filogenéticas entre las especies animales se encuentran los genes mitocondriales y nucleares, recomendándose incluso el uso simultáneo de ambos ya que utilizar uno solo puede traer consigo sesgos de linaje, hibridación introgresiva y retención de polimorfismos ancestrales (Irwin *et al.*, 1991; Grechko, 2002).

ADN Nuclear (ADNn)

En eucariontes, la mayor parte de la información genética se encuentra contenida en el núcleo de la célula. El ADNn se encuentra empaquetado y asociado a proteínas (histonas), conformando los cromosomas (Berg *et al.*, 2008). Contiene regiones únicas (es decir una sola copia) y no únicas (duplicadas o regiones repetitivas). Se considera que los organismos diploides tienen dos copias de cada región genética (locus) en los pares homólogos de los cromosomas, llamados alelos, sin tener en cuenta si contienen regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones o regiones intergénicas).

En el caso de los mamíferos, uno de los marcadores nucleares más utilizados para la reconstrucción filogenética es el gen nuclear conocido como *RAG2* (Recombination Activating Gene-2). Los genes conocidos como *RAG1* y *RAG2* pertenecen al complejo V(D)J de recombinación, se consideran un par de genes importantísimos para la inmunidad adaptativa. Son homólogos en los vertebrados e invertebrados (de Camargo y Alves, 2005).

Los genes RAG's están compuestos por una secuencia larga de ADN. El gen *RAG2* cuenta con 1363 pares de bases; muestran altos niveles de conservación en la secuencia; hay ausencia de intrones; son ortólogos; y se han mantenido del mismo tamaño a lo largo de su historia evolutiva, por lo que se consideran buenos marcadores para reconstrucciones filogenéticas (de Camargo y Alves, 2005).

ADN mitocondrial (ADNmt)

El material genético de mitocondria es especialmente importante para historias filogeográficas y de estructura poblacional genética estrechamente relacionada al linaje, debido a su herencia uniparental y permite también inferir cambios demográficos y de dispersión entre especies (Rentería, 2007). En algunos casos, el ADNmt ha evolucionado de 5 a 10 veces más rápido que el ADN nuclear, dependiendo del taxón y la región del ADNmt (Grechko, 2002). Algunos trabajos como el de Brown et al., (1982), han confirmado la existencia de tendencias de sustitución en el ADNmt de tal forma que se ha propuesto una tasa de divergencia de 2% por millón de años, sin embargo, no en todos los genes mitocondriales se cumple dicha tasa, como en el *citocromo-b* (Krajewski y King, 1996).

Desde Kocher *et al.*, (1989) el gen mitocondrial *citocromo-b* (1104 pb) ha sido empleado en reconstrucciones filogenéticas de aves, mamíferos y peces (Krajewski y King, 1996; Magoulas *et al.*, 1996; Moore, 1995; Farias *et al.*, 2001; Lewis-Oritt *et al.*, 2001; Agneresson *et al.*, 2011). Este gen es apreciado como un buen marcador con modelos que consideran heterogeneidad en las tasas de sustitución (Ballard y Rand, 2005), ya que muestra posiciones en los codones que evolucionan rápido y lento, regiones conservadas y regiones más variables, así como dominios (Farias *et al.*, 2001). Ha sido utilizado para establecer hipótesis de relaciones ancestría-descendencia entre genes de géneros de la familia Phyllostomidae, tales como *Artibeus*, *Carollia*, *Chiroderma*, *Dermanura*, *Enchisthenes*, *Koopmania*, *Phyllostomus* y *Rhinophylla* (Irwin *et al.*, 1991).

2.4 Estimación de los tiempos de divergencia en filogenias moleculares

Los métodos moleculares para la construcción de filogenias, además de proporcionar información de relaciones genealógicas entre especies, son una herramienta que permite discernir de manera numérica las diferencias entre dos o más secuencias. Esta característica ha sido muy utilizada para medir los tiempos de divergencia, basándose en el supuesto del reloj molecular.

La hipótesis del reloj molecular fue introducida en los años 1960's (Zuckerkandl y Pauling, 1965), y considera que las secuencias de ADN evolucionan a una tasa constante y de tal forma que dos o más secuencias diferentes pueden ser usadas para calcular el total del tiempo que ha pasado desde que divergieron una de la otra (Sanderson, 1997; Page y

Holmes, 1998; Nei y Kumar, 2000; Freeland, 2005). Esta idea fue apoyada posteriormente con la teoría neutral propuesta por Motoo Kimura (1968).

Actualmente se conoce que las tasas de sustitución en el genoma no son constantes, entre las razones por las cuales las tasas no son constantes a lo largo del tiempo tienen que ver con los tiempos generacionales, tasas metabólicas (con una tasa metabólica mayor, la síntesis de ADN aumenta, y en consecuencia las tasas de mutación nucleotídica), tasas de mutación y diferencias entre la fidelidad de la replicación y maquinaria de reparación; y el tamaño poblacional, ya que la deriva génica es mayor en poblaciones pequeñas (Rutschmann, 2006; Martin y Palumbi, 1993).

En la práctica, al estimar los tiempos de divergencia, uno de los principales errores es asumir una tasa de sustitución constante, por lo cual se debe aplicar una prueba de hipótesis de reloj molecular (Sanderson, 1997; 2002). Los métodos de cálculo de reloj molecular consideran el largo de rama así como la tasa de sustitución para estimar los tiempos de divergencia, por lo que se sugiere fijar una fecha absoluta a partir de la cual se estime el resto de los tiempos de divergencia (Magallón, 2004). Esta fecha debería idealmente ser obtenida a partir de información que es independiente de los datos moleculares. Por ejemplo, a partir del registro fósil o un evento geológico conocido, como la emergencia de una isla (Freeland, 2005; Page y Holmes, 1998), así las fechas relativas obtienen el carácter de fechas absolutas. El siguiente paso es calcular la divergencia en las secuencias que ha ocurrido desde ese momento (Sanderson, 2002; Magallón, 2004).

En la actualidad, se cuenta con métodos de estimación de tiempos de divergencia que consideran heterogeneidad en las tasas de sustitución entre linajes, como los propuestos por Sanderson (1997, 2002) y Drummond y *et al.*, (2006) en los cuales se “relaja” la hipótesis de reloj molecular. Uno de los programas más populares actualmente es el programa BEAST. Posiblemente la característica más distintiva de BEAST es su enfoque en la calibración de filogenias y genealogías, es decir, los árboles que incorporan una escala de tiempo. Esto se consigue modelando explícitamente la tasa de evolución molecular en cada rama en el árbol. En el nivel más simple esto puede ser una tasa uniforme en el árbol (por ejemplo, en el caso de un reloj molecular estricto) con esta tasa conocida o estimada. Sin embargo, uno de los recientes avances en las filogenias moleculares ha sido la introducción de los modelos de "reloj molecular relajado" que no asumen la tasa constante.

BEAST (Drummond y Rambaut, 2007).

2.5 Tasas de Diversificación

El estudio de las filogenias basadas en caracteres moleculares, además de formular hipótesis de relaciones ancestría-descendencia, permite explorar fenómenos de diversificación. En años recientes se han propuesto diferentes análisis para estimar las tasas de diversificación basados en diferentes modelos (Nee, 2001; Chan y Moore, 2002; Rabosky, 2006a,b), de los cuales, el más utilizado es el llamado “modelo nulo” de nacimiento-muerte propuesto por Kendall, en el cual se asumen tasas de crecimiento y extinción constantes (Nee et al, 1994; Nee, 2001; Magallón, 2004; Nee, 2006).

Mediante el uso del modelo nulo y una filogenia molecular dada en un estudio, Rabosky (2006a, b) propone como herramienta estadística la verosimilitud para inferir las tasas de diversificación de un clado. Se pone a prueba la hipótesis de que los datos observados en una filogenia se generen con una tasa constante o variable temporalmente mediante la implementación del modelo de nacimiento-muerte (Rabosky, 2006a; Rabosky y Lovette, 2008).

El programa LASER (Rabosky, 2006b) estima la tasa de especiación mediante el cálculo de la verosimilitud en distintos modelos macroevolutivos, en los que se pueden considerar los modelos de: nacimiento puro y nacimiento-muerte bajo una tasa constante (RC) así como nacimiento puro con una o dos tasas de diversificación (modelos yule 2 o 3), denso-dependientes (nacimiento puro hasta la capacidad de carga K), y nacimiento-muerte con tasas variables RV. La verosimilitud de cada modelo es comparada bajo el criterio de información de Akaike (AIC), el cual es una función del logaritmo de la verosimilitud (Rabosky, 2006a; Flores, 2007).

2.6 Filogenias moleculares y radiaciones

Como se mencionó anteriormente, una radiación adaptativa es la diversificación de un linaje o una especie que explota una variedad de recursos y que, posteriormente, difieren en características morfológicas o fisiológicas usadas para explotar tales recursos (Schluter, 1996; Givnish y Sytsma, 1997). Schluter (1996) considera que la evolución en las diferencias ecológicas, entre los organismos, muestran radiación adaptativa.

Aunque la idea de radiación adaptativa ya estaba implícita en “El Origen de las Especies” de Darwin, fue Henry Fairfield Osborn (1902) quien acuñó el concepto y Simpson (1953) incorporó la idea de “innovación clave” como eje central en la idea de la radiación (Givnish, 1997). Con los estudios de David Lack (1940, 1947) la “radiación adaptativa” adquirió su sentido ecológico incorporándose a la síntesis de la teoría evolutiva (Givnish, 1997). La idea de radiación adaptativa, de manera intrínseca, se asocia con la selección natural, de esta forma se consideran tres procesos fundamentales:

1. La diferenciación del fenotipo (morfolología y/o fisiología) entre poblaciones y/o especies causada por diferencias en los recursos disponibles en el ambiente.
2. Diferenciación fenotípica causada por competencia por los recursos (divergencia en el despliegue de los caracteres). Diferencia en presiones selectivas.
3. Especiación ecológica. Se considera como el aislamiento reproductivo a consecuencia de la divergencia por la selección natural y competencia por el recurso (Schluter, 1996).

La sistemática molecular aporta herramientas en el estudio de la radiación adaptativa. Esta disciplina, en conjunto con la ecología, biogeografía, paleontología y evolución molecular se ha convertido en una herramienta con gran potencial para esclarecer hipótesis evolutivas que nos permitan determinar las formas de especiación de un grupo (Givnish y Systma, 1997; Sanderson *et al.*, 2004).

2.7 Nicho Conservado

Un aspecto ecológico importante para entender la historia evolutiva de las especies es su distribución. En este sentido, algunos autores han desarrollado la idea del nicho conservado, en la cual se dice que la conservación del nicho ecológico en periodos evolutivos moderados refleja el modo de especiación del grupo (Peterson *et al.*, 1999) y que ciertas condiciones (bióticas y/o abióticas) pueden mantenerse en largas escalas de tiempo evolutivo (Wiens and Graham, 2005). El nicho ecológico se entiende bajo la propuesta hecha por Grinnell (1917), quien lo define como las condiciones medioambientales en las cuales una especie se puede reproducir. Algunos autores han explorado la idea del nicho conservado utilizando información climática para determinar si hay congruencia de éstos

con las relaciones filogenéticas propuestas (Prinzing *et al.*, 2001; Wiens, 2004; Wiens y Graham, 2005).

Cuando la idea de nicho conservado es aplicada en aspectos filogenéticos, los autores consideran que especies hermanas mostrarán mayores similitudes en algunas condiciones, tal como lo planteaba Darwin (Wiens, 2004; Wiens y Graham, 2005; Losos, 2008).

Para el caso de la familia Phyllostomidae, se han realizado trabajos como el de Stevens (2011), en el cual explora la idea del nicho conservado estimando diversidad filogenética, así como un análisis de componentes principales para algunas de las variables climáticas de temperatura y humedad. Este trabajo concluye que hay una correspondencia entre los taxones más jóvenes dentro de la familia a los extremos de su distribución así como una relación importante entre la temperatura y la diversidad de la familia Phyllostomidae.

II. Justificación

Uno de los aspectos que se desean clarificar con la presente investigación es la aparición de la nectarivoría en la familia Phyllostomidae. Como se ha mencionado anteriormente dentro de esta familia se encuentran miembros que se alimentan de insectos, sangre, frutos, néctar y carne (Wetterer *et al.*, 2000). Se han realizado pocos trabajos que profundicen en el estudio de la evolución en el consumo de néctar (Gillete, 1975; Ferrarezi y Giménez, 1996; Wetterer *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2012). En estos trabajos se sugiere que la condición ancestral de alimentación en Phyllostomidae es la insectívora. Otro aspecto a destacar es que los estudios filogenéticos proponen clados independientes para cada tipo de dieta, es decir, que las especializaciones correspondientes han ocurrido en diferentes tiempos por reversiones y convergencias como lo es la pérdida del hábito nectarívoro en especies de los géneros *Phyllostominae* y *Stenodermatinae*; y/o que algunas especializaciones como la carnivoría evolucionaron más de una vez (Kirsch y Lapointe, 1997; Wetterer *et al.*, 2000). El estudio de los hábitos alimenticios en murciélagos es muy importante para determinar tanto las relaciones específicas así como los patrones evolutivos que han seguido.

Los marcadores moleculares son óptimos para resolver la historia evolutiva de los murciélagos filostómidos, ya que en principio son independientes de las características morfológicas (a menos que sean directamente los involucrados en su codificación), son más abundantes y más fáciles de analizar. Sin embargo, no se puede definir solo con base en las hipótesis filogenéticas en qué momento aparecieron los diferentes hábitos alimenticios. Para resolver esta cuestión es necesario hacer uso del cálculo de los tiempos de divergencia, datos ecológicos y cuidadosos mapeos de caracteres y análisis de la evolución de los mismos.

III. Hipótesis

a) La diversificación de los murciélagos nectarívoros está relacionada con diversos eventos geológicos, ecológicos, climáticos y/o biológicos (i.e., radiaciones de grupos de plantas).

b) La aparición del hábito alimenticio basado en néctar, ocurrió en más de una ocasión dentro de la familia Phyllostomidae.

IV. Objetivos

Objetivo general:

Proponer una nueva hipótesis de la evolución de los murciélagos filostómidos, con énfasis en las especies consumidoras de néctar de México.

Objetivos particulares:

Aportar información al estudio de la evolución de los murciélagos filostómidos utilizando un marcador mitocondrial (*Citocromo-b*) y un marcador nuclear (*RAG2*).

Calcular tiempos de divergencia que nos permitan inferir eventos de diversificación de grupos dentro de la familia Phyllostomidae, y en particular de las especies nectarívoras de México.

Explorar, con base en la idea de nicho conservado, las diferencias que pudieran existir entre especies de acuerdo a su hábito alimenticio.

V. Materiales y Métodos

1. Obtención de Secuencias

Se realizó un muestreo de las especies pertenecientes a la familia Phyllostomidae en el sitio web NCBI (Apéndice 1), considerando a un representante de cada especie de la familia, con la finalidad de analizar la mayor cantidad de especies. Se depuraron las sinonimias, corroborándolas con la clasificación propuesta en el superárbol del orden Chiroptera (Jones *et al.*, 2002) y en Mammal Species of the World (Wilson y Reeder, 2005) manteniendo así un número razonable de OTU's. El objetivo del muestreo en la web de NCBI-Gen Bank fue el de obtener la mayor cantidad de especies nectarívoras para inferir de manera más precisa el momento de la aparición de este hábito alimenticio y poder relacionarlo con otros eventos naturales, ya sea, ecológicos o geológicos conocidos.

Se consideraron principalmente secuencias completas del gen mitocondrial *citocromo-b* (*Cyt-b*, 1140pb) y del gen nuclear *RAG2* (1363pb), aunque en algunas especies se utilizaron secuencias parciales (Apéndice 1).

Para las especies de la subfamilia Glossophaginae, de las cuales no se contaba con información molecular, se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de piel de 22 especies, 15 especies provenientes de dos colecciones zoológicas en México (UAM-Iztapalapa y Facultad de Ciencias, UNAM) y siete del museo Smithsonian Institution en Washington, D.C. y del Museo Americano de Historia Natural, New York, EUA (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplares de museo a partir de los cuales se realizó extracción de ADN

Especie	Museo	No. de Catálogo
<i>Anoura caudifer</i>	Museo Americano de Historia Natural de Nueva York	AMCC 109578
<i>Anoura caudifer</i>	Museo Nacional Historia Natural "Smithsonian Institution"	USNM 581931
<i>Anoura cultrata</i>	Museo Nacional Historia Natural "Smithsonian Institution"	USNM 588022
<i>Anoura geoffroyi</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera"	1009
<i>Choeroniscus godmani</i>	Museo Nacional Historia Natural "Smithsonian Institution"	USNM 578191
<i>Choeroniscus minor</i>	Museo Americano de Historia Natural de Nueva York	AMCC 110453

<i>Choeronycteris mexicana</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”	5969
<i>Glossophaga comissarissi</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”	6879
<i>Glossophaga morenoi</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”	7899
<i>Glossophaga soricina</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”	6839
<i>Hylonycteris underwoodii</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”	1009
<i>Leptonycteris nivalis</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”	7980
<i>Leptonycteris yerbabuena</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”	850
<i>Lichonycteris obscura</i>	Museo Nacional Historia Natural “Smithsonian Institution”	USNM 575499
<i>Lonchophylla thomasi</i>	Museo Americano de Historia Natural de Nueva York	AMCC 110369
<i>Musonycteris harrisoni</i>	Colección de Mamíferos Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa)	
<i>Musonycteris harrisoni</i>	Colección Mamíferos Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”	9489

Como grupo externo se utilizaron representantes de la familia Mormoopidae y Noctilionidae (Apéndice 1), por ser grupos hermanos de la familia Phyllostomidae. Se cuenta con información del registro fósil de dichas familias y adicionalmente se considera que estas tres familias surgieron a partir de la superfamilia Noctilionidae en base a biogeografía histórica y relaciones de ancestría-descendencia (Dávalos, 2003).

2. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó con el kit de Qiagen Dneasy para muestras de museo modificado (Apéndice 3). Se utilizó dicho protocolo debido a que las muestras de piel han sufrido diferentes tratamientos para su conservación, los cuales consisten principalmente de químicos que inhiben tanto la obtención de ADN así como la reacción en cadena de la polimerasa y por otra parte los individuos depositados en museos cuentan con décadas de antigüedad, por lo que en esas condiciones el ADN obtenido se encuentra muy fragmentado. Una vez realizada la extracción del material genético, el producto de ADN extraído fue conservado a -20° C.

3. Amplificación de los genes *Citocromo-b* y *RAG2*

Dado que el ADN obtenido no resultó en una banda intensa y/o clara al ser corrida en un gel de agarosa al 1.5%, se consideró que no se encontraba en óptimas condiciones (estaba sucio y/o degradado), por lo que la amplificación de los marcadores se llevó a cabo usando además primer's internos (Baker *et al.*, 2003).

Se utilizaron como primer's externos o de anclaje los reportados por Steppan y colaboradores (1999) y como primer's internos los reportados por Dávalos y Jansa (2004) para llevar a cabo la amplificación del gen *Cyt-b* (1140 pb; Tabla 2) y únicamente en dirección 3' a 5' forward, es decir en una sola cadena o dirección.

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *Citocromo-b*

Primer	Secuencia	Referencia
L14725*	TGAAAAAYCATCGTTGT	Steppan et al., 1999
H15915*	TCTTCATTTYWGGTTTACAAGAC	
NEW12	GACCCRGACAACCTAMAYCCN	Dávalos y Jansa, 2004
BATH3	GCTAAYCCRGCTCCATATT	
BATL5	TGCCGDGAYGTAACTACGG	
BATH4	CCTACGCAATYTTACGCTC	
RNEW12	CTCCTAGGAGACCCAGACAA	
BATH5	AAGCCAATGCYTATTYTGA	
BATH2	GCTACAGTCATYACCAACCT	
BATL4	TTCTGAGGAGCCACAGTCAT	
RU13	CAYGAAACHGGSTCHAAYAYCC	
Reverse4	ACGCAATCCTACGCTCCAT	

* Primers utilizados para la amplificación del gen completo.

Las condiciones de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) fueron modificadas a partir de las reportadas por Flores (2007), primero se amplificó el gen completo y a partir del producto de la PCR se realizó la secuenciación, con los primers internos (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de programa en termociclador para la PCR, para el marcador *Cyt-b*

Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
95° C	3 minutos	35
96° C	30 segundos	
52° C	1 minuto	
72° C	2 minutos	
72° C	7 minutos	

Por otro lado, la amplificación del gen *RAG2* (1363 pb; Tabla 4), se realizó con los primer's y las condiciones reportadas por Baker y colaboradores (2000; Tabla 5), en las cuales los productos se obtienen en fragmentos de distintas longitudes y en ambas direcciones, 3' – 5' y 5' – 3'. En este caso, la amplificación y la secuenciación se llevaron a cabo con los mismos primers, es decir, cada fragmento amplificado del gen se secuenció independientemente del resto y utilizando los mismos primer's con que fueron amplificados.

Tabla 4. Primers utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *RAG2*

Primer	Secuencia
RAG2-F1	GGCYGGCCCAARAGATCCTG
RAG2-F1Int	GRACAGTCGAGGGAARAGCATGG
RAG2-F1B	ATCCTGCCCACTGGAGTTTTTC
RAG2-F2	TTTGTTATTGTTGGTGGCTATCAG
RAG2-F2B	GTTRTTGTRGTTGGCTATCA
RAG2F2Int	GGAYTCCACTCCCTTTGAAGA
RAG2-R1	AACYTGYTTGTCTCCTGGTATGC
RAG2-R1Int	GGGCAGGCASTCAGCTAC
RAG2-R2	GRAAGGATTTCTTGGCAGGAGT
RAG2-R2Int	GCAGCAWGTAATCCAGTAGC

Los productos se almacenaron a 4° C hasta ser corridos en un gel de agarosa al 1.5%, empleando bromuro de etidio para calcular el tamaño mediante comparación con el marcador (*ladder*) de 100 pb Invitrogen. Todas las reacciones se realizaron con Taq polimerasa (Biogenica) con su respectivo buffer.

Tabla 5. Condiciones de programa en termociclador para la PCR, para el marcador *RAG2*

Temperatura	Tiempo	No. de Ciclos
95°C	2 min	35
90°C	30 seg	
55°C	30 seg	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

Los productos de la PCR fueron secuenciados de manera comercial enviándolos a la Universidad de Washington en High-Throughput Genomics Unit. En dicha secuenciación se utilizaron los mismos primers utilizados en la amplificación. Se enviaron a una concentración de 10 μ M en 10 μ L de producto de PCR y 3 μ M en 10 μ L de primer.

4. Alineación de las secuencias de ADN

Una vez que las secuencias fueron obtenidas, éstas se compararon en una búsqueda (BLAST) en el sitio web de la NCBI GenBank para corroborar su pertenencia a la familia Phyllostomidae y de manera más precisa a la subfamilia Glossophaginae. De esta manera también se comprobó la identidad de los ejemplares de los cuales se tomaron las muestras.

Los fragmentos obtenidos fueron ensamblados en el programa Consed (Edwin et al., 1998) a fin de obtener la secuencia completa de cada gen para cada especie. Posteriormente, todas las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal X (Thompson et al., 1997). Se transformaron a formato Nexus para poder ejecutar el programa BEAST (Drummond y Rambaut, 2007), con el cual se construye una filogenia con probabilidades posteriores y con éste mismo programa se obtuvieron fechas para los nodos. Por último, con el programa DNAsp (Librado y Rosas, 2009) se calcularon parámetros básicos moleculares, tales como el porcentaje G/C, la diversidad nucleotídica y los sitios informativos.

5. Selección del Modelo de Evolución Molecular

Los modelos de evolución son hipótesis sobre los detalles del proceso de sustitución nucleotídica. Para seleccionar el modelo de sustitución en la familia Phyllostomidae para ambos marcadores (*Cyt-b* y *RAG2*), se valoraron los ajustes de cada uno de los genes a todos los modelos disponibles en el programa JMODELTEST, comparándolo con una prueba de verosimilitud LRT y el criterio de Información de Akaike AIC (Posada y Crandall, 1998).

El programa JMODELTEST utiliza, entre otras medidas, el *Likelihood Ratio Test* para comparar dos tipos de modelos de evolución, con base en la verosimilitud como herramienta estadística para explorar entre los modelos de sustitución que más se ajustan a la sustitución entre el set de secuencias. El programa corre con un orden, por ejemplo, puede tomar un modelo simple como el Jukes-Cantor, y se van comparando contra el siguiente modelo, el cual incluye un parámetro más, llegando a los modelos más complejos sucesivamente para determinar cuál de éstos presenta la mayor verosimilitud (Posada y Crandall, 2001).

Para el presente trabajo se utilizaron tres bases de datos distintas. En primer lugar se decidió obtener el modelo de sustitución para cada gen por separado para determinar si la presencia de secuencias indeterminadas causaba o no un sesgo en el modelo de sustitución respecto de la base de datos más robusta, además se pretendió determinar si era necesario marcar particiones al momento de estimar las filogenias, y por último se construyó una base de datos con ambos genes concatenados.

6. Estimación de Filogenias

Basados en métodos bayesianos, se reconstruyó la filogenia para la familia usando como grupo externo individuos de las familias Noctilionidea y Mormoopidae, que son consideradas como grupos hermanos de la familia Phyllostomidae. La filogenia se estimó mediante inferencia Bayesiana utilizando el programa BEAST (Drummond y Rambaut, 2007), con 100,000,000 de cadenas. Este programa permite estimar largos de rama (i.e. número de sustituciones por unidad de tiempo), bajo un modelo de sustitución previamente obtenido a partir de JMODELTEST. En el caso del software BEAST, también permite obtener fechas de divergencias una vez que se han establecido los puntos de calibración

mencionados en apartados anteriores y que, en el presente trabajo, obedecen a criterios de biogeografía histórica y hallazgos fósiles (Czaplewski *et al.*, 2003; Dávalos, 2004 y 2007).

7. Prueba de Hipótesis de Reloj Molecular

Primero es necesario realizar una prueba estadística para inferir si los datos de una filogenia estimada se ajustan a una tasa constante de sustitución, es decir a un reloj molecular. La prueba de hipótesis del reloj molecular consiste en comparar la verosimilitud de una filogenia, en donde el juego de hipótesis a contrastar se infiere a partir de una prueba de cociente de verosimilitudes LRT ($LRT = 2[\ln L_0 - \ln L_1]$) en el cual, $\ln L_0 =$ verosimilitud con reloj molecular y $\ln L_1 =$ verosimilitud sin reloj molecular (Felsenstein, 2004). Las inferencias en esta prueba se realizan al comparar el valor del cociente con el valor de Chi^2 con $n - 2$ grados de libertad (Felsenstein, 2004).

Se aplica la fórmula de LRT para decidir si se rechaza o no la hipótesis nula (reloj molecular). Si la verosimilitud de $\ln L_0$ es visiblemente menor que la verosimilitud de $\ln L_1$, la hipótesis nula será rechazada, ya que se asume que los datos no se ajustan a una tasa constante y por ende se explicarán de mejor manera si se relaja la hipótesis.

8. Estimación de los tiempos de divergencia y origen de clados.

Las secuencias obtenidas tanto de la base de datos del sitio web del NCBI como las obtenidas a partir de las muestras de museo, después de la alineación, fueron guardadas en un archivo en formato nexus (*.nex), mediante el programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009). El archivo en formato nexus fue utilizado para generar un nuevo archivo con extensión *.xml, mediante el programa Beauti, una extensión del programa BEAST, el cual es necesario para realizar el análisis bayesiano.

La fecha estimada por el programa BEAST se obtiene de la media de las fechas obtenidas en todos los árboles. Éste supuesto fue establecido en el programa antes de realizar el análisis. La forma en que se relaja la hipótesis de reloj molecular se conoce como el método lognormal no-correlacionado. En este modelo las tasas asignadas a los puntos medios de las ramas y asume una distribución prior lognormal relacionando al punto medio de la rama ancestral al punto medio de la rama derivada. Las ramas de un árbol son expresadas como el producto entre la tasa de sustitución y el tiempo transcurrido, y por

tanto se asume una distribución particular que puede ser exponencial o log-normal (Drummond *et al.*, 2006). Una distribución lognormal puede ser empleada con la varianza escalada respecto a la longitud de rama en unidades de tiempo, lo que implica cambios en la tasa de evolución a lo largo de la rama. Alternativamente, el uso de una distribución exponencial implicaría cambios ocurridos en los nodos y el tamaño del cambio es independiente de la longitud de rama. Esto es muy similar a la forma en que se trata común la tasa de heterogeneidad entre los sitios (Drummond *et al.*, 2006).

Para resolver los momentos de divergencia dentro de la familia se cuenta con puntos de calibración establecidos para diferentes grupos en trabajos anteriores. Para la familia Phyllostomidae se cuenta con dos antecedentes muy cercanos en un intervalo de 27.4 a 27.6 m. a. (Jones *et al.*, 2005; Flores, 2007) y un tiempo de divergencia respecto de la familia Mormoopidae de 36 m. a. (Czaplewski y Morgan, 2003). Para la subfamilia Glossophaginae se ha reportado una edad de 22.8 m. a. (Teeling *et al.*, 2005; Flores, 2007). Se cuenta además con el registro fósil de un murciélago que pertenece al grupo de los choeronycterinos en Colombia con una edad de entre 12 y 13 m. a., el cual es el más antiguo para éste grupo (Czaplewski *et al.*, 2003), y para el género *Tonatia* hay fósiles con una edad aproximada de 16 m. a. (Czaplewski y Cartelle, 1998).

9. Inferencia de las tasas de especiación

Las tasas de diversificación se calcularon a partir del árbol con el valor con mayor probabilidad posterior, estimado por BEAST con longitudes de rama y con fechas establecidas. Las tasas de diversificación fueron estimadas con el programa LASER (Rabosky, 2006b). Este programa nos permite evaluar si las tasas han sido constantes en el tiempo o si han ocurrido incrementos y/o decrementos en la diversificación.

El programa LASER prueba el ajuste de los datos del árbol con mayor verosimilitud a varios modelos macroevolutivos, entre los que encontramos el modelo de "nacimiento puro", "nacimiento-muerte" y "tasa de extinción"; junto con el criterio de Akaike seleccionamos el que mejor representa el fenómeno de la diversificación (Rabosky, 2006a). Este programa nos permite discernir entre modelos de tasas constantes y otros más complejos, como aquellos que incorporan extinción y variación en las tasas de sustitución en el tiempo.

Con la fórmula propuesta por Bailey (1964) se calcularon las tasas de diversificación promedio para la familia Phyllostomidae y para tres de las subfamilias que la componen:

$$D = (\ln n_1 - \ln n_0) / t$$

Siendo n_1 = Número total de especies actuales, n_0 (ó diversidad inicial) = Número de especies al origen del grupo, que se considera que es 1 porque todas tienen un ancestro común y t = tiempo en escala de millón de años (Bokma, 2003).

10. Análisis de Datos Climáticos

La inferencia filogenética además de permitirnos establecer relaciones entre especies basados en información morfológica y molecular, también nos abre la posibilidad de probar si estas relaciones se pueden asociar a otras características de las especies o categorías superiores, como géneros o incluso subfamilias. Un conjunto de variables que pueden servir para éste tipo de exploraciones son las variables climáticas que para algunos autores forman parte del "set" o conjunto de características del nicho, argumentando que las especies más cercanas entre sí (especies hermanas) compartirán ciertas características de su hábitat y del hábitat de su ancestro común próximo (Losos, 2008), mismas que pueden ser rastreadas con la ayuda de la reconstrucción filogenética.

En uno de los objetivos planteados en el presente trabajo se hace referencia a la exploración de la idea del nicho conservado, utilizando como herramienta principal la información climática de los sitios de colecta de los murciélagos miembros de la familia Phyllostomidae (Wiens y Graham, 2005). Por lo tanto, se construyó una base de datos con características ambientales a partir de los registros de captura de distintas colecciones nacionales e internacionales almacenados en el sitio web GBIF Data Portal, en el cual se ingresó una búsqueda por especie. Una vez que se descargaron todas las referencias, se suprimieron todas las georreferencias repetidas por especie. En el programa gvGIS (2009), se proyectaron las georreferencias en una capa del continente americano, los puntos que no entraban en zonas terrestres se visualizaron y se eliminaron.

Los datos geográficos fueron utilizados para proyectarlos en capas climáticas (Hijmans *et al.*, 2005) que nos permitieran obtener distintas variables coincidentes con la distribución de los murciélagos y (Eckersley *et al.*, 2006; Kozak *et al.*, 2010) de ésta

manera, se obtiene la información climática registrada en cada punto de colecta en todo el continente.

La información de cada variable o capa climática fue ingresada en una nueva base de datos. Se realizó un análisis de componentes principales, en el programa Statistica 8.0, con la finalidad de conocer si una o distintas variables se correlacionaban con la distribución de las especies y también para saber si existe relación ecológica entre especies relacionadas filogenéticamente o por hábitos alimenticios, de acuerdo a la propuesta de consevación de nicho, en la cual las especies más cercanas filogenéticamente pudieran mostrar afinidades ecológicas entre ellas (Prinzing et al., 2004; Wiens y Graham, 2005; Eckersley *et al.*, 2006; Broennimann *et al.*, 2007; Pearman *et al.*, 2008; Nogués-Bravo, 2009).

11. Mapeo de caracteres

Se proyectó un modelo de reconstrucción de caracteres ancestrales con el programa Mesquite, con el método "Trace Character History" (Maddison y Maddison, 2011), éste método nos muestra, a través de un código de colores (arbitrario), en los nodos las verosimilitudes proporcionales de cada estado estado de carácter. Los estados ancestrales de hábito alimenticio fueron reconstruidos sobre la topología de mayor probabilidad posterior, utilizando el método ML, el cual incorpora la información de largo de ramas en la inferencia del estado ancestral. Se construyó una base de datos con caracteres ancestrales basados en información bibliográfica respecto del hábito alimenticio de las especies actuales (Tabla 6).

Tabla 6. Lista de referencias de las cuales se consultaron los hábitos alimenticios de los murciélagos Phyllostomidae

Autor	Año	Grupo de Estudio
Gillete	1975	Chiroptera
Howell	1979	Glossophaginae
Howell y Hart	1980	Glossophaginae
Koopman	1981	Glossophaginae
Fleming	1982	Phyllostomidae

Fleming	1988	<i>Carollia</i>
Rydell y Speakman	1995	Phyllostominae
Valiente-Banuet <i>et al</i>	1996	Glossophaginae
Heithaus	1998	Chiroptera
Arizaga <i>et al</i>	2000	Glossophaginae
Godínez-Alvarez y Valiente-Banuet	2000	
Wetterer <i>et al</i>	2000	Phyllostomidae
Arizmendi <i>et al</i>	2002	Glossophaginae
Freeman	2002	Glossophaginae
Santos y Arita	2002	Glossophaginae
Lobo <i>et al</i>	2005	Glossophaginae
Soto-Centeno y Kurta	2006	Glossophaginae
Dávalos	2007	Stenodermatinae
Flores	2007	Glossophaginae
Fleming y Muchhala	2008	Glossophaginae
Fleming <i>et al</i>	2009	Glossophaginae
Baker <i>et al</i>	2010	Phyllostomidae
Datzmann <i>et al</i>	2010	Phyllostomidae
Rojas <i>et al</i>	2011	Phyllostomidae
Noguiera <i>et al</i>	2012	Phyllostomidae
Rojas <i>et al</i>	2012	Phyllostomidae

Los estados de carácter fueron codificados como 0: insectívoro; 1: frugívoro; 2: nectarívoro; 3: carnívoro y 4: hematófago. No se utilizó el estado de carácter omnívoro debido a la falta de un criterio sólido que determine el grado de especialización o preferencia hacia un tipo específico de alimento. Para el caso de las especies que se consideran omnívoras, en el presente trabajo se les consideró en la categoría de carnívoras debido a la capacidad de consumo de ese recurso. Por otra parte, se carece de un criterio consensuado sobre los hábitos alimenticios de muchas especies, por lo tanto se consideró que un hábito alimenticio es predominante sobre los demás basados en las fuentes bibliográficas disponibles y basados en los criterios mencionados en el trabajo de Wetterer *et al.*, (2000).

La matriz de estados de carácter fue construida en el programa MacClade 4.0 (Maddison y Maddison, 2005). Una vez establecidos los estados de carácter de cada especie

ésta matriz fue cargada junto a la filogenia generada en el programa BEAST, de esta forma el programa Mesquite calcula para cada nodo la verosimilitud del estado de carácter ancestral.

VI. Resultados

1. Muestreo y Secuenciación

La familia Phyllostomidae cuenta con alrededor de 160 especies (según Wilson y Reeder, 2005). De éstas se consideran cuatro subfamilias con miembros que se alimentan de néctar como fuente primaria: Brachyphyllinae, Glossophaginae, Lonchophyllinae y Phylloonycterinae (Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002; Cartens *et al.*, 2002), que incluyen un total de 41 especies nectarívoras (Jones *et al.*, 2002). No se tomaron en cuenta los reportes más recientes de especies nuevas o descritas recientemente con este tipo de hábito alimenticio (Muchhala *et al.*, 2005; Cole y Wilson, 2006; Woodman, 2007; Mantilla-Meluk y Baker, 2008; Dávalos and Corthals, 2008). En el presente trabajo se consideraron a las subfamilias, Brachyphyllinae, Lonchophyllinae y Phylloonycterinae dentro del grupo Glossophaginae, debido a la relación filogenética que mantienen así como el mismo hábito alimenticio.

En el sitio web NCBI, Genbank, se obtuvieron 103 secuencias de especies de la familia Phyllostomidae, todas del gen *citocromo-b* de las cuales siete secuencias pertenecen a la subfamilia Glossophaginae, dos a Brachyphyllinae, dos a Phylloonycterinae y seis a Lonchophyllinae (Tabla 7). En total se utilizaron de éste sitio web 18 secuencias que corresponden a especies con hábitos alimenticios en base al néctar. De la misma fuente se muestrearon especies con información del gen nuclear *RAG2*, de la cual se obtuvieron 81 secuencias de la familia, seis pertenecen Glossophaginae, dos a Phylloonycterinae, dos a Lonchophyllinae y una a Brachyphyllinae para obtener un total de 11 especies con hábitos principalmente nectarívoros.

Tabla 7. Clasificación taxonómica y muestreo de los murciélagos nectarívoros de la familia Phyllostomidae^a

Subfamilia	Género	Especies	Muestreo en Base de Datos/Secuenciación
Brachyphyllinae	<i>Brachyphylla</i>	<i>cavernarum</i>	Gen Bank (Cyt-b y RAG2)
		<i>Nana</i>	GenBank (Cyt-b y RAG2)
Phylloonycterinae	<i>Phylloonycteris</i>	<i>Aphylla</i>	GenBank (Cyt-b y RAG2)
		<i>poeyi</i> *	Sin Información
	<i>Erophylla</i>	<i>bombifrons</i> *	Sin Información
		<i>Sezerkoni</i>	GenBank (Cyt-b y RAG2)
Glossophaginae	<i>Anoura</i>	<i>aequatoris</i> *	Sin Información
		<i>cadenai</i> *	Sin Información

	<i>Caudifer</i>	<i>Citocromo-b, RAG2</i>
	<i>Cultrata</i>	<i>Citocromo-b, RAG2</i>
	<i>Geoffroyi</i>	<i>Citocromo-b</i>
	<i>latidens*</i>	Sin Información
	<i>fistulata*</i>	Sin Información
<i>Choeronycteris</i>	<i>Mexicana</i>	<i>Citocromo-b</i>
<i>Choeroniscus</i>	<i>Godmani</i>	<i>Citocromo-b</i>
	<i>Minor</i>	<i>Citocromo-b</i>
	<i>periosus*</i>	Sin Información
<i>Hylonycteris</i>	<i>underwoodi</i>	<i>Citocromo-b</i>
<i>Lichonycteris</i>	<i>Obscura</i>	<i>Citocromo-b, RAG2</i>
<i>Musonycteris</i>	<i>Harrisoni</i>	<i>Citocromo-b</i> (parcial)
<i>Scleronycteris</i>	<i>ega*</i>	Sin Información
<i>Glossophaga</i>	<i>commissarisi</i>	<i>RAG2</i> (parcial)
	<i>Leachii</i>	Sin Información
	<i>longirostris</i>	GenBank (Cyt-b)
	<i>Morenoi</i>	<i>RAG2</i>
	<i>Soricina</i>	GenBank (Cyt-b y <i>RAG2</i>)
<i>Leptonycteris</i>	<i>curasoae*</i>	Sin Información
	<i>Nivalis</i>	<i>Citocromo-b, RAG2</i>
	<i>yerbabuenae</i>	<i>Citocromo-b</i>
<i>Monophyllus</i>	<i>Plethodon</i>	GenBank (Cyt-b)
	<i>Redmani</i>	GenBank(Cyt-b y <i>RAG2</i>)
<i>Lionycteris</i>	<i>Spurelli</i>	GenBank (Cyt-b y <i>RAG2</i>)
<i>Lonchophylla</i>	<i>Handleyi</i>	Gen Bank (Cyt-b)
	<i>hesperia*</i>	Sin Información
	<i>Mordax</i>	Gen Bank (Cyt-b)
	<i>Robusta</i>	GenBank (Cyt-b y <i>RAG2</i>)
	<i>Thomasi</i>	GenBank (Cyt-b y <i>RAG2</i>)
<i>Platalina</i>	<i>genovesium</i>	GenBank (Cyt-b)

^a Modificado de Carstens *et al.*, 2002. * Especies que no se incluyeron en el presente trabajo.

Se lograron amplificar 17 secuencias, de las cuales 11 corresponden al gen mitocondrial *citocromo-b* y seis al gen *RAG2* (Tabla 7), todas pertenecientes a especies de la subfamilia Glossophaginae. Únicamente las secuencias de la especie *Musonycteris harrisoni* del gen mitocondrial y la secuencia del gen *RAG2* para la especie *Glossophaga comissarissi* se secuenciaron de manera parcial, sin embargo éstas también fueron incluidas

en la reconstrucción filogenética, así como en los análisis posteriores.

En el caso de los datos de distribución geográfica de las diferentes especies de la familia, se obtuvo información para 159 especies, mismas que se sujetaron a una revisión de sinonimias, así como las especies que no se encontraban en la matriz de secuencias.

Se obtuvieron la diversidad nucleotídica, el porcentaje de GC y los sitios polimórficos para la base de datos de ambos genes (Tabla 8). En el caso de *citocromo-b*, el cual cuenta con una cadena de 1140 pb, se obtiene un porcentaje G/C de 43.5, mientras que para *RAG2* de 1363pb, éste mismo porcentaje alcanza un valor de 44.9. La diversidad nucleotídica fue de 0.168 y 0.043 para *citocromo-b* y para *RAG2*, respectivamente. En ese sentido, la diversidad se muestra mayor para el gen mitocondrial debido a que sus tasas de mutación son más frecuentes, incluso el gen *citocromo-b* es muy utilizado por esta característica en trabajos en genética de poblaciones.

Tabla 8. Parámetros de Diversidad Nucleotídica de la familia Phyllostomidae

	<i>Citocromo-b</i>	<i>RAG2</i>
Diversidad Nucleotídica ()	0.16833	0.04287
Número de sitios polimórficos (S)	671	508
Porcentaje G/C	43.55	44.94
Pares de base	1140	1363

2. Modelos de Sustitución

Como se mencionó en el apartado de metodología, para determinar el modelo sustitución de cada base de datos se utilizó el programa JMODELTEST, este procedimiento se realizó con secuencias con bases indeterminadas y sin la presencia de éstas. Cualquier cambio que se realiza en la base datos que se ingresa en el programa puede derivar en un nuevo modelo de sustitución ya que se cuenta con 88 modelos de sustitución que se pueden ajustar a los datos ingresados.

Los modelos de sustitución que más se ajustaron para las diferentes bases de datos fueron: el modelo GTR+ para el gen *RAG2*; las bases de datos de *citocromo-b* y concatenadas nos arrojaron el modelo de sustitución GTR+ +I. Éste último modelo es el

más complejo y fue el que mostró el valor de máxima verosimilitud más alto (Drummond *et al.*, 2006).

3. Filogenias

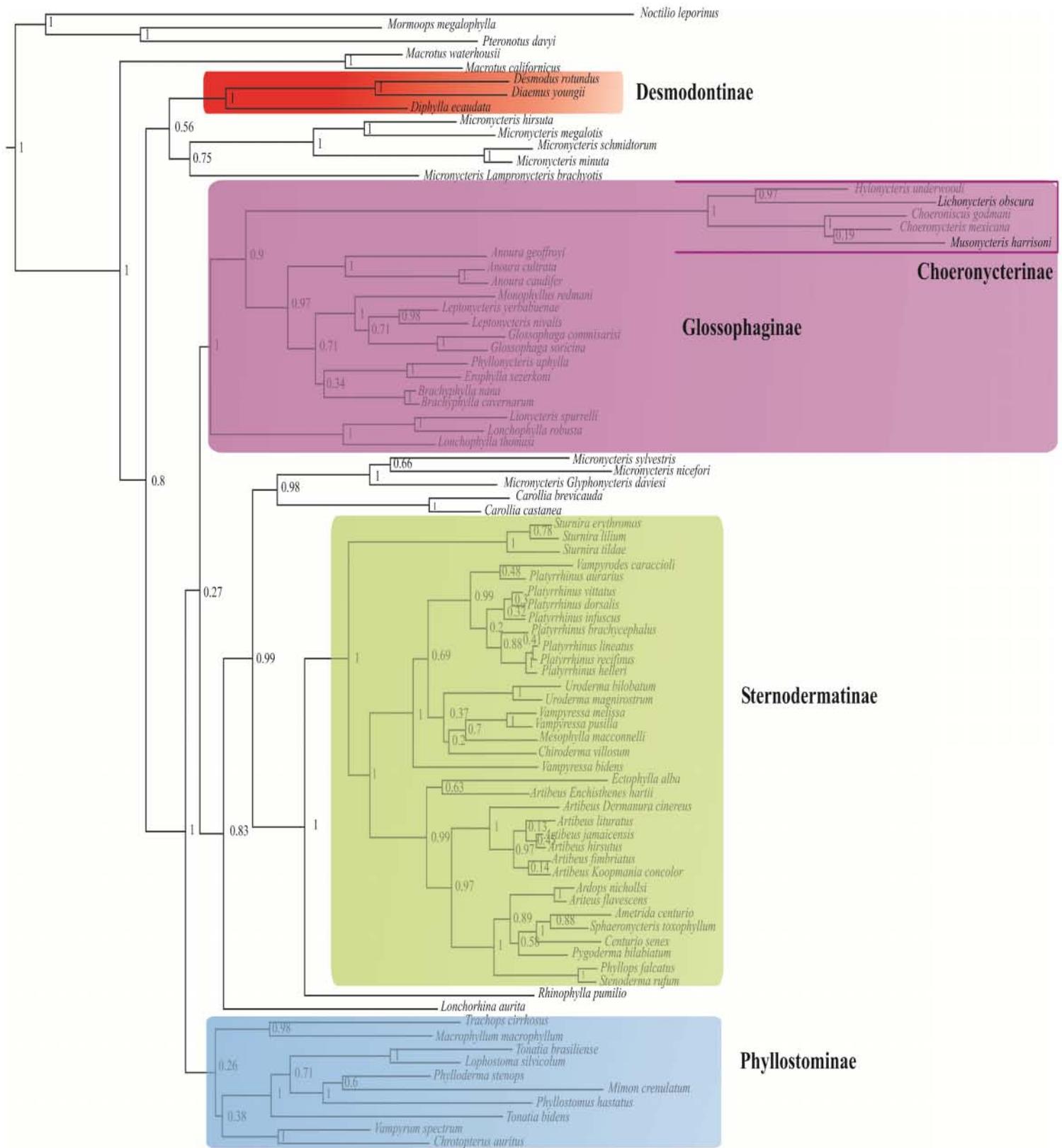
En cada filogenia se corrieron 100,000,000 de pasos para obtener el intervalo de credibilidad con los valores más altos de probabilidad posterior. La primera filogenia fue construida a partir del marcador nuclear *RAG2*, en este caso se contaba con el menor muestreo de especies para la construcción de esta filogenia (85). La segunda se construyó a partir del gen mitocondrial *citocromo-b* con 120 especies. La tercera fue la base de datos global en la cual incluimos los dos genes y 123 especies. Como grupo externo (*outgroup*) se consideraron tres especies pertenecientes a las familias hermanas Noctilionidea y Moormopidea, para las que se encontraron secuencias completas de ambos marcadores en el Gen Bank y se incluyeron en las tres filogenias.

La filogenia construida a partir del gen *RAG2* (Fig. 1) nos muestra en general valores de probabilidad posterior altos y cercanos a 1. Sin embargo se encontraron 15 nodos con valores menores a 0.5. La topología mantiene en general los mismos grupos en cuanto a las relaciones filogenéticas de los miembros de la familia, que otras propuestas como el superárbol de Wetterer *et al.* (2000). Dentro de las diferencias entre ambas filogenias, se encuentra al género *Macrotus*, el cual en la filogenia obtenida en este estudio es el grupo hermano del resto de Phyllostomidae y no es el grupo hermano del género *Micronycteris*, como lo establece la hipótesis del superárbol. La subfamilia Phyllostominae la podemos considerar parafilética, ya que el género *Micronycteris* se agrupó, con algunos miembros (*M. sylvestris* y *M. nicefori*), como clado independiente y basal de la subfamilia Stenodermatinae y, por otra parte el resto de sus miembros (*M. hirsuta*, *M. megalotis*, *M. schmidtorum*, *M. minuta* y *M. Lampronnycteris brachyotis*) se ubicaron como grupo hermano de los murciélagos hematófagos. Con excepción de la inclusión del género *Micronycteris* en la subfamilia Carollinae, los demás grupos se mantuvieron monofiléticos y se agruparon principalmente por hábitos alimenticios. Los murciélagos carnívoros también forman un grupo monofilético y como grupo externo de los frugívoros y los nectarívoros. Estos dos últimos grupos mantienen su relación como grupos hermanos.

La subfamilia Glossophaginae se mantiene monófiletica, los valores de probabilidad

posterior se calcularon por encima de 0.5 con excepción del nodo que une al género *Brachyphylla* con las especies *Erophylla sezekorni* y *Phyllonycteris aphylla* (0.34). Dentro de la familia los géneros son monofiléticos. Cabe destacar que dentro de este grupo, los tradicionalmente llamados coeronicterinos muestran claras diferencias en cuanto a largos de rama o número de sustituciones en las secuencias en el gen *RAG2* respecto del resto de los nectarívoros.

En la segunda filogenia construida a partir del gen mitocondrial *citocromo-b* (Fig. 2) se aprecian diez nodos a lo largo de la filogenia con probabilidades posteriores menores a 0.5. La mayor parte de los valores de probabilidad posterior más bajos se aprecian en nodos intragéneros. Por ejemplo, dentro del género *Sturnira* se cuentan dos nodos con valores de 0.2. Dentro el género *Platyrrhinus* se observan dos valores más por debajo del 0.5, sin embargo el género se mantiene monofilético, y justo en el nodo basal que agrupa a éste género con los géneros *Mesophylla*, *Vampyressa* y *Uroderma* se encuentra otro de los valores de probabilidad posterior menor. Por último, el nodo que relaciona a las especies *Vampyressa melissa* y *V. pusilla* junto con la especie *Mesophylla macconnelli* y las especies del género *Uroderma* cuentan con un valor de probabilidad de 0.26.

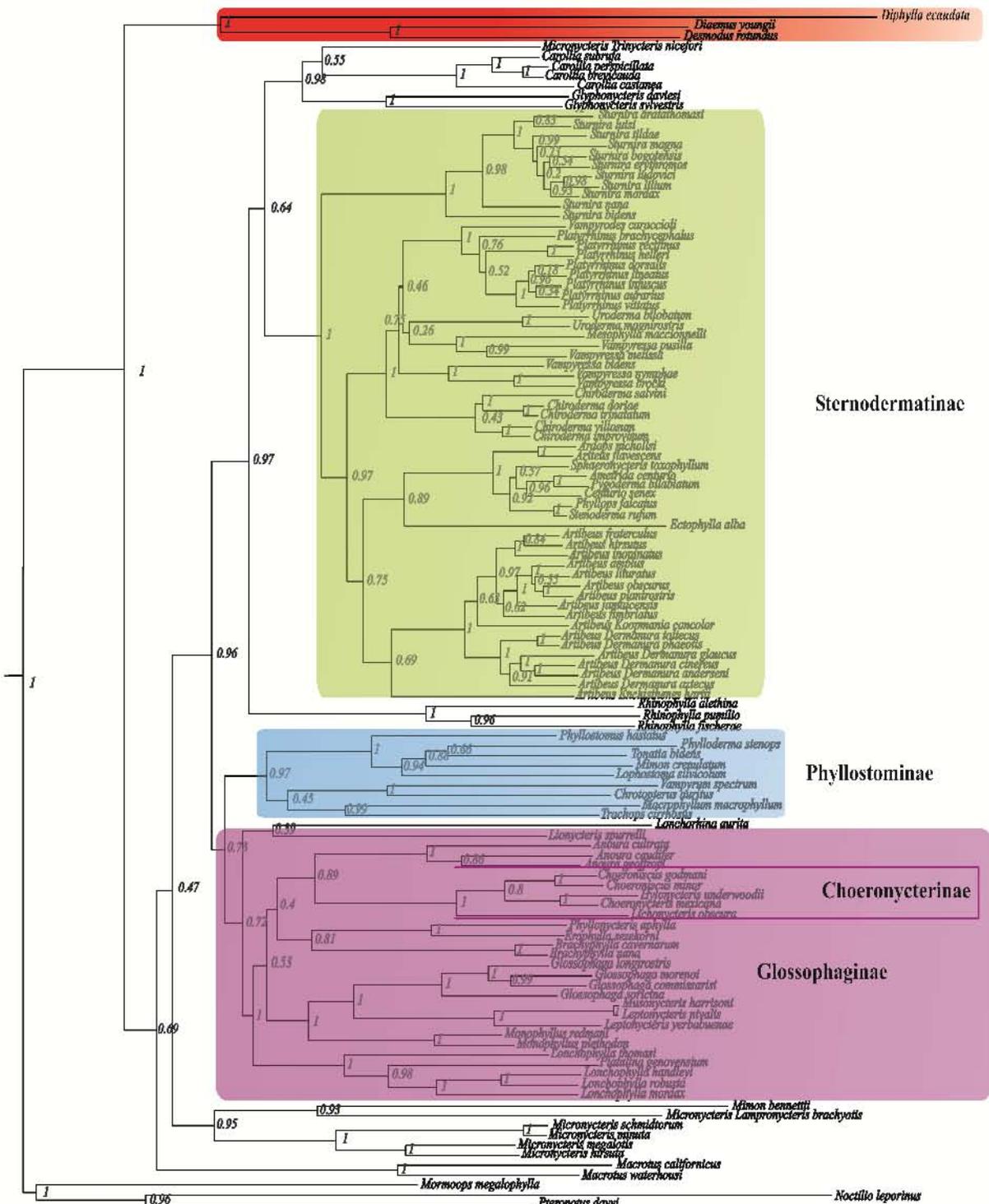


Al igual que en la filogenia de *RAG2*, en la hipótesis filogenética del gen *cyt-b* las especies del género *Micronycteris* forman un grupo parafilético y nuevamente junto a especies de la subfamilia Carrollinae. Dentro de la subfamilia Glossophaginae, a pesar de que se agrupan todas las especies que tradicionalmente se consideran nectarívoras, se puede observar una especie de la subfamilia Phyllostominae, *Lonchorhina aurita*, la cual exhibe hábitos alimenticios insectívoros, entre otras diferencias (principalmente morfológicas) que lo agrupan con los demás miembros de su grupo.

El grupo de los murciélagos carnívoros mantiene unidad. Estas especies que se se agrupan como especies hermanas de los nectarívoros, a diferencia de la posición basal que se exhibe en la filogenia con el gen nuclear en la cual son el grupo hermano de los frugívoros. La filogenia con el gen mitocondrial coincide con la hipótesis tradicional de que los murciélagos insectívoros son el grupo hermano de los filostómidos, excepto de las tres especies hematófagas de las que se tiene registro (desmodontinos).

En los géneros glosofáginos, las especies se agrupan de manera monofilética, sin embargo hay especies con posiciones inesperadas, por ejemplo, *Musonycteris harrisoni* que en la filogenia de *cyt-b* (Fig. 2) se agrupa como especie hermana de *Leptonycteris nivalis*. *M. harrisoni*, tradicionalmente se ha emparentado con los coeronicterinos. Dicho evento puede ser un artefacto debido a la falta de información de la secuencia que se amplificó a partir de la muestra de museo, ya que para esta especie solo se lograron secuenciar 400 pb del gen. A pesar de la inclusión de *M. harrisoni* en el clado del género *Leptonycteris*, la relación entre éste último con el género *Glossophaga* se mantiene constante.

La filogenia de los datos concatenados (Fig. 3) tiene diez nodos con valores de probabilidad posterior menores a 0.5, que en su mayoría se ubican en relaciones entre géneros. Por ejemplo, en el caso de las especies del género *Vampyressa*, las especies de *V. pussila* y *V. melissa* junto con la especie *Mesophylla macconelli* forman un grupo, hermano a los géneros *Platyrrhinus*, *Vampyrodes* y *Uroderma*. Este nodo cuenta con un valor de probabilidad posterior de 0.4. Dentro del género *Platyrrhinus* se observan entre especies hermanas tres valores por debajo de 0.5 de probabilidad posterior. Las especies del género *Sturnira*, también cuentan con tres nodos con valores bajos, sin embargo el género se mantiene monofilético. La relación entre los géneros *Carollia* y *Glyphonycteris* también se muestra con un valor bajo en su nodo (0.38) en la filogenia mitocondrial.



Desmodontinae

Sternodermatinae

Phyllostominae

Choeronycterinae

Glossophaginae

0.2

Como grupo basal de la familia Phyllostomidae en la filogenia mitocondrial, al igual que la filogenia basada en el gen *RAG2*, se ubican las especies del género *Macrotus* (con hábitos alimenticios basados en insectos). El género *Micronycteris* resulta parafilético, por una parte se agrupa con las especies *Micronycteris Glyphonycteris daviesi* y *M. Trynicteris daviesi* (cabe destacar que las mencionadas especies se encuentran en discusión en cuanto a su estatus taxonómico) y por otra parte se asocia al género *Carollia* (subfamilia Carrollinae), a pesar de mostrar hábitos alimenticios distintos, mientras que el resto género se agrupan en la base de la familia acompañados por la especie *Mimon bennettii*.

Las especies de murciélagos con hábitos alimenticios carnívoros se agruparon como grupo monofilético, es decir, todas las especies que tienen la capacidad de consumir carne se ubicaron en un solo clado a pesar de ser considerados como parte de la misma subfamilia (Wetterer *et al.*, 2000) en los que se encuentran los géneros *Macrotus*, *Micronycteris* y *Lonchorina* (Subfamilia Phyllosotominae), géneros que se distribuyeron como clados parafiléticos. Éste último género se ubica como especie externa del grupo de los murciélagos nectarívoros (Glossophaginae).

La subfamilia Glossophaginae se agrupa monofiléticamente. Con excepción del género *Lonchophylla*, el resto de los géneros son monofiléticos. Cabe hacer mención que las especies con las que se agrupa el género se han clasificado en conjunto en el grupo de los "Lonchophyllinae" (Carstens *et al.*, 2002; Dávalos y Jansa, 2004). Los géneros *Phyllonycteris* y *Erophylla* se agrupan en los "Phyllonycterinea" y los Coeronicterinos (grupo que también es monofilético) se agrupa con el resto de los Glossophaginae. En general las especies dentro de la subfamilia se agrupan de forma tal que corresponden con clasificaciones taxonómicas, principalmente aquellas basadas tanto en caracteres morfológicos como en información molecular (Carstens *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2002).

4. Prueba de Hipótesis de Reloj Molecular

En la prueba de hipótesis de reloj molecular usada se compara la verosimilitud de una filogenia, forzando un reloj molecular (hipótesis nula, $\ln L_0$), y la verosimilitud de la misma sin forzar la tasa constante o reloj molecular (hipótesis alternativa), mediante una prueba de cociente de verosimilitudes LRT, con la fórmula: $LRT=2(\ln L_0 - \ln L_1)$, donde $\ln L_0$ =verosimilitud con reloj molecular y $\ln L_1$ =sin reloj molecular (Felsenstein 1983). La diferencia más clara entre el árbol o filogenia que supone reloj molecular y la filogenia con tasas de sustitución heterogéneas radica en que en el primero el número de longitudes de rama a estimar se consideraría $n - 1$ donde n = número de taxa, mientras que el segundo (que no supone reloj) se considera $2n - 3$ (Lewis, 1998). En el programa Phylip 3.69 (Felsenstein, 2005) se obtuvieron los valores de verosimilitud para cada base de datos bajo los supuestos de reloj molecular (o tasa constante de sustitución) y considerando una tasa heterogénea de sustitución sin reloj molecular.

Tabla 9. Valores de verosimilitud utilizados para probar reloj molecular en las bases de datos

Marcador	Verosimilitud supuesto Reloj Molecular	Verosimilitud supuesto Tasa Heterogénea	Grados de libertad	Diferencia de Valores de Verosimilitud	Valor crítico X^2
<i>Citocromo-b</i>	- 45415.15194	-45264.38458	121	150.7674	147.65
<i>RAG2</i>	- 10157.91876	-9936.49706		221.4217	
Concatenado	-52608.34968	-55034.49474		2426.14506	

Con esta prueba se encontró que ninguna de las bases de datos (i.e., los dos marcadores por separado y el archivo concatenado de ambos genes), se ajustan al modelo de reloj molecular estricto (o sea, no presentan una tasa de mutación constante; Tabla 9). Con 121 grados de libertad y 95% de confianza, la prueba de Chi-cuadrada mostró diferencias significativas entre los supuestos de reloj molecular y tasas heterogéneas de sustitución para todas las bases de datos. En el caso de la base de datos concatenada, la

diferencia entre las verosimilitudes bajo los distintos supuestos fue aún mayor. Esto quiere decir que la tasa de sustitución para la familia Phyllostomidae en los genes utilizados en el presente trabajo, no se comporta de manera constante. Se empleó la opción establecida en el programa Beast denominada "Uncorrelated lognormal" (Drummond *et al.*, 2007).

5. Estimación de los Tiempos de Divergencia

Las estimaciones de los tiempos de divergencia en la familia Phyllostomidae se llevaron a cabo usando tres puntos de calibración reportados anteriormente: 1) 27 m. a. para la familia Phyllostomidae, (Jones *et al.*, 2005; Flores, 2007), 2) para la familia Mormoopidae se estableció una edad de 36 m. a. (Czaplewski y Morgan, 2003), y 3) 22 m. a. para la subfamilia Glossophaginae, (Teeling *et al.*, 2005; Flores, 2007). Estos puntos se basan en el registro fósil y se refieren a los registros más antiguos para cada uno de los grupos. Se optó por no incluir todas las fechas de fósiles con las que se contaban, debido a que de ésta forma se permitiría que el programa estimara las fechas para cada grupo y así se podría posteriormente comparar las fechas fósiles con las fechas estimadas por divergencia molecular, considerando que los fósiles más antiguos conocidos no necesariamente son los más ancestrales.

Las fechas de diversificación estimadas a partir de la filogenia construida con ambos genes en una misma base de datos son muy similares a las edades calculadas para las filogenias de los marcadores genéticos por separado (Apéndice 5). El nodo basal (Grupo troncal), en el que convergen las especies de la familia Moormopidea, Noctilionidae y Phyllostomidae, muestra una edad de 36.2 (32.24 - 43.3) m. a. Para la familia (grupo troncal) Phyllostomidae se tiene una fecha de 27.67 (24.67 - 30.86) m. a. (Fig. 4), difiere del tiempo estimado en la filogenia del gen *RAG2* por ca. 0.11 m. a. y ca. 0.8 m. a. respecto del tiempo en la filogenia basada en el *citocromo-b* (Apéndice 4).

Las subfamilias (grupo corona) que componen a la familia Phyllostomidae se agruparon en clados monofiléticos. La excepción son las especies del género *Micronycteris* (de las cuales todavía no se ha llegado a un consenso en cuanto a su estatus taxonómico), incluyendo a *Micronycteris*, *Trinycteris nicefori* y las especies que se determinaron dentro del género *Glyphonycteris* (Simmons, 1996) las cuales se agrupan como especies hermanas de *Carollia*.

El género *Macrotus* (principalmente insectívoros) muestra una fecha de 9.65 (3.47 - 20.93) m. a. La subfamilia Desmodontinae (grupo corona), que se compone de las tres únicas especies hematófagas se originó hace 21.2 (12.64 - 27.18) m. a., con el gen *RAG2* se obtuvo una fecha de 23.9 (13.32 - 28.18) m. a. y con el gen *Citocromo-b* de 23.47 (15.2 - 30.8) m. a.

Phyllostominae (grupo corona), donde encontramos a la mayoría de los murciélagos insectívoros y carnívoros, sin incluir la totalidad de sus miembros, se obtiene una fecha de 20.99 (14.43 - 25.31) m. a. de origen, mientras que en con *RAG2* la fecha es de 20.87 (12.01 - 28.18) y para la filogenia con *citocromo-b* fue 20.1 (15.11 - 25.94) m. a. (Apéndice 5).

La subfamilia Stenodermatinae (grupo corona) se calcula la edad de 15 (10.9 - 19.9) m. a. El género *Sturnira*, (uno de los mejores muestreados en este trabajo, con 11 especies), tiene una edad de 8.68 m. a. En la filogenia del gen nuclear la fecha obtenida es de 13.39 (7.8 - 21.1) m. a. y en la filogenia del gen *citocromo-b* es de 13.9 (14.5 - 24.5) millones.

Para la subfamilia Glossophaginae (grupo troncal) se obtiene una fecha de 21.91 (18.6 - 24.9) m. a., a similar a la estimación en la filogenia basada en el *citocromo-b* (21.32 m. a.) y la filogenia basada en el gen *RAG2* (21.53 m. a.) (Apéndice 5). Entre los murciélagos nectarívoros encontramos al clado de los loncofilinos que junto con los generos *Lionycteris* y *Platalina* comparten un nodo ancestral con una edad de 14.07 (8.5 - 19) m. a., muy similar a la edad del grupo de los coeronicterinos para los que se calculó una de edad de 14.01 (9.6 - 18.1) m. a. Uno de los murciélagos que se ha indentificado con mayor relación con plantas de las familias Cactaceae y Agavacea se ha clasificado dentro de los coeronicterinos (grupo corona) es *Choeronycteris mexicana* el cual tiene una edad de 8.24 m. a.

En cuanto al clado de los géneros *Leptonycteris* y *Glossophaga*, ambos con representantes en México y asociados al consumo de néctar y polinización de agaves y cactus, el nodo ancestral presentó una edad de 13.21 (8.25 - 19.1) m. a. El género *Leptonycteris* cuenta con una edad de 6.63 (2.44 - 14.45) m. a. mientras que *Glossophaga* tiene una edad de 7.95 (4.1 - 14.1) m. a.

6. Cálculo de las tasas de diversificación

Se calcularon las tasas de diversificación con el programa LASER 2.2 (Rabosky, 2006) para las tres filogenias. En dos de ellas, *citocromo-b* y Concatenado, el modelo que mejor se ajustó fue el llamado modelo *yule-2-rates*, el cual es un modelo que representa cambios a través del tiempo. Para la filogenia del gen *RAG2*, el modelo que más se ajustó fue el modelo "pureBirth", modelo que se ajusta a una tasa de diversificación constante a través del tiempo (Tabla 10). Se realizó el cálculo para las tres filogenias para explorar la posibilidad de diferencias muy marcadas entre los cálculos.

Debido a que la filogenia construida a partir de ambos genes es considerada más robusta, y el modelo que mejor se ajustó a los datos es el modelo *yule-2-rates* de tasas variables a través del tiempo, con éste se calcularon las tasas de diversificación, obteniendo un punto de cambio hace 1.39 m. a. en donde decae la tasa (Fig. 5).

Tabla 10. Modelos de diversificación seleccionados para las tres filogenias construidas

Filogenias	Modelo	Parámetros	Tipo	LH	R1	R2	St	AIC	AIC
<i>RAG2</i>	pureBirth	r1	RC	-4.700	0.084	X	X	11.401	11.66
<i>citocromo-b</i>	yule2rates	r1, r2, st	RV	81.82	0.103	0.034	0.69	-30.21	-0.455
Concatenada	yule2rates	r1, r2, st	RV	18.1	0.593	0.11	1.39	-157.6	20.23

Se puede observar el cálculo para todos los miembros de la familia Phyllostomidae (Fig. 5) y se puede notar como el número de nodos se incrementa y por lo tanto la gráfica se acerca más a una función constante. El único cambio en la tasa de especiación que se detecta, es muy reciente, hace 1.39 m. a., cuando decrece la tasa de especiación. Esta fecha coincide con el nodo más reciente fechado en la filogenia y que corresponde con la divergencia entre las especies *Micronycteris minuta* y *M. sylvestris*.

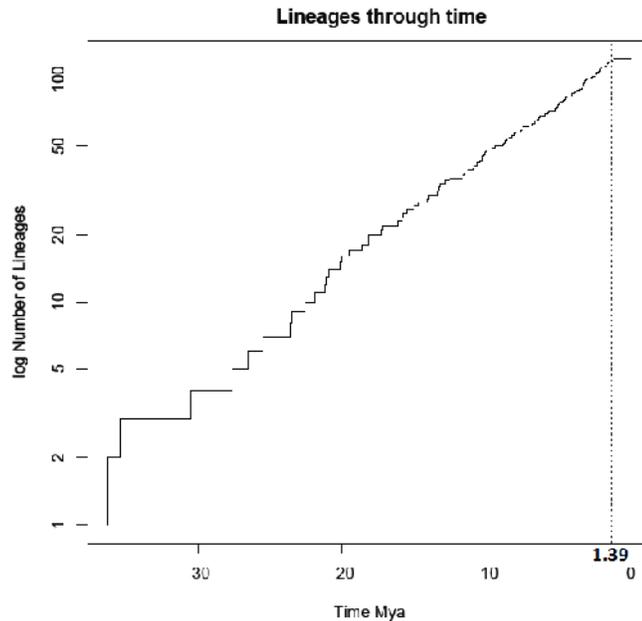


Figura 5. Tasa de diversificación de la familia Phyllostomidae. Se muestra el logaritmo del número de linajes a través del tiempo en millones de años, se aprecia el punto en el que hay un cambio en la tasa hace 1.39 m. a.

El promedio de las tasas de diversificación calculado con la fórmula de Bailey (1964), se aplicó para la familia Phyllostomidae y para los grupos monofiléticos dentro de ella (Tabla 11), en éste caso para las subfamilias Stenodermatinae, Desmodontinae, Glossophaginae y Phyllostominae (Bokma, 2003). En la última se descartaron los géneros *Macrotus*, *Micronycteris*, *Glyphonycteris* y *Trinycteris* debido a que sus miembros no forman un grupo monofilético, aún cuando tradicionalmente se consideran parte de la misma subfamilia. La fórmula de Bailey aplicada al total de las especies conocidas para la familia Phyllostomidae con las fechas obtenidas en la filogenia más robusta, nos dio como resultado un promedio de 0.19 especies por millón de años.

Tabla 11. Promedio de las tasas de diversificación de grupos monofiléticos dentro de la familia Phyllostomidae

Grupo	Spp/millón de años
Phyllostomidae	0.186
Glossophaginae	0.175
Choeronycterinae	0.148
Glossophagini	0.148
Stenodermatinae	0.284
Desmodontinae	0.052

El grupo con la mayor diversificación promedio es la subfamilia Stenodermatinae (0.284) en la cual se clasifican los géneros *Artibeus* (el más numeroso de toda la familia), *Platyrrhinus* y *Vampyressa* que en conjunto suman 41 especies del total empleadas en el presente análisis. En contraste, el grupo monofilético con menor diversificación es el de los hematófagos (0.052) al contar solo con tres especies. La subfamilia Glossophaginae (0.175) se ubica sólo por debajo de la subfamilia Stenodermatinae y muy cerca del promedio global para la familia (0.186). Por lo tanto, el grupo que más especies aporta para el incremento del promedio de las tasas de diversificación es Stenodermatinae mientras que el grupo que disminuye éste promedio es el grupo Desmodontinae.

7. Análisis de Condiciones Climáticas

Se realizó un análisis de componentes principales para analizar las condiciones climáticas donde habitan los diferentes grupos de murciélagos, en este caso los agrupamos por hábitos alimenticios considerando que prácticamente estos coinciden con los clados correspondientes a las subfamilias que se han manejado en el presente trabajo. Por otra parte se esperaría que entre especies hermanas se encontraran similitudes en las condiciones climáticas en las que se han colectado cada especie y por lo tanto, diferencias entre los grandes grupos como se plantea en la idea de nicho conservado (Peterson *et al.*, 1999; Losos, 2008).

La base de datos construida para el análisis de variables climáticas cuenta con 20673 registros de 159 especies de la familia Phyllostomidae que se han capturado. A pesar de la gran cantidad de datos y colectas en toda América, no se cuenta con registro para todas las especies y en el caso de algunas de ellas solo se tienen unos cuantos individuos con registro (se tienen 17 especies con tan sólo una referencia geográfica).

Como se aprecia en la Fig. 6, los primeros tres componentes principales explican ca. del 70% de la variación de estos datos climáticos. En el Componente Principal 1 (PC 1; 33.47% del total de la varianza) correlaciona de manera negativa con las variables de la temperatura media anual, la temperatura mínima del mes más frío, temperatura media del trimestre más húmedo, temperatura media del trimestre más seco, temperatura media del

trimestre más cálido, temperatura media del trimestre más frío (Bio1, Bio6, Bio8, Bio9, Bio10 y Bio11 respectivamente), mientras que correlaciona de manera positiva con la temperatura media del rango diurno (Bio2) y la altitud. En otras palabras, el Primer Componente principal describe la variación en temperatura y la altitud.

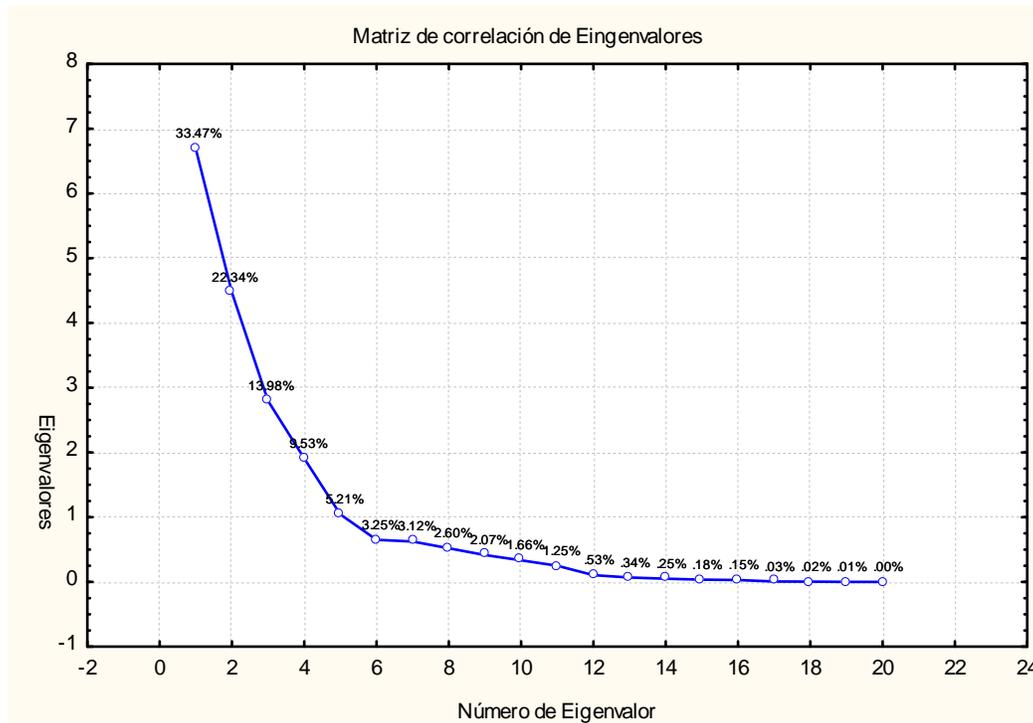
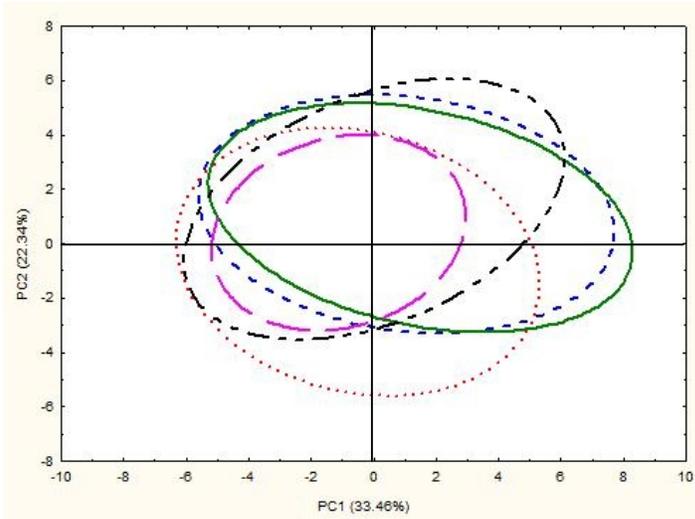


Figura 6. Gráfica de codo de la varianza explicada por cada componente principal. La inflexión más marcada se encuentra en la componente sexta, sin embargo con los tres primeros componentes se explica el 69.79 % de la variación.

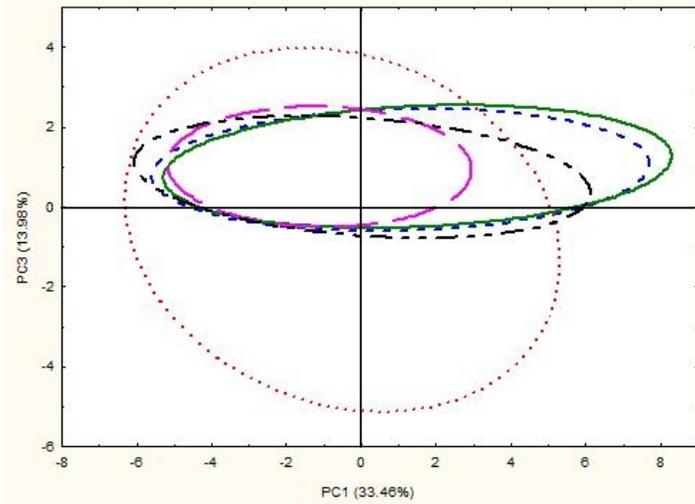
El Componente Principal 2 (PC2; 22.34% de la varianza) correlaciona de manera negativa con las variables de precipitación anual, precipitación del mes más húmedo, precipitación del cuarto más seco y precipitación del cuarto más frío (Bio12, Bio13, Bio17 y Bio19). El Componente Principal 3 (PC3; 13.98% de la varianza) correlaciona de manera negativa con las variables de isothermalidad, temperatura máxima del mes más cálido y de manera positiva con la precipitación estacional (Bio3, Bio5 y Bio15).

Las elipses que se forman a partir de las gráficas de dispersión (Fig. 7) muestran que los valores son heterogéneos y que todos los grupos de murciélagos comparten la mayoría de la variación de las condiciones de temperatura y precipitación. El grupo que muestra el mayor rango de variación es el de los murciélagos frugívoros abarcando incluso la misma

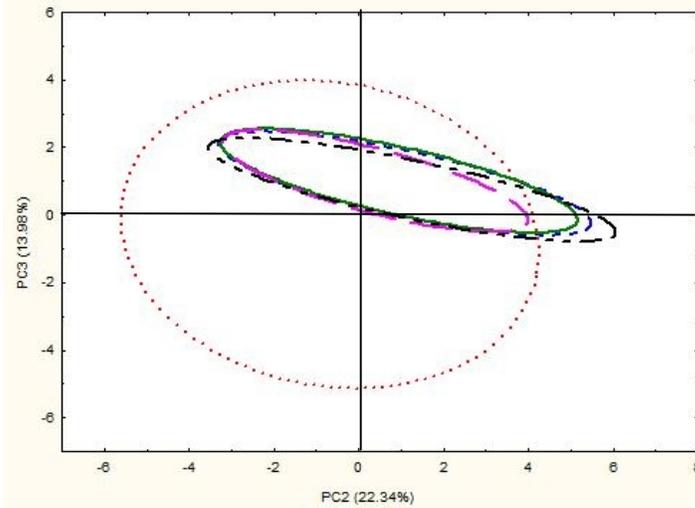
área que el resto de los grupos de hábitos alimenticios.



7a



7b



7c

Figura 7. Gráficas de dispersión de las tres componentes principales. -- Nectarívoros; Frugívoros; _ Hematófagos; _ Carnívoros; _ _ Insectívoro. En la figura 7a se proyecta a la PC 1 contra la PC2; la figura 7b muestra a la PC1 contra la PC3 y; en la figura 7c se grafica la PC2 contra la PC3.

Cuando graficamos los componentes primero y tercero (Figura 7b) nuevamente observamos traslape de las áreas de las elipses, y nuevamente los frugívoros de la familia Stenodermatinae se distribuyen en una circunferencia más amplia al centro de la gráfica. Cuando analizamos los datos de los componentes segundo y tercero (Figura 7c) confirmamos nuevamente que no hay diferencias notables entre los grupos, y la elipse del grupo de los frugívoros abarca prácticamente toda el área de distribución de las condiciones climáticas de la familia Phyllostomidae. En general, el grupo de frugívoros no muestra una tendencia clara hacia un tipo de clima en particular. El resto de los grupos se pueden observar más ligados a las condiciones climáticas explicadas por el PC3 (Figs. 7b y 7c), es decir que la isothermalidad (cociente Bio2/Bio7), una variable de temperatura (Bio5) y otra de precipitación (Bio 15) restringen la distribución de esos grupos, principalmente de los carnívoros quienes tienen un rango más restringido para esas condiciones, es decir que las condiciones climáticas son más específicas para este grupo.

8. Mapeo de Hábitos Alimenticios

Se calculó la verosimilitud de los estados de carácter de hábito alimenticio en la filogenia de la matriz de datos concatenada, a partir de los largos de rama y la topología obtenida anteriormente en el programa BEAST. De ésta forma con base a una nueva matriz de estados de carácter, se incorporaron los datos de las especies muestreadas (Fig. 8). Al realizar la reconstrucción del carácter ancestral en el programa Mesquite, resultó que los datos se ajustaron al modelo Mk1, lo que nos indica que las transformaciones tienen una probabilidad equivalente entre ellas.

En la Fig. 8 se puede observar que el estado ancestral es la alimentación primordialmente insectívora (valor de máxima verosimilitud = 51.6). Esto coincide con la evidencia fósil de la familia (Jones *et al.*, 2005; Monteiro y Nogueira, 2011), también coincide con hipótesis evolutivas de relación con las familias Moormopidae (Dávalos, 2006) y Noctilionidae (Teeling *et al.*, 2005), esta última familia también cuenta con los murciélagos pescadores. Estas familias cuentan en su mayoría con especies insectívoras.

El hábito de la carnivoría y la hematofagia aparecieron en eventos independientes cada uno. La hematofagia solo se encuentra en el clado de los Desmodontinae y la

carnivoría en miembros de la subfamilia Phyllostominae. De la misma forma el hábito alimenticio basado primordialmente en néctar aparece en el grupo de los Glossophaginae como un evento único, sin embargo no se puede perder de vista que la gran mayoría de estos murciélagos no han perdido la capacidad de consumo de insectos (Wetterer *et al.*, 2000), lo cual no se ve reflejado en la filogenia debido a que no se consideran proporciones de consumo de cada tipo de alimento. A pesar de que en el presente trabajo no se establecieron parámetros en cuanto a las proporciones del tipo de dieta para determinar el grado de especialización, se sabe que hay diferencias en cuanto a la fisiología de los diferentes grupos dentro de la familia Phyllostomidae (Schondube *et al.*, 2001).

El grupo más numeroso en la familia es el de los frugívoros, siendo la subfamilia Stenodermatinae la que agrupa a la mayoría de los murciélagos frugívoros, sin embargo no es el único grupo con murciélagos que presentan este tipo de hábito alimenticio. Los grupos Carrollinae, Rhinophyllinae y un miembro del género *Phyllostomus* (dentro de los Phyllostomini) también tienen dicha fuente de alimentación primaria, por lo que el consumo de frutos se considera con tres apariciones distintas en la familia.

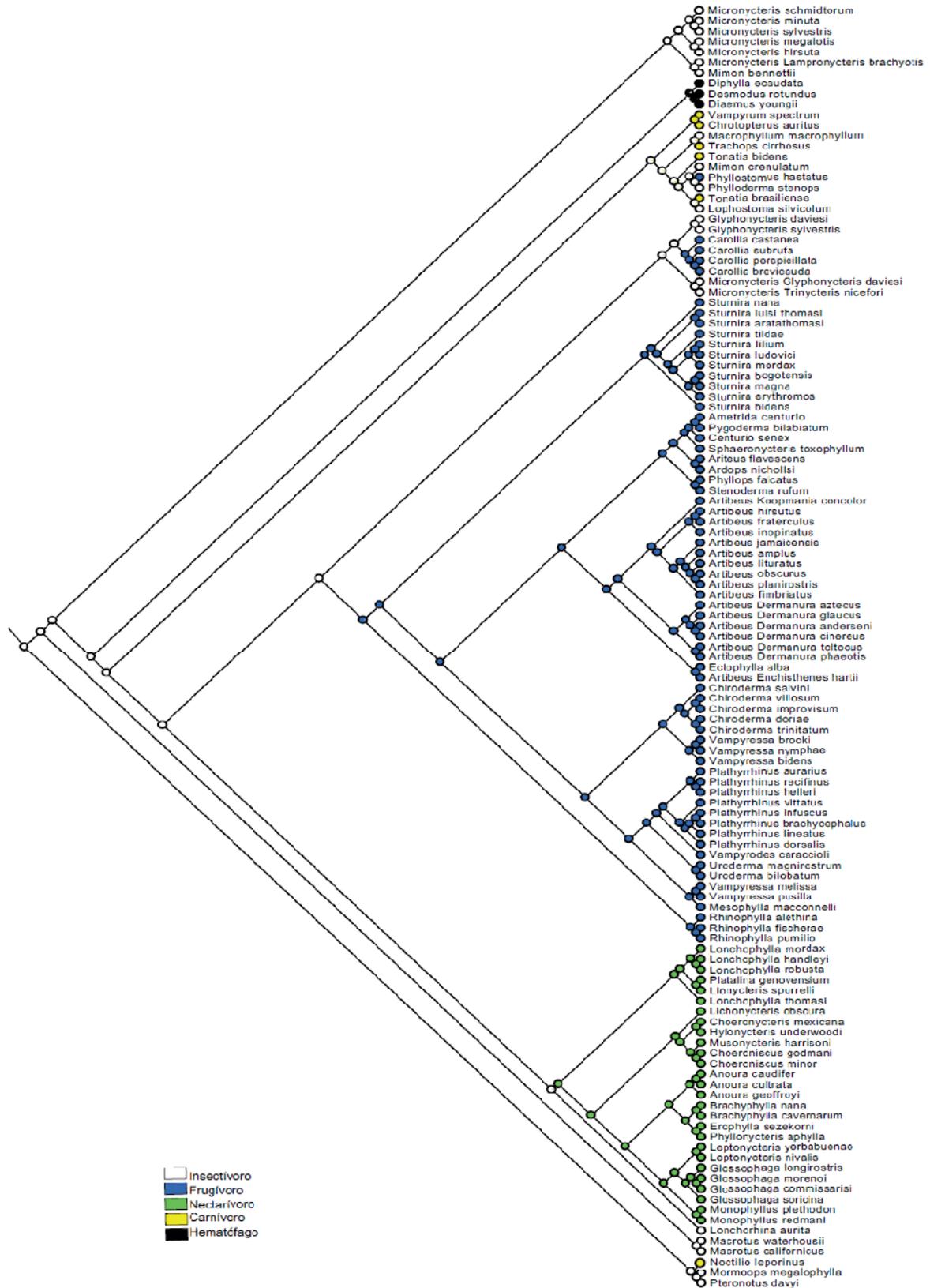


Figura 8. Filogenia Bayesiana de la familia Phyllostomidae, basada en la base de datos concatenada de los genes *cyt-b* y *RAG2*. Se observan los estados de carácter de hábitos alimenticios en cada nodo calculados con el programa Mesquite.

VII Discusión

Se reconstruyeron filogenias con tres juegos de datos: 1) con el gen mitocondrial *Cyt-b*, 2) con el gen nuclear *RAG2* y 3) con ambos genes. De las tres filogenias estimadas considero que la más robusta es la filogenia concatenada usando ambos marcadores moleculares, ya que representa la mayor cantidad de datos. La presente propuesta agrupa a los miembros de la familia Phyllostomidae de manera monofilética, teniendo en la raíz del árbol un valor de 1 de probabilidad posterior, mismo nodo del cual divergen los miembros de la familia Mormoopidae y Noctilionidae que se utilizaron como grupos externos.

Comparando las filogenias entre sí y con filogenias propuestas anteriormente bajo diferentes métodos de reconstrucción filogenética y usando diferentes tipos de caracteres, tanto moleculares como morfológicos, destaca que las filogenias de mi estudio apoyan la propuesta de monofilia de la familia Phyllostomidae y de la subfamilia Glossophaginae, la cual como se ha mencionado anteriormente agrupa a las especies principalmente nectarívoras. En el presente análisis se consideró la nomenclatura propuesta por Wetterer *et al.* (2000).

Con base en el registro fósil, se utilizaron tres puntos de calibración. Se consideró el representante fósil más antiguo conocido para la familia Moormopidea de 36 m. a. (Czaplewski y Morgan, 2003). En el caso de la familia Phyllostomidae se usó una fecha de 27 m. a. y para la subfamilia Glossophaginae una edad de 22.8 m. a. fechas propuestas a partir de estimados de reloj molecular (Teeling *et al.*, 2005; Flores, 2007). Se decidió utilizar estos puntos para tratar de no subestimar o sobreestimar los cambios a través del tiempo (Weir y Schluter, 2008), sin embargo se cuenta con más información de registro fósil (i.e. un murciélago que pertenece al grupo de los coeronicterinos en Colombia, con una edad de entre 12 y 13 m. a. (Czaplewski *et al.*, 2003) y con otra fecha propuesta por Hoffman *et al.* (2008) para la subfamilia Phyllostominae. Además, para la tribu Vampiryni se ha propuesto una edad mayor a los 13 m. a. con base en métodos de máxima verosimilitud (Hoffman *et al.*, 2008).

A pesar de que se contaba con más información acerca del registro fósil de algunos grupos de filostómidos, algunos autores mencionan que la calibración de tiempos a partir de de estos datos puede ser un tanto tendencioso, ya que el registro como lo conocemos es

incompleto (Near *et al.*, 2005). Los fósiles que se recuperan los consideramos como un punto de divergencia para algunos grupos actuales, lo cual no necesariamente es real, ya que posteriormente cabe la posibilidad de que se encuentran nuevos vestigios.

Primero, los tiempos de divergencia calculados en este trabajo son los siguientes: Phyllostomidae: 27.9 m. a.; Glossophaginae: 23.2 m.a.; Coeronicterinos: 12.8 m.a.; las especies del género *Leptonycteris* divergen hace 7.4 m.a.; son similares a trabajos anteriores en los que se han usado otros algoritmos para la construcción filogenética y para la estimación de edades de clados utilizando como modelo a los miembros del orden Chiroptera (Teeling *et al.*, 2001; Flores, 2007; Hoffman *et al.*, 2009).

Las tasas de diversificación también presentan datos importantes para entender la evolución de los murciélagos nectarívoros, ya que las fechas en las que éstas tasas cambian nos indica que ocurrieron eventos claves en la dinámica de los clados en distintos momentos y coinciden con fechas reportadas para otros trabajos mencionados anteriormente, con base en esto, podemos inferir que hay una relación de eventos ecológicos entre especies que interactúan de manera estrecha. Entre estas coincidencias se puede destacar la presencia de especies de géneros coeronicterinos en un contexto espacio-temporal con plantas de la familia Cactaceae (Arakaki *et al.*, 2011; Barba, 2012) y Agavaceae (Good-Ávila *et al.*, 2006; Flores 2007) y los eventos climáticos y/o geológicos que se han presentado en los sitios en los que se han encontrado fósiles de filostómidos, principalmente en Sudamérica, en donde se han documentado para los periodos Oligoceno y Mioceno (Wang *et al.*, 1994; Wolfe *et al.*, 1994) hace poco más de 34 m. a., mismas fechas en las que la familia Phyllostomidae ya habitaba esa zona.

El análisis de componentes principales basado en variables climáticas de la distribución de la familia Phyllostomidae no mostró una clara diferenciación entre grupos en cuanto a las condiciones que prefieren y en las que se desarrollan las especies de acuerdo a sus hábitos alimenticios. Es decir, no hay una relación sencilla entre las variantes climáticas y el tipo de alimento que consume. Sin embargo, se pueden apreciar algunas restricciones para la mayoría de los grupos, con excepción de los murciélagos frugívoros. Dichas restricciones están dadas por la PC3 que representa a variables de precipitación y temperatura (Bio3, Bio5 y Bio15) y se notan más marcadas en el grupo de los carnívoros, mientras que los nectarívoros, insectívoros y hematófagos se distribuyen en climas menos

específicos y no se distinguen diferencias claras entre éstos tres. Se propone que tal vez con otro análisis que distinga la influencia de cada una de las variables en cada grupo se podría encontrar alguna diferencia entre ellos.

1. Muestreo

La familia Phyllostomidae es muy rica en diversidad de especies y es reconocida por que cuenta con todas las formas de alimentación que se presentan en el orden Chiroptera (Gillete, 1975; Ferrarezi y Gimenez, 1996; Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2011; Monteiro y Nogueira, 2011; Agnarsson *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2012). Se compone de alrededor de 140 especies (Wetterer *et al.*, 2000), de las cuales actualmente se pueden reconocer 32 especies agrupadas en la subfamilia Glossophaginae, dos especies en la subfamilia Brachyphyllinae y cinco especies en la subfamilia Phyllonycterinae. Todas se consideran como consumidoras de néctar estrictas. Estas cifras pueden cambiar con el descubrimiento de nuevas especies y con el cambio en el estatus taxonómicos de otras (Simmons, 1996; Fonseca y Pinto, 2004; Pacheco *et al.*, 2004; Muchhala *et al.*, 2005; Cole y Wilson, 2006; Nogueira *et al.*, 2012).

Debido a la riqueza de especies de la subfamilia, el muestreo debe ser representativo para hacer un mejor análisis. Cualquier especie que se agrega o se resta puede influir en la topología y en los subsecuentes cálculos de tasas de diversificación y fechas de diversificación de los clados. Sin embargo, la cantidad de especies conocidas y agrupadas dentro de la familia ha aumentado conforme se avanza en el muestreo y se realizan nuevos estudios taxonómicos del grupo (ver por ejemplo Woodman, 2007; Dávalos y Corthals, 2008). En el presente trabajo se aportan 17 nuevas secuencias para el análisis de relaciones entre miembros de la familia Phyllostomidae, y más específicamente para la subfamilia Glossophaginae.

En otro trabajo con objetivos similares al presente, Datzmann *et al.*, (2010) analizaron a la subfamilia Glossophaginae para detectar la historia evolutiva del hábito alimenticio a base de néctar. Aunque el número de especies que toman los autores (32 especies) es considerablemente menor al muestreo empleado en el presente trabajo, aún cuando la cantidad de marcadores (12 marcadores nucleares y mitocondriales, con 10396

pb) que se utilizaron es más alta. Desafortunadamente la información genética no está disponible para todas las especies de la familia, por lo tanto, es necesario continuar con el muestreo tanto de individuos por especies como de sus genes, de tal manera que nos permita mayor precisión en el estudio de los filostómidos. Se han descubierto nuevas especies en los años recientes que podrían dar mayor soporte a las hipótesis actuales o bien podrían generar más información para proponer nuevas relaciones filogenéticas y/o nuevas historias evolutivas, así como en aspectos ecológicos, biogeográficos y evolutivos.

En las muestras de museos la piel ha sido tratada con diversas sustancias químicas, las cuales pueden provocar que el ADN se degrade (Payne y Sorenson, 2003), por lo cual la obtención de información genética requiere de un esfuerzo mayor. Otro aspecto importante en el muestreo de individuos depositados en museos, es la escases del material, ya que para el propósito de las colecciones contar con un individuo mutilado se considera que le resta valor para posteriores estudios taxonómicos y la muestra que se destina para investigación molecular y/o genética es muy escasa.

2. Estimación de las Filogenias

Dentro de la familia Phyllostomidae en el presente estudio, el grupo hermano del resto corresponde a un clado distinto en cada juego de genes. Con el gen *citocromo-b* el grupo basal es la subfamilia Desmodontinae, que coincide con Baker *et al.*, (1989), Van Den Bussche (1991), Jones *et al.*, (2000), Wetterer *et al.*, (2000) quienes basan los análisis en evidencia total y/o marcadores moleculares (Van Den Bussche, 1991; Hoffman *et al.*, 2008; Agnarsson *et al.*, 2011). Las filogenias construidas con el gen *RAG2* y con los datos concatenados ubican al género *Macrotus* como grupo basal de la familia Phyllostomidae, al igual que las filogenias propuestas por Baker *et al.*, (2001) con análisis de parsimonia, Baker *et al.*, (2003), Agnarsson *et al.*, (2011); Rojas *et al.*, (2011 y 2012) y Baker *et al.*, (2012) con inferencias bayesianas y caracteres moleculares. Es claro que en este sentido se deben realizar más análisis para resolver las relaciones filogenéticas asociadas a la diversificación inicial de la familia, incorporando más datos o caracteres informativos. Una de las razones por las cuales no se ha resuelto del todo la diversificación es, tal vez, la falta de registro fósil (ancestro común). Sin embargo, los valores de probabilidad posterior obtenidos para las filogenias que soportan al género *Macrotus* como

especies basales son de 1.

Recientemente, Dávalos *et al.*, (2012) realizaron una comparación de distintas reconstrucciones filogenéticas utilizando caracteres morfológicos, moleculares y la combinación de ambos para la familia Phyllostomidae, además la reconstrucción se llevó a cabo con diferentes métodos (parsimonia, máxima verosimilitud y bayesianos), encontrando diferencias en la topología, a lo cual proponen ampliar la discusión en torno de qué tipo de caracteres proporcionan mayor resolución a la inferencia de las relaciones de ancestría-descendencia entre las especies.

Las relaciones entre grupos superiores al nivel de género no han quedado establecidas del todo. En este trabajo, la filogenia coincide con trabajos anteriores acerca de la sistemática de la familia Phyllostomidae, por ejemplo, el grupo Phyllostomini es descrita como un grupo parafilético por Baker *et al.*, (1989), Van Den Bissche (1991), Baker *et al.*, (2003), Teeling *et al.*, (2005), Dávalos (2006), Agnarsson *et al.*, (2011), Datzman *et al.*, (2011), Monteiro y Nogueira (2011), Rojas *et al.*, (2011; 2012), Baker *et al.*, (2012) y Dávalos *et al.*, (2012). Dentro de ésta subfamilia una de las relaciones más complicadas se encuentra dentro del género *Micronycteris*, que se ha agrupado dentro de los murciélagos Phyllostominae y que en tiempos recientes ha cambiado en número de especies, así como su *status* taxonómico (Simmons, 1996; Porter *et al.*, 2007), nuevamente podemos notar que no ha habido una correspondencia entre las clasificaciones morfológicas y los estudios a nivel molecular. Por ejemplo, *Glyphonycteris* y *Micronycteris* han sido relacionados, por un lado como un mismo género y por otra parte hay autores que les han conferido el nivel taxonómico de género a ambos grupos. Este mismo grupo en otros trabajos ha sido considerado monofilético (Wetterer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000), ambos con gran cantidad de información basada en "evidencia total"; sin embargo Wetterer *et al.*, (2000) no consideran caracteres con información directa del ADN.

Las relaciones entre las especies del género *Micronycteris* y afines se han vuelto un tema de discusión, ya que anteriormente se conocía como un grupo monofilético y ahora, con nueva evidencia, se ha mostrado más complicado, es decir, el grupo *Micronycteris* no es congruente con la clasificación tradicional, en la que se señala al género *Glyphonycteris* como género hermano de *Micronycteris* (Baker *et al.*, 2012; Dávalos *et al.*, 2012).

Las relaciones entre grupos definidos anteriormente como subfamilias mantienen

cierta constancia en las propuestas de los diferentes autores, al igual que la aquí presentada. En dos topologías de filogenias con "evidencia total" los Phyllostominae se presentan como grupo hermano de las especies que componen *Carollia* y Stenodermatinae (Jones *et al.*, 2000; Wetterer *et al.*, 2000). *Carollia* y Stenodermatinae habían sido relacionados, aunque últimamente el género *Carollia* y el género *Rhinophylla* se separan para agruparse con *Glyphonycteris* y *Trinycteris* (Baker *et al.*, 2001, 2003; Rojas *et al.*, 2011; Agnarsson *et al.*, 2011; Baker *et al.*, 2012). Las diferencias establecidas entre los diferentes autores, están dadas principalmente por el tipo de marcadores utilizados y por el método, a pesar de que a niveles taxonómicos como el de familia, subfamilia se han mantenido la mayoría de los grupos. En la presente propuesta filogenética el género *Carollia* se agrupa con los géneros *Trinycteris* y *Glyphonycteris*, lo cual indica que el hábito alimenticio principalmente frugívoro aparece como evento independiente en grupos distintos dentro de la familia.

Dentro de los glosófaginos no todos los murciélagos que consumen néctar son considerados parte del grupo, hay clasificaciones que consideran a los *Brachyphylla*, *Lonchophylla* y *Phyllonycteris* como grupos independientes, a pesar de que en la mayoría de las filogenias se agrupan de manera monofilética, compartiendo características tanto genéticas como ecológicas y morfológicas. Para Carsterns *et al.*, (2002) en los nectarívoros se agrupan los coeronicterinos y glosófaginos en la subfamilia Glossophaginae y se separa al género *Lonchophylla*. Sin embargo, menciona que las características asociadas a la nectarivoría relacionan a los *Lonchophylla* con los Glossophaginae apoyando así la monofilia del grupo.

Para autores como Baker *et al.*, (2010) y, Rojas *et al.*, (2011; 2012), los glosófaginos no son un grupo monofilético, en sus análisis los géneros *Lonchophylla* y *Lionycteris* se relacionan dentro del grupo Stenodermatinae, lo cual nos habla de dos orígenes de la nectarivoría independientes. Los géneros como *Erophylla* y *Phyllonycteris* se mantienen como grupos hermanos en las filogenias de Jones *et al.*, (2000), Wetterer *et al.*, (2000), Carsterns *et al.*, (2002), Agnarsson *et al.*, (2011) y Rojas *et al.*, (2011).

Otro caso especial es el del género *Lonchorhina*, que en ocasiones se agrupa con los murciélagos nectarívoros (Glossophaginae), tanto en las filogenias construidas en este trabajo, como en las propuestas de Agnarsson *et al.*, (2011) y Rojas *et al.*, (2012), mientras que Baker *et al.*, (2003) lo colocan como grupo basal del clado conformado por Carollinae,

Stenodermatinae, Phyllostominae y Glossophaginae.

Las diferencias de la filogenia presentada en este trabajo y las propuestas hechas anteriormente están dadas, principalmente, por el tipo de caracteres utilizados para realizar cada una de éstas, además también hay diferencias en el método empleado. A pesar de las diferencias, también se han encontrado varias similitudes que nos indican congruencia en los métodos y en los caracteres utilizados, por ejemplo la monofilia de la familia Phyllostomidae, así como de Glossophaginae, Desmodontinae y la agrupación de la gran mayoría de los Stenodermatinae.

2.1 Hábitos Alimenticios

El orden Chiroptera cuenta con 19 familias, de las cuales se reconoce que 13 son especialistas insectívoras, cuatro muestran hábitos alimenticios a base de carne e insectos (Megadermatinae, Nycteridae, Noctilionidae y Vespertilionidae), otra familia con miembros que consumen néctar y frutas (Pteropodidae) y por último la familia Phyllostomidae con mayor diversidad alimenticia, ya que tiene miembros que consumen néctar, frutos, sangre, carne, insectos e incluso hay especies omnívoras (i.e. *Phyllostomus hastatus*). Esta información muestra que la alimentación a base de productos vegetales sólo ha ocurrido dos veces en el orden Chiroptera. Sin embargo, la dieta de la mayoría de las especies de Phyllostomidae ha sido poco estudiada, se sabe que hay variaciones en las proporciones de consumo de diferentes tipos de alimentos, tanto en el tiempo (estación climática) y como en el espacio, es decir geográficamente (Wetterer *et al.*, 2000). La forma de alimentación ancestral en la familia Phyllostomidae, se ha propuesto que era insectívora (Ferrarezi y Gimenez, 1996; Jones *et al.*, 2000; Wetterer *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2011).

Las especies tempranamente divergentes son insectívoras, tanto los miembros de los géneros *Macrotus* como los miembros de los géneros *Micronycteris* y *Mimon*. Esta idea es apoyada por el hecho que las especies miembros de las familias hermanas Mormoopidae y Noctilionidae, que son consideradas más cercanas al ancestro común en el superárbol (Jones *et al.*, 2000), también son insectívoras.

Las especies hematófagas se agruparon monofiléticamente, indicando que los hábitos alimenticios a base de sangre solo se han presentado una vez a lo largo de la

historia evolutiva del orden, este resultado coincide con los trabajos más recientes sobre la familia y en los que se ha señalado que la monofilia y la posición basal del grupo, siendo grupo hermano del género *Micronycteris* (Gillete, 1975; Ferrarezi y Gimenez, 1996; Wetterer *et al.*, 2000; Carsten *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2011; Monteiro y Nogueira, 2011; Rojas *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2012). De las tres especies que se alimentan de sangre, dos de ellas se especializaron en consumo de sangre de aves, mientras que *Desmodus rotundus* se alimenta primordialmente de sangre de mamíferos (Baker *et al.*, 2010).

Otro hábito alimenticio que podemos observar en especies de la familia es el hábito carnívoro, el cual se entiende como el consumo de otros vertebrados, y entre las especies de murciélagos filostómidos carnívoros se conocen a *Chrotopterus aurita*, *Mimon crenulatum*, *Phyllostomus hastatus* (se considera carnívoro en el presente trabajo debido a la capacidad de consumo de éste recurso, a pesar de ser omnívoro), *Tonatia bidens*, *T. brasiliense*, *Trachops cirrhosus* y *Vampyrum spectrum* todas agrupadas en la subfamilia Phyllostominae de manera monofilética. Es importante mencionar que la especie *C. aurita* también es capaz de consumir otro tipo de alimento como insectos y frutos, al igual que una especie del género *Phyllostomus* (Wetterer *et al.*, 2000).

La subfamilia más numerosa en cuanto a especies se refiere es Stenodermatinae, la cual cuenta con frugívoros estrictos con ocho géneros restringidos a bosques bajos y hábitats secundarios en los Neotrópicos y es un grupo monofilético (Fig. 3; Dávalos, 2007), sin embargo de manera global, la subfamilia abarca la más amplia gama de condiciones climáticas (Fig. 8). El resto de los frugívoros se encuentran en el clado Carrollinae (géneros *Carollia* y *Rhinophylla*). Sin embargo, la mayoría de las especies consumen además otro tipo de alimento, como insectos o néctar. Un claro ejemplo es *Carollia perspicillata* que varía las proporciones en cuanto al consumo entre frutos e insectos de acuerdo a la estación y disponibilidad de uno u otro recurso (Wetterer *et al.*, 2000). En ese sentido, son necesarios más trabajos sobre la dieta de cada especie de murciélago, para determinar con mayor precisión que tan especialistas o generalistas son sus hábitos alimenticios.

El consumo de frutos tal vez haya surgido en dos eventos dentro de la familia Phyllostomidea, a pesar de que los grupos Carrollinae y Stenodermatinae comparten

ancestro común, tanto en la hipótesis presentada en este trabajo como en propuestas anteriores, en las cuales se emplearon diferentes métodos y caracteres (Wetterer *et al.*, 2000; Carsten *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2011; Monteiro y Nogueira, 2011; Rojas *et al.*, 2011; Baker *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2012). La reconstrucción de caracteres sugiere que surgió dos veces, debido a la inclusión de miembros del grupo Micronycterinae, primordialmente insectívoros, como especies hermanas de *Carollia*, además de la presencia de una especie de *Phyllostomus* que también es capaz de consumir este tipo de alimento.

Las "especializaciones de consumo de néctar" aparecen una sola vez dentro de la familia Phyllostomidae en la filogenia concatenada, sin embargo autores como Simmons y Wetterer (2002) han incluido a los miembros de los grupos Glossophaginae y Phyllonycterinae como el primer grupo en el que aparecen el carácter de consumo de néctar llamándolo Hirsutoglossa, mientras que según ellos, los Lonchophyllinae y Brachyphyllinae posteriormente adquieren esta capacidad, en ese sentido la propuesta de que Lonchophyllinae es grupo hermano de la subfamilia Stenodermatinae es apoyada por Datzmann *et al.*, (2010) y Rojas *et al.*, (2011). En ambos casos la relación se mantiene igual. Por su parte Datzmann *et al.*, (2010) habla de una edad de 21 (15-23) m. a. para los Glossophaginae y 13 (8-19) m. a. para los Lonchophyllinae, fechas que concuerdan con las planteadas en la reconstrucción que se propone aquí (21.9 (18.5-24.8) m. a. para Glossophaginae y 14 (8.5-19) m.a. para Lonchophyllinae) y con la propuesta de Rojas *et al.*, (2011) en donde plantean edades de 20.1 (17-23.7) m. a. para Glossophaginae y 12.9 (8.6-17.2) m. a. para Lonchophyllinae.

Debido a la relación que se ha observado entre los cactus y agaves con los murciélagos, algunos autores han planteado que podría existir un fenómeno de coevolución entre éstos grupos (Good- Avila *et al.*, 2006; Flores, 2007; Fleming *et al.*, 2009) y una forma de explorar esta posibilidad es indagando eventos ecológicos, geológicos y/o climáticos en el pasado que pudieran haber impulsado cambios en poblaciones de murciélagos.

3. Tiempos de Divergencia

Se tienen distintas propuestas acerca del origen de los murciélagos, actualmente una de las más citadas es la del origen en la época Cretácica, durante el límite K-T. Bininda-Emonds (2005) menciona un origen para los murciélagos alrededor de hace 84.8 m. a. y 71.2 m. a., durante el Cretácico, mientras que Teeling *et al.*, (2005) proponen un origen de los Phyllostomidae, durante el Eoceno hace poco más de 36 (32-42) m. a. (Tabla 12).

Tabla 12. Tiempos de divergencia (millones de años) calculados para la familia Phyllostomidae por diferentes autores y el presente trabajo

Nodo	Estimados en este trabajo	Teeling <i>et al.</i> , (2005)	Flores (2007)	Baker <i>et al.</i> , (2010)	Datzmann, (2010)	Rojas <i>et al.</i> , (2012)
Raíz	36.25 (32.2 - 43.3)	42 (37 - 47)	47	33 (37.8 - 24.7)	47 (40 - 53)	---
Outgroup	35.4 (32 - 30.4)	36 (32 - 42)	40.97	31 (30.4 - 28.6)	42 (37 - 49)	37.8 (33.4 - 43.1)
Phyllostomidae	27.67 (24.7 - 30.9)	26 (21 - 30)	27.61	30 (35 - 25)	35 (34 - 40)	35.3 (32.8 - 37.9)
Micronycterinae	23.6 (14.6 - 28.9)	---	---	23.51 (19 - 28)	34 (30 - 38)	22.8 (16.8 - 28.5)
Glossophaginae	21.91 (18.6 - 24.9)	19 (15 - 23)	22.79	21.55 (19.7 - 23.4)	22 (17 - 25)	20.1 (17 - 23.7)
Desmodontinae	21.24 (12.6 - 27.2)	26 (21 - 30)	---	21.67 (21 - 22.4)	19 (12 - 24)	23.2 (19 - 27.4)
Phyllostominae (Carnívoros)	20.99 (14.4 - 25.3)	22 (17 - 26)	---	18.69 (17.7 - 20.1)	27 (23 - 31)	23.2 (20 - 26.6)
Stenodermatinae	15.05 (10.9 - 19.9)	---	---	14.56 (12.3 - 16.9)	14 (11 - 18)	15.5 (12.8 - 18.5)
Lonchophyllinae	14.07 (8.5 - 19)	---	---	11.13 (10.9 - 11.4)	13 (8 - 19)	12.9 (8.6 - 17.2)
Choeronycterinae	14.01 (9.6 - 18.1)	---	---	5.5 (2.4 - 8.6)	11 (5 - 11)	9.2 (6.4 - 11.9)
Glyphonycteris	11.54 (3.9 - 19.3)	---	---	12.36 (10.1 - 14.6)	14 (9 - 18)	14.4 (10.3 - 18.1)
Rhinophylla	10.63 (5.3 - 17.2)	---	---	17.04 (15.4 - 18.6)	20 (16 - 24)	17.7 (14.9 - 20.6)
Artibeus	10.24 (7.19 - 15.1)	---	---	6.62 (5.5 - 7.8)	12 (8 - 15)	6.5 (4.6 - 8.5)
Anoura	10.11 (4.9 - 17.3)	---	---	15.9 (14.3 - 17.7)	21 (15 - 23)	18 (14.7 - 21.5)
Glossophaga	7.95 (4.1 - 14.1)	---	11.82	11.50 (10.1 - 12.9)	14 (6 - 14)	10.4 (6.9 - 14.2)
Leptonycteris	6.63 (2.4 - 13)	---	12.43	11.50 (10.1 - 12.9)	14 (6 - 14)	10.4 (6.9 - 14.2)
Carollinae	6.44 (2.8 - 13)	---	---	17.58 (17.5 - 17.5)	5 (4 - 13)	18.8 (15.4 - 22.1)
Monophyllus	5.28 (1.5 - 13.5)	---	---	12.7 (11.9 - 13.5)	17 (9 - 18)	14.9 (11.2 - 18.5)
Platyrrhinus	5.1 (2.7 - 8.3)	---	---	7.99 (7 - 9)	---	6.9 (4.4 - 9.5)

A partir de los trabajos anteriores, se han realizado, con nuevas herramientas tecnológicas otras propuestas bajo el esquema de reloj molecular obteniendo resultados similares en el cálculo de las edades de la familia Phyllostomidae. En general, se puede notar que los tiempos estimados para la aparición y diversificación de la familia Phyllostomidae no distan de manera exagerada entre los diferentes autores y el presente trabajo. Cabe resaltar que en los trabajos realizados a principios de este siglo se utilizaron métodos basados en algoritmos distintos a los actuales. Por ejemplo, Teeling *et al.*, (2005) se basan en máxima verosimilitud, mientras que trabajos más recientes se basan en inferencia bayesiana, como las propuestas de Hoffman *et al.*, (2008); Baker *et al.*, (2010); Datzmann *et al.*, (2012) y; Rojas *et al.*, (2011). Ha sido muy importante el aporte de cada uno de los trabajos con distintos métodos, ya que se han encontrado coincidencias a grandes rasgos en los diferentes grupos analizados, además de que son apoyados por evidencia fósil.

Dentro de la familia Phyllostomidae podemos apreciar distintas hipótesis de tiempos de divergencia, como el trabajo realizado por Hoffman *et al.*, (2008) para la subfamilia Phyllostominae. En esta propuesta los autores no incluyen al género *Micronycteris*, mismo género que en filogenias moleculares se presenta como grupo parafilético. La edad de la subfamilia Phyllostominae calculada en el trabajo mencionado fue de 19.5 (+/- 2) m.a., durante el Mioceno-temprano. Esta edad se traslapa con la edad calculada en la filogenia de la base de datos concatenada presentada en este trabajo la cual es de 20.99 (14.4-25.3) m. a.

El grupo de los nectarívoros, agrupados todos en la subfamilia Glossophaginae, aunque hay algunos autores que hacen la distinción entre los lonchophyllinos, brachyphilinos y choeronycterinos (Carstens *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2011), en la presente reconstrucción filogenética se presentan como grupo monofilético. Se conocen 12 géneros que consumen néctar como fuente principal de alimentación. En este estudio, se estimaron los tiempos de separación de los clados caribeños que consumen néctar (*Brachyphylla*, *Erophylla* y *Phyllonycteris*) de los clados continentales, específicamente del género *Anoura*, de hace 17.31 m. a. A pesar de considerarse como un grupo monofilético con la presente hipótesis, hay autores que consideran que especies nectarívoras están relacionadas de manera más estrecha con la subfamilia Stenodermatinae (Datzmann *et al.*, 2011; Rojas *et*

al., 2011), lo cual sugeriría eventos de especialización independientes.

En terminos generales, las fechas estimadas para la familia Phyllostomidae con los dos genes utilizados en la presente propuesta no difieren en gran medida de los resultados reportados anteriormente, los cuales se basan en otros genes y/o se analizaron con diferentes métodos, tanto de filogenia como de calibración de reloj molecular. También es necesario aclarar que las diferencias se pueden deber a que en este trabajo se aportan nuevas secuencias, por lo que la muestra, al menos para la familia, es mayor que en otros trabajos. En el caso de los trabajos citados, los autores realizaron las construcciones filogenéticas y las estimaciones de tiempos de divergencia con pocos representantes por género lo cual puede limitar los cálculos a escala más fina, sin embargo se mantiene la consistencia de fechas estimadas a nivel de familia y subfamilia.

4. Radiación, tasas de diversificación, coevolución y climas

La radiación adaptativa es un concepto que implica la evolución rápida de varias especies en un arreglo amplio de tipos ecológicos y morfológicos, conducidos por la oportunidad ecológica. Al estudiarla se consideran tasa de especiación, número de especies y diversidad morfológica, que en algunos casos resulta en diversidad ecológica (Givnish y Sytsma, 1997). En el mismo sentido, Schluter (1996) considera que la radiación adaptativa es la diversificación de un linaje en especies que explotan una variedad de diferentes tipos de recursos y que difieren en sus características morfológicas y/o fisiológicas usadas para la explotación de esos recursos.

La familia Phyllostomidae cumple las características de una radiación adaptativa a partir de una dieta ancestral a base de insectos. Los descendientes actuales pueden ser insectívoros, pero también carnívoros (consumidores de presas vertebradas), nectarívoros, frugívoros, hematófagos y omnívoros. Además de los hábitos alimenticios, debido a las características morfológicas, tales como las diferencias estructurales de la mandíbula (Monteiro y Nogueira, 2011) que han desarrollado a lo largo de su historia evolutiva se considera que ocurrió un fenómeno de radiación adaptativa (Freeman, 2000).

A pesar de lo que mencionan autores como Givnish y Sytsma, (1997), Schluter (1996) y Futuyma (2005), otros autores cuestionan que la radiación adaptativa sea un proceso definible bajo las consideraciones antes mencionadas. Según Olson y Arroyo-

Santos (2009), la “adaptación” como tal no esta incluida en la idea de “radiación adaptativa”, ya que según ellos no hay un consenso en el concepto, puesto que los biólogos lo han utilizado para expresar la idea de evolución rápida o acelerada de muchas especies dentro de una amplia gama de tipos morfológicos y ecológicos, conducidos por oportunidades ecológicas.

En cuanto a los autores que defienden la idea de la radiación adaptativa y que manejan como ejemplo de este fenómeno a los murciélagos, se encuentran Fleming y Muchhala (2008). Ellos proponen que hay causas ecológicas de la radiación adaptativa y que pueden ser inferidas a partir de la "especialización ecológica" con el número de interacciones de los murciélagos y los organismos con los cuales interaccionan. Por otro lado, la "especialización fenotípica" en la cual se pueden observar la adaptación que funciona, sin darle peso a la relación con otro organismo, lo importante aquí es el tamaño, calidad y función. Y por último, la "especialización evolutiva" como proceso que incrementa la especialización ecológica (especificidad). Por ejemplo, en el caso de los murciélagos de la subfamilia Glossophaginae, la combinación de especializaciones fenotípicas que incrementan la efectividad como polinizador primario y restringe a los demás visitantes coincide con la idea de Fleming y Muchhala, y éste proceso, se cree que pudo haber ocurrido con un incremento de la diversidad de algunos grupos de plantas con flores durante el Mioceno (Good-Ávila, 2006; Flores, 2007; Barba, 2012).

Como ya se ha mencionado, la mayoría de las subfamilias de murciélagos filóstomidos aparecieron durante el Mioceno, incluyendo a los nectarívoros. El mismo caso ocurre con los colibríes, quienes muestran su mayor radiación en el Nuevo Mundo durante la misma época (alrededor de 17 m. a. atrás; Bleiweiss, 1998), y al igual que los murciélagos, muchos colibríes consumen insectos como fuente alimenticia secundaria (Fleming y Muchhala, 2008). Actualmente se tiene registro de plantas visitadas por ambos grupos jugando papeles antagónicos al competir por el recurso, por ejemplo *Passiflora penduliflora* es visitada por colibríes y por los quirópteros *Monophyllus redmani* y *Glossophaga soricina* (Kay, 2001).

En cuanto a las plantas relacionadas con los murciélagos, se conocen varios ejemplos, sin embargo la relación que han mantenido con los cactus y agaves ha llamado mucho la atención, al grado que se menciona que ésta relación es consecuencia de un

proceso de coevolución difusa (Flores, 2007; Barba, 2012). La primera coincidencia la podemos apreciar con las tasas de diversificación calculadas por Magallón y Castillo (2009), en donde ellas mencionan que ocurre un incremento en el número de especies de las angiospermas hace 34 m. a. (en el puente entre el Eoceno y Oligoceno), fecha que se encuentra muy cercana al tiempo de divergencia de la familia Phyllostomidae respecto de las familias Mormoopidae y Noctilionidae, calculados con la base de datos concatenada (36.25 m. a.).

La edad de origen de la familia Cactaceae ha sido datada con alrededor de 35 m. a. y su mayor diversificación ocurrió durante el Mioceno, con dos pulsaciones de diversificación rápida, una entre los 8 y 6 m. a. atrás y la segunda entre los 3 y 2.5 m. a. atrás (Arakaki *et al.*, 2011; Barba, 2012). De ésta familia, las tribus Hylocereeae y Pachycereeae están ampliamente distribuidas en Norte y Centro América (Nyffeler, 2002). Estas tribus cuentan con especies con características de polinización por murciélagos y fueron fechadas con una edad de 11.86 (11 - 13.55) m. a. (Barba, 2012), fecha que coincide con los rangos calculados para los nodos de los nectarívoros Choeronycterinea, Lonchophyllinae, *Anoura*, *Glossophaga*+*Leptonycteris*.

Otro grupo de plantas con relación ecológica actual con los murciélagos es Agavaceae. Good-Ávila *et al.*, (2006), obtuvieron la edad de esta familia como 20.5 a 25.8 millones de años. Y para *Agave sensu lato* una edad de entre 7.9 y 9.8 m. a. Como se puede apreciar la edad de origen de la familia, corresponde con el rango de edad estimado para el origen de los murciélagos nectarívoros (20.05 m. a.), y la edad del grupo *Agave sensu lato* corresponde con el rango de edad para los géneros *Glossophaga* y *Leptonycteris* (7.95 y 6.63 m. a. respectivamente, véase Apendice 4). Además *Agave sensu lato* tiene un pico en la tasa de diversificación hace 8-6 m. a. y otra hace 3-2.5 m. a. (Good-Ávila *et al.*, 2006), nuevamente coincidente con las fechas de origen de los géneros de murciélagos mencionados anteriormente, evento que corresponde con el incremento en las condiciones secas en el centro de México.

La evidencia geológica sugiere que la actividad volcánica entre los 30-15 m. a. atrás cambió el clima dentro el país, dando paso a regiones más secas en el centro después de este periodo y la formación del desierto de Sonora entre los 15 y 8 m. a. atrás (Van Devender, 2000). Entre los 5.3 y 1.8 m. a. atrás hubo una reversión general en el clima

provocando el cambio a un ambiente más tropical-húmedo después del cual se convirtió en periodos más fríos y secos en el periodo glaciario (Good-Ávila *et al.*, 2006).

En las exploraciones que se han realizado a la historia evolutiva de las Cactaceae, se ha inferido que la polinización en los nodos basales corresponde a síndromes de polinización por abejas, mientras que miembros de los géneros *Stenocereus*, *Pachycereus*, *Cephalocereus* y *Neobuxbaumia* actualmente presentan síndromes de polinización por visitantes nocturnos (Barba, 2012). Agavaceae del Nuevo Mundo parece haber evolucionado con la radiación de los glosófagos. Adicionalmente, las familias Caryocaraceae, Musaceae, Sonerataceae, relacionadas ecológicamente con la polinización nocturna evolucionaron en el Cretácico tardío y Cenozoico temprano, antes de la aparición de los murciélagos nectarívoros especializados (Barba, 2012).

Si las edades de origen y diversificación tanto de los murciélagos nectarívoros, como de las plantas asociadas a ellos coinciden de manera clara con la formación y extensión de las zonas áridas y semi-áridas de México y parte del continente (Nogués-Bravo, 2009), sería lógico buscar señales filogenéticas asociadas a variables climáticas. Se decidió por tanto explorar con el análisis de componentes principales las diferencias climáticas entre grupos, ya fuera por subfamilias o por hábitos alimenticios, sin embargo no se aprecian diferencias claras.

A pesar de no contar con un soporte estadístico que nos muestre de manera sencilla si hay variables climáticas que influyen sobre la distribución de los murciélagos filostómidos, sí se observa que la subfamilia Stenodermatinae (representada en el análisis como el grupo de los murciélagos frugívoros), abarca una gama más amplia de condiciones climáticas, a diferencia de Desmodontinae (hematófagos), Glossophaginae (nectarívoros) e incluso de los insectívoros. Una razón por la cual no se lograron diferenciar los grupos por variables climáticas puede obedecer al muestreo, considerando que la distribución de los frugívoros es muy amplia y que el número de especies es mayor en ese grupo respecto de los demás. A pesar de esto una diferencia que sí se aprecia es el rango amplio en las variables, misma que puede condicionar la presencia de recurso, es decir que los murciélagos hematófagos están más restringidos a condiciones climáticas tropicales por la presencia de sus presas (MacNab, 1974), mientras que el grupo de frugívoros puede encontrar mayor variedad de recursos en distintas condiciones climáticas (Rojas *et al.*,

2012). Una alternativa para explorar de manera más específica en las diferencias climáticas es realizar un análisis de la misma naturaleza pero a una escala más fina con grupos más pequeños, es decir no solo a nivel de hábito alimenticio sino por tribuos y/o géneros.

Por otra parte, el análisis de las tasas de diversificación nos ayuda a entender eventos que pudieron ocurrir a lo largo de la historia evolutiva del grupo (Barracough y Nee, 2001). En el caso de la familia Phyllostomidae, las tasas de diversificación nos muestran una tendencia de incremento constante alrededor de los últimos 30 m. a. coincidiendo con un incremento de grupos como de plantas ecológicamente relacionados, como cactus (Barba, 2012) y agaves (Good-Ávila *et al.*, 2006), en los que los tiempos de diversificación de grupos de murciélagos como *Leptonycteris* y *Glossophaga* coinciden con variaciones en las tasas de diversificación de los grupos antes mencionados.

Como se pudo observar en los resultados, el cálculo de la tasa de diversificación en el tiempo se ajustó a un modelo constante, sin embargo hay un decremento en dicha tasa hace 1.39 millones de años. Este decremento se puede explicar como un reflejo del muestreo. No se tomaron en cuenta todas las especies de las cuales se tienen registro debido a que en los últimos años se han descubierto nuevas especies y otras han cambiado de *status* taxonómico.

5. Coincidencias con eventos geológicos

Las fechas obtenidas en el presente trabajo pueden ser comparadas con eventos climáticos y/o geológicos que han ocurrido en la Tierra y específicamente en el continente Americano, lugar en el que se distribuyen los murciélagos de la familia Phyllostomidae. Por ejemplo, se ha mencionado que el origen de los filostómidos se dio al final del Eoceno, hace más de 35 a 33 m. a., durante el Eoceno ocurrió un calentamiento y una posterior disminución de la temperatura, sobre todo al final del mismo (Wolfe, 1994). Es también durante el Eoceno que se ha registrado la aparición de una alta diversidad de mamíferos en Sudamérica (Wilf *et al.*, 2003).

Durante la transición Eoceno-Oligoceno (35 m. a. atrás) vuelve a incrementarse la temperatura y en la transición hacia el Mioceno (23 m. a. atrás) ocurre otro decrecimiento de calor (Roth-Nebelsick, 2004; Blisniuk *et al.*, 2005; Van der Hammen *et al.*, 2000; Alroy *et al.*, 2000). Ambas fechas coinciden con puntos de divergencia de la familia

Phyllosotomidae, la primera con la aparición del grupo y la segunda con el surgimiento del grupo Glossophaginae y tal vez, un ligero incremento en su diversificación (Fig. 9).

En el Mioceno (23 - 6 m. a. atrás) se puede observar un cambio en la vegetación en varias zonas del continente. Alrededor de 20 m. a. atrás, este cambio se refleja en la dieta de caballos que habitaban en Norteamérica hace 20 a 15 m. a. y que se relacionó con una diversificación de ese grupo (Yang Wang, 1994). Por lo que podemos pensar que ésta fue una época muy importante para los murciélagos que se especializaron en el consumo de fuentes vegetales (ya sean frutos y/o néctar). Este lapso de tiempo coincide con las fechas de los nodos que nos indican la aparición de todas las subfamilias y la mayoría de sus géneros.

En el periodo del Mioceno tardío y la transición al Plioceno hay un cambio en la dieta de los herbívoros y un cambio en la fauna alrededor del mundo. Cambios faunísticos significativos han sido inferidos en Pakistán, Norteamérica, Sudamérica, Europa y África. En el sur de Norteamérica el cambio en la dieta ocurre entre los 6.8 y los 5.5 m. a. atrás, en el centro hace 4 m. a. atrás (Cerling et al., 1997), tiempo después ocurre el "gran intercambio" que se da (aproximadamente hace 2.7 m. a.) con la formación del Istmo de Panamá (Webb, 2006).

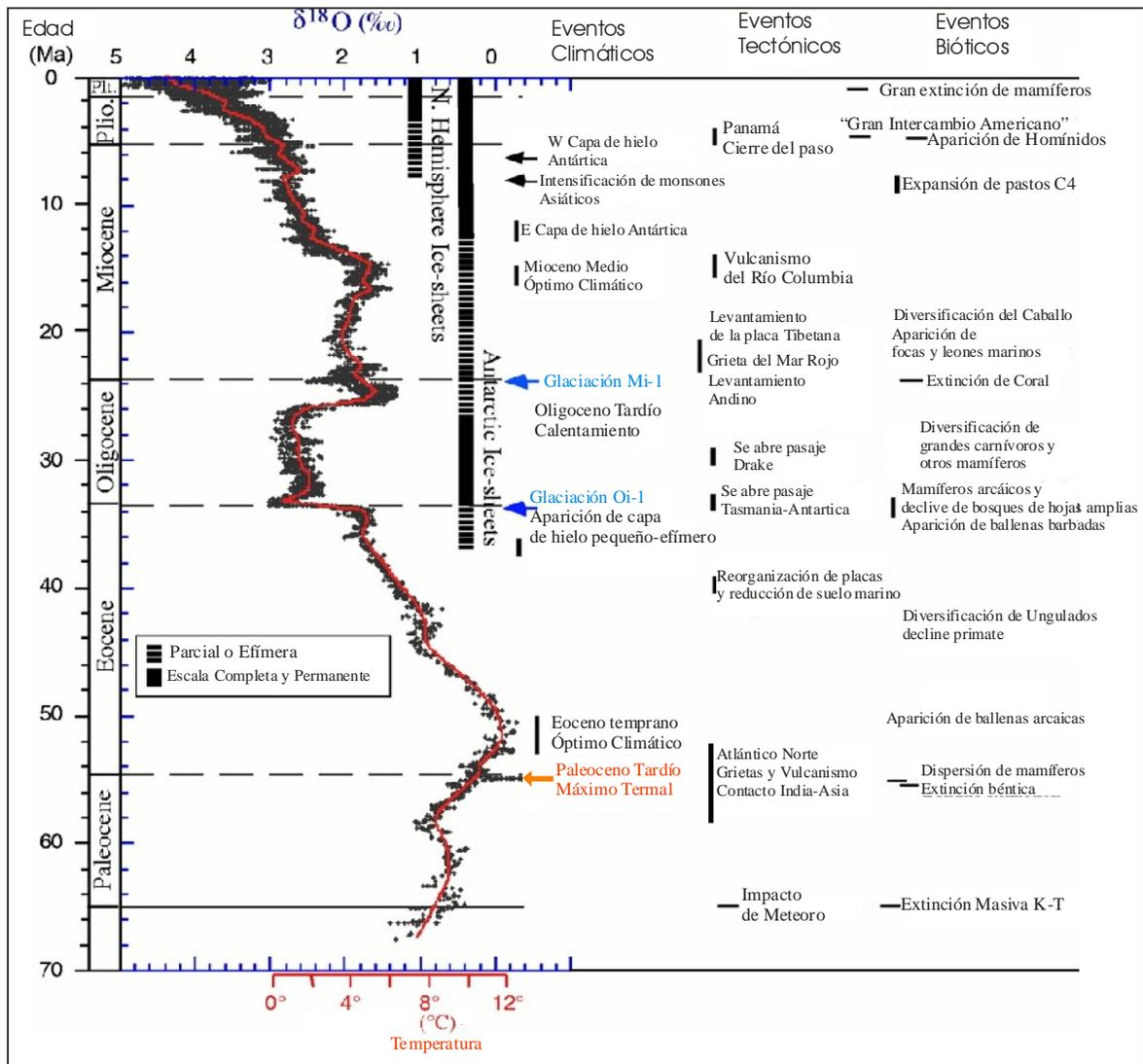


Figura 9. Diagrama temporal de calentamiento global con diversos eventos climáticos, tectónicos y biológicos. Modificado de Zachos *et al.*, (2001).

Dávalos (2006) plantea que la diversificación de géneros como *Carollia* y *Artibeus* se dió en el Plioceno por el puente del Istmo de Panamá, siendo su centro de origen Sudamérica y parte de América Central incluyendo la parte sur de México (Dávalos, 2006). Esta idea que se puede apoyar con las fechas planteadas con éste trabajo, ya que la aparición del género *Artibeus* ocurrió hace poco más de 6 m. a., y su mayor diversificación ocurrió entre 5 y 2 m. a. atrás.

En el caso de los murciélagos nectarívoros, las condiciones de diversificación podrían estar asociadas al incremento en recursos florales, en cuanto a incremento de especies, así como los cambios climáticos que favorecieron esta diversidad, ya que pudo haber un corredor de áreas áridas y semiáridas conectadas durante el avance del Pleistoceno

glacial (Wilkinson y Fleming, 1996; Fleming y Nassar, 2002).

Para poder relacionar con mayor claridad los eventos de especiación y/o radiación de los murciélagos filostómidos es necesario que se determine su centro de origen. En este sentido hay propuestas que si bien son aceptadas no se han podido consensuar de manera certera debido a la naturaleza del registro fósil. Si *Macrotus* es la base de la radiación de los filostómidos, entonces la distribución ancestral de los mormoopidos y los filostómidos fue adyacente en el norte de los Neotrópicos. Por otra parte, el fósil filostómido más antiguo conocido es de La Venta, Colombia (Czaplewski, 1997), indicativo de que se encontraron muy temprano en su historia en Sudamérica (Dávalos, 2006). Por lo cual se propone una colonización reversible de Sudamérica a las antillas o de Sudamérica a México y de ahí a las antillas, ambas hipótesis no se contraponen para Mormoopidea y/o a los glossophaginos (*Glossophaga* y *Leptonycteris*; Dávalos, 2007).

VIII. Conclusiones

1) La topología obtenida concuerda con estudios filogenéticos anteriores, tanto basados en caracteres morfológicos como en caracteres moleculares, y con estudios en los cuales utilizan ambos tipos de marcadores. La filogenia basada en los dos marcadores moleculares (concatenada) cuenta con suficiente soporte para apoyarnos en inferencias evolutivas.

2) La reconstrucción filogenética apoya la monofilia de la familia Phyllostomidae, de ésta misma forma, dentro de ésta, se agrupan los Desmodontinae, Stenodermatinae y los murciélagos nectarívoros (Glossophaginae). En contraste la subfamilia Phyllostominae y en particular los Micronycterinae son parafiléticos, dividiendo al género *Micronycteris* del género *Glyphonycteris*. De manera general, las subfamilias antes mencionadas se agrupan, en gran medida, de acuerdo a la naturaleza de su hábito alimenticio primario.

4) Se estimó una edad de 32.24 a 43.3 m. a. para la familia Phyllostomidae, y para el grupo de los nectarívoros (subfamilia Glossophaginae) una edad de 18.6 a 24.9 m. a. Las fechas de origen de la subfamilia Glossophaginae y de los géneros *Leptonycteris*, *Glossophaga* y el grupo Choeronycterinae, coinciden con fechas de eventos importantes relacionados con origen y diversificación de otros organismos relacionados ecológicamente, de manera antagónica (en competencia por el recurso), los colibríes y de manera mutualista con especies del grupo Cactaceae y *Agave*; grupos que han desarrollado parte de su historia evolutiva jugando roles ecológicos distintos. El apoyo más claro a esta idea es la coincidencia del aumento del número de especies de murciélagos nectarívoros en ciertas regiones y en ciertos momentos coincidentes con eventos geológicos y/o ecológicos de los que se tiene registro, principalmente durante el Mioceno.

5) Se observa una tasa de diversificación variable para el grupo de murciélagos filostómidos, que de manera estricta se ajusta a un modelo "yule2rates". Sin embargo, el cambio en la tasa coincide con la fecha de divergencia de uno de los nodos terminales correspondiente a las especies *Micronycteris minuta* y *M. silvestris* con una edad de 1.39 m. a, mismo que puede deberse a un muestreo incompleto de la familia.

6) Con éste trabajo se apoya la idea de que la diversificación de los murciélagos filostómidos esta relacionada con eventos climáticos y ecológicos, entre las que destaca la propuesta planteada anteriormente por Flores (2007) y Barba (2012) en la cual se propone una relación ecológica mutualista entre los murciélagos nectarívoros de América con los agaves y con cactus, respectivamente y una relación coevolutiva (de manera difusa) entre ambos grupos.

7) Los análisis realizados indican que se puede encontrar algún rastro filogenético de las condiciones climáticas en las que la familia Phyllostomidae se estableció y diversificó, sin embargo aún no se cuenta con la información particular que nos ayude a inferir en la historia evolutiva de los murciélagos y la importancia de dichas condiciones. Esta información nos ayudaría a entender aspectos de la relación ecológica y evolutiva entre estos mamíferos y las plantas a las cuales se han asociado, además de servir como base teórica para entender la importancia ecológica tanto de las especies mencionadas en el trabajo como de los ecosistemas en los que habitan que pueden estar en peligro por acción del hombre.

IX. Bibliografía

1. Adkins, R.M. and Honeycutt, R.L. 1991. Molecular phylogeny of the Superorder Archonta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88:10317-31.
2. Agnarsson, Ingi, Carlos M. Zambrana-Torrel, Nadia Paola Flores-Saldana and Laura J. May-Collado. 2011. A time-calibrated species-level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). *PLoS Curr*. 2011 February 4; 3: RRN1212.
3. Allen-Wardell, G., et al. 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology* 12:8-7.
4. Alroy, J., Koch, P. L., and Zachos. J. C. 2000. Global climate change and North American mammalian evolution. *Paleobiology* 26(sp4):259-288.
5. Alvarez, T., y L. González-Q. 1970. Análisis polínico del contenido gástrico de murciélagos Glossophaginae de México. *Anales Escuela Nacional Ciencias Biológicas* 18:137-165.
6. Arakaki, Mónica, Pascal-Antoine Christin, Reto Nyffeler, Anita Lendel, Urs Eggli, R. Matthew Ogburn, Elizabeth Spriggs, Michael J. Moore, and Erika J. Edwards. 2011. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages *PNAS* vol. 108(20):8379–8384.
7. Arita, H. T. y Santos del Prado, K. 1999. Conservation biology of nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Mammalogy* 80:31-41.
8. Arita, H. T. y Ceballos, G. 1997. Los mamíferos de México: Distribución y Estado de Conservación. *Revista Mexicana de Mastozoología* 2: 33-71.
9. Arizmendi, M. C., Valiente-Banuet, A., Rojas-Martínez, A., and Dávila-Aranda, P. 2002. Columnar Cacti and the Diets of Nectar-Feeding Bats. En: Fleming, T. H and Valiente-Banuet, A. Edit. 2002. *Columnar Cacti and Their Mutualists. Evolution, Ecology, and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson USA.
10. Arizaga, S., Ezcurra, E., Peters, E., Ramírez, F., Vega, E. 2000. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanisms, *American Journal of Botany*, 87:1004-1010.

11. Ballard, J. W.O., and Rand D. M. 2005. The Population Biology of Mitochondrial DNA and Its phylogenetic Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 36:621-642.
12. Baker, R. J., Craig. S. H. y Honeycutt R. L. 1989. Phylogenetic relationship and classification of the higher categories of the New World Bat Family Phyllostomidae. *Systematic Zoology*. 38(3):228-238.
13. Baker, R. J., Porter, C. A., Patton, J. C. and Van den Bussche. 2000. Systematics of Bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA Sequences. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*. 202: 1-16.
14. Baker, R. J., Hooper, S. R., Porter, C. A., and Van Den Bussche, R. A. 2003. Diversification among New World Leaf-Nosed Bats: An Evolutionary hypothesis and Classification Inferred from Digenomic Congruence of DNA Sequence. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*. 230:1-32.
15. Baker R.J., Bininda-Emonds O.R.P, Mantilla-Meluk H., Porter C.A., Van den Bussche R.A. 2010. Molecular timescale of diversification of feeding strategy and morphology in new world leaf-nosed bats (Phyllostomidae): a phylogenetic perspective. En *Evolutionary history of bats: fossils, molecules and morphology*, Cambridge Studies in Molecules and Morphology. Edited by Gunnel GF, Simmons NB. Cambridge University Press. 560 pp.
16. Barba Montoya, José Antonio. 2012. Diversificación de Pachycereae (Cactacea, Caryophyllales, Eudicotylodoneae) en relación al síndrome de polinización. Tesis de Maestría. UNAM.
17. Barry R. Lewis. ArcView 3.2a, MapInfo 6.0, and Manifold 4.5: A Comparative Review of Geographical Information System Software *Field Methods*, Vol. 12, No. 4. (1 November 2000), pp. 358-377.
18. Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko, Lubert Stryer. 2008. *Bioquímica*; versión española por José Ma. Macarulla. Barcelona; México: Reverté, 1226 p.
19. Bininda-Emonds, Olaf R. P., 2005. Fast Genes and Slow Clades: Comparative Rates of Molecular Evolution in Mammals. *Evolutionary Bioinformatics*. 3:59-85.
20. Bleiweiss, R. 1998. Tempo and mode of hummingbird evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*. 65, 63–76.

21. Blisniuk, Peter M., Libby A. Stern, C. Page Chamberlain, Bruce Idleman, and Peter K. Zeitler. 2005. Climatic and ecologic changes during Miocene surface uplift in the Southern Patagonian Andes. *Earth and Planetary Science Letters* 230: 125–142.
22. Barraclough, T. G. and Nee, S. 2001. Phylogenetics and speciation. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16(7):391-399.
23. Broennimann O, U. A. Treier, H. Müller-Shärer, W. Thuiller, A. T. Peterson y A. Guisan. 2007. Evidence of climatic niche shift during biological invasion. *Ecology Letters*. 10:701-709.
24. Bulmer, M., Wolfe, K. H, and Sharo, P. M. 1991. Synonymous nucleotide substitution rates in mammalian genes: Implications for the molecular clock and the relationship of mammalian orders. *Proceedings of Natural Academy of Sciences*. 88:5974-5978.
25. Burland, T. M., Barratt, E. M. y Racey, P. A. 1998 Isolation and characterization of microsatellite loci in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*, and cross species amplification within the family Vespertilionidae. *Molecular Ecology*. 7, 136-138.
26. Cartens C. B., Lundrigan L. B. y Myers P. 2002. A Phylogeny of the Neotropical Nectar-Feeding Bats (Chiroptera: Phyllostomidae) Based on Morphological and Molecular Data. *Journal of Mammalian Evolution*. 9(1):23-39.
27. Ceballos, G. y Giselle, O. 2005. *Los mamíferos de México*. Conabio. México. 986 pp.
28. Cerling, T. E., Harris, J. M., MacFadden, B. J., Leakey, M.G., Quade, J. Eisenmann, V. and Ehleringer, J. R. 1997. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature*. 389:153-158.
29. Chan, K. M. A., and Moore, B. R. 2002. Whole-tree methods for detecting differential diversification rates. *Systematic Biology*. 51(6):855-865.
30. Cole, F. R. y Wilson D. E. 2006. *Leptonycteris yerbabuena*. *Mammalian Species*. American Society of Mammalogists. 797: 1-7.
31. Collins, L.S., Coates, A. G., William, A.B., Aubry, MP. And Zhang Jijun. 1996. The late Miocene Panama Isthmian strait. *Geology*. 24:687-690.
32. Czaplewski, N.J., and Cartelle, C. 1998. Pleistocene bats from cave deposits in Bahia, Brazil. *Journal of Mammalogy*. 79:784-803.
33. Czaplewski, N. J, Takai, T. M. Naeher, N. Shigehara, y T. Setogushi. 2003. Additional bats from the middle Miocene La Venta fauna of Colombia. *Revista Academia Colombiana de la Ciencias*. Volumen 27(103):263-282.

34. Czaplewski, N. J., and G. S. Morgan. 2003. Fossil bats of the Americas. http://www.snomnh.ou.edu/collectionsresearch/crs/vertpaleo/fossil_bats/IT_phyllostomidae.html. Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History, acceso el 22 Junio 2011.
35. Dávalos, L. M. 2004. Phylogeny and biogeography of Caribbean mammals. *Biological Journal of Linnean Society*. 81:373-394.
36. Dávalos, L. M. 2005. Molecular phylogeny of Funnel-eared bats (Chiroptera: Natalidae), with notes on biogeography and conservation. *Molecular phylogenetics and Evolution*. 37:91-103.
37. Dávalos, L.M., 2006. The geography of diversification in the mormoopids (Chiroptera: Mormoopidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 88:101-118.
38. Dávalos, L.M. 2007. Short-faced bats (Phyllostomidae: Stenodermatinae): a Caribbean radiation of strict frugivores. *Journal of Biogeography*. 34:364-375.
39. Dávalos, L. M. and Corthals, A. 2008. A new species of *Lonchophylla* (Chiroptera: Phyllostomidae) from the eastern Andes of northwestern South America. *American Museum Novitates*. Number 3635, 16 pp.
40. Dávalos, L. M. and Jansa, S, A. 2004. Phylogeny of the Lonchophyllini (Chiroptera: Phyllostomidae). *Journal of Mammalogy*. 85(3):404-413.
41. Datzmann T, O Von Helversen y F Mayer. 2010. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evolutionary Biology* 10:165.
42. Demuth, J. P. De Bie, T. Stajich, J.E. Cristianini, N. and Hahn, M. W. 2006. The evolution of mammalian gene families. *Plos ONE*. 85:1-10.
43. Drummond, A., J, Simon, Y. W. Ho., Matthew J. Phillips y Rambaut A. 2006. Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLOS Biology*. 4(5):699-710.
44. Drummond, A. J. y Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 7:214.
45. Easterla, D. A. 1972. Status of *Leptonycteris nivalis* in Big Bend National Park, Texas. *Southwestern Naturalist* 17: 287-292.

46. Eckersley D.D., D.W. Schwa and C.O. Webb. 2006. Niche evolution and adaptive radiation: testing the order of trait divergence. *Ecology* 87(7):550-561.
47. Eick, G. N., Jacobs, D. S., and Matthee, C. A. 2005. A nuclear DNA Phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Molecular Biology and Evolution*. 22(9):1869-1886.
48. Eiting, Thomas P. and Gunnell, Gregg F. 2009. Global Completeness of Bat Fossil Record. *Journal of Mammal Evolution*. 16:151-173.
49. Farias, I.P, Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H. and Meyer, H. 2001. The Cytochrome-b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution*. 53:89-103.
50. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on Phylogenies with a Molecular Clock. *Systematic Zoology*. 34(2):152-161.
51. Felsenstein, J. 1984. Distance Methods for inferring phylogenies: A justification. *Evolution*. 38(1):16-24.
52. Felsenstein, J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. pp 662.
53. Felsenstein, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
54. Ferrarezi, H., and Gimenez, E. D. A. 1996. Systematic patterns and the evolution of feeding habits in Chiroptera (Archonta: Mammalia). *Journal of Computational Biology*. 1:75-94.
55. Fleming, T. H. 1982. Foraging strategies of plant-visiting bats. p. 287-325. In *Ecology of bats* (T. H. Kunz, ed.). Plenum Publishing Corporation, New York. 425 pp.
56. Fleming, T. H. 1988. *The Short-Tailed Fruit bat. A study in Plant-Animal Interaction. Wildlife behavior and Ecology Series*. The University of Chicago Press. 322pp.
57. Fleming, H. T. 1994. Lesser Long-Nosed Bat, Recovery Plan. Arizona Game and Fish Department (AGFD). U.S. Fish and Wildlife Service, Unpublished abstract compiled and edited by the Heritage Data Management System, Arizona Game and Fish Department, Phoenix, Arizona.

58. Fleming, T. H., and Nassar, J. 2002. Population Biology of the lesser long-nosed bats, *Leptonycteris curasoae* in México and Northern South-America. En: Fleming, T. H and Valiente-Banuet, A. Edit. 2002. Columnar Cacti and Their Mutualists. Evolution, Ecology, and Conservation. The University of Arizona Press. Tucson USA.
59. Fleming, T.H. And Muchhala, N. 2008. Nectar-feeding bird and bat niche in two worlds: pantropical comparisons of vertebrate pollination systems. *Journal of Biogeography*. 35:764-780.
60. Fleming, T. H., Geiselman, C. and Kress, W. J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany*. 104:1017-1043.
61. Flores, I. N. 2007. Coevolución entre el género *Agave sensu lato* y sus murciélagos polinizadores (Phyllostomidae). Tesis de Maestría. UNAM.
62. Fonseca, René M, and Pinto, Miguel. 2004. A New *Lophostoma* (Chiroptera: Phyllostomidae: Phyllostominae) from the Amazonia of Ecuador. *Ocasional Papers, Museum of Texas Tech University*. 242:1-12.
63. Freeland, J. R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons, Ltd. 388 pp.
64. Freeman, P.W. 2002. Nectarivorous feeding mechanisms in bat. *Biological Journal of the Linnean Society* 56(3): 439-463. En Tschapka, M. and Dressler, S. 2002. Chirotherophily: On bat-flowers and flower bats. *Royal Botanic Gardens*, 114- 123.
65. Futuyma, Douglas J. 2005. *Evolution*. Sinauer Associates Inc. Publishers. USA. pp. 603.
66. Gillete, D.D. 1975. Evolution of feeding strategies in bats. *Tewiba*. 18:39-48.
67. Givnish, T. J. and Sytsma, K. J. 1997. *Molecular Evolution and Adaptive Radiation*. Cambridge UK. New York, USA. 621 pp.
68. Godínez-Alvarez, H. y Valiente-Banuet, A. 2000. Fruit-Feeding behavior of the bats *Leptonycteris curasoae* and *Choeronycteris mexicana* in flight cage experiments: consequences for dispersal of columnar cactus seeds. *Biotropica*. 32(3):552-556.
69. Godínez-Alvarez, H., Valiente-Banuet, A., Rojas-Martínez, A. 2002. The role of seed dispersers in the population dynamics of the columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo*. *Ecology*. 83 (9):2617-2629.

70. Goldman, N. 1993. Statistical test of models of nucleotide substitution. *Journal of Molecular Evolution*. 36:182-198.
71. Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S., and Eguiarte, L E., 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(24):9124-9129.
72. Grechko, U.V. 2002. Molecular DNA Markers in Phylogeny and Systematics. *Russian Journal of Genetics*. 38(8):851-868.
73. Gunell, G. F., y Simmons B. N. 2005. Fossil Evidence and the Origin of Bats. *Journal of Mammalian Evolution*. 12(1/2):209-246.
74. gvGIS Software. Asociación gvSIG. (<http://www.gvsig.com/>).
75. Hawkins, J., Hughes, C. E., and Scotland, R. W. 1997. Primary Homology Assessment, Characters and Character States. *Cladistics* 13(3): 275–283.
76. Hahn, M. W. 2008. Toward a Selection Theory of Molecular Evolution. *Evolution*. 62-2:255-265
77. Hedrick, P. W. 2005. *Genetic of Population*. Jones and Bartlett Publishers. UK. 737 pp.
78. Heithaus, E. R. 1998. Coevolution between plants and bats. p. 327-367. En *Ecology of bats* (T. H. Kunz, ed.). Plenum Publishing Corporation, New York. 425 pp.
79. Hershkovitz, M. A., and E. A. Zimmer. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. *Taxon* 46: 217–232.
80. Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones and A. Jarvis, 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.
81. Hill, John E. y Smith, James D., *Bats: A Natural History*. University of Texas Press, Austin, USA. 1984.
82. Hoffman, F. G., Hoofer, Steven R., Baker, R. J. 2008. Molecular dating of the diversification of Phyllostominae bats based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:653–658.

- 83.Hoffman, F. G and Baker, Robert J. 2001. Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera:Phyllostomidae) and Phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome-b gene. *Journal of Mammalogy*. 82(4):1092–1101.
- 84.Hoffman, F. G. and Baker, R. J. 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (Carollia:Phyllostomidae). *Molecular Ecology*. 12:3403-3414.
- 85.Homan, A., y Knox Jones, J. 1975. *Monophyllus redmani*. *Mammalian Species*. The American Society of Mammalogist. 57:1-3.
- 86.Hooper, S. R. and Baker, R. J. 2006. Molecular systematics of Vampiressine bats (Phyllostomidae:Stenodermatinae) with comparison of direct and indirect surveys of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39:424-438.
- 87.Hornik. 2012, “The R FAQ”, and give the above, *official* URL and the ISBN 3-900051-08-9: <http://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>
- 88.Howell, D. J. y Hart D. L. 1980. Optimal foraging in glossophagine bats: when to give up. *American Naturalist* 115: 696–704.
- 89.Howell, D., y B. S. Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats, the cost of semelparous advertising. *Ecology*. 62: 1-7.
- 90.Howell, D. J. 1979. Flock foraging in nectar-feeding bats: advantages to the bats and to the host plants. *American Naturalist*. 113:23-49.
- 91.Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J. P. 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science*. 294:2310-2314.
- 92.Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 17:754-755.
- 93.Huelsenbeck, J. P., Larget, B. Miller R. E., and Ronquist, F. 2002. Potential Applications and Pitfalls of Bayesian Inference of Phylogeny. *Systematic Biologu*. 51(5):673-688.
- 94.Janis, C. M., 1993. Tertiary mammal evolution in the context of changing climates, vegetation, and tectonic events. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 24:467-500.
- 95.Jepsen, G. L. 1966. Early Eocene bat from Wyoming. *Science* 154: 1333.

96. Jones, K. E., Andy Purvis, Ann MacLarnun, Olaf R. P. Bininda-Emonds y Nancy B. Simmons. 2002. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biological Reviews*. 77:223-259.
97. Jones K. E., Olaf, R P., Bininda-Edmonds y John L. Gittleman. 2005. Bats, Clocks and Rocks: Diversification Patterns in Chiroptera. *Evolution*. 59 (10):2243-2255.
98. Jones, K. E. and Teeling, E.C. 2006. The evolution of echolocation in bats. *Trends in Ecology and Evolution*. 21(3):149-156.
99. Kay, E. 2001. Observations on the pollination of *Passiflora penduliflora*. *Biotropica*. 33(4):709-713.
100. Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217:624-626.
101. Kirsch, J. A. W., and Lapointe, F. S. 1997. You aren't (always) what you eat: evolution of nectar-feeding among old world fruit bats (Megachiroptera: Pteropodidae). En: Givnish, T. J. and Sytsma, K. J. comp. 1997. *Molecular evolution and adaptive radiation*. Cambridge University, 1997. 621 pp.
102. Koopman, K. F. 1981. The Distributional Patterns of New World Nectar-Feeding Bats. *Annual Missouri Botanical Garden*. 68:352-369.
103. Koopman, K. 1994. Chiroptera: systematics. *Hadbuch der Zoologie*. 8:1-217.
104. Kozak Kenneth H, y John J. Wiens. 2010. Accelerated rates of climatic-niche evolution underlie rapid species diversification *Ecology Letters* 13:1378-1389.
105. Krajewski, C., and King, D.G. 1996. Molecular Divergence and Phylogeny: Rates and Patterns of Cytochrome b Evolution in Cranes. *Molecular Biology and Evolution*. 13(1):21-30.
106. Kunz, T. H., 1982. *Ecology of bats*. Plenum Publishing Corporation, New York. 425 pp.
107. Lewis-Oritt, N., Van Den Bussche, R. A., and Baker, R. J. 2001. Molecular evidence for evolution of piscivory in *Noctilio* (Chiroptera: Noctilionidae). *Journal of Mammalogy*. 82(3):748-759.
108. Lewis-Oritt, N., Porter, C. A., and Baker, R. J. 2001. Molecular Systematics of the Family Moormopidae (Chiroptera) Based on Cytochrome- b and Recombination Activating Gene 2 Sequencies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20(3):426-436.

109. Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
110. Lim, B. K. 2007. Divergence times and origin of neotropical sheath-tailed bats (tribe Diclidurini) in South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 45:777-791.
111. Lin, Yu-Hsin and Penny, D. 2006. Implications for Bat Evolution from Two New Complete Mitochondrial Genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 18(4):684-688.
112. Llorente, J. 2003. La búsqueda del método natural. Conacyt, SEP, Fondo de Cultura Económica. México. 158 pp.
113. Lobo, A. J., Quesada, M., and Stoner, K. E. 2005. Effects of pollination by bats on the mating system of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) populations in two tropical life zones in Costa Rica. *American Journal of Botany*. 92(2):370-376.
114. Losos, Jonathan B. 2008. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*, 11: 995–1007
115. Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>.
116. Maddison D. R., and Maddison, W. P. 2005. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.08a.
117. Magallón, Susana and Sanderson, Michael J., 2001. Absolute Diversification Rates In Angiosperm Clades. *Evolution*, 55(9):1762–1780.
118. Magallón, S. A. 2004. Dating lineages: molecular and paleontological approaches to the temporal framework of clades. *International Journal of Plant Sciences*. 165(4):7-21.
119. Magallón, S., and Castillo, A., 2009. Angiosperm diversification trough time. *American Journal of Botany*. 96(1):349-365.
120. Magoulas, A. Tsimenides, N. And Zouros, E. 1996. Mitochondria DNA phylogeny and the reconstrucción of the population history of a species: The case of the European Anchovy (*engraulos encrasicolus*). *Molecular Biology and Evolution*. 13(1):178-190.

121. Mantilla-Meluk, H and R. J. Baker., 2006. Systematics of small *Anoura* (Chiroptera: Phyllostomidae) from Colombia, with description of a new species. Occasional Papers, Museum of Texas Tech. No. 261.
122. Martén-Rodríguez, S. and Fenster, C.B. 2008. Pollination ecology and breeding systems of fine *Gesneria* species from Puerto Rico. *Annals of Botany*. 102:23-30.
123. Martin, A. P. and Palumbi, S. R. 1993. Body, size, metabolic rate, generation time and the molecular clock. *Proceedings of Natural Academy Science*. 90:4087-4091.
124. Martins de Camargo, M., and Alves, L. 2005. Adapting to a changing world: RAG genomics and evolution. *Human Genomics*. 2(2): 132-137.
125. Martínez, C. L. 2007. Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En: E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre, comp. *Ecología Molecular*. 1ª Edición. Semarnat, Conabio, INE, UNAM. 592 pp.
126. Marshall, L. G. 1988. Land mammals and the Great American Interchange. *American Scientist*. 76:380-387.
127. Marshall OJ. 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 20(15):2471-2472.
128. McNab, B.K. 2003. Standard energetics of phyllostomid bats: the inadequacies of phylogenetic-contrast analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 135:357-368.
129. Molina-Freaner, F., Eguiarte, L. E. 2003. The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: contrasting roles of bats as pollinators, *American Journal of Botany*, 90: 1016-1024.
130. Monteiro, Leandro R., and Nogueira, Marcelo R. 2011. Evolutionary patterns and processes in the radiation of phyllostomid bats. *BMC Evolutionary Biology*. 11:137.
131. Moore, W. S. 1995. Inferring Phylogenies from mtDNA variation. *Mitochondrial-Gene Trees versus Nuclear-Gene Trees*. *Evolution*. 49(4): 718-726.
132. Morrone, J. J. 2001. *Sistemática, Biogeografía, Evolución*. Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio. Museo de Zoología Alfonso L. Herrera. Facultad de Ciencias, UNAM. 124 pp.

- 133.Moritz, C. 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transaction of Royal Society of London. B.* 349:113-118.
- 134.Muchhala, N., P. Mena, V., and L. Albuja V. 2005. A new species of *Anoura* (Chiroptera: Phyllostomidae) from the Ecuadorian Andes. *Journal of Mammalogy.* 86:457-461.
- 135.Munguía-Rosas, M.A., Sosa, V.J., Ojeda, M.M. and De-Nova, A. J. 2009. Specialization clines in the pollination systems of agaves (Agavaceae) and columnar cacti (Cactaceae): A phylogenetically controlled Meta-analysis. *American Journal of Botany.* 96(1):1887-1895.
- 136.Müller, K. 2006. Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 38:667-676.
- 137.Near, T.J., and Sanderson, M. J. 2004. Assessing the quality of molecular divergence time estimates by fossil calibrations and fossil-based model selection. *Philosophical Transactions of Royal Society of London.* 359:1477-1483.
- 138.Nee, S. Mooers, A. Q. and Harvey, Ph. 1992. Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. *Proceedings of National Academic of Sciences.* 89:8322-8326.
- 139.Nee, S. Holmes, E.C., May, R.M. and Harvey, P.H. 1994. Extinction rates can be estimated from molecular phylogenies. *Philosophical Transactions: Biological Sciences.* 344:77-82.
- 140.Nee, S. 2001. Inferring speciation rates from phylogenies. *Evolution.* 55:661-668.
- 141.Nee, Sean. 2006. Birth-Death Models in Macroevolution. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics.* 37:1-17.
- 142.Neuweiler, G. 2000. *The Biology of Bats.* Oxford University Press. New York. 310 pp.
- 143.Near, T.J. and Sanderson M. J. 2004. Assessing the quality of molecular divergence time estimates by fossil calibrations and fossil-based model selection. *Philosophical Transactions: Biological Sciences.* 359:1477-1483.
- 144.Nei, M. y Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press. USA. 333pp.

145. Nogueira, Marcelo P., Isaac P. Lima, Adriano L. Peracchi, and Nancy B. Simmons. 2012. New Genus and Species of Nectar-Feeding Bat from the Atlantic Forest of Southeastern Brazil (Chiroptera: Phyllostomidae: Glossophaginae). American Museum Novitates. American Museum of Natural History. Number 3747, 30 pp.
146. Nogués-Bravo, David. 2009. Predicting the past distribution of species climatic niches. *Global Ecology and Biogeography*. 18:521-531.
147. Novacek, M. J. 1985. Evidence for echolocation in the oldest known bats. *Nature* 315: 140.
148. Novembre, John y Stephens, M. 2008. Interpreting principal components analyses of spatial population genetic variation. *Nature*. 40(5):646-649.
149. Nyffeler, Reto. 2002. Phylogenetic Relationships In The Cactus Family (Cactaceae) Based On Evidence From *Trnk/ Matk* And *Trnl-Trnf* Sequences. *American Journal of Botany* 89(2): 312–326.
150. Ober, H. K. and Steidl, R. J. 2004. Foraging rates of *Leptonycteris curasoae* vary with characteristics of *Agave palmeri*. *The Southwestern Naturalist*. 49(1): 68-74.
151. Olson, M. E. And Arroyo-Santos, A. 2009. Thinking in continua: beyond the “adaptive radiation” metaphor. *BioEssays*. 9999:1-10.
152. Overton, L. C. and Rhoads D. D. 2004. Molecular phylogenetic relationships based on mitochondrial and nuclear gene sequences for the Todies (*Todus*, Todidae) of the Caribbean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32:524-538.
153. Pacheco, Víctor, Solari Sergio, and Velazco, Paul M. 2004. A New Species of *Carollia* (Chiroptera: Phyllostomidae) from the Andes of Peru and Bolivia. *Ocassional Papers, Museum of Texas Tech University*. 236:1-16.
154. Page, R. D and Holmes, E. C. 1998. *Molecular Evolution, a phylogenetic approach*. Blackwell Science. 346 pp.
155. Pagel, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature (Research Article)*, 401: 877-884.
156. Pagel, M, Meade A, Baker D. 2004. Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. *Systematic Biology*, 53, 673-684.

157. Pagel, M, Meade A. 2006. Bayesian analysis of correlated evolution of discrete characters by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *American Naturalist*, 167, 808-825.
158. Payne, Robert B. and Sorenson, Michael D. 2003. Museum Collections as Sources of Genetic Data. *Bonner zoologische Beiträge*. 51:97-104.
159. Peter B. Pearman, Antoine Guisan, Olivier Broennimann y Christophe F. Randin. 2008. Niche Dynamics in Space and Time. *Trends in Ecology and Evolution*. 23(3):149-158.
160. Peterson, A. T., J. Soberón and V. Sanchez-Cordero. 1999. Conservatism of Ecological Niches in Evolutionary Time. *Science* 285:1265-1267.
161. Phillips S, J. and Dudik, M. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*. 31:161-175.
162. Posada, D. and Crandall, K. A. 1998. Model-test: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics applications note*. 14(9):817-818.
163. Posada, D. and Crandall, K. A. 2001. Selection the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. *Systematic Biology*. 50(4):580-601.
164. Porter, C. A., Hooper, S. R., Cline, C. A., Hoffmann, F.G., and Baker, R.J. 2007. Molecular Phylogenetics of the phyllostomid bat genus *Micronycteris* with descriptions of two new genera. *Journal of Mammalogy*. 88(5):1205-1215.
165. Prinzing, A., Durka, W., Klots, S, and Brandl, R. 2001. The niche of higher plants: evindence for phylogenetic conservatims. *Proccedings of the Royal Society of London*. 268:2383-2389.
166. Proctor, M., Yeo, P & Lack, A. 1996. *The Natural History of Pollination*, Timber Press, Portland USA.
167. Pulquéiro, M. J. F and Nichols, R. A. 2006. Dates from the molecular clock: how wrong can we be? *Trends in Ecology and Evolution*. 22(4):180-184.
168. Rabosky, D. L. 2006a. Likelihood Methods for Detecting Temporal Shifts in Diversification Rates. *Evolution*. 60(6):1152-1164.
169. Rabosky, D. L. 2006b. LASER: A Maximun Likelihood Toolkit for Detecting Temporal Shifts in Diversifiacion Rates From Molecular Phylogenies. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2:247-250.

170. Rabosky, D. L. y Lovette. I.J. 2008. Explosive Evolutionary Radiations: Decreasing Speciation or Increasing Extinction Through Time?. *Evolution* 62-8:1866-1875.
171. Rabosky, D. L. 2009. Ecological Limits on Clade Diversification in Higher Taxa. *The American Naturalist*. 173(5):662-674.
172. Rentería, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre, comp. *Ecología Molecular*. 1ª Edición. Semarnat, Conabio, INE, UNAM. 592 pp.
173. Rex K, Czaczkcs BI, Michener R, Kunz TH, Voigt CC. 2010. Specialization and omnivory in diverse mammalian assemblages. *Ecoscience*, 17, 37–46.
174. Rocha, M., Valera, A., Eguiarte, L. E. 2005. Reproductive ecology of five sympatric *Agave Littea* (Agavaceae) species in central Mexico, *American Journal of Botany*, 92: 1330-1341.
175. Rojas-Sandoval, J. and Meléndez-Ackerman, E. 2009. Pollination biology of *Harrisia portoricensis* (Cactaceae), an endangered Caribbean species. *American Journal of Botany*. 96(12):2270-2278.
176. Rojas Danny, Angel Vale, Victoria Ferrero and Luis Navarro. 2011. When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae. *Molecular Ecology*. 20:2217-2228.
177. Rojas Danny, Angel Vale, Victoria Ferrero and Luis Navarro. 2012. The role of frugivory in the diversification of bats in the Neotropics. *Journal of Biogeography*. Special Issue. 1-13.
178. Roth-Nebelsick, A., T. Utescher, V. Mosbrugger, L. Diester-Haass, and H. Walther. 2004. Changes in atmospheric CO₂ concentrations and climate from the Late Eocene to Early Miocene: palaeobotanical reconstruction based on fossil floras from Saxony, Germany. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 205: 43– 67.
179. Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
180. Ronquist, F., van der Mark, P. and Huelsenbeck, J.P. 2010. Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. Lemey, Philippe, Salemi, Marco and Vandamme, Anne-Mieke Editors. *The Phylogenetic Handbook*. 2º Edition. Cambridge University Press. pp 723.

181. Rutschmann, F. 2006. Molecular dating of phylogenetic trees: A brief review of current methods that estimate divergence times. *Diversity and Distribution*. 12:35-48.
182. Rydell, J., and Speakman, J. R. 1995. Evolution of nocturnality in bats: potential competitors and predators during their early history. *Biological Journal of Linnean Society*. 54:183-191.
183. Rydell, J., Entwistle, A., and Racey, P. A., 1996. Timing of foraging flights of three species of bats in relation to insect activity and predation risk. *OIKOS*. 76:243-252.
184. Sanderson, M. J. 1997. A Non-parametric Approach to Estimating Divergence Times in the Absence of Rate Constancy. *Molecular Biology and Evolution*. 14(2):1218-1231.
185. Sanderson, M. J. 2002. Estimating Absolute Rates of Molecular Evolution and Divergence Times: A Penalized Likelihood Approach. *Molecular Biology and Evolution*. 19(1):101-109.
186. Sanderson, M. J. 2003. R8S: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics*. 19:301-302.
187. Sanderson, M. J., Thorne, J. L., Wikström, N., and Bremer, K. G. 2004. Molecular evidence on plant divergence times. *American Journal of Botany*. 91:1656-1665.
188. Santos, M. and Arita, H. 2002. Priority Areas for the Conservation of New World Nectar-Feeding Bats. En: Fleming, T. H and Valiente-Banuet, A. Edit. 2002. *Columnar Cacti and Their Mutualists. Evolution, Ecology, and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson USA.
189. Schluter, D. 1996. Ecological Causes of Adaptive Radiation. *The American Naturalist*. 148:40-64.
190. Schnitzler, Hans-Ulrich and Kalko, E. 2009. Echolocation by Insect-Eating Bats. *Bioscience*. 51(7):557-569.
191. Schondube, J. E., Herrera-M., L. G., and Martínez del Rio, C. 2001. Diet and the Evolution of Digestion and Renal Function in Phyllostomids Bats. *Zoology*. 104:59-73.
192. Scott, P. E. 2004. Timing of *Agave palmeri* flowering and nectar-feeding bat visitation in the Peloncillos and Chiricahua Mountains. *The Southwestern Naturalist*. 49 (4): 425-434.

193. SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social) 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994. que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres y terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial, 438:2-60. En: Arita, H. T., and K. Santos Del Prado. 1999. Conservation biology of nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Mammalogy* 80:31-41.
194. Simmons, N. B. 1996. A New Species of *Micronycteris* (Chiroptera: Phyllostomidae) from Northeastern Brazil, with Comments on Phylogenetic Relationships. *American Museum Novitates*. American Museum of Natural History, New York. Number 3158. 34 pp.
195. Simmons, N. B. 2005. An Eocene Big Bang for Bats. *Science*. 307:527-528.
196. Simmons, M. P., Müller, K. and Norton, A. P. 2007. The relative performance of indel-coding methods in simulations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44:724-740.
197. Simmons, N. B. and Wetterer, A. L. 2002. Phylogeny and Convergence in Cactophilic Bats. En: Fleming, T. H and Valiente-Banuet, A. Edit. 2002. *Columnar Cacti and Their Mutualists. Evolution, Ecology, and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson USA.
198. Silva-Montellano, A., and Eguiarte, L. E. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity, *American Journal of Botany*. 90:377-387.
199. Soriano, P. J. and Ruiz, A. 2002. The role of Bats Birds in the Reproduction of Columnar Cacti in the Northern Andes. En: Fleming, T. H and Valiente-Banuet, A. Edit. 2002. *Columnar Cacti and Their Mutualists. Evolution, Ecology, and Conservation*. The University of Arizona Press. Tucson USA.
200. Soto-Centeno, J. A and Kurta, A. 2006. Diet of two nectarivorous bats. *Erophylla sezekorni* and *Monophyllus redmani* (Phyllostomidae), on Puerto Rico. *Journal of Mammalogy*. 87(1):19-26.
201. Springer, M. S., DeBry, R. W., Dovady, C., Amrine, H. M., Madsen, O. de Jong, W.W., and Stanhope, M. J. 2001. Mitochondrial versus Nuclear Gene Sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. *Molecular Biology and Evolution*. 18(2): 132-143.
202. Springer, M. S., Teeling, E. C., Madsen, O., Stanhope, M. J., y de Jong W.W. 2001. Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation. *PNAS Evolution*. 98(11):6241-6246.

203. Springer, M. S., Teeling, E. C., Madsen, O., Stanhope, M. J. y Wilfried, W. de Jong. 2001. Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation. PNAS, Harvard University, Cambridge. 98(11):6241-6246.
204. StatSoft, Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
205. Steppan S.J., Akhverdyan M.R., Lyapunova E.A., Fraser D.G., Vorontsov N.N., Hoffmann R.S., Braun M.J. 1999. Molecular phylogeny of the marmots (Rodentia: Sciuridae): tests of evolutionary and biogeographic hypotheses. Systematic Biology 48: 715–734.
206. Stevens, R D. 2011. Relative effects of time for speciation and tropical niche conservatism on the latitudinal diversity gradient of phyllostomid bats. Proceedings of Real Society of British. 278: 2528-2536.
207. Swofford, D. L. 2003. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 2. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
208. Teeling, E. C., M. Scally, D. J. Kao, M. L. Romagnoli, M. S. Springer, and M. J. Stanhope. 2000. Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. Nature 403:188–192.
209. Teeling, E. C., Springer M. S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien, S. J., Murphy, W J. 2005. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. Science. 307:580-584.
210. Teeling, E. C., Madsen, O., Van Den Bussche, R. A., W. de Jong, W., Stanhope, M. J. and Springer M. S. 2002. Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophid microbats. PNAS, Harvard University, Cambridge. 99(3):1431-1436.
211. Tejedor, M. F., Czaplewski, N. J., Goin, F. J, and Aragón E. 2005. The oldest record of South American bats. Journal of Vertebrate Paleontology 25(4): 990-993.
212. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougnin, F. Higgings, D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24, 4876-4882.
213. Tschapka, M. and Dressler, S. 2002. Chiropterophily: On bat-flowers and flower bats. Royal Botanic Gardens, Kew. 114- 123.

214. Uwe, J., Fensome, R. A., and Medlin, L. K. 2003. The Application of a Molecular Clock based on Molecular Sequence and the Fossil Record to Explain Biogeographic Distribution within the *Alexandrium tamrense* "Species complex" (Dinophyceae). *Molecular Biology and Evolution*. 20(7):1015-1027.
215. Valiente-Banuet, A., Arizmendi, M.C., Rojas-Martínez, A., and Domínguez-Canseco, L. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*. 12:103-119.
216. Van Den Bussche, R. A. 1992. Restriction-site Variation and Molecular Systematics of New World Leaf-Nosed Bats. *Journal of Mammalogy*. 73(1):29-42.
217. Van Den Bussche, R. A. 1991. Phylogenetic Analysis Site Variation in the Ribosomal DNA Complex of New World Leaf-Nosed Bat Genera. *Systematic of Zoology*. 40(4):420-432.
218. Van Den Bussche, R. A., and Hooper, S. R., 2004. Phylogenetic Relationships among Recent Chiropteran Families and the Importance of Choosing appropriate Out-Group Taxa. *Journal of Mammalogy*. 85(2):321-330.
219. Van der Hammen, Thomas, and Hooghiemstra, Henry. 2000. Neogene and Quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia. *Quaternary Science Reviews* 19:725-742.
220. Van Devender, T.R. 2000. The deep history of the Sonoran Desert. Pp. 61–69. En S.J. Phillips and P.W. Comus (eds.). *A Natural History of the Sonoran Desert*. Arizona-Sonora Desert Museum Press, Tucson and University of California Press, Berkeley.
221. Von Helversen, O. and Reyer, H.U. 1984. Nectar intake and energy expenditure in a flower-visiting bats. *Oecologia* 63:178-178, En: Tschapka, M. and Dressler, S. 2002. *Chiropterophily: On bat-flowers and flower bats*. Royal Botanic Gardens, 114- 123.
222. Wang, Y., Thure E. Cerling and Bruce J. MacFadden. 1994. Fossil horses and carbon isotopes: new evidence for Cenozoic dietary, habitat, and ecosystem changes in North America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 107: 269-279.
223. Webb, S. D., 2006. The Great American Biotic Interchange: Patterns and Processes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93(2):245-257.
224. Weir J. T., and Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology* 17, 2321–2328.

225. Wetterer, A. L., Rockman, M. V. and Simmons, N. B., 2000. Phylogeny of Phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): Data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 248. pp 200.
226. Wiens, J. J. 2004. Speciation and Ecology Revisited: Phylogenetic Niche Conservatism and The Origin Of Species. *Evolution*, 58(1):193–197.
227. Wiens, John J., and Graham, Catherine H. 2005. Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:519-39
228. Wilf, Peter, N. Rubén Cúneo, Kirk R. Johnson, Jason F. Hicks, Scott L. Wing, John D. Obradovich. 2003 High Plant Diversity in Eocene South America: Evidence from Patagonia. *Science* Vol 300:122-125.
229. Wilson, D and Reeder, D. M. 2005. *Mammals Species of the World: a taxonomic geographic reference*. Baltimore: Johns Hopkins University. 2141 pp.
230. Wilkinson, G. S and Chapman, A. M. 1991. Length and Sequence Variation in Evening Bat D-Loop mtDNA. *Genetics* 128: 607-617.
231. Wilkinson, G. S. and Fleming, T. H. 1996. Migration and Evolution of Lesser Long-Nosed Bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*. 5:329-339.
232. Williams-Guillén, K., Perfecto, I., and Vandermeer, J., 2008. Bats Limit Insects in a Neotropical Agroforestry System. *Science*. 320: 70.
233. Wolfe, Jack A., 1994. Tertiary climatic changes at middle latitudes of western North America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 108: 195 205.
234. Wollenberg, K. L. Arnold, and House J.C. 1996. Recognizing the forest for the trees: testing temporal patterns of cladogenesis using a null model of stochastic diversification. *Molecular Biology and Evolution*. 13:833-849.
235. Woodman, Neal. 2007. A new species of nectar-feeding bat, genus *Lonchophylla*, from western Colombia and western Ecuador (Mammalia: Chiroptera: Phyllostomidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 120(3):340–358.
236. Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K. 2001. Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *Science*. 292 (5517): 686-693.

X. Apéndices

Apéndice 1

Tabla 13. Número de catálogo en el sitio web NCBI_Gen Bank de las secuencias utilizadas para la construcción de la filoogenia de los marcadores *Citocromo-b* y *RAG2*, en total se utilizaron 117 secuencias de ambos marcadores de 119 especies, de las cuales tres pertenecen a la familia Noctilionidae.

Especie	Cyt-B	RAG2
<i>Ametrida centurio</i>	AY604446	AF316430
<i>Anoura geoffroyi</i>	FJ155495	AF316431
<i>Ardops nichollsi</i>	AY572337	AF316434
<i>Ariteus flavescens</i>	AY604436	AF316435
<i>Artibeus amplus</i>	AY684756	----
<i>Artibeus Dermanura anderseni</i>	U66509	----
<i>Artibeus Dermanura aztecus</i>	FJ376713	----
<i>Artibeus Dermanura cinereus</i>	U66511	AF316443
<i>Artibeus Dermanura glaucus</i>	U66512	----
<i>Artibeus Dermanura phaeotis</i>	FJ376727	----
<i>Artibeus Dermanura toltecus</i>	FJ376728	----
<i>Artibeus Enchisthenes hartii</i>	EU160972	AF316449
<i>Artibeus fimbriatus</i>	U66498	DQ903835
<i>Artibeus fraterculus</i>	U66499	----
<i>Artibeus hirsutus</i>	FJ179226	AF316433
<i>Artibeus inopinatus</i>	FJ179228	----
<i>Artibeus jamaicensis</i>	GQ861667	GU328048
<i>Artibeus Koopmania concolor</i>	U66519	AF316432
<i>Artibeus lituratus</i>	FJ179234	DQ985532
<i>Artibeus obscurus</i>	U66507	DQ985518
<i>Artibeus planirostris</i>	U66508	----
<i>Brachyphylla cavernarum</i>	EU521660	AF316436
<i>Brachyphylla nana</i>	EU521662	FN641675
<i>Carollia brevicauda</i>	FJ154120	AF316437
<i>Carollia castanea</i>	AF512006	FN641676
<i>Carollia perspicillata</i>	AF511990	----
<i>Carollia subrufa</i>	AF187024	----
<i>Centurio senex</i>	AY604444	AF316438
<i>Chiroderma doriae</i>	AY169958	----
<i>Chiroderma improvisum</i>	L28938	----
<i>Chiroderma salvini</i>	L28939	----
<i>Chiroderma trinitatum</i>	DQ312413	----
<i>Chiroderma villosum</i>	FJ154121	AF316439

<i>Choeroniscus godmani</i>	----	AF316440
<i>Choeronycteris mexicana</i>	----	AF316441
<i>Chrotopterus auritus</i>	FJ155481	AF316442
<i>Desmodus rotundus</i>	DQ077398	AF316444
<i>Diaemus youngii</i>	FJ155475	AF316445
<i>Diphylla ecaudata</i>	DQ077399	AF316447
<i>Ectophylla alba</i>	DQ312404	AF316448
<i>Erophylla sezekorni</i>	AY620439	AF316450
<i>Glossophaga commisaris</i>	AF382886	----
<i>Glossophaga longirostris</i>	AF382875	----
<i>Glossophaga morenoi</i>	AF382882	----
<i>Glossophaga soricina</i>	AF423081	AF316452
<i>Glyphonycteris daviesi</i>	AY380747	----
<i>Glyphonycteris sylvestris</i>	AY380746	----
<i>Hylonycteris underwoodi</i>	----	AF316453
<i>Leptonycteris yerbabuenae</i>	AF382889	AF316454
<i>Lionycteris spurrelli</i>	AF423100	AF316455
<i>Lonchophylla handleyi</i>	AF423094	----
<i>Lonchophylla mordax</i>	AF423095	----
<i>Lonchophylla robustus</i>	AF423091	FN641677
<i>Lonchophylla thomasi</i>	AF423086	AF316456
<i>Lonchorhina aurita</i>	FJ155494	AF316457
<i>Lophostoma silvicolium</i>	DQ903830	AF442083
<i>Macrophyllum macrophyllum</i>	FJ155484	AF316458
<i>Macrotus californicus</i>	AY380744	AF316459
<i>Macrotus waterhousii</i>	AY380745	AF316460
<i>Mesophylla macconnelli</i>	FJ154122	AF316462
<i>Micronycteris Glyphonycteris daviesi</i>	----	AF316464
<i>Micronycteris hirsuta</i>	DQ077416	AF316465
<i>Micronycteris Lampronnycteris brachyotis</i>	AY380748	AF316463
<i>Micronycteris megalotis</i>	DQ077427	AF316467
<i>Micronycteris minuta</i>	DQ077405	AF316468
<i>Micronycteris schmidtorum</i>	DQ077406	AF316470
<i>Micronycteris sylvestris</i>	----	AF316471
<i>Micronycteris Trinycteris niceforis</i>	AY380749	AF316469
<i>Mimon bennettii</i>	DQ903832	----
<i>Mimon crenulatum</i>	FJ155478	AF316472
<i>Monophyllus plethodon</i>	AF382887	----
<i>Monophyllus redmani</i>	AF382888	AF316473
<i>Mormoops megalophylla</i>	AF330808	AF316474
<i>Musonycteris harrisoni</i>	----	AF316475

<i>Noctilio leporinus</i>	AF330802	AF316477
<i>Phylloderma stenops</i>	FJ155480	AF316480
<i>Phyllonycteris aphylla</i>	AF187033	AF316478
<i>Phyllops falcatus</i>	AY604450	AY604453
<i>Phyllostomus hastatus</i>	FJ155479	AF316479
<i>Platalina genovensium</i>	AF423101	----
<i>Platyrrhinus dorsalis</i>	FJ154139	FJ154337
<i>Platyrrhinus aurarius</i>	FJ154129	FJ154327
<i>Platyrrhinus brachycephalus</i>	FJ154132	FJ154330
<i>Platyrrhinus helleri</i>	FJ154147	AF316481
<i>Platyrrhinus infuscus</i>	FJ154151	FJ154349
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	FJ154173	DQ903840
<i>Platyrrhinus recifinus</i>	FJ154176	FJ154374
<i>Platyrrhinus vittatus</i>	FJ154178	FJ154376
<i>Pteronotus davyi</i>	AF338671	AF316482
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	AY604438	AF316483
<i>Rhinophylla alethina</i>	AF187028	----
<i>Rhinophylla fischerea</i>	AF187032	----
<i>Rhinophylla pumilio</i>	AF187031	AF316484
<i>Sphaeronycteris toxophyllum</i>	AY604452	AF316486
<i>Stenoderma rufum</i>	AY604432	AF316487
<i>Sturnira aratathomasi</i>	AF435252	----
<i>Sturnira bidens</i>	AF435201	----
<i>Sturnira bogotensis</i>	AF435248	----
<i>Sturnira erythromos</i>	FJ154179	FJ154377
<i>Sturnira lilium</i>	DQ312398	AF316488
<i>Sturnira ludovici</i>	AF435236	----
<i>Sturnira luisi</i>	AF435250	----
<i>Sturnira magna</i>	AF435180	----
<i>Sturnira mordax</i>	AF435216	----
<i>Sturnira nana</i>	AF435253	----
<i>Sturnira tildae</i>	DQ903816	DQ903847
<i>Tonatia bidens</i>	DQ903829	AF442088
<i>Tonatia brasiliense</i>	----	AF316489
<i>Trachops cirrhosus</i>	DQ903828	AF316490
<i>Uroderma bilobatum</i>	AY169955	AF316491
<i>Uroderma magnirostrum</i>	FJ154180	FJ154378
<i>Vampyressa bidens</i>	FJ154181	AF316492
<i>Vampyressa brocki</i>	DQ312421	FJ154383
<i>Vampyressa melissa</i>	FJ154185	----
<i>Vampyressa nymphae</i>	DQ312418	----

<i>Vampyressa pusilla</i>	DQ312428	AF316493
<i>Vampyrodes caraccioli</i>	FJ154184	AF316494
<i>Vampyrum spectrum</i>	FJ155482	AF316495

Apéndice 2

Protocolo de Extracción Utilizado para la extracción de ADN en muestras de museo o desecados usando Kit de Quiagen.

Consideraciones previas:

El ADN obtenido a partir de museo en general va a estar muy degradado y probablemente traiga consigo contaminantes que inhiban la reacción de PCR. En principio se debe evitar usar vórtex en altas revoluciones y de ser posible, en los pasos donde se requiera homogeneización es mejor invertir los tubos o pipetear suavemente. Es recomendable empezar la extracción con poco tejido para evitar dentro de lo posible la presencia de inhibidores de PCR, en este caso, entre menos tejido inicial, mejor.

1. Cortar un trozo de tejido de aproximadamente 5x5 mm, colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml, cortarlo en trozos más pequeños.
2. Agregar 1 ml de agua bidestilada estéril, vortex por 15 segundos, remover el agua, repetir una vez más, si el tejido está demasiado sucio repetir hasta que el agua no se enturbie.
3. Para hidratar el tejido, agregar **1ml** de solución **PBS** (8g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24 KH₂PO₄ aforar en 800 ml, ajustar pH a 7.4, esterilizar), vortex por 15 segundos, sellar el tubo con parafilm y dejar reposando a **55°C** toda la noche. Nota importante: el PBS se debe mantener almacenado en refrigeración, además de que al momento de ser usado solo se debe abrir el frasco en un medio estéril ya que este reactivo es muy susceptible a contaminarse.
4. Examinar que la textura del tejido sea suave (debe observarse un incremento en su volumen debido a la hidratación), de lo contrario, desechar el PBS y agregar nuevo. Dejar incubando hasta que el tejido quede completamente hidratado. Nota: si el PBS se encuentra turbio desecharlo y cambiarlo hasta que sea transparente.
5. De ser posible, cortar el tejido en pedazos aún más pequeños y colocarlos en un tubo nuevo.
6. Agregar **500 µl** de solución de **lisis de Pääbo** (0.01M Tris HCL pH 8.0, 0.01 M EDTA pH 8.4, 0.1 M NaCl, =.039 M DTT, 2% SDS, 50 mg/ml Proteinasas K).
7. Agregar **10 µl** de **proteinasas K** (10mg/ml) y **10 µl** de **DTT 0.5M**. Sellar el tubo e incubar a **55°C toda la noche** con agitación periódica. El tejido debe estar completamente digerido, de lo contrario agregar **10 µl** de **proteinasas K** (10mg/ml) y **5 µl** de **DTT 0.5M** y

continuar la digestión hasta que la solución **no tenga sólidos visibles**.

8. Agregar 200 μl de buffer AL y 200 μl de **etanol al 100%**, homogeneizar pipeteando suavemente y aplicar la solución a la columna.

9. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto, desechar el tubo de colecta junto con lo centrifugado. Nota: En el caso de que la columna no alcance a mantener el volumen de la solución de lisis, centrifugar y vaciar el tubo de colecta, y posteriormente aplicar el volumen de solución de lisis restante y volver a centrifugar.

10. Colocar la columna en un tubo de colecta nuevo, agregar 500 μl de **buffer AW1 wash** y centrifugar a **8,000 rpm por 1 minuto**, desechar el tubo de colecta junto con lo centrifugado.

11. Agregar 500 μl de **buffer AW2 wash** y centrifugar a **14,000 rpm por 1 minuto**, desechar lo centrifugado y colocar el tubo en el mismo tubo de colecta.

12. Centrifugar a **14,000 rpm por 1 minuto** y desechar el tubo de colecta junto con lo centrifugado.

13. Colocar la columna en un tubo nuevo y etiquetado de 1.5 ml es necesario cortar la tapa del tubo, por lo que es recomendable etiquetar tanto el tubo como la tapa.

14. Eluir el DNA con 50 μl de **buffer AE** precalentado a **65°C**, incubar la columna a Temperatura Ambiente por 10 minutos y centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto.

15. Reaplicar la solución con el DNA a la columna, incubar 15 minutos a Temperatura Ambiente y centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto

16. Es posible hacer otra elución, no obstante esta solución tendrá una cantidad menor de DNA, aunque también contendrá menos inhibidores (en caso de que estos no estén presentes en la solución con mayor concentración).

17. Hacer alícuotas y almacenar la solución con el DNA.

Apéndice 3

Concentraciones de reactivos para la PCR, en una reacción de un total de 25 μ l.

Cyt-b

Reactivo	Volumen en microlitros (μ l)
Buffer 1X.....	2.5
MgCl ₂ 3mM.....	2.5
dNTP's 0.15 nM.....	0.75
Primer (forward) 0.4 μ M.....	2
Primer (reverse) 0.4 μ M.....	2
Taq 3U.....	0.3
H ₂ O.....	11.95

RAG2

Reactivo	Volumen en microlitros (μ l)
Buffer 1X.....	2.5
MgCl ₂ 3mM.....	1.25
dNTP's 0.15 nM.....	1.25
Primer (forward) 0.4 μ M.....	1.5
Primer (reverse) 0.4 μ M.....	1.5
Taq 3U.....	0.3
H ₂ O.....	13.7

Apéndice 4

Tabla 14. Edades e intervalos (95% HPD) obtenidos en BEAST, para la filogenia construida con el marcador nuclear RAG2.

	RAG2			
	Nodo	Valores	Rangos	
Raíz	1	37.81	34.36	43.42
Outgroup	2	35.78	31.82	39.23
Phyllostomidae	3	27.56	23.72	31.55
Micronycterinae	9	21.61	9.24	28.46
Glossophaginae	10	21.53	18.06	24.8
Desmodontinae	6	23.88	13.32	28.89
Phyllostominae (Carnívoros)	11	20.87	12.01	28.18
Stenodermatinae	23	13.39	7.74	21.1
Lonchophyllinae	31	9.43	3	19.7
Choeronycterinae	32	9.36	4.53	15.15
Glyphonycteris	29	10.37	3.28	18.64
Rhinophylla	18	15.95	9.35	21.92
Artibeus	55	4.37	1.25	10.06
Anoura	35	8.96	2.93	20.44
Macrotus	49	5.55	0.96	22.17
Glossophaga	63	3.11	0.57	10.22
Leptonycteris	59	3.77	0.78	10.94
Carollinae	57	4.21	0.91	16.5
Monophyllus	39	7.85	3.17	16.05
Platyrrhinus	56	4.27	1.47	9.67

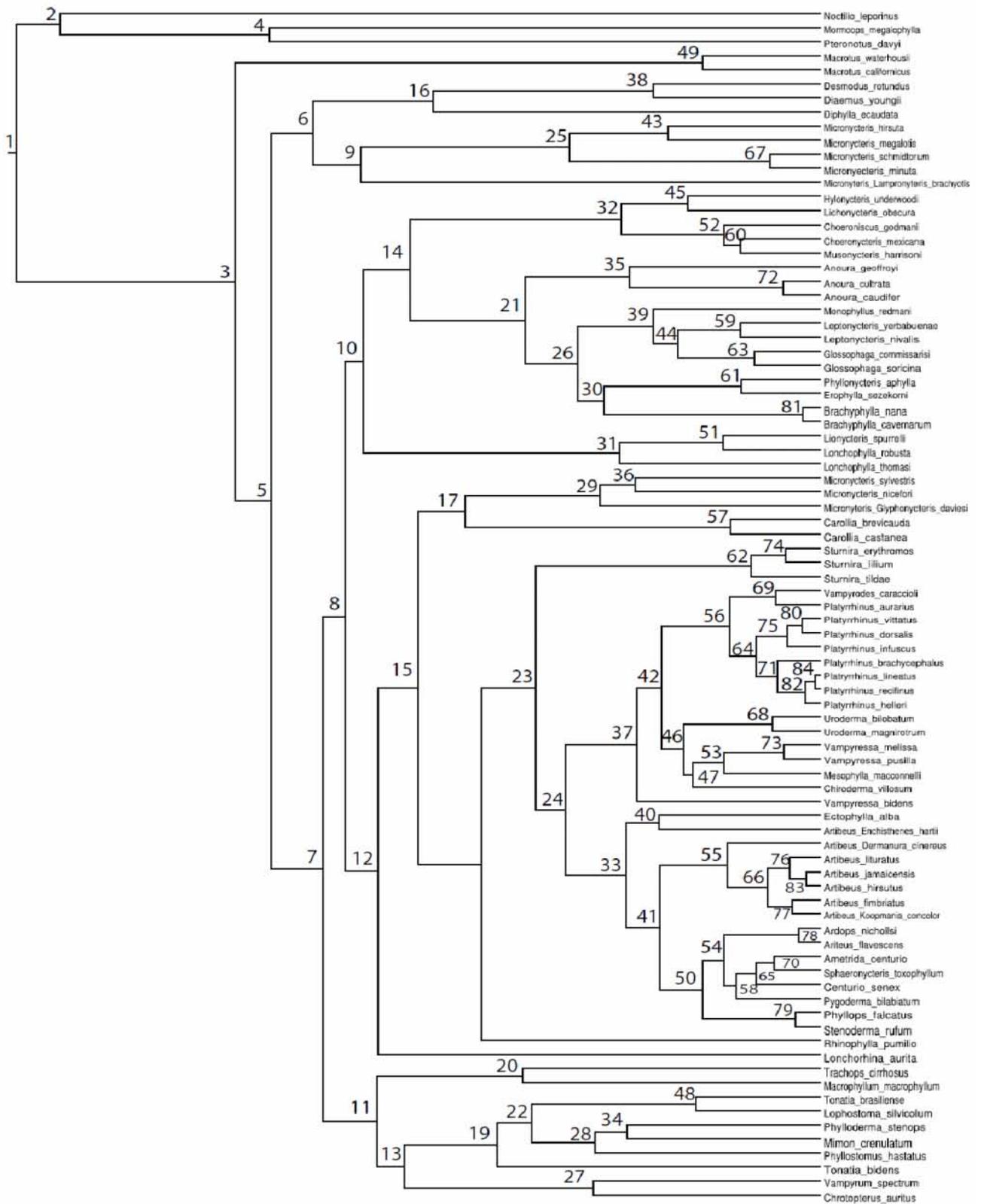
Tabla 15. Edades e intervalos (95% HPD) obtenidos en BEAST para la filogenia construida con el marcador nuclear Cyt-b.

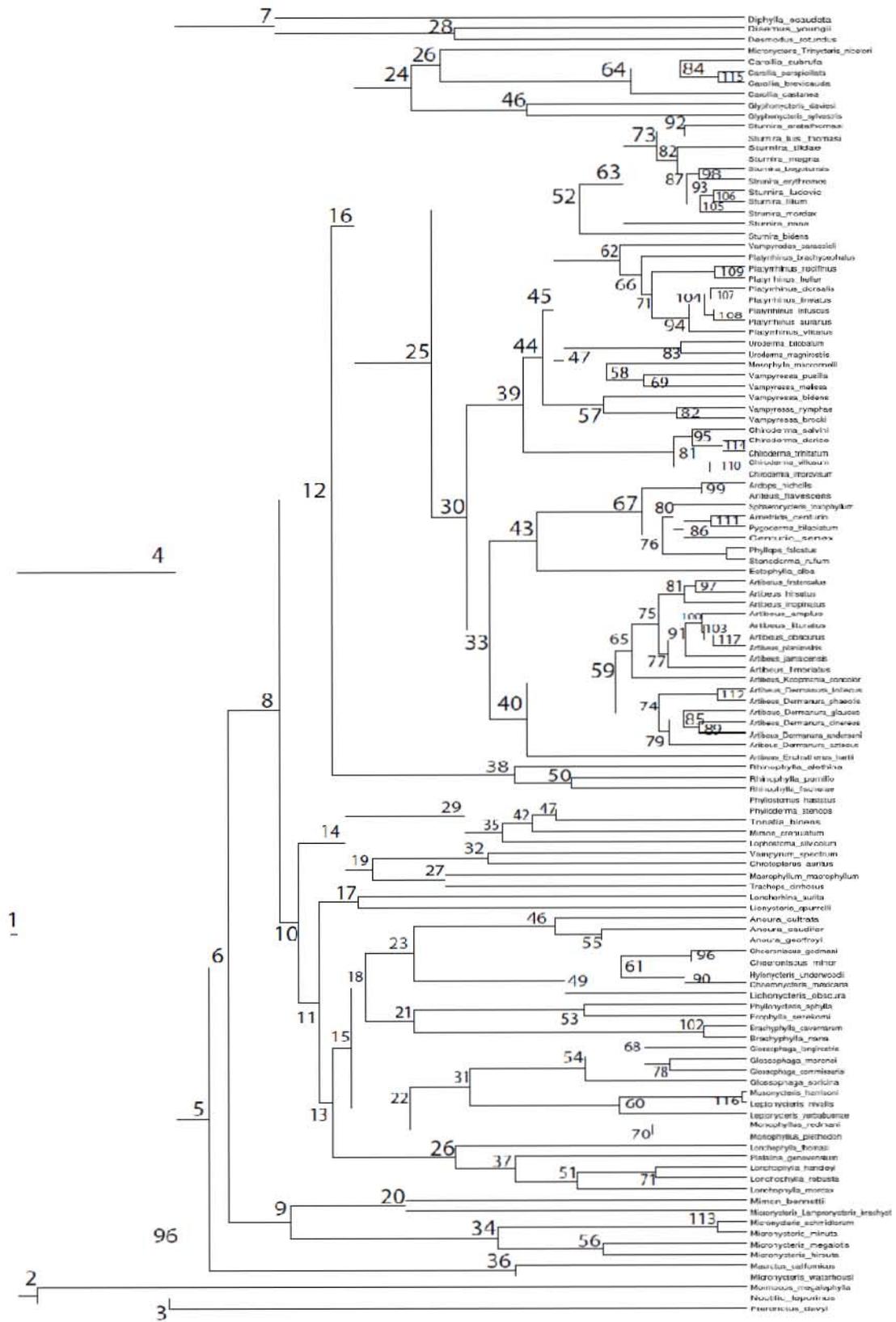
	Cyt-B			
	Nodo	Valores	Rangos	
Raíz	1	36.38	32.59	45.71
Outgroup	2	35.49	31.88	39.21
Phyllostomidae	4	28.47	25.32	32.7
Micronycterinae	8	22.8	14.86	29.71
Glossophaginae	11	21.32	17.88	25.76
Desmodontinae	7	23.47	15.2	30.79
Phyllostominae (Carnívoros)	14	20.01	15.11	25.94
Stenodermatinae	16	19.51	14.47	24.54

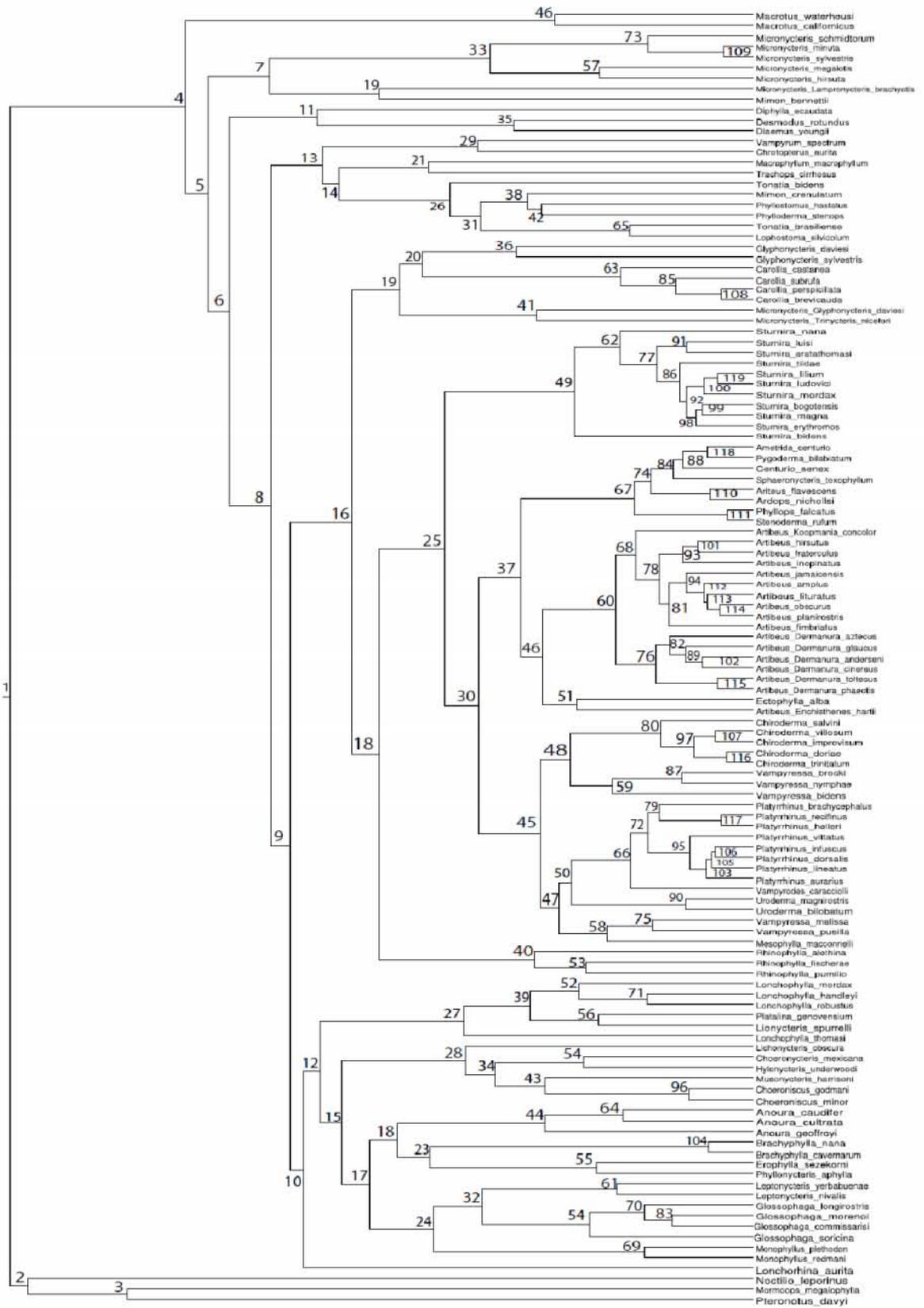
Lonchophyllinae	26	14.51	8.35	20.15
Choeronycterinae	49	9.05	4.8	16.31
<i>Glyphonycteris</i>	46	10.87	4.8	18.39
<i>Rhinophylla</i>	38	11.51	5.98	18.87
<i>Artibeus</i>	40	10.94	7.17	16.82
Anoura	46	9.53	5.17	16.67
<i>Macrotus</i>	36	11.54	4.97	22.1
<i>Glossophaga</i>	54	8.01	4.58	13.37
<i>Leptonycteris</i>	60	6.34	2.61	12.11
Carollinae	64	5.69	2.66	11.84
<i>Monophyllus</i>	70	4.7	1.91	11.45
<i>Platyrrhinus</i>	66	5.19	3.25	8.65

Tabla 16. Edades e intervalos (95% HPD) obtenidos en BEAST, para la filogenia construida a partir de la base de datos de los marcadores mitocondrial y nuclear concatenados.

	Concatenado			
	Nodo	Valores	Rangos	
Raíz	1	36.25	32.24	43.3
Outgroup	2	35.4	32.01	39.42
Phyllostomidae	4	27.67	24.67	30.86
Micronycterinae	7	23.6	14.56	28.89
Glossophaginae	10	21.91	18.58	24.89
Desmodontinae	11	21.24	12.64	27.18
Phyllostominae (Carnívoros)	13	20.99	14.43	25.31
Stenodermatinae	25	15.05	10.86	19.87
Lonchophyllinae	27	14.07	8.49	19.03
Choeronycterinae	28	14.01	9.59	18.14
<i>Glyphonycteris</i>	36	11.54	3.96	19.3
<i>Rhinophylla</i>	40	10.63	5.33	17.24
<i>Artibeus</i>	46	10.24	7.19	15.09
Anoura	44	10.11	4.98	17.31
<i>Macrotus</i>	46	9.65	3.47	20.93
<i>Glossophaga</i>	54	7.95	4.09	14.07
<i>Leptonycteris</i>	61	6.63	2.44	14.45
Carollinae	63	6.44	2.77	13
<i>Monophyllus</i>	69	5.28	1.49	13.54
<i>Platyrrhinus</i>	72	5.1	2.67	8.26







Apéndice 5

La filogenia estimada con el marcador nuclear *RAG2* (Fig. 4) nos dio una fecha de divergencia entre la familia Phyllostomidea y el grupo externo de Noctilionidea y Mormoopidea de 37.81 m. a. En ésta filogenia, los murciélagos el género *Macrotus* (subfamilia Phyllostominae), resultan como el grupo externo (basal) de la familia Phyllostomidae, con una fecha de divergencia del resto de la familia de 27.5 m. a. Los murciélagos insectívoros del género *Micronycteris* se agrupan con los murciélagos hematófagos, con una fecha de divergencia entre ellos de 23.8 m. a. Los murciélagos de la subfamilia Stenodermatinae divergieron del resto de la familia hace 15.9 m. a., agrupándose de manera monofilética.

El momento de divergencia entre los nectarívoros (Glossophaginae) y los frugívoros (Phyllostominae) se calculó hace 22.38 m. a. y el género de *Leptonycteris* y el género *Glossophaga* en conjunto divergen del resto de los consumidores de néctar hace 11.4 m. a. Los géneros coeronicterinos, según el cálculo propuesto, habrían divergido hace 9.34 m. a., mientras que como grupo muestra un tiempo de divergencia de 19.3 m. a. del resto de los glosófaginos. Los murciélagos nectarívoros del Caribe divergieron hace 11.4 m. a. del resto de los glosófaginos, además de estar agrupados monofiléticamente.

Cuando calculamos los tiempos de divergencia con el marcador mitocondrial (Fig. 5), se obtiene como primera fecha para la familia Phyllostomidae de 28.5 m. a. Las fechas de divergencia no varían en gran medida respecto del gen nuclear. Por ejemplo la subfamilia Glossophaginae presenta una fecha de divergencia respecto de la subfamilia Phyllostominae de 22.37 m. a., para el grupo de los desmodontinos (hematófagos) se obtiene una fecha de 23.47 m. a. La subfamilia Stenodermatinae (en donde se encuentran la mayoría de los consumidores de frutos) en esta filogenia se incluyen dentro del mismo clado a los géneros *Carollia* (miembros de las subfamilia Carrollinae) y *Micronycteris* (miembros de la familia Phyllostominae), la fecha de origen se calculó en 19.5 m. a. El grupo de los murciélagos carnívoros, es el clado hermano de los nectarívoros en la filogenia mitocondrial; la fecha de origen calculada es de 20 m. a., muy cercana a la fecha propuesta para la subfamilia Glossophaginae.

Para algunos miembros de los géneros *Micronycteris* y *Mimon*, los cuales se agrupan en la familia Phyllostominae (que en ésta filogenia se presenta como una

subfamilia parafilética) y son insectívoros, su edad fue de 22.8 m. a., a diferencia del género *Macrotus*, con una fecha de 11.5 m. a. y que se es el grupo basal de las subfamilias Phyllostominae, Stenodermatinae, Carrollinae, Glossophaginae, Lonchophyllinae, Phyllonycterinae, Brachyphyllinae, no así de la subfamilia Desmodontinae (la cual queda como grupo basal de la familia Phyllostomidae).

La subfamilia nectrívora Glossophagina tiene su origen hace 21.32 m. a. Las especies del grupo coeronicterino (géneros *Choeronycteris*, *Choeroniscus*, *Hylonycteris*, *Scleronycteris*, *Musonycteris* y *Lichonycteris*) y las especies del género *Anoura* exhiben una fecha de divergencia entre ellos de 16.6 m. a., misma fecha con diferencia de 0.2 m. a. de separación con los murciélagos endémicos del Caribe, géneros *Brachyphylla*, *Erophylla* y *Phyllonycteris*. Dentro de esta rama, podemos considerar como fecha de origen de los coenoricterinos 9 m. a., similar al género *Anoura*, con 9.5 m. a. El origen los nectarívoros caribeños, coeronicterinos y los *Anoura* se infiere en unos 19 m. a.

El género *Glossophaga* se originó hace 8 m. a., mientras que se separa del género *Leptonycteris* hace 13.8 m. a. Para *Leptonycteris* el tiempo de divergencia entre sus dos especies es de 6.3 m. a.

