



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Genética de la conservación del murciélago de cabeza
aplanada *Myotis planiceps* en Los Pinos, Coahuila

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Thalia Cecilia Vargas García



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Rodrigo Antonio Medellín Legorreta
2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos del jurado

1.- Datos de la alumna

Vargas
García
Thalia Cecilia
304144950
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304144950

2.-Datos del tutor

Dr.
Rodrigo Antonio
Medellín
Legorreta

3.- Datos del sinodal 1

Dr.
Luis Enrique
Eguiarte
Fruns

4.-Datos del sinodal 2

Dr.
Joaquín
Arroyo
Cabrales

5.-Datos del sinodal 3

Dr.
Gerardo Jorge
Ceballos
González

6.- Datos del sinodal 4

Dr.
Jorge
Ortega
Reyes

7.- Datos del trabajo escrito

Genética de la conservación del murciélago de cabeza aplanada *Myotis planiceps* en Los Pinos, Coahuila.

96 p.

2014

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Ecología y Conservación de Vertebrados Terrestres bajo la dirección del Dr. Rodrigo A. Medellín y en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental bajo la dirección del Dr. Luis Eguiarte Fruns en el Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

“Genética de la conservación del murciélago de cabeza aplanada (*Myotis planiceps*) en Los Pinos, Coahuila.”

ÍNDICE

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
Biología de la Conservación	13
Genética de la Conservación	15
Genética de poblaciones	15
Deriva génica y endogamia.....	17
Flujo Génico.....	17
Selección Natural.....	18
Marcadores Moleculares.....	18
Reacción en cadena de la ADN polimerasa.....	19
ADN mitocondrial.....	20
Citocromo b.....	21
Modelación de nicho ecológico y reconstrucción paleoclimática.....	22
Orden Chiroptera.....	23
Familia Vespertilionidae.....	25
Caracterización de la especie.....	27
Clasificación y descripción.....	27
Historia natural y ecología.....	28
Distribución.....	30
Estado de conservación	31
ANTECEDENTES.....	33
Genética de la conservación en mamíferos.....	33

Genética en el Orden Chiroptera.....	34
Migración.....	34
Flujo génico.....	35
Procesos pasados.....	37
OBJETIVOS.....	39
Objetivo General.....	39
Objetivos Particulares.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Descripción del sitio.....	40
Captura de murciélagos.....	40
Colección de material biológico.....	41
Extracción de ADN.....	41
Amplificación	42
Secuenciación.....	43
Diversidad Genética.....	43
Red de Haplotipos.....	44
Historia Demográfica.....	45
Pruebas de neutralidad y distribución de diferencias pareadas (<i>mismatch</i>).....	46
Modelación de nicho ecológico y reconstrucción paleoclimática.....	47
RESULTADOS.....	48
Diversidad genética.....	53
Red de Haplotipos.....	55
Rarefacción.....	57
Historia demográfica.....	58

Pruebas de neutralidad y distribución de diferencias pareadas (<i>mismatch</i>).....	58
Modelación de nicho ecológico y reconstrucción paleoclimática.....	61
DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIONES.....	72
LITERATURA CITADA.....	74
APÉNDICES.....	91

RESUMEN

La pérdida de la diversidad genética disminuye la capacidad de las poblaciones para adaptarse a los cambios ambientales y aumenta el riesgo de extinción. El murciélago de cabeza aplanada (*Myotis planiceps*) es una especie microendémica en peligro de extinción (NOM-059, SEMARNAT, 2010) cuya presencia únicamente se ha registrado en el área limítrofe entre los estados de Coahuila, Nuevo León y Zacatecas y actualmente enfrenta problemas de pérdida de hábitat principalmente por cambio de uso de suelo, incendios forestales y sobreexplotación de agua.

El presente estudio pretende aportar información que permita establecer estrategias para la conservación a largo plazo de la especie *Myotis planiceps*. El principal objetivo fue estimar la diversidad genética del murciélago en Los Pinos, Coahuila usando un marcador mitocondrial e inferir los patrones históricos que la moldearon e influyen en la actualidad. Para ello se colectaron muestras entre marzo y agosto del año 2012 y se secuenció un fragmento de 630 pb de citocromo b de 40 muestras. La diversidad genética de *M. planiceps* se comparó con los valores reportados para otra especie del mismo género (*M. lucifugus*) y los resultados encontrados con el gen citocromo b indican que la diversidad genética en la población de *M. planiceps* es baja ($Hd=0.692$, $\pi=0.00157$) en comparación con los valores reportados para *M. lucifugus* ($Hd=0.819$, $\pi=0.0074$)

La distribución de diferencias pareadas (*mismatch*) y la modelación de nicho ecológico sugieren que la población atravesó una expansión poblacional lo que podría deberse a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno.

Se discute acerca del valor de las estimaciones genéticas obtenidas en el presente como un primer acercamiento para la caracterización genética de esta especie sin olvidar los procesos ecológicos y antropogénicos que ejercen un impacto sobre la especie.

ABSTRACT

Loss of genetic diversity reduces the capability of populations to adapt to environmental changes and increases extinction risk. The Mexican flat-headed bat (*Myotis planiceps*) is an endemic species restricted to the borderland area of Coahuila, Zacatecas and Nuevo Leon in north central Mexico and is currently enlisted as critically endangered by the IUCN.

The main goal of our study was to determine the genetic diversity within the population at Los Pinos, Coahuila and to infer the historical processes that may have influenced this diversity by using a portion of the mitochondrial gene cytochrome *b* (*cytb*). Samples were collected from March to August 2012 and 630 bp of the *cyt b* were sequenced from 40 individuals identified as *M. planiceps*. Six different haplotypes were found and a haplotype network was used to deduce the relationship among them. Population growth statistics were calculated to determine if there was evidence of population expansion and an environmental niche model was constructed based on conditions during the Last Glacial Maximum (LGM) and the Last Interglacial (LIG).

The mitochondrial DNA analyses show low genetic diversity within *Myotis planiceps* at Los Pinos ($Hd=0.699$, $\pi= 0.0016$) when compared to a widely distributed bat from the same genre (*Myotis lucifugus*) ($Hd=0.819$, $\pi =0.0074$). Both, population growth statistics and environmental niche model suggest population expansion, which might have been caused by climatic changes during the Pleistocene.

INTRODUCCIÓN

Biología de la Conservación

La biología de la conservación es una ciencia multidisciplinaria que surgió con el objetivo de proteger y restaurar la diversidad biológica. Para lograrlo combina el conocimiento de las ciencias puras y aplicadas que brindan elementos para tomar decisiones acertadas de manejo y conservación (Primack *et al.*, 2001).

El origen de la conservación estuvo fundamentado por argumentos morales sobre el valor de la naturaleza, así como el derecho de las generaciones futuras a disfrutar de ella y usar los recursos que nos provee (Van Dyke, 2008). Actualmente la conservación de la naturaleza se considera importante por: 1) los valores intrínsecos de la naturaleza que son aquellos independientes de cualquier utilidad para los seres humanos; 2) los valores instrumentales o económicos que son aquellos en los que se asigna un valor en el mercado por alguna función o uso reconocido para la sociedad, por ejemplo los servicios ecológicos; y 3) los valores emocionales, espirituales y psicológicos que contribuyen al bienestar emocional espiritual y estético de los seres humanos (Norton, 1987).

El crecimiento exponencial de la población humana y las consecuentes actividades para abastecer nuestras necesidades nos han llevado a la destrucción y degradación de los ecosistemas. Las especies en peligro de extinción normalmente se reducen debido a la pérdida de hábitat por destrucción, fragmentación y degradación, sobreexplotación, especies introducidas, enfermedades, contaminación o cambio climático. Además de esto las especies se enfrentan a factores demográficos, genéticos y ambientales que incrementan el riesgo de extinción (Freeland, 2011).

A pesar de que las extinciones son un proceso natural que sucederá tarde o temprano, de acuerdo con el *Millenium Ecosystem Assessment* (2005) la tasa de extinción anual en la actualidad

es mucho mayor (de 100 a 1,000 veces) que la extinción de fondo que existía antes de la aparición de los humanos modernos hace alrededor de 150,000 años.

Las especies con mayor probabilidad de enfrentarse a la extinción son las especialistas que presentan baja tolerancia ambiental, alta especialización en la dieta, alta especialización de hábitat y alta dependencia de alguna otra especie; así como las especies raras que tienen abundancia local reducida, alta especificidad del hábitat, extensión geográfica pequeña y baja ocupación del hábitat (Figura 1) (Rabinowitz,1981; Benayas, 2009).

La rareza en biología de la conservación es meramente el estatus actual de una población existente que está restringida en número o área en un nivel demostrablemente menor que el resto de los organismos (Reveal, 1981). Las causas de la rareza pueden ser intrínsecas de la especie por características como historia de vida lenta o baja vagilidad o extrínsecas por factores como alteraciones humanas, extinción post-Pleistoceno, introducción de especies exóticas o pérdida de hábitat. Se requiere entender los factores antes mencionados que ocasionan la rareza de una especie para poder plantear medidas de manejo (Raphael y Molina, 2007).

EXTENSION GEOGRAFICA		AMPLIA				PEQUEÑA			
ESPECIFICIDAD DEL HABITAT		ELEVADA		RESTRINGIDA		ELEVADA		RESTRINGIDA	
ABUNDANCIA LOCAL		ELEVADA	REDUCIDA	ELEVADA	REDUCIDA	ELEVADA	REDUCIDA	ELEVADA	REDUCIDA
OCUPACION DEL HABITAT	ALTA	COMUN	EXTENDIDA	INDICADOR		LOCALMENTE COMUN	INEXISTENTE	INDICADOR ENDEMICO	
	BAJA	MUY DISPERSA	DISPERSA	LOCALMENTE AMENAZADA		POTENCIALMENTE AMENAZADA		AMENAZADA	

Figura 1. Clasificación de las especies con base en los tres criterios de rareza establecidos por Rabinowitz (1981) y ocupación del hábitat. (Tomado de Benayas, 2009)

Genética de la Conservación

La genética de la conservación surge como respuesta a la necesidad de conservar la diversidad genética dentro y entre poblaciones, y de esta manera las bases para asegurar que se mantenga la habilidad adaptativa de las especies ante los cambios ambientales (Primack *et al*, 2001). Para ello utiliza herramientas moleculares para preservar los procesos evolutivos (Frankham *et al.*, 2010).

La diversidad genética es un componente básico de la biodiversidad. Se define como las variantes heredables de cada organismo o población sobre las cuales actúan los procesos evolutivos que generan la biodiversidad (Frankham *et al.*, 2010).

La distribución de la variación genética en las poblaciones obedece a la interacción entre las fuerzas evolutivas históricas y contemporáneas como son la deriva génica, la mutación, la selección y el flujo génico (Hedrick, 2011). Estos factores a su vez están influenciados por la historia de vida específica, el comportamiento y la ecología de una especie. Cabe mencionar, que los eventos como vicarianza, colonización, dispersión a larga distancia y glaciaciones también pudieron haber influido dramáticamente en los patrones de la diversidad que observamos actualmente (Slatkin, 1987).

Los estudios en genética de la conservación usan marcadores moleculares para estimar los parámetros de diferenciación genética, diversidad haplotípica y nucleotídica en una población con la finalidad de valorar el estado de conservación en el que se encuentran y posteriormente, diseñar estrategias y tomar decisiones para su protección (Lande, 1988).

Genética de Poblaciones

La genética de poblaciones surgió como un modelo sólido que unificó el concepto de Selección Natural de Wallace (1858) y Darwin (1859), con los mecanismos de herencia de las variantes genéticas propuestos por Mendel en esos años. La finalidad de la genética de poblaciones es

medir la cantidad de variación genética dentro y entre las poblaciones naturales y explicar su origen (Hartl y Clark, 1989).

Para estimar las diferencias genéticas entre dos individuos se requiere comparar la misma región del genoma bajo el supuesto de que tienen su origen en la misma secuencia ancestral. A las diferentes versiones de la misma región se les denominan alelos y pueden observarse usando secuencias nucleotídicas (Hedrick, 2011).

Las secuencias de nucleótidos pueden ser diferentes entre sí debido a cambios en las bases nitrogenadas en cada sitio, las mutaciones. Dichas mutaciones, ocurren por mecanismos físicos que pueden ser errores en la replicación del ADN, inserciones de elementos transposones, rompimiento físico del cromosoma o errores en la meiosis (Hedrick, 2011).

Las mutaciones juegan un papel muy importante en los procesos evolutivos, es a partir de ellas que se genera toda la diversidad genética y los procesos que actúan para eliminar o dispersar las mutaciones definen los patrones de diversidad genética (Frankham, 2004). Las principales formas de mutación son las sustituciones puntuales, deleciones, inserciones y re-arreglos cromosómicos (Nei y Kumar, 2000).

Las mutaciones más importantes son aquellas que ocurren en loci que tienen un impacto en la tasa reproductiva, supervivencia o conducta y afectan la adecuación. Estas, pueden ser benéficas, neutras, letales o deletéreas; sin embargo, también ocurren en regiones no codificantes del genoma, por lo que no resultan en sustituciones de aminoácidos y por lo tanto no tienen un impacto en la adecuación, en principio son neutras. Este tipo de mutaciones son útiles como marcadores moleculares y proveen información valiosa respecto a las diferencias entre individuos, poblaciones y especies (Frankham, 2004).

Deriva Génica y Endogamia

La deriva génica es el cambio en las frecuencias alélicas que se debe al azar (Hedrick, 2011). Se presenta como consecuencia del tamaño finito de las poblaciones, lo que ocasiona un error de muestreo aleatorio pues la cantidad de individuos que se reproducen y dejan descendencia también es finita y sólo una porción de los genotipos de la población pasa a la siguiente generación (Gillespie, 2004). El efecto es mayor en poblaciones pequeñas donde los alelos pueden perderse en menos generaciones por el azar en el muestreo (Hedrick, 2011) y las consecuencias son pérdida de la diversidad genética y fijación de alelos que no necesariamente confieren ventajas selectivas (Frankham *et al.*, 2010)

Cuando la población es finita, existe relación de parentesco entre todos los individuos de la población debido a que comparten ancestros comunes. Entre más pequeña es una población, mayor es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar tengan la misma secuencia por que provienen del mismo ancestro. A este fenómeno también se le denomina *endogamia* (Hartl y Clark, 1997).

La endogamia se define como el apareamiento entre individuos que comparten alelos idénticos por ancestría. En poblaciones de tamaño pequeño, el apareamiento de individuos emparentados ocurre con mayor frecuencia de lo que se esperaría por azar, en ocasiones incluso es inevitable y aunque no afecta las frecuencias alélicas, sí aumenta la expresión de alelos deletéreos que reducen la adecuación de los individuos. La endogamia como tal no tiene efectos adversos sino hasta que ocasiona depresión por endogamia y se reduce la adecuación (Hedrick, 2011).

Flujo Génico

La migración es el flujo de genes que ocurre cuando algunos individuos se mueven de una a otra población y se reproducen en ella. El flujo génico, a diferencia de la mutación, puede restaurar

rápidamente la diversidad genética por el aporte de información genética nueva resultado del intercambio genético (Hedrick, 2011) y contrarresta la diferenciación genética que ocasiona el aislamiento geográfico (Slatkin, 1987). Se estima que un migrante por generación es suficiente para compensar los efectos de la deriva génica, sin embargo, cuando se trata de especies amenazadas se recomienda mayor intercambio genético (Mills y Allendorf, 1996).

Cuando hay flujo génico alto, se homogeniza la variación genética entre las poblaciones y la estructura poblacional se debilita. En cambio cuando el flujo génico es bajo, las poblaciones quedan aisladas, adquieren mutaciones distintas y terminan por evolucionar de manera independiente (Hedrick, 2011).

Selección Natural

La selección natural es el mecanismo propuesto inicialmente por Darwin y Wallace y es el proceso responsable de adaptación, ya que favorece o elimina variantes alélicas que confieren ventajas o desventajas a los individuos que las poseen. Las diferentes combinaciones de genes tienen diferentes valores de adecuación para sobrevivir a los diversos ambientes existentes (Dobzhansky, 1964). Los fenotipos con caracteres favorables hereditarios aumentan su frecuencia por que presentan mayor probabilidad de supervivencia y reproducción (Hamilton, 2009).

La selección natural puede simplemente mantener un nivel alto de diversidad o llevar a la especiación al promover adaptaciones locales, pero también puede ayudar a mantener la cohesión específica al eliminar mutaciones deletéreas (Hedrick, 2011).

Marcadores moleculares en genética de la conservación

Los marcadores moleculares son secciones pequeñas del genoma que presentan secuencias de ADN alternativas fácilmente identificables y por lo tanto sirven como herramienta para medir la variación genética inter e intra específica. Las variaciones que pueden ser estudiadas utilizando marcadores moleculares tienen la ventaja de ser cuantitativamente más precisas y comparables

estadísticamente que otras medidas ecológicas. Así podemos estudiar aspectos filogenéticos, taxonómicos, filogeográficos, de estructura poblacional y conservación (Frankham, 2010).

Para que un marcador molecular sea eficiente debe 1) ser específico para un solo locus, 2) no deben encontrarse ligados, 3) debe detectar un número grande de alelos o secuencias alternativas de manera constante, y 4) debe crear patrones de bandeo en gel que puedan interpretarse con facilidad (Ortega, 2006).

Aunque en la actualidad existe una gran variedad de marcadores moleculares, algunos son más adecuados cuando se trabaja con especies amenazadas o en peligro de extinción y de tamaño pequeño. Los marcadores que se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) presentan la importante ventaja de requerir una cantidad mínima de tejido (Beebee y Rowe, 2008).

Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la ADN polimerasa es el proceso enzimático mediante el cual se multiplica una región específica de ADN hasta generar miles de copias a partir de una cantidad muy pequeña de muestra. El desarrollo de la PCR fue posible gracias al descubrimiento de una bacteria (*Thermus aquaticus*) adaptada para habitar en pozas termales con altas temperaturas. A partir de esta bacteria se desarrolló la *Taq* polimerasa, una molécula que permanece estable a temperaturas de entre 85 y 95°C que se requieren para desnaturalizar el ADN separando los puentes no covalentes (Beebee y Rowe, 2008).

Una vez separadas las hebras, se baja la temperatura de manera que se formen los puentes entre los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) que reconocen por apareamiento complementario los extremos de la secuencia de ADN de interés. En estos extremos la *Taq* polimerasa inicia la síntesis de hebras complementarias de manera exponencial.

ADN mitocondrial

La mitocondria tuvo su origen hace mil quinientos millones de años en una α -proteobacteria que invadió una célula primitiva eucariota con la que posteriormente desarrolló una relación simbiótica (Dakubo, 2010). Este es el único organelo de los mamíferos que cuenta con su propio genoma y juega un papel vital para mantener la homeostasis celular y en procesos metabólicos como la fosforilación oxidativa, la apoptosis y el envejecimiento (Boore, 1999).

El ADN mitocondrial consiste en una molécula circular de doble hebra relativamente pequeña (Fig.2) de alrededor de 16,000 pares de bases, se hereda principalmente por vía materna, no presenta recombinación y existe una gran cantidad de copias por célula (Allendorf, 2012). Mientras que el genoma nuclear tiene una sola copia en cada célula eucariota, el genoma mitocondrial está representando varios miles de veces (Vigilino, 2012). La falta de recombinación del ADN mitocondrial implica que el genoma que se hereda es idéntico al materno lo que permite identificar linajes mitocondriales maternos (haplotipos) y rastrearlos a través del tiempo y el espacio con relativa facilidad (Freeland, 1994).

Comparado con el genoma nuclear, el genoma mitocondrial en mamíferos es mucho más compacto y presenta una organización diferente que carece de intrones. Consta de únicamente 37 genes que codifican para 22 tRNAs, 2 rRNAs y 13 mRNAs (Boore, 1999). Además, a pesar del papel tan importante que desempeña la mitocondria en la producción de energía, la tasa de evolución del genoma mitocondrial es mucho más rápida, de 10 a 17 veces mayor que la del genoma nuclear (Brown, 1980; Dakubo, 2010). Lo anterior se ha especulado que puede ser debido a que el ADN mitocondrial no está protegido por proteínas tipo histonas, y a que queda expuesto a la acción de los radicales libres que se generan como resultado del metabolismo oxidativo (Brown, 1979). También se ha demostrado que los mecanismos de reparación del ADN mitocondrial son menos eficientes que los nucleares (Wallace, 1994).

Los marcadores mitocondriales han sido ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones animales tanto por su alta tasa de evolución, que permite análisis evolutivos de eventos recientes, como por la facilidad de extraer este tipo de ADN y debido a que el arreglo de los genes es conservado lo que permite el uso de *primers* universales que amplifican regiones de la mitocondria de vertebrados e invertebrados. Lo anterior resulta útil cuando no se tiene conocimiento previo acerca del ADN mitocondrial de una especie particular (Freeland, 1994).

Citocromo B

El gen codificante para el citocromo b se encuentra en la mitocondria y está constituido por 1,140 pares de bases. Su posición varía entre las diferentes especies de mamíferos pero siempre se encuentra asociado a la región Hipervariable I (HVI) de la región control (Fig. 2). Este gen codifica para una proteína hidrofóbica integral de la membrana con una longitud de 380 aminoácidos y 8 segmentos transmembranales. Estas regiones de aminoácidos son un elemento vital para el transporte de electrones de la cadena respiratoria de la mitocondria y la generación de ATP por lo que se encuentran altamente conservados, pero en regiones menos activas el citocromo b sí presenta variación. Por ello, el gen del citocromo b se ha usado para estudios filogenéticos y para identificación de especies principalmente por la homología que presenta entre diferentes organismos (Linacre y Tobe, 2013).

presentan vegetación desértica, estuvieron cubiertas por lagos con vegetación propia de ambiente templados húmedos (Arroyo-Cabrales, *et al.*, 2008).

La modelación de la distribución potencial de una especie permite responder preguntas ecológicas y biogeográficas que de otra manera no podrían resolverse. El rango de distribución de una especie se restringe por factores ecológicos e históricos y está dado por el nicho que ocupa (MacArthur, 1972). De acuerdo con Grinnel (1917), el nicho ecológico de una especie es el conjunto de condiciones ecológicas en las que se puede mantener una población.

Una de las herramientas más utilizadas en la actualidad para predecir la distribución potencial de una especie son los modelos de nicho ecológico (MNE) que relacionan la distribución conocida de una especie con los parámetros de variación ambiental para determinar cuáles condicionan la presencia de la especie en el espacio ecológico y después proyectarlo en el espacio geográfico (Anderson y Martínez Meyer, 2003; Phillips *et al.*, 2006). Bajo el supuesto de que los linajes mantienen su nicho ecológico ancestral, se puede modelar la distribución de la especies hacia el pasado (Wiens, 2004).

Orden Chiroptera

Todos los murciélagos pertenecen al orden Chiroptera. El término Chiroptera deriva del griego *cheiros* -mano y *pteron*-ala. Este orden recibe su nombre porque los brazos, manos, dedos y piernas de los organismos que pertenecen a este grupo están modificados para sostener la membrana que sirve como ala. Son los únicos mamíferos que presentan vuelo verdadero (Altringham, 1996) y es gracias a esta capacidad que su distribución es tan amplia. Podemos encontrarlos desde latitudes tropicales hasta templadas, excepto por los polos (Kunz, 1982).

Dentro de los mamíferos, el orden Chiroptera es el más diverso y exitoso sólo después de Rodentia (Neuweiler, 2000). Existen 18 familias con cerca de 1,200 especies en el mundo (Simmons, 2005) y México ocupa el sexto lugar a nivel mundial, con 139 especies de murciélagos superado sólo por Brasil, Perú, Colombia, Ecuador y Venezuela (Ceballos y Simonetti, 2002). Las ocho familias presentes en México son Emballonuridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae, Natalidae, Thyropteridae, Vespertilionidae y Molossidae (Medellín, *et al.*, 2008). De estas ocho, cinco son endémicas de América (Ceballos y Oliva, 2005).

Dentro de los mamíferos, el orden Chiroptera es el que presenta la más amplia gama de gremios alimentarios (Neuweiler, 2000) lo que les facilita la colonización y explotación de un gran número de hábitats. Los murciélagos pueden ser insectívoros, hematófagos, carnívoros, nectarívoros y frugívoros (Kunz 1982, Altringham 1996, Medellín *et al.*, 2009, Kunz y Parsons, 2009). Para los diferentes tipos de alimentación se observan adaptaciones específicas como hocicos alargados y lenguas vellosas para extraer el néctar de las flores (Koopman, 1981; Kunz, 1982; Proctor *et al.*, 1996; Neuweiler, 2000; Tschapka y Dressler, 2002) o el activador de plasminógeno que tienen los murciélagos hematófagos en la saliva para evitar que la sangre de sus presas coagule (Tellgren-Roth *et al.*, 2009).

Se ha propuesto que los murciélagos juegan un papel de vital importancia en los ecosistemas (Neuweiler, 2000). Un ejemplo de lo anterior son las especies que se alimentan de insectos y que actúan como controladores naturales de plagas manteniendo el balance de las poblaciones de insectos nocturnos (Altringham, 1996; Pierson, 1998; López-Damián, 2007). Cada noche los murciélagos capturan cientos de insectos, entre ellos escarabajos y palomillas que

anualmente ocasionan pérdidas económicas en los cultivos de hasta miles de millones de pesos (López-Damián, 2007; Boyles *et al.*, 2011). Además el abono de este tipo de murciélagos es un fertilizante agrícola de excelente calidad (Medellín *et al.*, 2009).

Por otra parte, las especies que se alimentan de néctar fungen como polinizadores contribuyendo a la fertilización de muchas plantas con flores mediante la transportación del polen entre individuos (Fleming, 1982; Kunz, 1982; Trejo, 2013). Los que se alimentan de frutos mueven las semillas lejos de las plantas o árboles contribuyendo a la dispersión y posible colonización de nuevos espacios. Con estas dos formas de alimentación se benefician por lo menos 130 géneros de plantas (Howell y Hodgkin, 1976; Racey y Swift, 1995).

A pesar de todos los servicios ambientales que proveen los murciélagos y que benefician a los humanos, actualmente gran parte de ellos se encuentran amenazados debido a actividades antropogénicas (Fenton, 1997). Las poblaciones disminuyen principalmente por la destrucción de los hábitats que son comúnmente reemplazados para el cultivo y ganadería o desarrollos urbanos. Además se enfrentan a vandalismo dentro de las cuevas y al uso de pesticidas en áreas agrícolas cercanas (Medellín *et al.*, 2009).

Familia Vespertilionidae

La familia Vespertilionidae es la segunda más diversa de todos los mamíferos (sólo superada por la familia Muridae, Rodentia) comprende 35 géneros y alrededor de 318 especies (Wilson y Reeder, 1993). Cerca de la tercera parte de todos los murciélagos son miembros de esta familia, la cual presenta el mayor rango geográfico de distribución en regiones tropicales y templadas, siendo el grupo dominante en estas últimas (Barclay y Harder, 2003).

En México se han registrado 45 especies repartidas en 13 géneros: *Antrozous*, *Bauerus*, *Corynorhinus*, *Eptesicus*, *Euderma*, *Idionycteris*, *Lasionycteris*, *Lasiurus*, *Myotis*, *Nycticeius*, *Parastrellus*, *Perimyotis*, *Pipistrellus* y *Rhogeessa* (Medellín, 2008).

Los miembros de la familia Vespertilionidae son de tamaño pequeño a mediano y se caracterizan por tener una cola larga que se extiende hasta el borde del uropatagio sin sobrepasarlo. La mayoría de los vespertiliónidos son insectívoros que cazan y comen durante el vuelo, aunque también incluye especies carnívoras (Verts *et al.*, 1998). Son de hábitos nocturnos o crepusculares y se refugian durante el día en cuevas, grietas, minas abandonadas, árboles, follaje o construcciones (Nowak, 1991). La pérdida de refugios implica mayor gasto energético y reduce su adecuación por que los murciélagos se ven obligados a aumentar su movilidad y el área de distribución lo que reduce la cohesión social. Además están más expuestos a depredación y sus interacciones cooperativas disminuyen (Chaverri y Kunz, 2011).

Las especies que pertenecen a la familia Vespertilionidae maduran más rápidamente que las especies del resto de las familias, tienen períodos de gestación muy cortos para que la cría pueda desarrollarse en el verano, sea destetada y que tanto la cría como la madre acumulen reservas de grasa suficientes para el invierno. La mayoría de las especies tienen una sola cría por camada, algunas especies de esta familia pueden presentar camadas de 2 y hasta 4 crías. Las especies que tienen camadas de una sola cría presentan tasas reproductivas menores que aquellas especies que tienen camadas más grandes. Sin embargo, aquellas especies con tasas de reproducción mayores suelen tener menor longevidad (Barclay *et al.*, 2004).

Caracterización de la especie

Clasificación y descripción

El murciélago insectívoro *Myotis planiceps* (Fig.3) o murciélago de cabeza aplanada (Baker, 1955) pertenece a la familia Vespertilionidae, subfamilia Vespertilioninae y es una de las especies más pequeñas del mundo (Arroyo *et al.*, 2006). Tiene una longitud total de 80.6mm y la longitud del antebrazo se reporta desde 26.5 a 29.8 mm (obs pers.) con un peso promedio de entre 3.57 g y 4.32 g (Arroyo *et al.*, 2005). Su nombre se debe a que presenta un cráneo pequeño completamente aplanado (Baker, 1955) que en algún momento se pensó era una adaptación para refugiarse en grietas (Matson, 1975). Tiene dientes pequeños, los incisivos superiores de la mitad de la longitud de los caninos (Baker, 1955).



Figura 3. Murciélago de cabeza aplanada *Myotis planiceps* (Vespertilionidae: Chiroptera).

Es un myotino de rostro simple y sin ornamentaciones. Tiene orejas medianas que no se proyectan más allá del rostro. El pelaje es largo (8- 9.9.mm), sedoso y oscuro que se aclara en las puntas. El cráneo pequeño se hace angosto hacia la parte anterior. La cola es larga y se extiende hasta el uropatagio (Baker, 1955; Zarza-Villanueva, 2006).

Historia natural y ecología

Esta especie fue descubierta en 1952 por Albert Alcorn quien le disparó a un *Myotis planiceps* macho que sobrevolaba un cuerpo de agua artificial en la localidad de Bella Unión, Coahuila (Baker, 1955). En 1955 Rollin Baker determinó que se trataba de una especie que no se había descrito previamente y tomó como fundamento para su descripción el antebrazo corto, cráneo completamente aplanado, primero y segundo premolar son del mismo tamaño y están separados, además del pelaje largo color castaño canela. Transcurrieron 15 años sin que hubiese otro avistamiento, hasta el 16 de septiembre de 1966 cuando Jean Mathieu capturó con la mano al segundo ejemplar, también macho y escrotado, que se encontraba a una altura de 1.20 m debajo de la corteza de una conífera del género *Pseudotsuga* en el Cerro del Potosí, Nuevo León (Jiménez-Guzmán, 1968).

Transcurrieron cuatro años antes de que se registrara nuevamente la presencia de *Myotis planiceps*. En esta ocasión P.L. Clifton capturó una hembra utilizando una red sobre un arroyo seco en La Laja, Zacatecas (Matson y Patten, 1975).

Después de esos tres avistamientos no se tuvieron más registros y en 1996 la IUCN declaró a la especie como extinta en la Lista Roja de Especies en Peligro (Arroyo-Cabrales *et al.*, 2005; Arroyo-Cabrales *et al.*, 2008a). En el año 2000, integrantes del Programa para la Conservación de los Murciélagos de México (PCMM) y del Museo del Desierto de Coahuila realizaron una visita prospectiva a la localidad tipo en el municipio de Arteaga, Coahuila con la finalidad de buscar individuos de *Myotis planiceps* y encontraron ocho individuos.(Arroyo-Cabrales *et al.*, 2005).

Desde el 2006 hasta el 2008 se llevó a cabo la caracterización del refugio de verano de *Myotis planiceps*. Esta especie se guarece bajo la falda de hojas secas de *Yucca carnerosana* en asociación con pino piñonero (*Pinus cembroides*) y se estableció que los murciélagos de cabeza aplanada eligen las yucas con mayor altura (4 a 5 m) que el resto del dosel y que se encuentran

rodeadas de otras yucas igual de altas que representan refugios disponibles. También se observó que las yucas elegidas como refugio son más cálidas en la orientación Este (Núñez-Rojo-Rojo, 2011).

En el 2014 (Haynie *et al*), se secuenciaron 1140pb de citocromo b y 1148pb de Rag2 para 7 individuos de *M. planiceps*. Como resultado se obtuvo una reconstrucción filogenética que establece a *M. volans* como la especie hermana (Apéndice 1). El tiempo de divergencia se estimó en 1.27 millones de años (Pleistoceno temprano-medio) y el tiempo del ancestro común más reciente se estimó en 0.27mda.

Distribución

Myotis planiceps es una especie de murciélago neártico endémica de México que se distribuye en un área muy restringida de menos de 1,000km² en la Sierra Madre Oriental donde convergen los estados de Coahuila, Nuevo León y Zacatecas (Fig.4) (Arroyo-Cabrales *et al*, 2005). De acuerdo con la IUCN el área de distribución está calculada entre 95 y 465km² (Arroyo-Cabrales *et al.*, 2006, Arroyo-Cabrales *et al*, 2008a).

Rzedowski (2006) describe el área como bosque de coníferas de clima semiárido con bosque boreal e intermontano a más de 2,000 msnm, que presenta coníferas y *Quercus sp.* Los pinares de climas semiáridos por lo general están conformados por especies piñoneras y colindan con pastizales y matorrales xerófilos o encinares arbustivos que contienen elementos típicos de desierto. *M. planiceps* únicamente se ha registrado en lugares con asociación de pino piñonero (*P. cembroides*) y palma samandoca (*Y. carnerosana*) (Arroyo-Cabrales *et al.*, 2005, Núñez-Rojo, 2011).

Bella Unión, la localidad tipo en Arteaga, Coahuila, es importante no sólo por su riqueza de especies y endemismos de plantas, sino porque sus grandes masas forestales proveen servicios ecológicos: regulan el clima, sirven como cuenca de captación de agua, protegen contra la erosión del suelo, evitan azolves y brindan zonas de esparcimiento (Hori-Ochoa, 1998; Núñez-Rojo, 2011).

La geología de la región se caracteriza por estar conformada por rocas sedimentarias mesozoicas plegadas que descansan sobre basamento paleozoico y precámbrico. Estos sedimentos depositados en el fondo de los mares primitivos se convirtieron en rocas calizas, lutitas y areniscas (Alanís *et al.*, 1996). El área pertenece a la Provincia de la Sierra Madre Oriental, subprovincia de la Sierra Plegada (López-Ramos, 1979). A la Sierra de Arteaga también se le

denomina el Anticlinorio de Arteaga debido a que presenta una sucesión estructural de pliegues , que juntos integran un anticlinal general (López-Ramos, 1979).

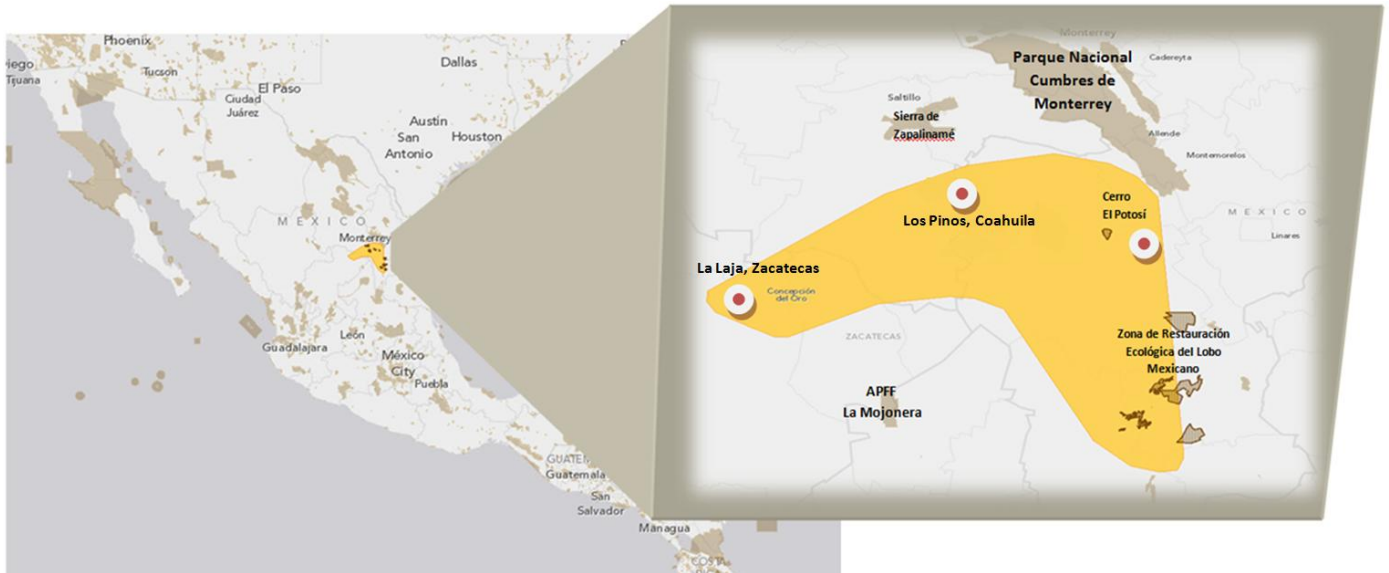


Figura. 4. Mapa de distribución potencial del murciélago de cabeza aplanada *Myotis planiceps* al Norte de México donde convergen los estados de Coahuila, Nuevo León y Zacatecas (Modificado de IUCN <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=14191>. En café se muestran las áreas naturales protegidas).

Estado de conservación del Orden Chiroptera en México

De las 130 especies de murciélagos presentes en México, 38 se encuentran en la NOM-059- (SEMARNAT, 2010); cuatro en peligro de extinción, 17 amenazadas y 17 sujetas a protección especial.

El murciélago de cabeza aplanada (*M. planiceps*), junto con el murciélago platanero (*Musonycteris harrisoni*), el vampiro falso (*Vampyrum spectrum*), y el miotis pescador (*Myotis vivesi*), es una de las 4 especies mexicanas consideradas en peligro de extinción (SEMARNAT, 2010).

A nivel internacional, está considerado como en peligro en la lista roja de especies de la IUCN (Arroyo-Cabrales *et al*, 2008a; Zarza-Villanueva, 2006).

Se considera que *M. planiceps* es una especie con distribución muy restringida, cuya supervivencia se encuentra amenazada por factores antropogénicos (Núñez-Rojo, 2011). Como ya mencioné, el murciélago de cabeza aplanada únicamente se ha registrado en los municipios de Mazapil, Zacatecas; Arteaga, Coahuila y Galeana, Nuevo León. Ninguna de estas localidades se encuentra protegida por el gobierno federal o estatal (Núñez-Rojo, 2011); sin embargo, el área está rodeada por áreas naturales.

Al noreste de la Sierra de Arteaga se encuentra el Parque Nacional Cumbres de Monterrey en el estado de Nuevo León y al este se encuentra la Sierra de Zapalinamé con protección estatal como “Zona Sujeta a Conservación Ecológica”. Existen intentos previos por decretar la Sierra de Arteaga como “Área de Protección de Flora y Fauna” pero hasta la fecha se mantiene sin protección. En el Estado de Zacatecas la distribución al sureste es cercana al Área de Protección de Flora y Fauna La Mojonera.

ANTECEDENTES

Genética de la Conservación de mamíferos mexicanos

En cuanto al uso de marcadores moleculares en mamíferos de México, los mamíferos marinos son uno de los grupos más estudiados. Se ha estudiado la variación genética del lobo Marino de California (Maldonado *et al.*, 1995), el lobo fino de Guadalupe (Weber *et al.*, 2004) y se ha estudiado la variación genética y filogenia de los manatíes (Medrano-González *et al.*, 2006).

De cetáceos se han llevado a cabo estudios de genética de poblaciones típicos con ballena jorobada (Urban *et al.*, 1999), ballena gris (Medrano-González *et al.*, 2001), delfín (Natoli *et al.*, 2004) y vaquita marina (Jaramillo-Legorreta *et al.*, 1999).

En el orden Rodentia que alberga la mayor cantidad de especies, se han realizado estudios con *Thomomys bottae* (Álvarez-Castañeda y Patton, 2004), *Liomys pictus* (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2002), *Chaetodipus bailey* (Riddle *et al.*, 2000), *Neotoma fuscipes* (Matocq, 2002), *Oryzomys cuoesi* (Vega, 2006), *Peromyscus guardia* (Vázquez, Domínguez, *et al.*, 2004), *Peromyscus furvus* (Harris y Rogers, 1999), por mencionar algunos.

Dentro de un marco de conservación destaca por su endemismo el estudio realizado con la ardilla terrestre del Perote (*Spermophilus perotensis*) en la que se analizó la diversidad genética con región control mitocondrial y microsatélites nucleares y se determinó que la especie enfrente problemas severos de pérdida de diversidad genética y altos niveles de endogamia (Ochoa-Hein, 2008).

En el 2013, en un estudio del caso del oso negro mexicano (*Ursus americanus*), que se distribuye en la Sierra de Zapalinamé, muy cerca del sitio de estudio de *Myotis planiceps*, se determinó amplificando la región control mitocondrial, que la estructura genética fue influenciada por los cambios climáticos suscitados en la última glaciación y se confirmó la existencia de dos

clados: uno en la Sierra Madre Oriental y otro en la Sierra Madre Occidental (Juárez-Casillas, *et al*, 2013). Previamente se había sugerido que dichas ramas se originaron a partir de dos refugios pleistocénicos (Wooding y Ward, 1997)

Genética en el Orden Chiroptera

Recientemente las herramientas moleculares se han usado para investigar aspectos básicos de la biología de los murciélagos que de otra manera sería muy difícil conocer por su naturaleza aérea y nocturna (Burland y Worthington Wilmer, 2001). Sin embargo, teniendo en cuenta la gran diversidad de murciélagos, son pocos los trabajos que se han enfocado en este orden y una gran parte se enfocan en análisis taxonómicos y sistemáticos (Puechmaille *et al.*, 2012; Larsen *et al.*, 2012;).

En cuanto a los estudios que utilizan marcadores moleculares para responder interrogantes sobre aspectos ecológicos y evolutivos pueden dividirse en aquellos que abordan la migración, el flujo génico o procesos pasados que influyen la diversidad genética (Burland y Worthington Wilmer, 2001).

Migración

Los marcadores mitocondriales, como la región control, se han usado en especies migratorias como *Leptonycteris curasoae* para evaluar la estructuración genética. En 1996, Wilkinson y Fleming detectaron baja estructuración genética con secuencias de 53 especímenes muestreados y encontraron que algunos de los individuos capturados en localidades separadas hasta por 1,800 km presentaban haplotipos mitocondriales idénticos.

En *Nyctalus noctula*, especie migratoria de zonas templadas, se secuenció la región control de 138 individuos y se encontró un patrón de estructuración poblacional casi panmítico entre las colonias de maternidad de Europa Central. La comparación de los haplotipos mitocondriales entre los refugios de verano y de invierno indica que los refugios de invierno son compartidos por los

miembros de diferentes colonias de maternidad por lo que presentan mayor diversidad (Petit y Mayer, 2000).

En México y EUA, se determinó que existe baja estructuración genética entre dos poblaciones del murciélago insectívoro *Tadarida brasiliensis* que presentan conductas diferentes (migratorios y no migratorios). En total se analizaron las secuencias de 94 murciélagos de 11 localidades entre los cuales se demostró contacto reproductivo (Russell *et al.*, 2005).

En *M. lucifugus* se usaron microsatélites y citocromo b para determinar la diversidad y estructura genética entre los refugios de maternidad localizados en Minnesota, E.U.A. Se analizó un fragmento de citocromo b y 10 microsatélites nucleares de 182 hembras de *M. lucifugus*. Se encontraron niveles altos de diversidad genética y se determinó que el patrón de estructuración genética es más fuerte con el marcador mitocondrial lo que apoya la hipótesis de filopatría en las hembras de la especie (Dixon, 2011a). El patrón en la estructura de genética de estas poblaciones indica que las hembras se dispersan y migran estacionalmente por lo que podrían estar jugando un papel importante en la dispersión del Síndrome de Nariz Blanca. (WNS, por sus siglas en inglés).

b) Flujo Génico y Barreras geográficas

La capacidad de vuelo de los murciélagos en conjunto con sus hábitos nocturnos, impiden el estudio de algunos aspectos básicos de su biología y ecología mediante métodos directos tradicionales. El desarrollo de técnicas moleculares, nos permite hacer inferencias a partir de secuencias de ADN cuando el objeto de estudio es difícil de capturar o seguir.

En Europa, se utilizaron seis microsatélites para evaluar el impacto de la fragmentación en la variación genética de *Rhinolophus ferrumequinum*. Los resultados indicaron que las siete colonias de maternidad muestreadas en Europa y Gran Bretaña, estaban genéticamente aisladas y presentaban baja variación. Lo anterior sugiere que no existe flujo génico entre las poblaciones separadas por el Canal Inglés (Rossiter *et al.*, 2000).

Por el contrario, existen estudios genéticos que han demostrado que la capacidad de vuelo de algunas especies de murciélagos es suficiente para superar barreras físicas que parecerían infranqueables (Burland y Worthington Wilmer, 2001). En *Artibeus jamaicensis* se determinó con secuencias mitocondriales que existe flujo génico entre las poblaciones de diferentes islas, que las poblaciones de las Antillas tenían su origen en una población continental de Sudamérica y que el linaje mitocondrial más común está presente en 3 islas con una distancia total de 1,400 km (Pumo *et al.*, 1996).

En *Myotis myotis*, tanto las montañas como los océanos entre España y África representan barreras físicas infranqueables que generan alta divergencia genética entre poblaciones. Los resultados se obtuvieron con microsatélites y citocromo b. Se estableció que no hay migración entre estas dos regiones y que se trata de dos clados diferentes (Castella *et al.*, 2000).

En el año 2010, un estudio en México tuvo como objetivo medir de manera indirecta la capacidad de dispersión de *M. vivesi* entre las islas del Golfo de California mediante el análisis de patrones de variación genética. Para ello se utilizó la región control mitocondrial y 24 microsatélites nucleares de 257 individuos y encontraron que las subpoblaciones, a pesar de estar separadas por extensas áreas de mar abierto, mantienen una diversidad genética alta y presentan altas tasas de flujo génico (Floyd *et al.*, 2010).

En *Myotis daubentonii* se encontró baja estructuración genética entre las poblaciones muestreadas en el Mar del Archipiélago, Finlandia y Europa usando nueve microsatélites. Sin embargo, se observó un incremento gradual en la diferenciación genética a lo largo de una escala geográfica grande, lo que es indicativo de aislamiento genético por distancia (Laine *et al.*, 2013).

En el año 2014 se comparó la estructura genética de *Myotis lucifugus* entre colonias al este y al oeste de la meseta de los Apalaches en EUA. Aunque los resultados de los 8 microsatélites no revelaban estructuración, sí se registró diferenciación genética significativa con

el marcador mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) lo que sugiere que no existe flujo génico entre los dos grupos de colonias (Butterworth *et al.*, 2014)

En EUA se evaluó la diversidad genética de *M. septentrionalis* usando 10 microsatélites nucleares en 182 individuos y encontraron alta diversidad genética y poca estructuración a pesar del decremento poblacional por el que ha atravesado la especie debido al Síndrome de nariz blanca (WNS, por sus siglas en inglés) y aún con hábitat fragmentado. Una posible explicación del buen estado de la población es la capacidad migratoria de esta especie y que puede subsistir en parches pequeños de bosque, lo que permite que continúe el flujo génico entre poblaciones (Johnson *et al.*, 2014).

c) Procesos pasados

Además de la geografía, los eventos pasados también pueden tener un fuerte impacto sobre la diversidad de las poblaciones (Hewitt y Butlin, 1997). Las fluctuaciones climáticas que ocurrieron en el Pleistoceno y el efecto de estas sobre la distribución de los ecosistemas pueden influenciar la distribución actual de los organismos y sus genes. Ditchfield (2000) estudió el efecto de los cambios ambientales del Pleistoceno usando secuencias de citocromo b y demostró que 17 especies de murciélagos neotropicales comparten haplotipos mitocondriales y que existe poca estructuración a una escala geográfica de hasta 1,000 km. El efecto de los cambios climáticos en el Pleistoceno también depende de la ecología individual de cada especie: *Artibeus lituratus* que habita tanto áreas abiertas como bosques, no presentó estructuración, mientras que especies que habitan exclusivamente en bosques como *Glossophaga soricina* los efectos se vuelven más evidentes a distancias mayores.

En *Nyctalus noctula* se investigaron las consecuencias genéticas que tuvieron los cambios en la distribución de las especies a lo largo del tiempo. Esta especie de murciélago pasó por un periodo de expansión post Pleistocénica desde un refugio al sur de Europa cuando los bosques en

esta zona se recuperaron por lo que se observa una subdivisión genética mínima entre las poblaciones (Petit *et al.*, 1999).

En *Macroderma gigas*, por el contrario, se observa alta estructuración genética entre colonias de latitudes altas y bajas obtenida con región control y seis microsatélites. Lo anterior sugiere que esta especie en Australia atravesó una contracción histórica que potencialmente sigue ocurriendo (Worthington Wilmer *et al.*, 1994,1999).

Posteriormente, (Dixon, 2011b) la modelación de nicho para investigar el papel que tuvo la biogeografía histórica y estructura genética de *M. lucifugus*. Se modeló el nicho ecológico del presente y del Último Máximo Glacial usando las variables de BIOCLIM. Para el Último Máximo Glacial, el autor se basó en el Community Climate System Model (CCSM) y se calcularon estadísticos de crecimiento poblacional que apuntan a que la población atravesó una expansión significativa hace aproximadamente 18,000 años. Los resultados de la modelación también sugieren que existió un refugio pleistocénico grande a lo largo del sur de Estados Unidos y otros más pequeños al oeste de Norteamérica (Dixon, 2011b).

OBJETIVOS

Objetivo general

Estimar la diversidad genética del murciélago de cabeza aplanada (*Myotis planiceps*) en Los Pinos, Coahuila bajo una perspectiva de conservación.

Objetivos particulares

- Determinar la diversidad nucleotídica y haplotípica de *M. planiceps* en Los Pinos, Coahuila utilizando un marcador mitocondrial (citocromo b) y compararla con los valores reportados para otra especie ampliamente distribuida del mismo género (*M. lucifugus*).
- Inferir la historia demográfica de *M. planiceps* y establecer si la población atravesó cuellos de botella o expansión poblacional recientes.
- Modelar el nicho ecológico de *M. planiceps* con base en las localidades de registro de la especie en la actualidad, en el último Máximo Glacial y en el Último Interglacial.
- Con base en la información genética, elaborar sugerencias para la conservación de *Myotis planiceps*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sitio de estudio

Los Pinos, Coahuila.

El estudio se llevó a cabo en la Escuela Técnica en Servicios de Hospitalidad “El Pinar” ubicada en la localidad de Los Pinos en el municipio de Arteaga en el extremo sureste de Coahuila, en las coordenadas 25°20'32.60"N 100°47'26.10"O a 2103 msnm. El clima es seco estepario y desértico y en las partes altas de la sierra es templado. La precipitación es escasa la mayor parte del año y la temperatura es extremosa con veranos calurosos e inviernos fríos. La humedad atmosférica es baja y la evaporación elevada (García, 1973).

Es el único sitio donde se han localizado refugios de maternidad de *Myotis planiceps*, se encuentra dentro de una propiedad privada que pertenece a la prelatura del Opus Dei y se utiliza con fines recreativos. El principal problema al que se enfrenta el ecosistema en ese sitio es la ampliación de las construcciones ya existentes que pasaron de 6,000m² a 12,000m².

Captura de murciélagos

Debido a que se desconoce la ubicación de los refugios de invierno de la especie, los muestreos se planearon en primavera y verano de acuerdo con el éxito de capturas reportado por Núñez-Rojo (2011).

La captura de murciélagos se llevó a cabo con redes de nylon de 12 y 18 m en la localidad de Los Pinos, Coahuila en los meses de marzo, abril, junio, julio y agosto del año 2012 durante 4 noches de cada mes. Las redes se colocaron sobre cuerpos de agua artificiales al atardecer, se revisaban cada 10 minutos y se cerraban a las 00:00hrs cuando cesaba casi por completo la

actividad de los murciélagos. En los meses de abril y junio se localizaron los refugios de maternidad en *Yucca carnerosana* y se cercaron con redes de 3 y 6 m.

Una vez capturados, los murciélagos fueron identificados utilizando la guía "Identificación de los Murciélagos de México" (Medellín, et al., 2008). En seguida, se registró el peso corporal, la longitud de antebrazo (AB), longitud de oreja derecha (OD), sexo, edad (Anthony, 1988) y estado reproductivo (Kunz y Parsons, 1988), mismo que en las hembras se clasificó en: gestantes mediante la palpación del abdomen y observación de glándulas mamarias desarrolladas, lactancia, y no reproductivas. En el caso de los machos se determinó según la posición de los testículos (abdominal- inactivo o escrotal-activos sexualmente).

Colección de material biológico

Se tomaron 34 muestras de tejido de la membrana alar de aproximadamente 2mm² de un área desprovista de vasos sanguíneos, de manera que no comprometiera la capacidad de vuelos de los individuos muestreados. Las muestras fueron sumergidas en viales con alcohol para su conservación y traslado al laboratorio. Los murciélagos fueron liberados la misma noche y en el mismo lugar donde se capturaron. En el muestreo se incluyeron 7 muestras tomadas en el año 2005 cuando se encontró la primera yuca de maternidad en Los Pinos, Coahuila.

Extracción de ADN

La extracción de tejido de membrana alar se efectuó utilizando el kit comercial de extracción DNeasy™ Blood and Tissue (Qiagen Inc., Chatsworth, California). Se modificó el protocolo sugerido por el proveedor (Ver Apéndice 1). La extracción exitosa de ADN fue comprobada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TAE 0.5X teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz UV.

Amplificación

Para amplificar el citocromo b (Citb) se utilizaron los *primers* universales (Tabla 1) Myo450F (Larsen *et al.* 2011) y H15915 (Irwin *et al.* 1991).

Tabla 1. Descripción de los *primers* universales utilizados para amplificar el gen citocromo b en *Myotis planiceps*.

Región	Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
Citocromo b	Myo450F	CTC TCT GCR ATY CCA TAY ATY GG	Larsen <i>et al.</i> 2011
Citocromo b	H15915	AAC TGC AGT CAT CTC CGG TTT ACA AGA C	Irwin <i>et al.</i> 1991

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 3.5 µl de ADN, 1X de Tris-HCl pH 8.3, 2 mM de MgCl₂, 0.9 mM de dNTP's, 1.2 µM de cada primer y 1 U de Taq polimerasa para un volumen final de 15 µl. Se utilizó un termociclador programable Verity de Applied Biosystems y se incluyeron controles negativos en todas las reacciones con las siguientes condiciones (Tabla 2):

Tabla 2. Condiciones de amplificación del gen citocromo b en *Myotis planiceps*.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 seg	
Denaturalización	96°C	15 seg	
Alineación	53°C	15 seg	35x
Extensión	72°C	2 min	
Extensión Final	72°C	7 min	

La correcta amplificación de los productos de PCR de citocromo b se comprobó con corrida electroforética en un gel de agarosa al 1.5% con Buffer TAE 0.5X teñido con bromuro de etidio y posterior exposición a luz UV (Fig. 5).

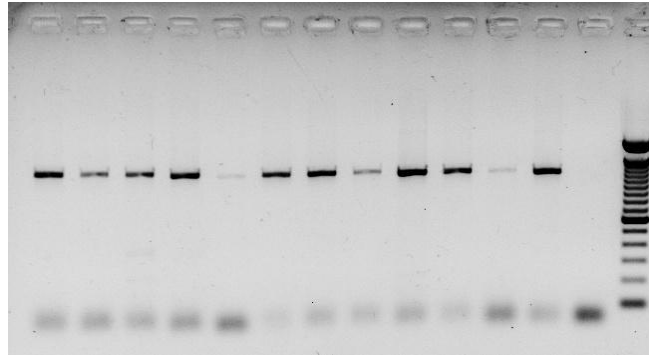


Figura 5. Gel de agarosa al 1.5% utilizado para corroborar la correcta amplificación de citocromo b

Secuenciación

Cada fragmento de citocromo b se secuenció por duplicado en el High Throughput Genomic Center de la Universidad de Washington. Los cromatogramas que resultaron de la secuenciación se visualizaron y analizaron usando el editor de alineamiento de secuencias Bioedit (Hall, 1999). Se eliminaron los extremos de las secuencias de baja calidad donde estaban los *primers*. Para confirmar los resultados y resolver ambigüedades se alinearon las secuencias *forward* y *reverse*.

Diversidad genética

Los índices de diversidad nos permiten calcular la variación en una población o entre poblaciones. Los más usados para estudiar la variabilidad del ADN mitocondrial son el número de sitios polimórficos (S) que se refiere al número de loci que presentan más de un alelo por locus; número de haplotipos (n_h), diversidad haplotípica de Nei (H_d) y diversidad nucleotídica (π).

La diversidad haplotípica indica la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes y se calcula usando la fórmula de Nei (1987):

$$H_d = \frac{n(1 - \sum p_i^2)}{(n-1)}$$

donde n es el número de individuos muestreados y p_i es la frecuencia del n -ésimo haplotipo.

La diversidad nucleotídica indica la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición y tomados al azar sean diferentes. Se calcula usando la fórmula de Nei (1987).

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum p_i p_j \pi_{ij}$$

donde π_{ij} es el número de diferencias por sitio entre dos secuencias tomadas al azar p_i y p_j

Red de haplotipos

Para inferir la relación entre los haplotipos se construyó una red de haplotipos con el algoritmo de Median Joining (MJ) Network. Una red consta de nodos y conexiones; los nodos corresponden a las secuencias obtenidas y las conexiones que los unen representan las diferencias o pasos mutacionales. En el presente estudio, la red se elaboró con los parámetros preestablecidos por el programa Network v. 4.6.1.2. (www.fluxus-engineering.com; Bandelt *et al.*, 1999).

La construcción de la red toma en cuenta la secuencia, la frecuencia de los haplotipos y calcula la probabilidad de que cada haplotipo sea un grupo externo. El número máximo de mutaciones entre pares de haplotipos se calcula mediante parsimonia (Clement *et al.*, 2000) y posteriormente se conectan los haplotipos que difieren por un solo cambio, luego los que difieren por dos y así sucesivamente. Finalmente la red estima la relación entre todos los haplotipos con base en el número mínimo de mutaciones y se representan eventos coalescentes por medio de las conexiones entre los haplotipos.

La red de haplotipos nos permite hacer inferencias acerca de la ancestría siguiendo los principios de coalescencia. Los haplotipos con mayor probabilidad de ser los ancestrales son aquellos que 1) se presentan con mayor frecuencia, 2) tienen múltiples conexiones, 3) están en el interior de la red, 4) tienen una amplia distribución geográfica (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

Historia demográfica

Las pruebas de neutralidad pueden reflejar eventos demográficos. Esto es relevante porque tanto la demografía histórica como la contemporánea impactan la estructura de las poblaciones. La reducción drástica del tamaño poblacional también se conoce como cuello de botella poblacional, y puede o no estar relacionado con un cuello de botella genético (Barret y Kohn, 1991).

La θ de Watterson es un estadístico calculado a partir del número de sitios polimórficos (S). Se ve afectado por el tamaño de la muestra por lo que también se incluye el número de nucleótidos (mT) y número de secuencias de la muestra (ak). Se calcula usando la fórmula de Nei (1987) como:

$$\theta = \frac{S_k}{m_T a_k}$$

donde $a_k = 1 + \frac{1}{2} + \frac{1}{3} + \dots + \frac{1}{k-1}$ es el factor de corrección.

La D de Tajima compara dos estimadores de variación: π , que se ve más afectado por alelos de mayor frecuencia pero es independiente del tamaño de muestra y θ_w , a la que sí afecta el tamaño de muestra y los alelos poco frecuentes (Charlesworth y Charlesworth, 2010). Se calcula a partir de la siguiente expresión:

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

Cuando D resulta positiva, π es mayor que θ lo que indica que algunos alelos se encuentran bajo selección balanceadora. Si D resulta negativa quiere decir que θ posee un valor

mayor que π debido a la presencia de variantes deletéreas lo que indica selección purificadora.

Cuando $D = 0$ la población se encuentra en equilibrio neutral.

Si se asume neutralidad selectiva para el citocromo b, esta prueba también sirve para inferir procesos demográficos mediante la relación entre la mutación y la deriva génica. Una población cuyo tamaño poblacional ha permanecido constante a través del tiempo presentará el mismo número de variantes tanto comunes como raras entre linajes y π será igual a Θ . Sin embargo, si una población atravesó una reducción drástica en el tamaño poblacional (*bottleneck*), el número de sitios polimórficos será menor por lo que π sería mayor que Θ y D tendría un valor positivo. Si al contrario, el tamaño de una población se expande, entonces el número de sitios polimórficos crecería más rápido que π y la D resultaría negativa (Hedrick, 2011).

La F_s de F_u es un estadístico particularmente sensible al crecimiento poblacional. Los valores negativos de este estadístico indican un proceso de expansión poblacional

Distribución de diferencias pareadas (Mismatch distribution)

La diversidad mitocondrial puede representarse mediante la frecuencia del número de diferencias pareadas (Crawford, 2007). Esta prueba compara las secuencias en una muestra pareadas y calcula el número de diferencias y muestra la frecuencia de los sitios que difieren usando histogramas. Además de representar la diversidad, estas distribuciones permiten inferir episodios de la historia demográfica de una población como expansiones o reducciones del tamaño poblacional (Rogers y Harpending, 1992).

La forma de la distribución por diferencias pareadas es altamente informativa (Crawford, 2007). Cuando una población ha sufrido una rápida expansión poblacional o espacial, se espera observar en el análisis una distribución unimodal (Poisson), mientras que cuando una población está subdividida o ha permanecido en equilibrio demográfico se espera que exhiba una

distribución bimodal o multimodal (Rogers y Harpending, 1992). En el histograma se grafican la cantidad de diferencias en el eje y, y la frecuencia de los pares de individuos que las presentan en el eje x.

El análisis de la distribución de diferencias pareadas para este estudio se realizó con el software Arlequín 3.5 (Excoffier y Lisher, 2010) y la significancia se calculó usando el índice de rugosidad (raggedness) de Harpending (1992).

Modelación de nicho ecológico y reconstrucción paleoclimática

La distribución potencial de *M. planiceps* fue modelada usando MaxEnt (Phillips, *et al.*, 2006). El algoritmo de este programa busca identificar en un espacio ecológico las variables ambientales que determinan la presencia o ausencia de una especie de manera no aleatoria. Para ello utilizan registros georreferenciados de la especie y capas bioclimáticas del área de estudio.

El algoritmo de MaxEnt divide el mapa en píxeles y con aquellos en los que se reporta presencia, hace correlaciones por par de píxeles con las variables bioclimáticas disponibles en capas bioclimáticas. Con dichas correlaciones se genera una nube de puntos, se extrae el pixel promedio y los valores asociados de las variables. El umbral, por encima del cual se asignan las posibles presencias se establece con base en el pixel promedio.

Finalmente se caracteriza la entropía de Shannon, midiendo el cambio entre los píxeles con presencias predichas y el resto de los píxeles, de manera que se elija la distribución de la probabilidades en los píxeles que distribuya de forma homogénea y azarosa la información (Martínez-Ainsworth, 2013). Cabe mencionar que toda modelación incorpora cierto grado de incertidumbre. Los errores de omisión descartan información espacial de nicho de lugares que podrían ser ocupados mientras que los errores de comisión incluyen lugares que no podrían sostener a la especie (Wiens, 2009).

La modelación al pasado se hizo con base en nueve registros de *M. planiceps* con la finalidad de examinar si los cambios ambientales pasados influenciaron y moldearon la diversidad genética que observamos en la actualidad. En la literatura se sugieren 30 (Wisz *et al.*, 2008) o 50 (Kadmon *et al.*, 2003) datos de presencia como mínimo para generar modelos estadísticamente válidos. Sin embargo, dada la rareza de la especie bajo estudio, se cuenta con pocos registros de presencia de *M. planiceps* en tres localidades muy cercanas. Se usaron 19 variables ambientales y altitud de BIOCLIM disponibles para el presente, el Último Máximo Glaciar y el Último Interglaciar con una resolución espacial de 30arcsec (aproximadamente 1 km²).

Las variables ambientales se tomaron de la base de datos de Worldclim (Hijmans *et al.*, 2005). Se utilizó el *Community Climate System Model* (CCSM) desarrollado en colaboración por el *US Department of Energy*, por la *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) y la *National Science Foundation* (NSF). El sistema consta de cuatro componentes geofísicos paralelos (atmósfera, tierra, océano y capas de hielo) que corren de manera simultánea y tienen la ventaja de estar en constante intercambio de información.

Las variables climáticas de este modelo se han relacionado con la tolerancia ecológica y fisiológica de los organismos, de ahí su efectividad para predecir las distribuciones pasadas y presentes. (Hijman y Graham, 2006). El umbral se estableció en el valor más bajo que incluyera todos los puntos georreferenciados proporcionados al modelo. (minimum training presence =0.4213). La validación del modelo consta de tres pruebas: Jackknife, curvas de omisión y curvas de Receiver Operating Characteristic (ROC) (Apéndice 4). Los valores van de 0.5 para modelos sin habilidad predictiva a 1.0 para modelos que proveen predicciones perfectas.

RESULTADOS

Captura de murciélagos

Se estandarizó el esfuerzo de captura en horas-red (una red de 12m colocada por una hora equivale a una hora-red). El esfuerzo total fue de 400 horas-red que comprende 40 días de muestreo en 5 salidas de campo de marzo a agosto del 2012 (5 horas-red (12m) /noche)(Tabla 3) en las que se capturaron 13 especies en total (Tabla 4).

Tabla 3. Esfuerzo de captura estandarizado en horas red (1 red de 12 m colocada una hora) por localidad por muestreo.

Mes	Los Pinos, Coahuila
Marzo 2012	5 horas-red x 4 noches
Abril 2012	5 horas-red x 4 noches
Junio 2012	5 horas-red x 4 noches
Julio 2012	5 horas-red x 4 noches
Agosto 2012	5 horas-red x 4 noches
Total horas-red	400 horas-red /20 noches

Del total de los murciélagos capturados, 81 individuos pertenecían a la especie *Myotis planiceps*. La proporción de sexos observada presentó un sesgo a favor de las hembras (97.5% de los *M. planiceps* capturados fueron hembras. La interpretación de estos resultados sugiere una dispersión diferencial por sexo por lo que se sugiere realizar análisis con marcadores nucleares para obtener una mejor comprensión acerca del proceso de dispersión, flujo génico y estructura poblacional.

En los muestreos de marzo y agosto no se capturaron individuos de *Myotis planiceps*. En abril y junio se localizaron los refugios de maternidad en *Y. carnerosana* (Fig 6), que coinciden con la descripción de Núñez-Rojo (2011). Además de estas características, ambos refugios de

maternidad, al igual que el encontrado en el año 2005 por el Dr. Joaquín Arroyo y colaboradores, se encontraban cercanos a una fuente de agua.

Los meses en los que se obtuvo mayor cantidad de información tanto en el 2012 como en el 2005 (Arroyo *et al.*, 2005) fueron aquellos en los que se localizaron las yucas de maternidad con hembras gestantes y lactantes principalmente.

A partir de junio del 2012 se talaron árboles (fig. 7), entre ellos una de las yucas elegidas previamente como refugio de maternidad y se inició la construcción de más de 12,000 m².

Tabla 4. Listado de especies de murciélagos capturadas en el presente estudio. Se indica la localidad en la que fueron capturados y su estado de conservación en la NOM-059 y en la lista roja de la IUCN.

Familia	Especie	Coahuila	NOM-059/IUCN
Phyllostomidae	<i>Choeronycteris mexicana</i>	x	A/ NT
	<i>Myotis californicus</i>	x	
	<i>Myotis thysanodes</i>	x	
	<i>Myotis melanorhinus</i>	x	
Vespertilionidae	<i>Myotis planiceps</i>	x	P/E
	<i>Lasiurus xanthinus</i>	x	
	<i>Lasiurus blossevilli</i>	x	
	<i>Lasiurus cinereus</i>	x	
	<i>Antrozous pallidus</i>	x	
	<i>Idionycteris phyllotis</i>	x	
	<i>Corynorhinus townsendii</i>	x	
Molossidae	<i>Eptesicus fuscus</i>	x	
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	x	



Figura 6. Refugios de maternidad de *Myotis planiceps* en *Yucca carnerosana* encontrados en abril (a) y junio (b) del año 2012 en Los Pinos, Coahuila cercanos a un cuerpo de agua artificial.



Figura 7. Deforestación alrededor del sitio de muestreo y del refugio de maternidad de *Myotis planiceps* en Los Pinos, Coahuila., junio (a) y julio (b) del año 2012.



Figura 8. En el año 2013 se realizó una visita al sitio para corroborar el estado de la especie y se encontró la construcción casi terminada. El cuerpo artificial de agua que proveía el recurso para muchos animales en el área fue removido. No se tuvo éxito en la captura de *Myotis planiceps*.

En abril todos los murciélagos de cabeza aplanada se encontraban aparentemente inactivos. El periodo de actividad reproductiva reportado por Núñez-Rojo (2011) es el comprendido entre los meses de mayo a agosto, que corresponden a la transición entre primavera y verano. Los resultados del presente estudio coinciden con lo observado anteriormente. De las 50 hembras capturadas en junio 16 se encontraban gestantes, 29 lactantes y 5 postlactantes. En julio la actividad reproductiva disminuyó y únicamente se registraron 7 hembras de las cuales 5 estaban inactivas y 2 postlactantes. El promedio del peso corporal de 81 individuos medidos fue de 4.44 g y la longitud del antebrazo de 28.34 mm.

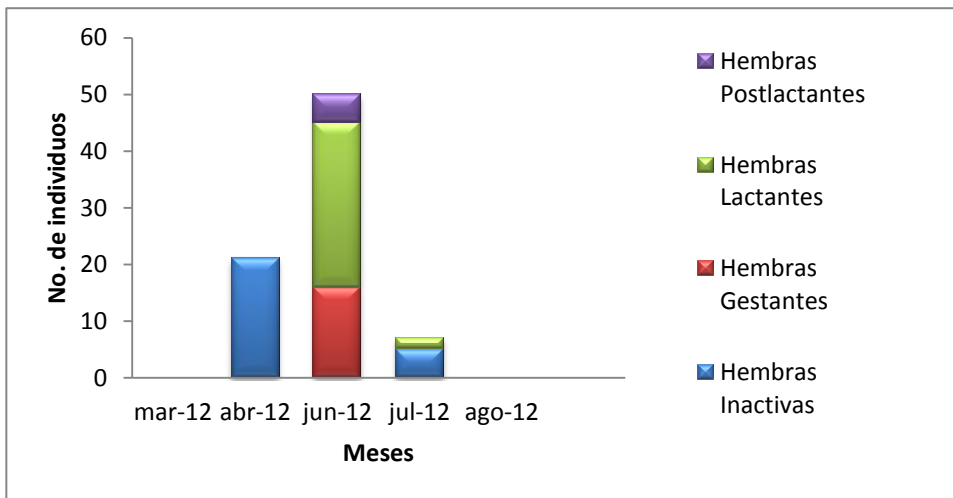


Figura 9. Estado reproductivo de las hembras *Myotis planiceps* en el periodo marzo-agosto del 2012.

Diversidad genética

De un total de 81 *Myotis planiceps* capturados se obtuvieron muestras de 38 individuos. Se lograron amplificar y secuenciar con éxito 33 secuencias de 630 pb de citocromo *b* de Los Pinos, Coahuila. También se amplificaron y secuenciaron con éxito siete secuencias de individuos capturados en la yuca de maternidad en un muestreo previo en el año de 2005 en la misma localidad.

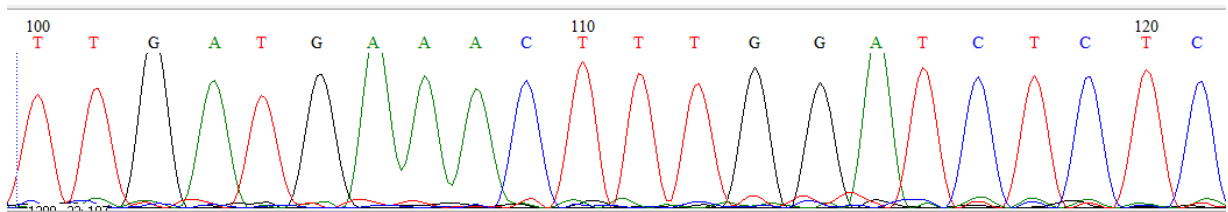


Figura 10. Sección de un cromatograma de los 100 a los 120pb de la secuencia de citocromo *b* para la muestra 1. Cada nucleótido está representado con un color diferente.

Se analizaron las 40 secuencias (m) de 630 pb (n) de citocromo *b* y se observaron 6 haplotipos con 4 sitios polimórficos (S) de los cuales tres son parsimoniosamente informativos. Todas las sustituciones observadas son transiciones. La composición nucleotídica de las secuencias de citocromo *b* presenta un sesgo de guanina: C =28.30%, T = 30.43%, A = 30.31%, G= 10.96%. La diversidad haplotípica (**Hd**) de *M. planiceps* es de 0.692 y la diversidad nucleotídica (**π**) de 0.00157. De acuerdo con Grant y Bowen (1998) cuando la diversidad haplotípica es grande (>0.5) y la nucleotídica es pequeña, es posible que la especie haya sufrido un cuello de botella seguido de un crecimiento poblacional rápido. Se usó el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para buscar la mayor similitud entre las secuencias en la base de datos de GenBank y las secuencias de los haplotipos mitocondriales de *M. planiceps*. Con el algoritmo *Megablast* se obtuvo el 99% de identidad para todos los haplotipos con *Myotis yumanensis* y *M. volans* (Larsen *et al*, 2012) y el 91% con *M. lucifugus* (Dewey *et al.*, 2006).

En el Haplotipo 1 se agruparon siete individuos en total, de los cuales un individuo pertenece a la primera yuca de maternidad encontrada en el año 2005 y seis pertenecen a la yuca de maternidad encontrada en junio del 2012. El Haplotipo 2 es el más frecuente con 18 individuos, de los cuales 14 corresponden al muestreo del año 2012 y 4 al muestreo del 2005. En el Haplotipo 3 se agrupan 12 individuos de los cuales dos corresponden al año 2005 y 10 al muestreo del año 2012. Los haplotipos 4, 5 y 6 contienen un solo individuo cada uno, todos son de la localidad de Los Pinos y son exclusivos del muestreo del año 2012.

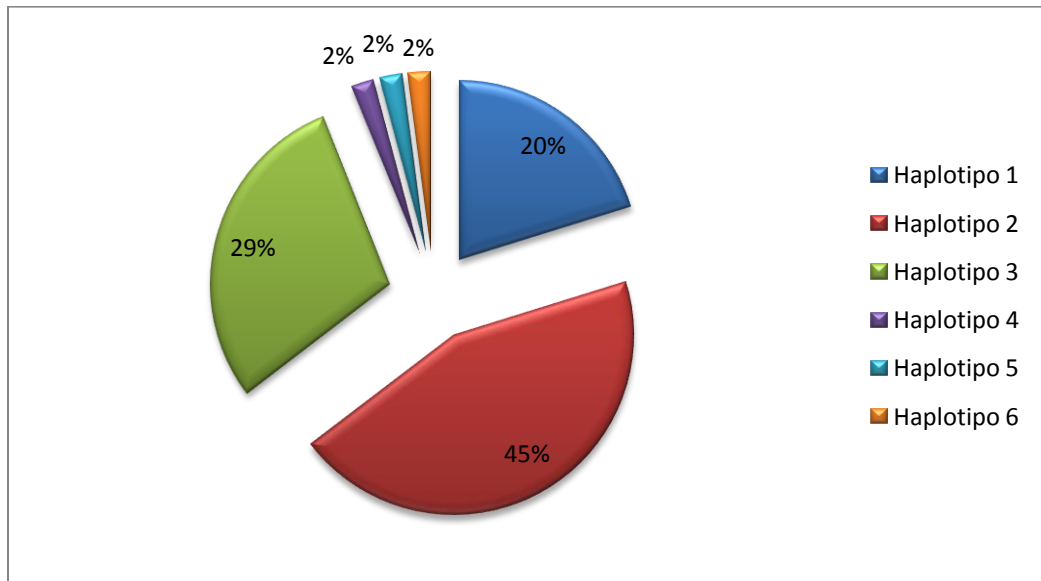


Fig. 11 Porcentaje de individuos por haplotipo del gen mitocondrial citocromo b, 630 pares de bases en la especie *Myotis planiceps*, en las localidades de Los Pinos, Coahuila. El Haplotipo más frecuente es Haplotipo 2 y es en el que se agrupa la mayor cantidad de individuos capturados en el primer refugio de maternidad conocido. Los Haplotipos 4, 5 y 6 están representado por un solo individuo.

Red de haplotipos

La genealogía se realizó usando las 40 secuencias obtenidas de citocromo b de *M. planiceps* y se incluyeron dos secuencias de *M. volans* tomadas de la base de datos de GenBank. Las relaciones entre los haplotipos se representaron como una red *Median Joining* obtenida con el programa Network (Bandelt, 1999). Los principios de coalescencia indican que los haplotipos con mayor probabilidad de ser ancestrales son aquellos que se presentan con mayor frecuencia, mayor rango de distribución, con más conexiones y se encuentran en el interior de la red, aunque en la práctica siempre es mejor usar como outgroup secuencias de la especie hermana o de otras especies muy cercanas, en este caso la especie hermana es *M. volans* (Haynie *et al.*, 2014). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta red, de los haplotipos exclusivos de *M. planiceps* (en amarillo) el Haplotipo ancestral es el número 2, que aparece con más frecuencia con un total de 18 individuos, se conecta con los Haplotipos 6 y 3, también exclusivos de *M. planiceps*, y con los haplotipos 8 y 7 que son exclusivos de *M. volans* (en naranja), la especie hermana. Existe un solo paso mutacional entre cada par de haplotipos de *M. planiceps* en las siguientes posiciones: 501 entre los Haplotipos 6 y 2; 417 entre los Haplotipos 2 y 3; 582 entre los Haplotipos 3 y 1; 582 entre los Haplotipos 4 y 5; 627 entre los Haplotipos 4 y 1 y 627 entre los Haplotipos 5 y 3.

Figura 12. Red de haplotipos obtenida con el programa Network a partir de 40 secuencias de citocromo b de *Myotis planiceps* (en amarillo) y dos secuencias de *Myotis volans* (en naranja). La figura muestra una red de ocho haplotipos, de los cuales seis se obtuvieron en la localidad de Los Pinos. El vector mediano Cada círculo representa un único haplotipo y el tamaño refleja el número de individuos que comparten haplotipo. Entre cada par de haplotipos se muestran los pasos mutacionales, en números rojos se indica la posición.

Al comparar la riqueza haplotípica con estos tamaños de muestra, se encontró una diferencia significativa entre la presentada por *M. lucifugus*, que es mayor que la de *M. planiceps* en todos los casos (T de Student= 0.0000395) (Tabla 5.).

Tabla 5. Riqueza de haplotipos. N: número de muestra; H *M.lucifugus*: Riqueza haplotípica para *M.lucifugus*; Hr *M. planiceps*: Riqueza haplotípica para *M. planiceps* rarefaccionada

N	H <i>M.lucifugu</i>	Hr <i>M.planiceps</i>
9	4	3.51
19	6	4.38
16	7	4.15
9	5	3.51
10	6	3.6
17	9	4.23
21	8	4.53
16	7	4.15
18	7	4.31
17	8	4.23
10	4	3.6
20	7	4.46

Pruebas de neutralidad y Distribución de diferencias pareadas (*Mismatch distribution*)

Aunque el valor positivo de la *D* de Tajima podría sugerir una reducción drástica reciente en el tamaño de la población (*bottleneck*) de *M. planiceps*, este no fue significativo y es casi indistinguible de cero. Por otra parte, el estadístico *F_s* de Fu que es particularmente sensible al crecimiento poblacional (Holsinger y Gottlieb, 1991), muestra un valor negativo que indica un proceso de expansión poblacional. El valor significativo y positivo del índice de *raggedness* también sugiere un escenario de expansión poblacional.

Tabla 6. Índices del análisis de la historia demográfica en *Myotis planiceps*. Los valores con asterisco son significativos

Núm de secuencias	<i>Raggedness</i>	<i>F_s</i> de Fu	<i>D</i> de Tajima
40	0.09523*	-1.326	0.11878

Dados los resultados obtenidos con las pruebas de neutralidad, se evaluó la posibilidad de una expansión poblacional usando Arlequin 3.5 (Excoffier y Lisher, 2010) con la aproximación de Schneider y Excoffier (1999), donde se compara la distribución observada de los *mismatches* con la esperada bajo un modelo nulo de expansión poblacional (Tabla 6). La prueba de las frecuencias de distribución de diferencias pareadas (*mismatch*) para *M. planiceps* bajo este modelo presentó una forma Poisson o unimodal (Fig. 14) apoyado con un valor de raggedness significativo (Tabla 6) ($r= 0.09523$ y $p\text{-valor} = 0.21000$). El valor de la suma de cuadrados de la desviación entre las curvas es de 0.00777220 de manera que no podemos rechazar la hipótesis nula de expansión poblacional.

La construcción de la distribución se basó en tres parámetros: 1) teta inicial, que es el valor dado antes de la expansión poblacional; 2) teta final que es el valor dado después del crecimiento y declive de la población y 3) tau que representa el tiempo de expansión en unidades de mutaciones (Rogers y Harpending, 1992) (Tabla 7).

Tabla 7. Estimación de parámetros poblacionales con el modelo basado en Mismatch Distribution (Rogers y Harpending 1992; Schneider y Excoffier 1999).

Variable	Valor estimado	Límite inferior	Límite superior
Tau	1.143	0.738	1.865
Theta0	0.000	0.000	0.018
Theta1	999999.000	3.233	99999.000

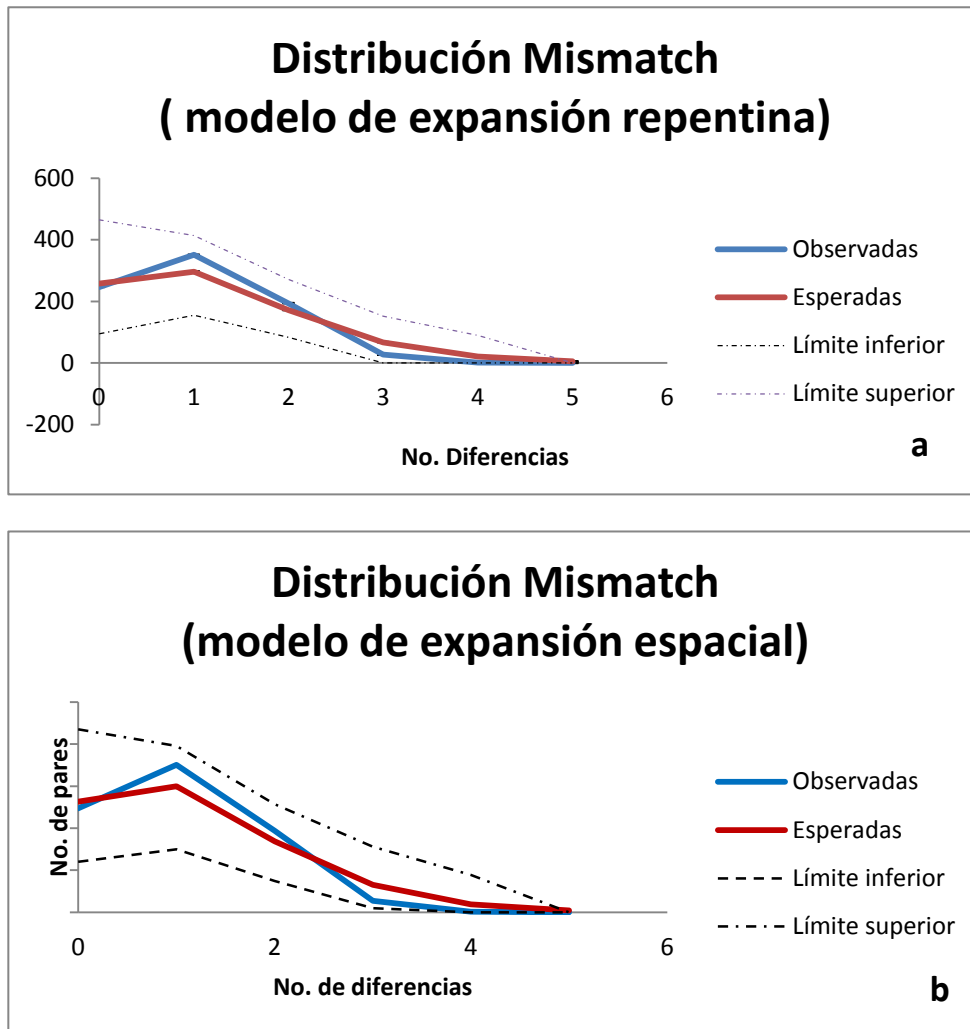


Figura 14. Distribuciones Mismatch para (a) el modelo de expansión repentina y (b) para el modelo de expansión espacial de *Myotis planiceps* en Los Pinos, Coahuila basado un fragmento de 630 pb del gen mitocondrial citocromo b. $SSD = 0.00777220$. Las líneas azules representan la distribución observada y las rojas la esperada. Ambos modelos con un 99% de intervalo de confianza ($\alpha=0.01$)

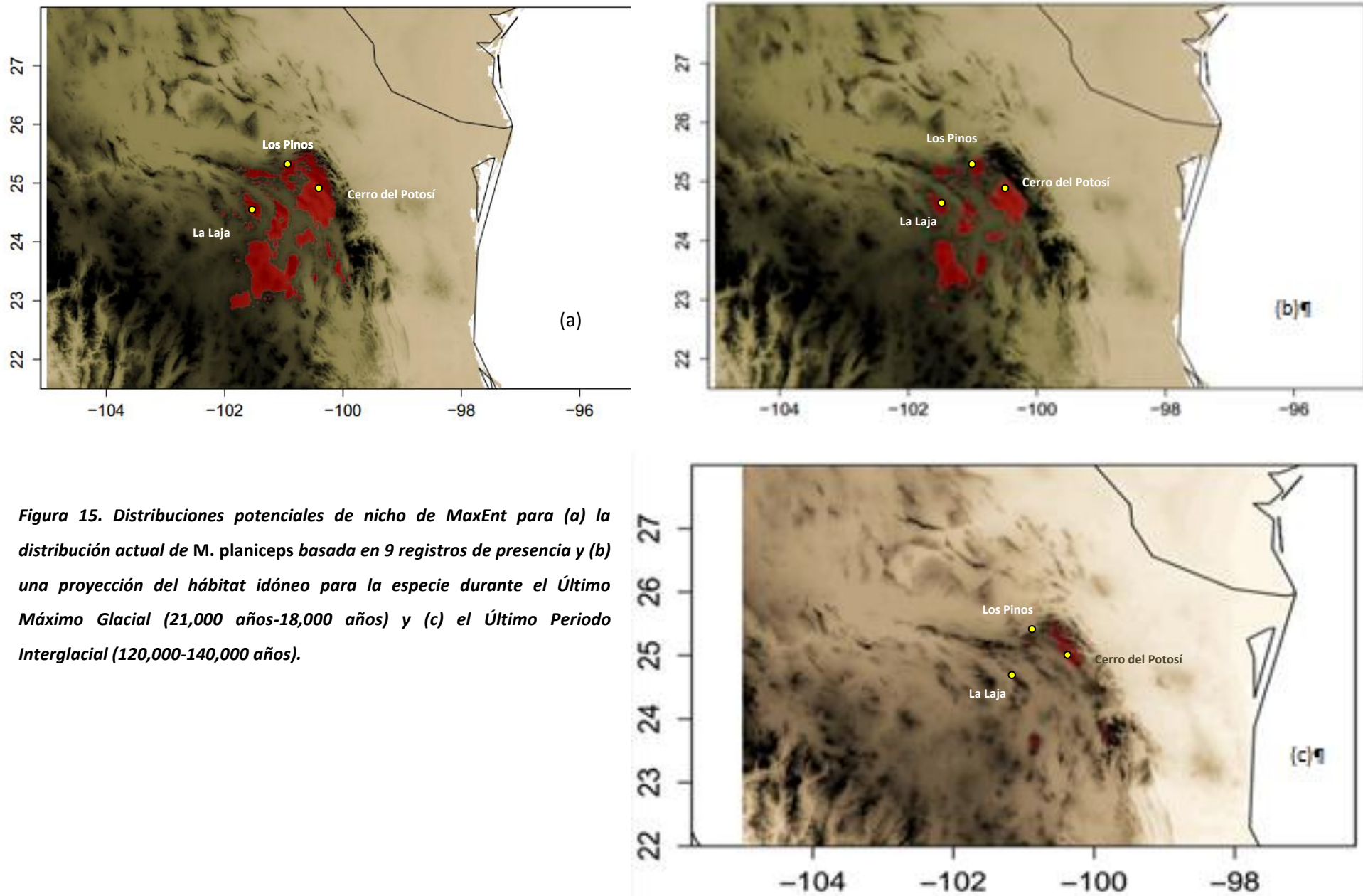
Modelación de nicho ecológico y reconstrucción paleoclimática

Las variables ambientales con mayor contribución relativa para la modelación que se describen a continuación son el promedio de las réplicas. La altitud contribuyó con 43.4%, la precipitación estacional con 25.9% y la precipitación del mes más húmedo con 15.7% (Apéndice 3). La curva ROC fue cercana a la unidad (0.966) con una desviación estándar de 0.005 lo que indica que presenta poca omisión, es decir no omite información espacial de nicho de lugares que podrían ser ocupados por la especie y poca comisión, que indica que no incluye lugares que no podrían sostener a la especie (Wiens *et al.*, 2009). Debe tenerse en cuenta que el valor de la curva depende del número de presencias y en el presente estudio únicamente se usaron nueve registros.

En la modelación de nicho al Último Interglacial (Fig. 15c) (140,000-120,000 años) podemos observar que las condiciones idóneas para que se estableciera *M. planiceps* se encontraban en la Sierra de Arteaga y en tres pequeños refugios al sur de ese lugar. En el último Máximo Glacial (fig. 15b), entre los 21,000 y 18,000 años, la modelación de nicho indica que las condiciones ideales se expandieron, lo que posiblemente permitió que la especie pudiera ampliar su distribución espacial. Sin embargo, la Sierra de Arteaga que antes tenía las condiciones adecuadas para la especie, en este periodo dejó de tenerlas. Hace 21,000 años la Tierra atravesó una glaciación que bajó la temperatura global, lo que volvió las montañas muy frías para ser habitadas por organismos que en otro momento las poblaban. La Sierra de Arteaga en este periodo era demasiado fría para ser habitable por este murciélago.

Conforme retrocedieron los casquetes polares y la temperatura aumentó, los *M. planiceps* pudieron expandir su distribución hacia el Norte y recolonizar la sierra de Arteaga que se

encuentra a más de 2000msnm y donde los encontramos en la actualidad (Fig.15a). Estos resultados concuerdan con la F_s de F_u y con el análisis de distribución de diferencias pareadas que sugieren que *M. planiceps* atravesó una expansión recientemente, sin embargo es preciso contar con evidencia del registro fósil que compruebe lo anterior.



1
2
3
4
5
6
7

Figura 15. Distribuciones potenciales de nicho de MaxEnt para (a) la distribución actual de *M. planiceps* basada en 9 registros de presencia y (b) una proyección del hábitat idóneo para la especie durante el Último Máximo Glacial (21,000 años-18,000 años) y (c) el Último Periodo Interglacial (120,000-140,000 años).

Para evaluar la importancia de las variables se corrió una prueba de Jackknife (Fig.16). La variable ambiental que provee más información para la modelación cuando se modela de manera aislada es la altitud. Asimismo, la altitud es la variable que afecta en mayor medida la modelación cuando no se incluye. Esto es indicativo de que esa variable brinda información útil que otras variables no le aportan al modelo. Lo anterior es congruente con el paisaje en el que se distribuye el murciélago de cabeza aplanada que se caracteriza por ser montañoso y de altitudes mayores a los 2,000 msnm.

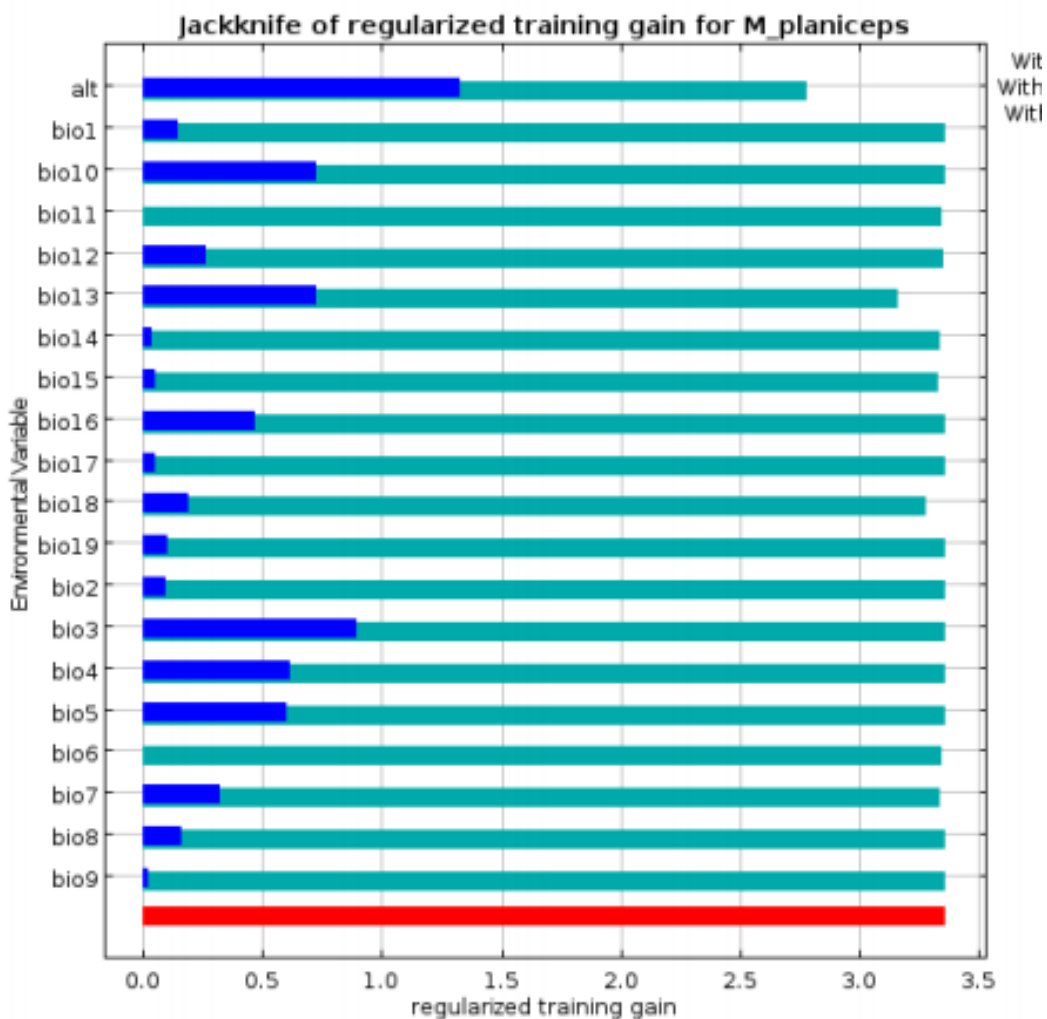


Figura 16. Prueba Jackknife en la que se muestra la contribución de cada variable ambiental al modelo de nicho ecológico. La variable más importante cuando se excluye o se modela de manera aislada es la altitud.

DISCUSIÓN

Captura de murciélagos

En este estudio se realizaron análisis para estimar la diversidad genética del murciélago de cabeza aplanada (*Myotis planiceps*), con el fin de aportar información sobre el estado de conservación en Los Pinos, Coahuila. El primer paso fue llevar a cabo una búsqueda exhaustiva de la especie con base en las localidades con mayor éxito de captura reportadas por Núñez-Rojo (2011). Durante los muestreos también se pudo documentar el cambio de uso de suelo debido a la construcción de un centro de convenciones del Opus Dei.

Después de iniciado el proceso de construcción las capturas disminuyeron considerablemente. Esto es equiparable al éxito de captura del estudio realizado del año 2006 al 2008 (Núñez-Rojo 2011) en el que tampoco se encontraron refugios de maternidad y se capturaron únicamente 23 ejemplares de la especie con un esfuerzo de muestreo de 1190 horas-red comprendidas en 85 días de muestreo en ocho salidas de campo.

Localizar la yuca (*Yucca carnerosana*) que elige *M. planiceps* para establecer su refugio de maternidad y que cambia con regularidad, facilita en gran medida el monitoreo, que de otra manera, por el tamaño tan pequeño de estos murciélagos, su excelente capacidad para detectar las redes de niebla, lo vasto del desierto y su baja densidad poblacional se vuelve sumamente difícil.

La correcta selección del refugio puede garantizar la supervivencia de los murciélagos. Sin un refugio adecuado, el clima extremo de temperaturas muy altas durante el día y muy bajas durante la noche, incrementa el gasto energético para la termorregulación de las hembras reproductivamente activas (Kunz, 1982). Además, en los refugios de maternidad forman asociaciones con otras hembras, se reduce la probabilidad de depredación y pueden beneficiarse con comportamientos de reciprocidad o nepotismo (Hamilton, 1964; Adams *et al.*, 2008).

De acuerdo con Humphrey (1975) la presencia o ausencia de refugios de maternidad es lo que más influye en la distribución y abundancia de especies neárticas. Los refugios que se encuentran en la propiedad privada que pertenece a la prelatura del Opus Dei convierten al sitio en uno de primordial importancia para la conservación de la especie. La deforestación que tuvo lugar en Los Pinos, afectó directamente a la población que ahí habitaba. La construcción será usada de manera recreativa como centro de convenciones, esto implica que albergará a una gran cantidad de personas. Aunado a esto, durante el proceso de construcción se talaron pinos y una de las yucas usadas previamente como refugio de maternidad.

Es necesario implementar medidas para la protección de los refugios y en general del área donde se ha localizado esta especie tan rara. En el murciélago *Thyroptera tricolor* se demostró que la remoción de los recursos que fungen como refugios está asociada a menor selectividad, mayor movilidad de los individuos y por lo tanto un decremento en la cohesión social. Las respuestas a la pérdida de refugios potencialmente reducen la adecuación de los murciélagos al incrementar el gasto energético, la exposición a depredadores y el decremento de interacciones cooperativas (Chaverri y Kunz, 2011). En el 2011 se determinó que *M. planiceps* elige yucas mayores a 4 m que estén rodeadas por otras yucas de la misma altura (Núñez-Rojo, 2011) y aparentemente que estén cerca de una fuente de agua. En el área, el cambio de uso de suelo es extenso y los cuerpos de agua rara vez se encuentran próximos a yucas con las características que la especie requiere. Además de los factores biológicos a los que se enfrenta la especie y la deforestación de la pequeña área donde se distribuye *M. planiceps*, hay que añadir que en el sitio de estudio ha habido incendios forestales importantes en la época de secas que amenazan la supervivencia de la especie y constituyen otro factor de riesgo para los refugios.

Por otra parte, la fuente de agua más cercana que tenía la especie para abastecerse de este recurso sin alejarse demasiado de los refugios de maternidad fue eliminada. Para la vida

silvestre, entre ellos los murciélagos, que habitan zonas secas, el agua es elemental especialmente para las hembras lactantes que necesitan 13 veces más cantidad de agua que aquellas inactivas reproductivamente (O'Farrell y Studier, 1980; Adams y Hayes, 2008).

Myotis planiceps es indudablemente una especie rara con base en los criterios establecidos por Rabinowitz (1981) ya que tienen una distribución muy restringida, no sólo a nivel global sino también a nivel local, presenta requerimientos de hábitat específicos en cuanto a la selección de yucas para su reproducción, el tamaño poblacional es muy pequeño también a nivel global y local, reportado por la IUCN en alrededor de 250 individuos en total (Arroyo-Cabrales *et al.*, 2008a). Su tamaño pequeño y alas amplias (Núñez-Rojo, 2011), al igual que las de otras especies insectívoras están diseñadas para maniobrar en vegetación cerrada y capturar a sus presas en el vuelo (Norberg y Rayner, 1987; Norberg, 1994).

Estas características, por otra parte, aumentan el costo del vuelo por lo que los murciélagos con este tipo de alas no están adaptados para desplazarse distancias muy largas y presentan poca tendencia a migrar (Altringham, 2011). El tamaño pequeño también puede ser una limitante para la dispersión, ya que está asociado a un metabolismo rápido, lo que lo obliga a alimentarse constantemente. Esto puede explicar por qué aunque la distribución de la asociación entre pino piñonero y yuca es amplia, no sucede lo mismo con la distribución del murciélago de cabeza aplanada.

Diversidad Genética

En cuanto a la diversidad genética, los parámetros encontrados se compararon con lo que se ha reportado para otra especie del mismo género. Existe mucha información disponible para el género *Myotis*, desafortunadamente la mayoría de los estudios se han realizado con marcadores de otra naturaleza (microsatélites, región control). Por lo anterior se usó la información disponible

para *M. lucifugus*. En el presente trabajo, el número de pares de bases (630pb) es semejante al usado para *M. lucifugus* (654pb) (Dixon, 2011). Estos valores se compararon con la media de los valores disponibles reportados por *M. lucifugus* (Dixon, 2011) que se distribuye en Norteamérica desde Estados Unidos hasta Alaska (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de parámetros básicos de diversidad genética entre *Myotis lucifugus* (Dixon, 2011) y *Myotis planiceps*. (m=número de secuencias; n=número de pares de bases; S=Sitios polimórficos; n_h= número de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica; π= diversidad nucleotídica)

Especie	m	n	S	n _h	Hd	π
<i>Myotis planiceps</i>	40	630	4	6	0.692	0.00157
<i>Myotis lucifugus</i>	182	654	No reportado	37	0.819	0.0074

Los resultados encontrados con el gen citocromo b indican que la diversidad genética en la población de *M. planiceps* es baja (Hd=0.692, π= 0.00157) en comparación con los valores reportados para *M. lucifugus* (Hd=0.819, π =0.0074). Debido a que los muestreos entre estos dos estudios no son equitativos, se realizó una rarefacción de la información que corrobora la baja diversidad genética en comparación con *M. lucifugus*. A pesar de las diferencias encontradas entre las dos especies de murciélagos, cabe mencionar que *M. lucifugus* se caracteriza por tener una distribución históricamente amplia, aunque en la actualidad las poblaciones de *M. lucifugus* se encuentran amenazadas por el síndrome de la nariz blanca (Dixon, 2011). Por otra parte la rarefacción también aporta información sobre el tamaño de muestra, el cual no es representativo de la población, por lo que se sugiere ampliar el tamaño de muestra e incorporar información de La Laja, Zacatecas y el Cerro del Potosí, Nuevo León.

De acuerdo con lo propuesto por Grant y Bowen (1998) el contraste entre la diversidad nucleotídica y haplotípica de *M. planiceps*, indica que la especie pudo atravesar un proceso de

expansión y contracción drástica en el pasado, probablemente asociado a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, dando lugar a una relativa diversificación de haplotipos con pocas diferencias nucleotídicas. La baja diversidad genética de *M. planiceps* es consistente con el tamaño de su población y su categoría de especie en peligro de extinción por lo que se sugiere la implementación de programas de recuperación para la población del murciélago de cabeza aplanada.

En la red de haplotipos obtenida con Network se observa que el haplotipo ancestral es el número dos: además de estar relacionado con los haplotipos exclusivos de la especie hermana (*M. volans*), con base en Vázquez-Domínguez *et al.* (2009) es el haplotipo que se encuentra mejor representado con 18 individuos y está conectado con los Haplotipos 6 y 3, exclusivos de *M. planiceps*. Los resultados de la secuenciación reportan únicamente 4 sitios segregantes, que generan 6 haplotipos diferentes y entre cada haplotipo la red únicamente muestra un paso mutacional entre cada par de haplotipos en las posiciones 501,417, 627, y 582. Lo anterior sugiere baja diferenciación.

Aunque la *D* de Tajima sugiere que la población atravesó un cuello de botella, no es significativa. El resto de los resultados indican una expansión reciente. Estas evidencias incluyen las distribuciones potenciales en el pasado, el valor negativo de la *F_s* de Fu, el valor positivo y significativo del índice de raggedness y el análisis de distribución de diferencias pareadas que, al presentar un valor negativo y una forma unimodal respectivamente son congruentes con un escenario de expansión. Un proceso como este puede generar niveles de diversidad genética bajos, debido a que el frente de la colonización de hábitats nuevos la realizan unos pocos individuos (Austerlitz *et al.*, 1997).

Para asegurar lo anterior sería preciso contar con evidencia en el registro fósil que compruebe lo anterior pero hasta ahora no se conocen fósiles de *M. planiceps*.

Mediante la modelación de nicho (Fig. 15) se puede observar que la distribución potencial abarca mayor área de la que es reportada por la IUCN (Fig. 4) y también se observa como adecuada un área en la que no se ha reportado la presencia de la especie, posiblemente porque la predicción de patrones de distribución potencial de una especie asume que no intervienen otros factores como competencia o limitaciones para la dispersión. El hecho de que la modelación indique que existen lugares adecuados pero no se ha registrado la presencia de *M. planiceps*, puede deberse a que en esos sitios ocurrió una perturbación reciente que erradicó a la especie, que el área no era adecuada sino hasta hace poco tiempo y la especie apenas empieza a expandir su distribución o que la densidad poblacional es insuficiente para colonizar otras áreas (Wiens *et al.*, 2009).

Cualquier ejercicio de modelación es sensible a la calidad y cantidad de la información con que se alimenta. El algoritmo de máxima entropía de MaxEnt puede arrojar resultados robustos de proyección espacial aún con pocos datos de presencia. En la literatura se sugieren 30 (Wisz *et al.*, 2008) o 50 (Kadmon *et al.*, 2003) como mínimo para generar modelos estadísticamente válidos. Sin embargo, dada la rareza de la especie bajo estudio, se cuenta con pocos registros de presencia de *M. planiceps* en tres localidades muy cercanas.

Aunque faltan análisis para demostrar la relación entre especies progenitor-derivada, como primer acercamiento para explicar la historia evolutiva de *M. planiceps*, con base en la filogenia elaborada para el género *Myotis* (Haynie *et al.*, 2014) en la que se determinó que *M. volans* es la especie hermana, los resultados genéticos obtenidos con BLAST a partir de las secuencias mitocondriales y los mapas generados mediante la modelación de nicho se puede sugerir que una pequeña población del ancestro común entre *M. volans* y *M. planiceps*, quedó aislada en uno o varios refugios al este de Norteamérica debido a las fluctuaciones climáticas ocurridas durante el Pleistoceno el tiempo suficiente para diferenciarse y especiar. En otros

mamíferos se ha observado un patrón de diferenciación genética entre poblaciones situadas al este y oeste del continente americano que pueden incluso llegar a considerarse subespecies o especies diferentes.

En el caso del oso negro mexicano (*Ursus americanus*) existen dos clados: uno en la Sierra Madre Oriental y otro en la Sierra Madre Occidental que sugieren que la estructura genética puede estar influenciada por los cambios climáticos suscitados en la última glaciación que representaron eventos vicariantes en los que la especie derivó (Juárez-Casillas, *et al*, 2013).

Con una distribución discontinua más al norte, otro vertebrado que presenta el mismo patrón de divergencia es la ardilla voladora nortea (*Glaucomys sabrinus*). La divergencia se explica por el avance de los casquetes polares que actuaron como los principales obstáculos para el flujo génico en Norteamérica durante el Pleistoceno (Arbogast 1999). Este patrón se repite en muchas especies de mamíferos neárticos como la zorra roja (*Vulpes vulpes*), el ratón meteorito de cola larga (*Microtus longicaudus*) y la ardilla de pino amarillo (*Tamias amoenus*) (Aubry, 2009; Conroy y Cook, 2000; Demboski y Sullivan, 2003).

CONCLUSIONES

- 1) La población de *Myotis planiceps* en Los Pinos, Coahuila, presenta baja diversidad genética con relación a otra especie del mismo género (*Myotis lucifugus*) para el marcador mitocondrial citocromo b. El conocimiento sobre la variación genética de las poblaciones es imprescindible para el desarrollo de estrategias de conservación a corto y largo plazo.

- 2) El trabajo de campo de la presente investigación fue exitoso porque se localizaron las yucas de maternidad, lo que indica que la población de murciélagos de cabeza aplanada continúa reproduciéndose.

- 3) Sin embargo, el área donde se encuentran las yucas que estos murciélagos eligen como refugio de maternidad, se encuentra dentro de una propiedad que pertenece al Opus Dei y está sujeta a cambio de uso de suelo por la construcción de un centro de convenciones.

Perspectivas de estudio y avances en una propuesta preliminar para un plan de Conservación

La protección de esta especie es importante por ser tan rara y en posible peligro de extinción, pero aún se desconocen muchos aspectos biológicos y ecológicos básicos. Por ejemplo, no se sabe de qué tamaño es la población, aún no se ha determinado de qué especies de insectos se alimenta *M. planiceps* y también se desconoce el destino de los murciélagos de cabeza aplanada en los meses más fríos del año.

Los esfuerzos de conservación de *Myotis planiceps* deben enfocarse en la protección del hábitat y de los refugios existentes. Esto puede lograrse mediante la educación ambiental y

concientización de los pobladores de las zonas aledañas y de los propietarios del área donde se encuentran los refugios de maternidad

Por otra parte, es importantes establecer si se trata de una o varias poblaciones para elaborar un plan de manejo. Para ello, se sugiere obtener muestras de las dos localidades faltantes y llevar a cabo análisis usando marcadores nucleares

Además se recomienda 1) llevar a cabo búsquedas exhaustivas en cada una de las localidades, y continuar con los monitoreos anuales de los refugios de maternidad (mínimo un censo anual); 2) establecer nuevos programas de investigación para darle seguimiento y continuidad al monitoreo priorizando el estudio de la dieta y de los refugios de invierno.

Por último, es deseable que se establezca un acuerdo formal con las autoridades locales y federales para la protección efectiva de Los Pinos, ya sea como área protegida, como santuario, o cualquier otra figura que asegure que esta zona se mantendrá en buen estado de conservación en el futuro.

LITERATURA CITADA

- Adams, R.A. y Hayes, M.A., 2008. Water availability and successful lactation by bats as related to climate change in arid regions of western North America. *Journal of Animal Ecology*, 77: 1115-1121.
- Alanís, F.G., Cano y Cano G. y Robalo, M. 1996. Vegetación y Flora de Nuevo León. Una guía botánico-ecológica. CEMEX. México. 251pp.
- Allendorf, F.W., Luikart, G. y Aitken, S.N., 2012. Conservation and the Genetics of Populations. 2a ed., John Wiley y Sons.
- Altringham, J.D. 1996. Bats: biology and behaviour. Oxford University Press.
- Altringham, J.D. 2011. Bats: from evolution to conservation. Oxford University Press.
- Anderson, R. y Martínez-Meyer, E., 2004. Modeling species' geographic distributions for preliminary conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. *Biological Conservation*, 116(2):167–179.
- Anthony, E.L.P. 1988. Age determination. En *Ecological and Behavioural Methods for the Study of Bats*. (Kunz, T.H.,ed.) Smithsonian Institution Press. Washington, E.U.A.
- Arbogast, B. S. 1999. Mitochondria DNA phylogeography of the new world flying squirrels (*Glaucomys*): implications for Pleistocene biogeography. *Journal of Mammalogy* 80:142–155.
- Arroyo-Cabrales, J., Kalko, E.K.V., Laval, R.K., Maldonado, J.E., Medellín, R.A., Polaco, O.J. y Rodríguez-Herrera, B. 2005. Rediscovery of the Mexican flat-headed bat *Myotis planiceps* (Vespertilionidae). *Acta Chiropterologica*. 7(2):309-318.
- Arroyo-Cabrales, J., Medellín R.A., Polaco O.J. 2006. The Flat-Headed *Myotis* is Alive and Well. "Extinct" bat is rediscovered in northern Mexico. *Bats Magazine*. 24(3):7-8.

- Arroyo-Cabrales, J., Álvarez-Castañeda, S.T., Cuarón, A.D. y Grammont, P.C. (2008a). *Myotis planiceps*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1.
- Arroyo-Cabrales, J., A.L. Carreño, S. Lozano-García, M. Montellano-Ballesteros (2008b). La diversidad en el pasado. En Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, pp. 227-262.
- Aubry, K. B., Statham, M. J., Sacks, B. N., Perrine, J. D. y Wisely, S. M. 2009. Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia. *Molecular Ecology*, 18: 2668–2686.
- Austerlitz, F., Jung-Muller, B., Godelle, B. y Gouyon, P.1997. Evolution of coalescence times, genetic diversity and structure during colonization. *Theoretical Population Biology*, 51: 148-164.
- Baker, R.H. 1955. A new species of bat (Genus *Myotis*) from Coahuila, México. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 68:165-166.
- Bandelt, H. J., Forster P., Sykes B. C. y Richards M. B. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16 (1): 37-48.
- Barclay, R. y Harder L. 2003. Life Histories of Bats: Life in the Slow Lane. En: Kunz, T. y Fenton, B. eds. Bat Ecology. The University of Chicago Press. EUA.
- Barclay, R.M.R., Ulmer, J., MacKenzie, C.J.A., Thompson, M.S., Olson, L., McCool, J., Cropley, E. y Poll, G. 2004. Variation in the reproductive rate of bats. *Canadian Journal of Zoology*, 82(5):688-693.
- Barret, S. y Kohn J. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. En Genetics and conservation of rare plants. Falk, D.y Holsinger K. (eds) Oxford University Press. Nueva York, EUA. pp. 3-30.

- Beebee, T. y Rowe, G. 2008. An introduction to molecular ecology, 2nd edition. Oxford University Press.
- Benayas, J.M.R. 2009. La rareza de las especies. *Investigación y Ciencia*. 392: 62-69.
- Bilgin, R., Karataş, A., Çoraman, E., y Morales, J. C. 2008. The mitochondrial and nuclear genetic structure of *Myotis capaccinii* (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Eurasian transition and its taxonomic implications. *Zoologica Scripta*, 37(3), 253–262.
- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 27: 1767-1780.
- Boyles, J.G. Cryan, P., McCracken, G. y Kunz, T. 2011. Economic Importance of Bats in Agriculture. *Science*, 332 (6025) 41-42.
- Brown, W. M., George, M. y Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1967-1971.
- Brown, W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Science*. USA 77: 3605-3609.
- Burland, T.M. y Worthington-Wilmer, 2001. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. *Biol. Rev.* 76:389-409
- Butterworth M., C. M., Vonhof, M. J., Rosenstern, J., Turner, G. G. y Russell, A. L. 2014. Genetic Structure of Little Brown Bats (*Myotis lucifugus*) Corresponds with Spread of White-Nose Syndrome among Hibernacula. *Journal of Heredity*, esu012
- Castella, V., Ruedi, M., Excoffier, L., Ibáñez, C., Arlettaz, R. y Hausser, J. 2000. Is the Gibraltar Strait a barrier to gene flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Molecular Ecology*, 9(11), 1761-1772.

- Castella, V., Ruedi, M., y Excoffier, L., 2001. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology*. 14: 708-720.
- Ceballos, G. y Oliva, G. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Fondo de Cultura Económica, México D.F., 988pp.
- Ceballos, G. y Simonetti J. A. 2002. Diversidad y conservación de los mamíferos neotropicales. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 582 pp.
- Charlesworth, B. y Charlesworth, D. 2010. Elements of Evolutionary Genetics. Colorado: Roberts and Company Publishers. Colorado, EUA. 734pp
- Chaverri, G., Kunz, T.H. 2011. Response of a specialist bat to the loss of a critical resource. *PLoS ONE* 6(12): e28821.
- Clement, M., Posada D. y Crandall A. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659
- Conroy, C.J. y Cook J.A. 2000, Phylogeography of a postglacial colonizer, *Microtus longicaudus* (Rodentia: Muridae). *Molecular Ecology*. 9:165-175
- Crawford, M. 2007. Anthropological genetics. Theory, methods and applications. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Dakubo, G. 2010. Basic mitochondrial genetics, bioenergetics and biogenesis. En Mitochondrial genetics and cancer. Springer Berlin Heidelberg. 3-38
- Darwin C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. J. Murray, London.

- Demboski, J. R. y Sullivan J. 2003. Extensive mtDNA variation within the yellow chipmunk, *Tamias amoenus* (Rodentia: Sciuridae), and phylogeographic inferences for northwest North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26:389-408.
- Dewey, T. A., Zinck, J. M. y Vonhof, M. 2006. Cryptic species in a widespread and widely studied North American bat, *Myotis lucifugus* (Chiroptera: Vespertilionidae).
- Ditchfield, A.D. 2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology* 9, 1307-1318.
- Dixon, M. D. 2011a. Population genetic structure and natal philopatry in the widespread North American bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 92(6), 1343–1351.
- Dixon, M. D. 2011b. Post-Pleistocene range expansion of the recently imperiled eastern little brown bat (*Myotis lucifugus lucifugus*) from a single southern refugium. *Ecology and Evolution*, 1(2), 191–200.
- Dobzhansky, T. 1964 Genetics and the origin of species. Columbia University Press. Nueva York, Estados Unidos de América. 364pp.
- Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. 2006. Arlequin ver 3.1. An integrated software package for population genetics data analysis. Universidad de Berna. Suiza.
- Excoffier, L. y Lisher, H.E.L. 2010. ARLEQUIN suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10.3, 564-567
- Fleming TH. 1982. Foraging strategies in plant-visiting bats. En Ecology of bats. (Kunz T.H., ed.) New York: Plenum Press, 287–325.
- Fleming, T. y Eby, P. 2003. Bat migration. En Bat Ecology. (Kunz, T. y Fenton, B., eds.) The University of Chicago Press. E.U.A.

- Floyd, C. H., Flores-Martínez, J. J., Mejía, O., y May, B. 2010. Conserving the endangered Mexican fishing bat (*Myotis vivesi*): genetic variation indicates extensive gene flow among islands in the Gulf of California. *Conservation genetics*.11(3), 813-822
- Frankham, R., Ballou, J. y Briscoe, D. 2004. A primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press.
- Frankham, R., Ballou, J. y Briscoe, D. 2010. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.
- Freeland, J.R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley and Sons, Ltd 388pp.
- Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L., y Hausser, J. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 31-46.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.
- Gillespie, J., 2004. Natural Selection en Population Genetics: A concise guide. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 232pp.
- Grant W.S. y Bowen B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lesson for conservation. *The Journal of Heredity*, 89 (5): 415-426.
- Grinnell, J. 1917. The niche-relationships of the California Thrasher. *The Auk*, 427-433.
- Gunnell, G.F., Thomas P. E. y Simons E.L. 2012 . African Vespertilionoidea (Chiroptera) and the antiquity of Myotinae. En Evolutionary History of Bats. Gunnell E.F. y Simmons N.(eds.). pp. 252-266.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.

- Hamilton W.D. 1964. The genetical evolution of social behaviour. *Journal of Theoretical Biology*. 7:1–16.
- Hartl, D. L., Clark. A. G. 1989. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Sunderland. 682 pp.
- Harris, D., y Rogers, D.S. 1999. Species limits and phylogenetic relationships among populations of *Peromyscus*. *Journal of Mammalogy* 80: 530-544.
- Haynie, M., Tsuchiya-Jerep, M., Arroyo-Cabrales, J., Medellín, R., Polaco, O. y Maldonado, J. 2014. Placement of the rediscovered *Myotis planiceps* (Chiroptera:Vespertilionidae) within the *Myotis* phylogeny. (En revision).
- Hedrick. P. 2011. Genetics of Populations. 3a ed. Massachusetts: Johnes and Bartlett publishers.
- Hewitt, G.M. y Butlin, R.K. 1997. Causes and consequences of population structure. En Behavioural Ecology: An evolution approach (Krebs, J.R. y Davies N.B.) 203-277 Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Hijmans, R. J., Cameron, S.E., Parra J.L., Jones, P.G. y Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25:1965–1978.
- Hijmans, R.J. y Graham, C.H. 2006. The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, 12, 2272–2281.
- Hori-Ochoa, M.C. 1998. Variabilidad de las respuestas espectrales de acuerdo a los cambios fenológicos de la vegetación del anticlinorio de Arteaga, Coahuila y Nuevo León, México. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. 138pp.
- Howell, D. J. y Hodgkin, N. 1976. Feeding adaptations in the hairs and tongues of nectar-feeding bats. *Journal of Morphology*, 148: 329–336.

- Humphrey, S.R. 1975. Nursery roosts and community diversity of Nearctic bats. *Journal of Mammalogy*. 56(2):321-346
- Humphrey, S.R.1982. Bats: Vespertilionidae and Molossidae. En Wild mammals of North America: Biology Management and Economics. Chapman J.A. y Feldhamer G.A. (eds.) John Hopkins University Press. Baltimore.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010. Mapas del estado de Coahuila; <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=geo&e=05>].
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010b. Mapas del estado de Zacatecas; Documento WWW [<http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=geo&e=32>].
- Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular. Evolution*. 32, 128–144.
- Guzmán, A. J. 1968. Nuevos registros de murciélagos para Nuevo León, México. En Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México: Serie Zoología. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 39, p. 133
- Jaramillo-Legorreta, A.M., Rojas-Bracho, L y Gerrodette, T.1999. A new abundant estimate for vaquitas: First step for recovery. *Marine Mammal Science* 15: 957-973.
- Johnson, J. B., Roberts, J. H., King, T. L., Edwards, J. W., Ford, W. M. y Ray, D. A. 2014. Genetic structuring of northern myotis (*Myotis septentrionalis*) at multiple spatial scales. *Acta Theriologica*, 59(2), 223-231.
- Juárez-Casillas, L.A., Varas, C., Cervantes, F.A. 2013. Análisis filogenético del linaje evolutivo del oso negro (*Ursus americanus*) de México. *THERYA*. 4(3):467-484.
- Kobayashi, F., Fukui, D., Kojima, E. y Masuda, R. 2012. Population Genetic Structure of the Japanese Large-Footed Bat (*Myotis macrodactylus*) Along Three Rivers on Hokkaido Island , Northern Japan. *Mammal Study*, 37(3), 227–235.

- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. y Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science*. USA. 86: 6196-6200.
- Kolstia, S., Ruohonen–Lehto, Väiölä M., R. y Sirkka–Liisa, V. 2000. Phylogenetic information in inter–SINE and inter–SSR fingerprints of the Artiodactyla and evolution of the Bov–ta SINE. *Heredity* 84: 37–45.
- Kunz, T. H. 1982. Ecology of bats. Plenum Press, New York, NY. 425 pp.
- Kunz, T. H. y Parsons, S. 1988. Ecological and behavioral methods for the study of bats. Smithsonian Institution Press Washington, DC.
- Kunz, T. H. y Parsons, S. 2009. Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats. The Johns Hopkins University Press. E.U.A. 920 pp.
- Laine, V. N., Lilley, T. M., Norrdahl, K. y Primmer, C. R. 2013. Population Genetics of Daubenton's Bat (*Myotis daubentonii*) in the Archipelago Sea, SW Finland. *Annales Zoologici Fennici* 50 (5) 303-315. Finnish Zoological and Botanical Publishing.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science (Washington)*, 241(4872), 1455-1460.
- Larsen, R. J., Knapp, M. C., Genoways, H. H., Khan, F. A. A., Larsen, P., Wilson, D. E., y Baker, R. J. 2012. Genetic diversity of neotropical *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) with an emphasis on South American species. *PloS One*, 7(10), e46578.
- Larsen, R. J., Larsen, P. A., Genoways, H. H., Catzeflis, F. M., Geluso, K., Kwiecinski, G. G., y Baker, R. J. 2012. Evolutionary history of Caribbean species of *Myotis*, with evidence of a

third Lesser Antillean endemic. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 77(2), 124-134.

- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- López-Damián, L. 2007. Protecting Mexico's corn. Bats help keep the pests at bay. *Bats Magazine*. 25(4).
- López Ramos, E. 1979. Geología de México. Tomo II. Secretaría de Educación Pública, México, D.F. 454 pp.
- Lu, G., Lin, A., Luo, J., Blondel, D. V., Meiklejohn, K. A., Sun, K. y Feng, J. 2013. Phylogeography of the Rickett's big-footed bat, *Myotis pilosus* (Chiroptera: Vespertilionidae): a novel pattern of genetic structure of bats in China. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 241.
- MacArthur, R.A. 1972. Geographical Ecology. Princeton University Press. EUA
- Maldonado, E.J., F. Orta-Dávila, B.S. Stewart, E. Geffen y R.K. Wayne. 1995. Intraspecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californianus*) from southern California and the Gulf of California. *Marine Mammal Science* 11 : 46-58
- Matocq, M.D. 2002. Phylogeographical structure and regional history of the dusky-footed woodrat, *Neotoma fuscipes*. *Molecular Ecology* 11 : 229-242.
- Matson, J.O. 1975. *Myotis planiceps*. *Mammalian Species*. (60):1-2.
- Matson, J.O. y Patten, D.R. 1975. Notes of some bats from the state of Zacatecas, México. *Contributions in Science*. Natural History Museum of Los Angeles County. 263: 1-12
- Medellín R. A., Arita, H., y Sánchez, O. 2008. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Instituto de Ecología, UNAM. 2da ed. México.

- Medellín, R., Abreu-Gobrois, A., Arizmendi, M., Mellinck, E., Ruelas, E., Santana, E., y Urbán, J., Conservación de especies migratorias y poblaciones transfronterizas. en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, pp. 459-515.
- Medrano-González L., Baker, C.S., Robles-Saavedra, M.R., Murrell, J. y Vázquez-Cuevas, M.J. 2001. Trans-oceanic population genetic structure of humpback whales in the North and South Pacific. *Memoirs of Queensland Museum*. 47: 465-479.
- Medrano-González, L. 2006. Hacia una dinámica de la mastofauna marina mexicana: análisis de composición funcional y de algunas estructuras genéticas poblacionales, en *Genética de mamíferos mexicanos: presente y futuro*. Vázquez-Domínguez E. y Hafner D.J. (eds.), New Mexico.
- Assessment, M. E. 2005. *Millennium Ecosystem Assessment Findings*. Millennium Ecosystem Assessment.
- Mills, L. S. y Allendorf, F. W. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*. 10: 1509-1518.
- Molina, E. 1995. Modelos y causas de extinción masiva. *Interciencia*.20(2):83-89
- Natoli, A., V.M. Peddemors y A.R. Hoelzel. 2004. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 363-375.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M. y Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. EUA. 333pp.
- Neuweiler, G. 2000. *The biology of bats*. Oxford University Press. EUA

- Norberg, U.M. 1994. Wing design, flight performance, and habitat use in bats. En *Ecological Morphology, Integrative Organismal Biology*. Wainwright, P.C. y Reilly, S.M.(eds.) 205-239. University of Chicago Press.
- Norberg, U.M. y Rayner J.M.V. 1987. Echological morphology and flight in bats (Mammalia: Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*. 335-427
- Norton, B.G. 1987. *Why preserve natural variety?* Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Nowak, R.M. 1991. *Walker's Mammals of the World*. Johns Hopkins. University Press, Baltimore, London. 5a ed. Vol. 2 1083-1104
- Nowak, R. M. 1994. *Walker's Bats of the World*. Baltimore, John Hopkins University Press, Baltimore.
- Núñez-Rojo, Ma. Paulina. 2011. Caracterización del hábitat y de los refugios del murciélago de cabeza plana (*Myotis planiceps*, VESPERTILIONIDAE) en tres estados del norte de México. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Ochoa-Hein, A.2008. Diversidad y estructura genética espacio-temporal de la ardilla terrestre del Perote (*Spermophilus perotensis*): Implicaciones para su conservación. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 89 pp.
- O'Farrell, M.J. y Studier, E. H. 1980. Physiological ecology of *Myotis*. En *Proceedings of the Fifth International Bat Research Conference*. D.E. Wilson y Gardner, A.L. (eds.) Texas Tech Press, Lubbock.415-424
- Ortega, J., 2006. Estudios moleculares en murciélagos: Inferencias basadas en ADN mitocondrial y microsatélites. En *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*.

Vázquez- Domínguez, E. y Hafner, D.J. (eds.) New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin. No. 32

- Petit, E., Excoffier, L. y Mayer, F., 1999. No evidence of bottleneck in the postglacial recolonisation of Europe by the noctule bat (*Nyctalus noctula*): where are the limits? *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 226, 1717-1722.
- Petit, E., Mayer F., 2000. A population genetic analysis of migration: the case of the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Molecular ecology*. 9: 683-690.
- Phillips, S., R. Anderson y R. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.
- Pielou, E.C. 1991. After the ice age. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Pierson, E. D. 1998. Tall trees, deep holes, and scarred landscapes: conservation biology of North American bats en *Bat Biology and Conservation*. Kunz T. H. y Racey P. A. (eds.), pp. 309–325. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Primack, R., Rozzi, R., Feisinger, P., Dirzo, R. y Masardo, F. 2001. Fundamentos de Conservación Biológica. Fondo de Cultura Económica.
- Puechmaille, S. J., Allegrini, B., Boston, E. S., Dubourg-Savage, M. J., Evin, A., Knochel, A. y Teeling, E. C. 2012. Genetic analyses reveal further cryptic lineages within the *Myotis nattereri* species complex. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 77(3), 224-228.
- Pumo, D.E., Kim, I., Remsen, J., Phillips, C.J. y Genoways, H.H. 1996. Molecular systematic of the fruit bat, *Artibeus jamaicensis*: origin of an unusual island population. *Journal of Mammalogy* 77:491-503.
- Rabinowitz, D. 1981. Seven forms of rarity. En *The Biological Aspects of Rare Plant Conservation*. (Synge, H., ed.) John Wiley y Sons Ltd.EUA. 205-217.

- Raphael, M.G., Molina, R. 2007. Conservation of rare or little-known species. Biological, social and economic considerations. Island Press. 375pp.
- Reveal, J.L. 1981. The concept of rarity and population threats in plant communities. 41-46. En Rare plant conservation. (Morse, L.E. y Henefin, M.S., ed.) New York Botanical Garden.
- Riddle, B.R., Hafner, D.J. y Alexander, L.F. 2000. Comparative phylogeography of Baileys' pocket mouse (*Chaetodipus baileyi*) and the *Peromyscus eremicus* species group: Historical vicariance of the Baja California Peninsular Desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 161-172.
- Roger A.R. y Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569.
- Rossiter, S. J., Benda, P., Dietz, C., Zhang, S. y Jones, G. 2007. Rangewide phylogeography in the greater horseshoe bat inferred from microsatellites: implications for population history, taxonomy and conservation. *Molecular Ecology* 16, 4699-4714
- Russell, A. L., Medellín, R. A. y Mccracken, G. F. 2005. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology* 14, 2207–2222
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Diario Oficial de la Federación. México.
- Schneider, S. y Excoffier, L., 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089
- Simmons, N. B. 2005. Order Chiroptera. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 1:312-529.

- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787–792.
- Stadelmann, B., Lin, L.-K., Kunz, T. H. y Ruedi, M. 2007. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 32–48.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Tellgren-Roth, A., Dittmar, K., Massey, S. E., Kemi, C., Tellgren-Roth, C., Savolainen. P., Lyons, L. A. y Liberles, D.A. 2009. Keeping the blood flowing—plasminogen activator genes and feeding behavior in vampire bats. *Naturwissenschaften* 96:39–47
- Tobe, S. S., y Linacre, A. M. 2008. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis*, 29(2), 340-347.
- Tobe, S. 2013. Wildlife DNA analysis: Applications in Forensic Science. Wiley.
- Urbán, J., Álvarez, C., Salinas, M., Jacobsen, J. y Balcomb K.C. 1999. Population size of humpback whale, *Megaptera novaeangliae*, in waters of the Pacific coast of Mexico. *Fisheries Bulletin* 97: 1017-1024.
- Van Dyke, F. Conservation Biology. Foundations, concepts and applications. 2a ed. Springer. 508 pp.
- Vázquez-Domínguez, E., Ceballos, G., y Piñero, D. 2002. Exploring the relation between genetic structure and habitat heterogeneity in the rodent *Liomys pictus* from Chamela, Jalisco. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 86: 17-29.

- Vázquez-Domínguez, E., Ceballos, G. y Cruzado, J. 2004. Extirpation of an insular subspecies by a single introduced cat: the case of the endemic deer mouse *Peromyscus guardia* on Estanque Island, Mexico. *Oryx* 38: 347-350.
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T. y Gutiérrez-García, T.A. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82: 277-297.
- Vega, R. 2006. Estructura y diversidad genética de *Oryzomys palustris cozumelae* de la isla de Cozumel. Tesis de maestría, Instituto de Ecología, UNAM, México.
- Verts, B.J. y Carraway, L., 1998. Land Mammals of Oregon. University of California Press
- Viglino, A. 2012. Study of variability and genetic structure of European populations of *Myotis emarginatus* and *Myotis capaccinii* (Chiroptera , Vespertilionidae). Universidad de Bologna.
- Wallace, A.R. 1858. On the tendency of the species to form varieties; and on the perpetuation of varieties and species by natural means of selection. *Proceedings of the Linnean Society of London*, 3: 53-62
- Waltari, E., Hijmans, R. J., Peterson, A. T., Nyari, A.S., Perkins, S.L. y Guralnick, R. P. 2007. Locating Pleistocene refugia: comparing phylogeographic and ecological niche model predictions. *PLoS one* 2:e563.
- Weber, D.S., B.S. Stewart y N. Lehman. 2004. Genetic consequences of a severe population bottleneck in the Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*). *Journal of Heredity*. 95 : 144-153

- Weyeneth, N., Goodman, S. M., y Ruedi, M. 2011. Do diversification models of Madagascar's biota explain the population structure of the endemic bat *Myotis goudoti* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Journal of Biogeography*, 38(1), 44–54.
- Wiantoro, S., Maryanto, I., y Abdullah, M. T. (2012). Phylogeny and Phylogeography of *Myotis muricola* (Gray, 1846) (Chiroptera: Vespertilionidae) from the West and East of Wallace's Line Inferred from Partial MtDNA Cytochrome b Gene, 35(2), 271–292.
- Wiens, J., 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution* 58: 193-197
- Wiens, J. A., Stralberg, D., Jongsomjit, D., Howell, C. A. y Snyder, M. A. 2009. Niches, models, and climate change: assessing the assumptions and uncertainties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement 2), 19729-19736.
- Wilkinson, G.S. y Fleming, T.H. 1996. Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular ecology* 5:329-339
- Wilson, D.E. y Reeder D.M. 1993. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Washington DC: Smithsonian Institution Press.
- Wooding, G. y Ward, R. 1997. Phylogeography and Pleistocene evolution in the North American black bear. *Molecular Biology and Evolution* 14:1096-1105.
- Worthington Wilmer, J., Hall, L., Barrat, E. y Moritz, C. 1999. Genetic structure and male-mediated gene flow in the ghost bat (*Macroderma gigas*). *Evolution*. 53, 1583-1591
- Worthington Wilmer, J., Moritz, C. Hall, L., y Toop J. 1994. Extreme population structuring in the threatened ghost bat, *Macroderma gigas*: evidence from mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*.257, 193-198.
- Zarza-Villanueva, H. 2006. Ficha técnica de *Myotis planiceps*. En: Los mamíferos mexicanos en riesgo de extinción según el PROY -NOM-059-ECOL-2000. (Medellín, R., ed.) Instituto de

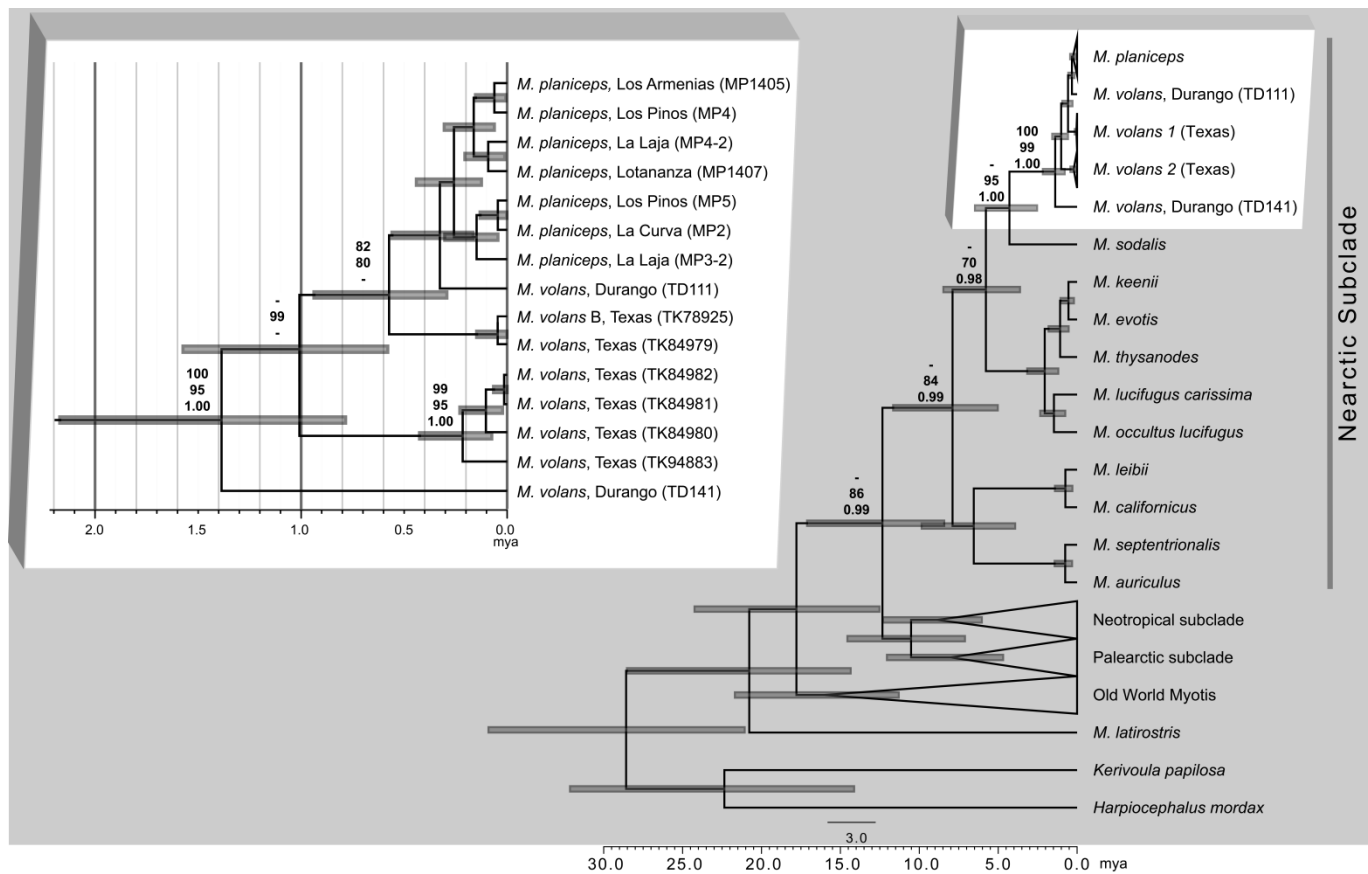
Genética de la Conservación del murciélago de cabeza aplanada *Myotis planiceps* en Los Pinos, Coahuila.
Vargas García T.C. 2014

Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO.

Proyecto No. 005. México. D.F.

APÉNDICES

Apéndice 1. Reconstrucción filogenética bayesiana con citocromo b para el Clado Neártico del género *Myotis*, insertando a *Myotis planiceps* (Haynie *et al.*, 2014).



Apéndice 2 Protocolo modificado de Extracción de ADN de *Myotis planiceps*.

La extracción de tejido de membrana alar se efectuó utilizando el kit comercial de extracción DNeasy™ Blood and Tissue (Qiagen Inc., Chatsworth, California). Se tomó únicamente la mitad de cada biopsia y se colocaron en un tubo de 1.5ml en donde se enjuagaron con 500 µl de solución PBS (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, 0.24 KH₂PO₄, aforado en 800 ml, pH ajustado a 7.4). Se agitaron por 15 segundos y después se desechó la solución. Esta acción se repitió 3 veces.

Posteriormente se añadieron 180 µl de buffer ATL incluido en el kit y 20 µl de proteinasa K. Con los tubos sellados se dejó incubar a 55°C durante dos horas. En caso de que el tejido no estuviera completamente digerido se añadían 10 µl de proteinasa K y se dejaba incubando una hora más.

En seguida se adicionaron 200 µl de buffer AL, se agito e incubó la solución a 70° por 10 minutos. Una vez transcurridos los 10 minutos, se agregaron 200 µl de etanol al 100%, se agito hasta homogeneizar y se aplicó la solución a las columnas incluidas en el kit comercial. Se centrifugaron las columnas a 14,000 rpm por 1 minuto y se desecharon los tubos de colecta junto con lo centrifugado.

A continuación, se colocaron las columnas en tubos nuevos de colecta, se agregaron 500 µl de buffer AW1 y se centrifugo a 14,000 rpm por 1 minuto. La solución se desechó junto con los tubos de colecta.

Una vez más se colocaron las columnas en tubos de colecta nuevos, se agregaron 500 µl de AW" y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Se desechó únicamente la solución y con los mismos tubos de colecta, se centrifugo nuevamente a 14,000 rpm durante dos minutos.

Finalmente la columna se colocó en tubos de 1.5 ml debidamente etiquetados y se añadieron 100 µl de buffer AE, previamente calentado a 65°C. Se dejó incubar las columnas a temperatura ambiente por 3 minutos y en seguida se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. La solución se reapplicó a las columnas, se dejó incubar a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto.

Apéndice 3. Secuencias de los haplotipos mitocondriales de *Myotis planiceps*

Hap_1

TCCGTTGACAAAGCCACTTTAACTCGATTCTTGCCTTTCACCTTCTCCTTCCATTTATTATTGCAGCCATAGTTATAGTCCACCTCCTATT
TCTACACGAAACAGGATCTAATAACCCAACAGGAATCCCCTCTAACGTAGACATAATTCCTTTCACCCCTATTACACAATCAAAGACA
TCCTCGGCTTGTTACTAATAATTGTAGCTCTACTTACATTAGTACTATTTTCTCCGGACATACTAGGAGACCCTGACAATTATACACCAG
CAAATCCACTGAACACTCCTCCCCATATCAAACCAGAATGATATTTCTTATTTCGCATACGCAATTCTACGATCAATCCCAAATAAACTA
GGAGGGGTATTAGCTCTAGTACTCTCAATTCTCATCCTAATTATTGTTCTCTACTCCACACCTCCAAACAACGCAGCATAACCTTCCGC
CCTCTAAGTCAATGCCTGTTCTGACTATTAACAGCAGACCTTTCACCCTGACATGAATCGGAGGACAGCCTGTTGAACACCCATATGT
TATCATCGGACAATTAGCATCAATTCTTACTTTTCTATTATTATTATCTTAATACCACTTACCAGCCTAATAGAAAATCATCTACTAAAA

Hap_2

TCCGTTGACAAAGCCACTTTAACTCGATTCTTGCCTTTCACCTTCTCCTTCCATTTATTATTGCAGCCATAGTTATAGTCCACCTCCTATT
TCTACACGAAACAGGATCTAATAACCCAACAGGAATCCCCTCTAACGTAGACATAATTCCTTTCACCCCTATTACACAATCAAAGACA
TCCTCGGCTTGTTACTAATAATTGTAGCTCTACTTACATTAGTACTATTTTCTCCGGACATACTAGGAGACCCTGACAATTATACACCAG
CAAATCCACTGAACACTCCTCCCCATATCAAACCAGAATGATATTTCTTATTTCGCATACGCAATTCTACGATCAATCCCAAATAAACTA
GGAGGGGTATTAGCTCTAGTACTCTCAATTCTCATCCTAATTATTGTTCTCTACTTCACACCTCCAAACAACGCAGCATAACCTTCCGC
CCTCTAAGTCAATGCCTGTTCTGACTATTAACAGCAGACCTTTCACCCTGACATGAATCGGAGGACAGCCTGTTGAACACCCATATGT
TATCATCGGACAATTAGCATCAATTCTTACTTTTCTATTATCATTATCTTAATACCACTTACCAGCCTAATAGAAAATCATCTACTAAAA

Hap_3

TCCGTTGACAAAGCCACTTTAACTCGATTCTTGCCTTTCACCTTCTCCTTCCATTTATTATTGCAGCCATAGTTATAGTCCACCTCCTATT
TCTACACGAAACAGGATCTAATAACCCAACAGGAATCCCCTCTAACGTAGACATAATTCCTTTCACCCCTATTACACAATCAAAGACA
TCCTCGGCTTGTTACTAATAATTGTAGCTCTACTTACATTAGTACTATTTTCTCCGGACATACTAGGAGACCCTGACAATTATACACCAG
CAAATCCACTGAACACTCCTCCCCATATCAAACCAGAATGATATTTCTTATTTCGCATACGCAATTCTACGATCAATCCCAAATAAACTA
GGAGGGGTATTAGCTCTAGTACTCTCAATTCTCATCCTAATTATTGTTCTCTACTCCACACCTCCAAACAACGCAGCATAACCTTCCGC
CCTCTAAGTCAATGCCTGTTCTGACTATTAACAGCAGACCTTTCACCCTGACATGAATCGGAGGACAGCCTGTTGAACACCCATATGT
TATCATCGGACAATTAGCATCAATTCTTACTTTTCTATTATCATTATCTTAATACCACTTACCAGCCTAATAGAAAATCATCTACTAAAA

Hap 4

>TCCGTTGACAAAGCCACTTTAACTCGATTCTTTGCCTTTCACTTTCTCCTTCCATTTATTATTGCAGCCATAGTTATAGTCCACCTCCTA
TTTCTACACGAAACAGGATCTAATAACCCAACAGGAATCCCCTCTAACGTAGACATAATCCCTTTACCCCTATTACACAATCAAAGA
CATCCTCGGCTTGTTACTAATAATTGTAGCTCTACTTACATTAGTACTATTTTCTCCGGACATACTAGGAGACCCTGACAATTATACACC
AGCAAATCCACTGAACACTCCTCCCCATATCAAACCAGAATGATATTTCTTATTTCGCATACGCAATTCTACGATCAATCCCAAATAAAC
TAGGAGGGGTATTAGCTCTAGTACTCTCAATTCTCATCCTAATTATTGTTCTCTACTCCACACCTCCAAACAACGCAGCATAACCTTCC
GCCCTAAGTCAATGCCTGTTCTGACTATTAACAGCAGACCTTCCACCCTGACATGAATCGGAGGACAGCCTGTTGAACACCCATAT
GTTATCATCGGACAATTAGCATCAATTCTTTACTTTTCTATTATTATTATCTTAATACCACTTACCAGCCTAATAGAAAATCATCTACTGA
AA

Hap_5

TCCGTTGACAAAGCCACTTTAACTCGATTCTTTGCCTTTCACTTTCTCCTTCCATTTATTATTGCAGCCATAGTTATAGTCCACCTCCTATT
TCTACACGAAACAGGATCTAATAACCCAACAGGAATCCCCTCTAACGTAGACATAATCCCTTTACCCCTATTACACAATCAAAGACA
TCCTCGGCTTGTTACTAATAATTGTAGCTCTACTTACATTAGTACTATTTTCTCCGGACATACTAGGAGACCCTGACAATTATACACCAG
CAAATCCACTGAACACTCCTCCCCATATCAAACCAGAATGATATTTCTTATTTCGCATACGCAATTCTACGATCAATCCCAAATAAACTA
GGAGGGGTATTAGCTCTAGTACTCTCAATTCTCATCCTAATTATTGTTCTCTACTCCACACCTCCAAACAACGCAGCATAACCTTCCGC
CCTCTAAGTCAATGCCTGTTCTGACTATTAACAGCAGACCTTCCACCCTGACATGAATCGGAGGACAGCCTGTTGAACACCCATATGT
TATCATCGGACAATTAGCATCAATTCTTTACTTTTCTATTATCATTATCTTAATACCACTTACCAGCCTAATAGAAAATCATCTACTGAAA

Hap_6

TCCGTTGACAAAGCCACTTTAACTCGATTCTTTGCCTTTCACTTTCTCCTTCCATTTATTATTGCAGCCATAGTTATAGTCCACCTCCTATT
TCTACACGAAACAGGATCTAATAACCCAACAGGAATCCCCTCTAACGTAGACATAATCCCTTTACCCCTATTACACAATCAAAGACA
TCCTCGGCTTGTTACTAATAATTGTAGCTCTACTTACATTAGTACTATTTTCTCCGGACATACTAGGAGACCCTGACAATTATACACCAG
CAAATCCACTGAACACTCCTCCCCATATCAAACCAGAATGATATTTCTTATTTCGCATACGCAATTCTACGATCAATCCCAAATAAACTA
GGAGGGGTATTAGCTCTAGTACTCTCAATTCTCATCCTAATTATTGTTCTCTACTTCCACACCTCCAAACAACGCAGCATAACCTTCCGC
CCTCTAAGTCAATGCCTGTTCTGACTATTAACAGCAGACCTTCCACCCTAACATGAATCGGAGGACAGCCTGTTGAACACCCATATGT
TATCATCGGACAATTAGCATCAATTCTTTACTTTTCTATTATCATTATCTTAATACCACTTACCAGCCTAATAGAAAATCATCTACTAAAA

Apéndice 4. Contribución de las variables ambientales para construir el modelo de nicho ecológico de *Myotis planiceps*

Variable	Descripción	% de contribución	Importancia de permutación
alt	Altitud	43.4	33.9
bio15	Precipitación estacional	25.9	1.1
bio13	Precipitación del mes más húmedo	15.7	56.8
bio3	Isotermalidad	7.7	0
bio4	Temperatura Estacional	2.7	0
bio7	Rango de temperatura anual	2.3	3
bio6	Temperatura mínima del mes más frío	0.8	0
bio18	Precipitación del trimestre más cálido	0.6	3.8
bio11	Temperatura media del trimestre más frío	0.4	0
bio14	Precipitación del mes más seco	0.3	1
bio16	Precipitación del trimestre más húmedo	0.1	0
bio12	Precipitación anual	0.1	0.5
bio9	Temperatura media del trimestre más seco	0	0
bio19	Precipitación del trimestre más frío	0	0
bio17	Precipitación del trimestre más seco	0	0
bio5	Temperatura máxima del mes más cálido	0	0
bio8	Temperatura media del trimestre más húmedo	0	0
bio10	Temperatura media del trimestre más cálido	0	0
bio1	Temperatura media anual	0	0
bio2	Rango diurno medio	0	0

