



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Identificación de *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* por características morfológicas, acústicas y código de barras de ADN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Eduardo Vázquez Rueda

Director o codirectores
Dr. Jorge Israel Ayala Berdón
Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Tlaxcala, Tlax.

Julio, 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Identificación de *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* por características morfológicas, acústicas y código de barras de ADN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Eduardo Vázquez Rueda

Director o codirectores

Dr. Jorge Israel Ayala Berdón

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Comité tutorial

Dra. Alba Mónica Montiel Gonzáles

Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses

Tlaxcala, Tlax.

Julio, 2018

HOJA DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en las Instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Se desarrolló gracias al financiamiento por parte de los propios asesores de tesis, así como también a la beca proporcionada al estudiante con clave 823321 otorgada por el CONACYT. La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Eduardo Vázquez Rueda** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **"Identificación de *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* mediante características morfológicas acústicas y código de barras de ADN"**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 16 DE 2018


DR. JORGE ISRAEL AYALA BERDÓN


DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZÁLEZ


DR. JORGE VÁZQUEZ PÉREZ


DRA. MELINA DEL REAL MONROY


DRA. MARÍA LUISA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma
ISO 9001:2015-NMX-CC-9000-IMNC-2017

ISO

Km. 1.5 carretera Tlaxcala/Puebla CP 90070 Tlaxcala 01248462 16-57 e-mail: posgrado@biologia.uax.mx



Tlaxcala Tlax

AGRADECIMIENTOS

- Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx
- A la beca recibida por el CONACYT (clave 823321)
- A los miembros del Comité tutor

AGRADECIMEINTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres: Benjamín Vázquez y Olimpia Rueda por todo el apoyo que siempre me han brindado.

A mi hermano: Omar Vázquez que me ha motivado a seguir adelante.

A mis directores de tesis por su apoyo y consejos durante la maestría.

A mis compañeros de la maestría por toda su ayuda y amistad.

A la Dra. Verónica Zamora y al CIIDIR-Unidad Durango por la ayuda y apoyo prestado.

RESUMEN

La identificación correcta de las especies es un requisito fundamental para el estudio de la diversidad biológica y para el diseño de estrategias de conservación. *Myotis melanorhinus* y *Myotis californicus* son dos especies de murciélagos vespertiliónidos morfológicamente similares y con una distribución simpátrica en diferentes zonas de América del Norte. Diferenciar ambas especies en campo mediante rasgos morfológicos ha sido un problema que persiste hasta la fecha. Diversos estudios sugieren que se puede distinguir entre estas especies de murciélagos mediante el análisis de sus llamadas de ecolocación. Sin embargo, los resultados de esta técnica para diferenciarlas no son suficientes, debido a que existe variación intraespecífica en la estructura de sus llamados. Como complemento a las técnicas de identificación morfológica y acústica, se ha propuesto el uso de técnicas moleculares de bajo costo. El gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (*coxI*) es la región estándar del código barras de ADN que puede ser utilizada para la identificación y descubrimiento de especies. En el presente estudio se llevó a cabo la identificación morfológica, acústica y molecular de individuos de *M. melanorhinus* y *M. californicus* del centro y norte de México (Tlaxcala, Baja California, Chihuahua, Durango y Sonora). Para la identificación de las especies se tomaron medidas de longitud total, longitud del antebrazo y peso, así como también seis medidas estándar de las vocalizaciones de los murciélagos. Para la identificación molecular, se amplificaron fragmentos del gen *coxI* (350 pb) a partir de muestras de tejido alar, muscular e hígado de murciélagos capturados en campo y de tejidos depositados en la colección del CIIDIR Durango. Las secuencias de ADN fueron analizadas a través de hipótesis evolutivas por métodos de parsimonia y máxima verosimilitud. Los resultados mostraron que *M. melanorhinus* y *M. californicus* presentaron longitudes de antebrazo (35.97 ± 2.4 , 32.66 ± 1.5), peso (5.38 ± 0.91 , 4.11 ± 0.92) y frecuencias mínimas de ecolocación (39.25 ± 2.2 , 42.38 ± 5.2) que fueron estadísticamente diferentes entre las dos especies de murciélagos. Sin embargo, la diferencia mínima entre estas características puede seguir generando confusión en la identificación de las especies que se lleva a cabo en campo. Con respecto a los datos moleculares, no proporcionaron información clara para identificar a *M. melanorhinus* y *M. californicus*. La divergencia entre secuencias dentro de las especies presentó valores altos (media=1.7%) en comparación con

estudios previos similares en otras especies de murciélagos, mientras que la divergencia media entre los congéneres fue de 2.4% lo que podría sugerir una divergencia reciente entre *M. melanorhinus* y *M. californicus*. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren el uso de las características morfológicas, acústicas y de técnicas moleculares como el *coxI* como herramientas complementarias en especies que generen confusión en su identificación en campo, siempre y cuando la longitud del fragmento de ADN o la región génica seleccionada, proporcione suficiente información para tal discriminación o dicha complementación incluya análisis filogenéticos.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 6 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 10 |
| 4. HIPÓTESIS | 10 |
| 5. OBJETIVOS | 11 |
| 5.1 Objetivo general | 11 |
| 5.2 Objetivos particulares | 11 |
| 6. METODOLOGÍA | 11 |
| 6.1 Captura de murciélagos en campo y toma de datos morfológicos | 11 |
| 6.2 Toma de datos acústicos | 12 |
| 6.3 Obtención de muestras de tejido, amplificación y secuenciación de ADN | 13 |
| 6.4 Análisis de datos | 16 |
| 7. RESULTADOS | 17 |
| 8. DISCUSIÓN | 22 |
| 9. CONCLUSIÓN | 26 |
| 10. PERSPECTIVAS..... | 27 |
| 11. REFERENCIAS | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Sonograma de una típica llamada de ecolocación de la fase de búsqueda extraída del software SonoBat 3.1.6.
- **Figura 2.** Esquema de la morfología alar de un murciélago.
- **Figura 3.** Diagrama de cajas y bigotes de los parámetros morfológicos utilizados para describir las diferencias entre *Myotis melanorhinus* y *M. californicus*.
- **Figura 4.** Diagrama de caja y bigotes de la frecuencia mínima utilizada para describir las diferencias entre los individuos *Myotis melanorhinus* y *M. californicus*.
- **Figura 5.** Análisis de parsimonia y máxima verosimilitud de un fragmento de secuencia del gen *coxI* de 45 individuos de *Myotis*
- **Fig. 6.** Individuo de *Myotis melanorhinus*, macho, adulto capturado en el PNLM
- **Fig. 7.** Individuo de *Myotis californicus*, macho, adulto capturado en el PNLM.

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Procedencia de los ejemplares de donde se obtuvieron las muestras de tejido de *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* en este estudio y la asignación de sus etiquetas moleculares.
- **Tabla 2.** Género, especie, número de individuos y localidad donde fueron obtenidos los datos.
- **Tabla 3.** Promedio de peso (g) y longitud del antebrazo (mm) de 12 individuos de *Myotis melanorhinus* y 32 de *M. californicus* del norte y centro de México.
- **Tabla 4.** Promedio las características acústicas de 12 individuos de *Myotis melanorhinus* y 32 de *M. californicus* del norte y centro de México.
- **Tabla 5.** Porcentaje de coincidencia con la secuencia de la especie de mayor similitud depositada en GenBank, distancia genética dentro y entre las especies y asignación taxonómica.

INTRODUCCIÓN

La identificación de las especies es esencial para el conocimiento, monitoreo y conservación de la diversidad biológica a gran escala. En el caso de la identificación de especies animales, se han utilizado diversos tipos de caracteres que van desde la determinación de la morfología externa (Jones y Bogdanowicz 2009), señales de comunicación para atraer pareja y recientemente con mayor frecuencia, marcadores moleculares para medir la divergencia de secuencias nucleotídicas entre las diferentes especies (Clare y cols. 2007, Hernández y cols. 2012). Los avances recientes en las técnicas moleculares han proporcionado herramientas útiles para investigar la relación entre especies externamente similares e identificar características morfológicas para discriminar entre ellas (Bradley y Baker 2001, Rodríguez y Ammerman 2004). Uno de los grupos animales que frecuentemente presenta problemas de identificación entre sus miembros son los murciélagos (orden Chiroptera).

Los murciélagos son un grupo de mamíferos ecológicamente diverso y geográficamente extendido. Con más de 1,300 especies descritas (Simmons 2003), el grupo se divide en dos subórdenes (Microchiroptera y Macrochiroptera), los cuales constituyen aproximadamente una quinta parte de todos los mamíferos existentes en el mundo. Estos organismos varían en tamaño desde los 2 gramos de peso en el pequeño murciélago moscardón (*Craseonycteris thonglongyai*) hasta los 1,300 gramos de peso del zorro volador malayo (*Pteroptus vampyrus*) con una envergadura de casi 1.5 metros (Kunz y Pierson 1994). El orden Chiroptera está presente en todos los continentes, excepto en la Antártida (Simmons 2009), son los únicos mamíferos que han desarrollado un vuelo verdadero, lo que les ha permitido colonizar una amplia variedad de nichos ecológicos diferentes, además les brinda la posibilidad de buscar refugio en diferentes tipos de estructuras (cavidades en los árboles, cuevas, grietas en las rocas, edificios abandonados; Kunz y Pierson 1994).

La dieta de los murciélagos incluye frutas, néctar, polen, invertebrados (insectos, arañas, crustáceos y escorpiones), pequeños vertebrados (ranas, aves, peces, otros mamíferos) y sangre (Nowak y cols. 1994). Los murciélagos juegan un papel muy importante en los ecosistemas, por la capacidad de dispersión de semillas y polen, de redistribución de nutrientes y de energía a través del guano (sustrato resultante de la acumulación de excrementos de murciélagos) para

sostener sistemas terrestres, acuáticos y de cuevas (Kunz y cols. 2011). Además de estos servicios, aproximadamente el 70% de las 1, 300 especies de murciélagos descritas a nivel mundial se alimentan de insectos y pueden controlar poblaciones y plagas, lo que ayuda a mantener una estabilidad en los sistemas agrícolas (Boyles y cols. 2011).

Además de la capacidad para volar, los murciélagos están adaptados para producir y recibir sonidos mediante un sofisticado sistema de ecolocación, que les permite navegar, orientarse y aprovechar fuentes de alimento en la oscuridad (Fenton 1994). La emisión de llamadas de alta frecuencia (emitidas entre 20 y 200 kHz) y la recepción de los ecos que se producen en los obstáculos del medio, se combinan en este sistema perceptual para hacer de los murciélagos un grupo altamente especializado desde el punto de vista acústico. Las llamadas de ecolocación de los murciélagos consisten en pulsos cuya duración oscila entre 0.2 y 100 ms. Estas señales son producidas por la laringe y proyectadas hacia el exterior a través de la boca o menos frecuente a través de las fosas nasales (Fenton 1994). De las más de 1, 300 especies de murciélagos descritas en la actualidad, cerca de 800 persiguen activamente a sus presas con el uso del sistema de ecolocación. La gran mayoría de estas especies se alimentan de insectos, que cazan al vuelo o posados sobre superficies, como las hojas de los árboles o el suelo (Simmons y cols. 1979).

Una típica secuencia de llamadas de ecolocación consta de llamadas de búsqueda, utilizadas para detectar a las presas, llamadas de aproximación, utilizadas durante la persecución de la presa y llamadas de la fase final de captura (“feeding buzz”, en inglés), emitidas por el animal justamente antes de capturar a su presa (Griffin y cols. 1960; Fig. 1). Las llamadas de búsqueda han sido utilizadas en los estudios de identificación de especies, dado que este tipo de llamadas son emitidas con mayor regularidad por los murciélagos durante el vuelo, en comparación con las llamadas de aproximación y la fase final de captura, las cuales presentan una mayor variabilidad en estructura. Además, las llamadas de la fase de búsqueda son consistentes en cuanto a duración y frecuencia de emisión a lo largo de toda la secuencia de ecolocación, y por lo general, tienen características específicas, lo que facilita la identificación de especies a través de su análisis (Ahlén 1981).

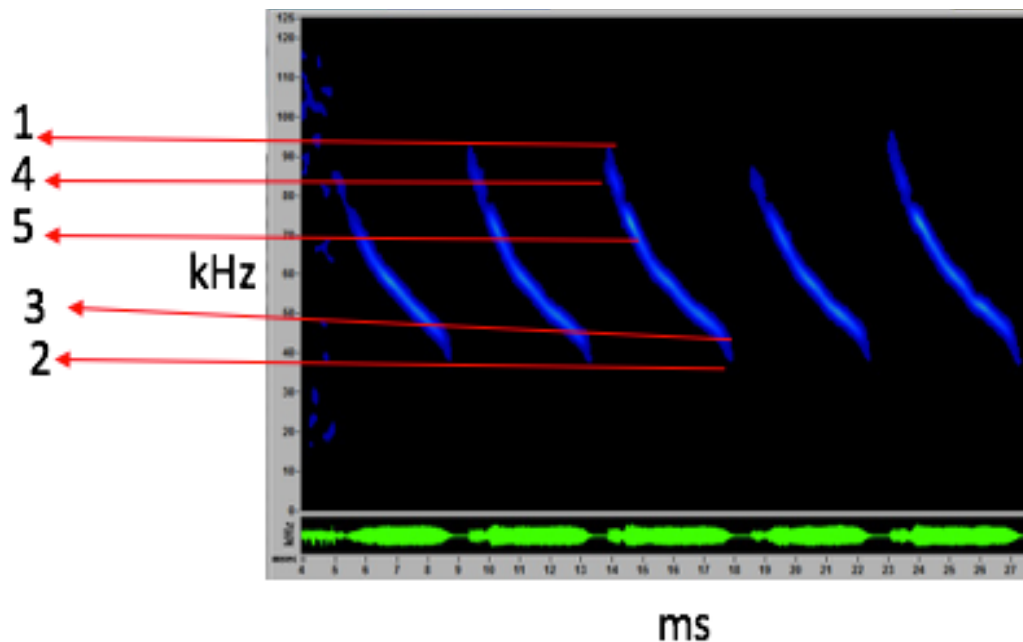


Fig. 1. Sonograma de una típica llamada de ecolocación de la fase de búsqueda extraída del software SonoBat 3.1.6. En el eje de las “y” la frecuencia (kHz) y en el eje de las “x” el tiempo en ms. 1) frecuencia máxima, 2) frecuencia mínima, 3) frecuencia inicial, 4) frecuencia final y 5) frecuencia característica de la llamada.

En cuanto a características morfológicas externas, la cara y orejas de los murciélagos tienen diferentes formas, que están relacionadas con adaptaciones al tipo de alimentación que los caracteriza (Kwiecinski y cols. 2013). Por ejemplo, se ha observado que los murciélagos que se alimentan de néctar tienen hocico y lengua alargados, lo que les permite la introducción de estas estructuras en las flores, mientras que los que se alimentan de insectos tienen el hocico más corto. Los ojos de los murciélagos están bien desarrollados, pero por lo general son pequeños, particularmente, los microquiropteros no utilizan la vista sino la ecolocación como medio principal para orientarse, al contrario de los macroquiropteros, que tienen una orientación más visual (Jones y Teeling 2006).

El cuerpo de los murciélagos está adaptado para el vuelo por lo que poseen las extremidades anteriores transformadas en alas, las cuales están formadas por una delgada membrana de piel denominada patagio, que se adhiere a los lados del cuerpo revistiendo todas las falanges de los dedos de la mano, excepto el pulgar (Altringham y cols. 1996). Dicha

membrana les permite sustentar el vuelo y recibe distintas denominaciones dependiendo de la región del ala o del cuerpo que cubra. Se denomina uropatagio a la membrana que se extiende centralmente entre los miembros posteriores, usualmente desde el tobillo y puede incluir la cola en las especies que la tienen (Fig. 2). La forma de esta membrana varía entre especies y en algunos casos, como en los miembros de la familia Vespertilionidae se encuentra muy desarrollada y puede ser utilizada como bolsa que les ayuda en la captura de sus presas, además de influir significativamente en la maniobrabilidad durante el vuelo (Schnitzler y Kalko 2001).

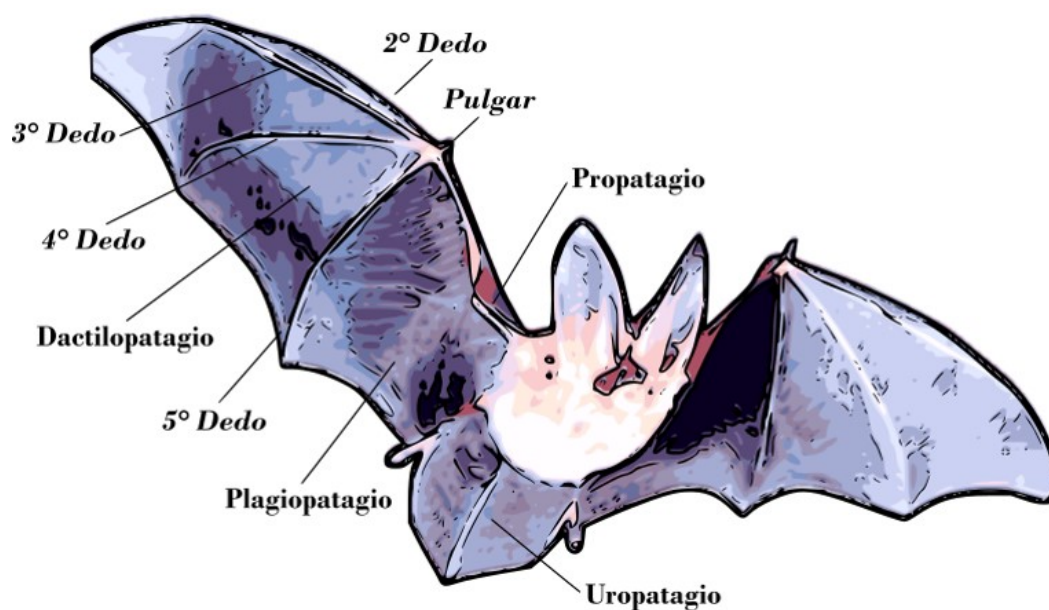


Fig. 2. Esquema de la morfología alar de un murciélago diseñado en el software Inksape 0.92.

Los miembros de la familia Vespertilionidae forman la familia más grande del orden Chiroptera, e incluye hasta la fecha cerca de 407 especies conocidas. Dentro de esta familia se encuentra el género *Myotis*, que es el género más variado de todos los mamíferos con más de 100 especies descritas (Simmons 2005). Además, es el género que presenta la mayor distribución ecológica y geográfica de todos los mamíferos conocidos en la actualidad (Bianconi y Pedro 2007). Los miembros de este grupo habitan todos los continentes, excepto la Antártida, y se les puede encontrar desde las tundras hasta las selvas y desiertos tropicales. Sin embargo, una cantidad importante de especies de este género que habitan en simpatria, poseen características morfológicas y ecológicas que hacen muy difícil su identificación en campo (Roy

y cols. 2017). Uno de estos casos es el de *Myotis melanorhinus* y *Myotis californicus*, que se distribuyen en el oeste de América del Norte y que son dos especies difíciles de identificar mediante caracteres morfológicos por habitar en simpatria (Constantine 1998).

Estas características dificultan la diferenciación entre estas dos especies, especialmente cuando las mediciones de sus características morfológicas se superponen. Bajo esta problemática, se sugiere que el uso de detectores ultrasónicos equipados para la detección y registro de sonidos de alta frecuencia, puede ser una herramienta útil para monitorear la actividad de los murciélagos (O'Farrell y Gannon 1999), así como para su identificación (Ahlen 1999, Murray y cols. 1999, O'Farrell y Gannon 1999). No obstante, se ha observado que la identificación de especies de murciélagos (incluyendo a *M. melanorhinus* y *M. californicus*) por medio de esta herramienta, no es del todo completa debido a que la estructura de las llamadas de ecolocación varía, no solo entre las especies, sino también dentro de las especies. Además, se han reportado diversos factores que influyen en la estructura de las llamadas, por ejemplo, la localización geográfica, el tamaño de los individuos y el modo de alimentación (Obrist 1995, Barclay y cols. 1999).

Debido a estos inconvenientes, el código de barras de ADN es una herramienta de bajo costo que puede aportar elementos adicionales para la identificación de las especies mediante el estudio de patrones de divergencia de secuencias en una región estandarizada de uno o varios genes. En este contexto, el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (*coxI*) ha sido seleccionado como la región del código de barras que puede ser utilizado, no solo para este grupo sino para todo el reino animal (Hebert y cols. 2003). Su efectividad ha sido validada en varios grupos animales, incluyendo al de los murciélagos (Clare y cols. 2007, 2011, Borisenko y cols. 2008) y la mayoría de las especies investigadas (> 94%) poseen matrices de códigos de barras distintas, con baja variación intraespecífica y altas divergencias entre taxones estrechamente relacionados (Ward y cols. 2005).

ANTECEDENTES

El *Myotis californiano*, *M. californicus*, y el *Myotis* occidental de patas pequeñas y nariz oscura, *M. melanorhinus*, son dos murciélagos morfológicamente similares que han tenido una

historia evolutiva compleja debido a la variación geográfica intraespecífica a través de su distribución en el oeste de América del Norte. La identificación de ambas especies mediante caracteres morfológicos externos ha sido un problema que persiste hasta la fecha (Constantine 1998). No obstante, se han descrito una serie de características que pueden ser empleadas para distinguir las dos especies. Por ejemplo, *M. melanorhinus* difiere de *M. californicus* en que el primero tiene una pendiente menos profunda en el área frontal del cráneo (van Zyll de Jong 1985), un cráneo más plano y ancho y una mayor amplitud rostral (Bogan 1975). Externamente, *M. californicus* carece de una máscara facial negra, hocico negro, vello facial (van Zyll de Jong 1985) y a menudo presenta una coloración de pelo en el cuerpo más oscura.

De manera adicional, un estudio llevado a cabo en San Bernardino CA., U.S.A, reveló que los miembros de *M. melanorhinus* desarrollan una cola que se extiende de 1.5 a 2.5 mm más allá del borde del uropatagio, mientras que la punta de la última vertebra de *M. californicus* es continua con el borde del uropatagio (Constantine 1998). Sin embargo, a pesar de las características anteriormente descritas, al día de hoy, no es fácil distinguir entre ambas especies debido principalmente a la variación intraespecífica en patrones de coloración ligados al origen geográfico de los individuos (Bogan 1975, van Zyll and Jong 1985). Criterios adicionales basados en el color o el grado de brillo del pelaje están sujetos a variaciones relacionadas con la estación del año, la muda, el sexo y la edad (Bogan 1975). Además, Constantine (1998) demostró que la medición de la cola puede ser difícil, ya que puede cambiar de forma durante la manipulación por parte del observador o durante diferentes actividades del murciélago, lo que puede comprometer la medición, adicionalmente se ha reportado que existe variación en los tamaños de la cola y que muchas veces los murciélagos pueden llegar a perderla. Asimismo, Hall (1981) reportó que las poblaciones de ambas especies habitan en simpatria en muchas localidades a lo largo de su distribución, lo que dificulta su correcta identificación en el campo. Bajo estas circunstancias, la identificación de estas dos especies por medio de caracteres morfológicos externos no es del todo concluyente, por lo que se ha sugerido el uso de las características ultrasónicas para obtener un resultado más completo.

Es generalmente aceptado que los murciélagos producen llamados que son específicos para cada especie (Fenton y Bell 1981). De hecho, se han hecho descripciones de nuevas especies usando inicialmente solo datos acústicos (Jones y cols. 2000). Como ejemplo, Parsons

y Jones (2000) registraron y analizaron las llamadas de ecolocación de 14 especies simpátricas de murciélagos en Gran Bretaña. Los autores emplearon como parámetros la duración de la llamada (cd), frecuencia inicial de la llamada (sf, frecuencia al inicio del pulso), frecuencia final (ef, frecuencia al final del pulso), frecuencia máxima (hf, frecuencia con la máxima energía del pulso) y frecuencia central (fcen, frecuencia de la energía más alta tomada a la mitad del pulso). Dichas mediciones se usaron para clasificar las llamadas a nivel de especie. Durante el estudio, los autores lograron identificar fácilmente dos especies del género *Rhinolophus* a partir de la duración de las llamadas. Para las 12 especies restantes, emplearon un análisis de función discriminante, el cual logró una tasa de clasificación global del 79%.

Adicionalmente Fukui y cols. (2004) estudiaron las características de la estructura de la llamada de ecolocación de murciélagos que habitan el bosque experimental de Tomakomai en Hokkaido, Japón, donde analizaron los sonogramas de 171 llamadas correspondientes a 8 especies de murciélagos diferentes. Al igual que en el estudio anterior, lograron distinguir fácilmente a *R. ferrumequinum* de las demás especies mediante el análisis de la cd, para las 7 especies restantes los autores evaluaron 5 parámetros (cd, sf, ef, hf y fcen) mediante un análisis de función discriminante, donde el 92% de las llamadas se clasificaron correctamente según la especie. Otro estudio similar se desarrolló en Italia por Russo y Jones (2002) en el que examinaron las llamadas de ecolocación de 950 murciélagos de 22 especies (tres rinólofidos, 18 vespertiliónidos y el molósido *Tadarida teniotis*). Los autores encontraron que *Rhinolophus ferrumequinum*, *R. hipposideros*, *R. euryale* y *T. teniotis* pueden identificarse midiendo solamente la hf. Posteriormente, los autores realizaron un análisis de función discriminante de las llamadas de las 18 especies sobrantes. Dicho análisis se basó en la cd, sf, ef, hf y fcen y proporcionó una clasificación global correcta del 82%.

Estos estudios demostraron que es posible distinguir entre especies de murciélagos mediante el análisis de las vocalizaciones ultrasónicas. Sin embargo, se ha reportado que la estructura de las llamadas de ecolocación puede ser afectada por variación geográfica inter e intraespecífica (Ratcliffe y Dawson 2003). Además, los individuos de una misma especie pueden cambiar drásticamente las características de sus llamadas mientras buscan, detectan y vuelan cerca de sus presas (Griffin y cols. 1960), bajo diferentes condiciones ambientales (Kalko 1995) y/o en la presencia de congéneres (Obrist 1995). Adicionalmente, se ha visto que las

llamadas también pueden variar dependiendo del sexo, la morfología (Jones y cols. 1992) y la edad (Russo y cols. 2001).

Thomas y cols. (1987) demostraron que las llamadas de *M. melanorhinus* varían geográficamente. Los autores observaron que los individuos que habitan el estado de Arizona, U.S.A presentan llamadas cortas (5 ms), con una frecuencia máxima de 44 kHz y una mínima de 41 kHz. En Wyoming, las llamadas de *M. melanorhinus* son aún más cortas (3.5 ms), con una frecuencia máxima de 62.4 kHz y una mínima de 40.3 kHz, mientras que las de Nuevo México las frecuencias máximas y mínimas fueron de 61.1 y 39.2 kHz respectivamente y una duración de 3.9 ms. De manera similar, Fenton y Bell (1981) demostraron que las llamadas de ecolocación de *M. californicus* también varían geográficamente, los individuos de esta especie grabados en Arizona emitían llamadas cortas (2 ms), una frecuencia máxima de 80 kHz y una mínima de 37 kHz, mientras que las llamadas procedentes de Columbia Británica, Canadá presentaban una frecuencia máxima de 67 kHz y una mínima de 35 kHz con una duración de 2 ms.

Sin embargo existe otra metodología complementaria para distinguir a las especies altamente similares morfológicamente y que en los últimos años ha sido muy utilizada. El código de barras de ADN, en el cual comúnmente se emplea un fragmento del gen *coxI*, puede ser una técnica complementaria para distinguir entre especies altamente similares morfológicamente. En Guyana, Clare y cols. (2007) buscaron evaluar la efectividad del gen *coxI* (658 pb) mediante la discriminación de 87 especies de murciélagos. Los autores encontraron que 81 especies mostraron baja variación intraespecífica (media=0.60%) y clara divergencia de secuencias de sus congéneres (media=7.80%), mientras que las otras seis mostraron linajes intraespecíficos profundamente divergentes, lo que sugiere que representan complejos de especies, es decir, son un grupo de especies estrechamente relacionadas donde la línea de demarcación precisa entre ellas es a menudo poco clara o críptica debido a su reciente formación en términos evolutivos.

De manera similar, Hernández y cols. (2012) examinaron la variación en un fragmento del *coxI* (454 pb) para discriminar 20 especies de murciélagos de la familia Phyllostomidae que habitan la Península de Yucatán, en el sureste de México y el norte de Guatemala. Posteriormente, los compararon genéticamente con otras muestras de América Central. La

mayoría de las especies tenían baja variación intraespecífica (media=0.75%), no obstante, algunos taxones presentaron una variación intraespecífica del 8,8%, lo que sugiere la posibilidad de existencia de especies crípticas. Con estos hallazgos se comprobó la eficacia del código de barras de ADN para identificar especies potencialmente crípticas de murciélagos, además, podemos estar seguros del uso del *coxI* como un marcador molecular para reconocer especies, como lo revelan las distintas matrices de códigos de barras para otros grupos de organismos, como por ejemplo, insectos (Hebert y cols. 2004), aves (Johnsen y cols. 2010) y peces (Ward y cols. 2005).

El objetivo principal de este trabajo de investigación consistió en identificar a *M. melanorhinus* y *M. californicus*, los cuales tienen una distribución simpátrica en el norte y centro de México (Hall 1981). Para cumplir con el objetivo, se analizaron datos morfológicos y acústicos de individuos capturados en el norte y centro de México. Además, se obtuvieron muestras de tejido alar, músculo e hígado para la extracción de ADN e identificación mediante el análisis de 350 pares de bases (pb) del gen *coxI*.

JUSTIFICACIÓN

La identificación de las especies es un requisito fundamental para el estudio de la diversidad y para diseñar estrategias de conservación ecológica exitosas. En México se han registrado 137 especies de murciélagos, de un total de 1,300 en el mundo, es decir, en el país se encuentra el 10% de la diversidad total de las especies de murciélagos. Desafortunadamente, la situación de los murciélagos, como la de muchos otros organismos de flora y fauna de nuestro país, se ha complicado por las actividades humanas. La importancia de los murciélagos es incuestionable, tanto en la naturaleza como para el hombre. Sin embargo, nuestro desconocimiento de los murciélagos y la destrucción de sus hábitats representan un riesgo para la supervivencia de estos animales. Conocer la identidad de las especies de murciélagos, permitirá conocer los requerimientos ecológicos y distribución de las especies, lo que puede ayudar a delinear áreas potenciales destinadas para la conservación. *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* son dos especies de murciélagos vespertiliónidos morfológicamente similares y con una distribución

simpátrica en el centro y norte del territorio mexicano. Identificar ambas especies en campo mediante caracteres morfológicos y acústicos ha sido en general complejo, por esta razón el gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (*coxI*) puede ser útil para corroborar la identidad de las especies.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el grado de similitud morfológica en los miembros de *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* con distribución en el centro y norte de México?

¿Qué parámetros acústicos son útiles para distinguir a los miembros de *M. melanorhinus* de *M. californicus* con distribución en el centro y norte de México?

¿Cuál es el grado de la divergencia de secuencias nucleotídicas entre las dos especies de murciélagos vespertilionidos?

OBJETIVOS

General

- Identificar a *M. melanorhinus* y *M. californicus* por medio de características morfológicas, acústicas y de código de barras de ADN (*coxI*).

Particulares

1. Determinar las características morfológicas de individuos de *M. melanorhinus* y *M. californicus*.
2. Caracterizar las vocalizaciones ultrasónicas emitidas por individuos de *M. melanorhinus* y *M. californicus*.
3. Secuenciar y analizar un fragmento del gen *coxI* de individuos de *M. melanorhinus* y *M. californicus*.

METODOLOGÍA

Para los fines de esta tesis se trabajó bajo el concepto fenético de especie, el cual describe a una especie como un grupo de organismos que son fenotípicamente similares y que parecen diferentes de otros grupos de organismos (Michener 1970, Sokal y Crovello 1970, Sneath y Sokal 1973).

Captura de murciélagos en campo y toma de datos morfológicos

Se capturaron individuos de *M. melanorhinus* y *M. californicus* en dos localidades pertenecientes al estado de Tlaxcala: 1) un bosque de coníferas en el Parque Nacional La Malinche (PNLM) (19°14'46.0"N 97°59'05.8"O) y un bosque de encino en la comunidad de Plan de Ayala, municipio de Tlaxco (19°29'50.3"N 98°05'40.5"O). Los individuos se capturaron mediante el uso de redes de niebla (2.1 x 6 m). En el PNLM, se colocaron cuatro redes de niebla en tres estanques artificiales que se encuentran en la cañada este de la montaña y que son usados por los murciélagos para beber agua y alimentarse. En la comunidad de Plan de Ayala, se colocaron cinco redes de niebla en los corredores al interior del bosque y tres redes a la salida de dos cuevas que se encuentran en el interior del mismo. Posterior a la captura, los murciélagos fueron identificados, medidos, pesados y se registró el sexo y su condición reproductiva. Los individuos fueron medidos con el uso de un vernier con una precisión de 0.01 mm. El peso de los individuos fue obtenido con una balanza digital con una precisión de 0.1 g (Ohaus, Newark, Nueva Jersey, U.S.A.). La edad de los individuos se determinó por el cierre del espacio epifisario del cuarto dedo. La condición reproductiva se clasificó en dos categorías: individuos reproductivos y no reproductivos. En machos, la condición reproductiva se evaluó mediante la inspección visual de los testículos, durante la espermatogénesis aumenta el tamaño de los mismos. En las hembras, la condición reproductiva se evaluó mediante la observación de un incremento en las glándulas mamarias. La identificación de las especies se llevó a cabo con el uso de la guía de campo de murciélagos de México propuesta por Medellín y cols. (1997). De manera adicional, se obtuvo información morfológica (peso y longitud de antebrazo) de 15 individuos depositados en la colección de mamíferos del CIDIIR, Durango.

Toma de datos acústicos

Al final de los procedimientos, los murciélagos fueron liberados en el lugar de captura. Durante la liberación, las vocalizaciones de los individuos fueron grabadas con el uso de un detector ultrasónico (Pettersen® D1000X, CA, USA) bajo los siguientes parámetros: Frecuencia de muestreo 300 kHz y Tiempo de expansión 10x. El procedimiento que se siguió fue el siguiente: Los individuos fueron liberados en la mano, la grabación comenzó inmediatamente después de que el murciélago inició el vuelo hasta alcanzar 10 segundos de grabación. Dichas grabaciones fueron caracterizadas con el Software SonoBat 3.1.6. Las medidas que se obtuvieron fueron: cd, fc, hf, lf, sf y ef (Parsons y Jones 2000, Fukui y cols. 2004). Adicionalmente se obtuvo información acústica de especímenes depositados en la colección de mamíferos del CIDIIR, Durango. Los murciélagos se capturaron bajo el permiso de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SGPA/DGVS/07019/15).

Obtención de muestras de tejido, amplificación y secuenciación de ADN

Las muestras de tejido para el análisis de ADN se obtuvieron de dos fuentes: 1) de los murciélagos capturados en campo y 2) de la colección de tejidos de mamíferos del CIDIIR, Durango (Tabla 1). En campo, las muestras se obtuvieron a través de muescas de 2 mm de diámetro que se tomaron de la parte interna del plagiopatagio de cada ala de cada individuo (Broders y cols. 2013). Ya que las muestras generan hoyos en las membranas, estas fueron tomadas en la región del plagiopatagio, lo cual no interfiere con la actividad de vuelo de los individuos (Pollock y cols. 2016). El tejido restante que se obtuvo de la colección de mamíferos del CIDIIR fue colectado en las siguientes localidades: Guanaceví, Durango, (25°55'53.3"N 105°57'19.4"O), Norogachi, Chihuahua (27°16'22.4"N 107°07'54.5"O), La Pila de Lolo, Sonora (27°09'39.0"N 109°35'07.8"O) y El Álamo, Baja California (31°35'34.7"N 116°03'03.9"O). Las muestras de tejido se almacenaron en etanol 95% a 4°C hasta el proceso de extracción del ADN en el laboratorio.

El ADN genómico de las 45 muestras de tejido que se obtuvieron se purificó de acuerdo al siguiente protocolo: Se eliminó el etanol por decantación y el exceso se eliminó en un concentrador Vacufuge plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con el uso de vacío y a 40 °C. Posteriormente, los tejidos se lavaron dos veces durante diez min con 500 µL de regulador salino

de fosfatos (PBS) (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na.HPO.8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM) con agitación constante. Se eliminó el PBS por decantación y se agregó una mezcla de 300 µL de regulador de extracción B (EBB) (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanol), 30 µL de SDS 10% y 10 µL de Proteinasa K (600 U/mL, Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) para el lisado celular y se incubó a 37° C por 24 h. Posteriormente, se agregaron 140 µL de acetato de potasio 5 M pH 5 a 4 °C y se centrifugó a 13, 000 rpm por 5 min a 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5810 R, NJ, U.S.A.). El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 400 µL de isopropanol frío invirtiendo el tubo suavemente para precipitar el ADN. Se centrifugó a 13, 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente (Thermo-Scientific Sorvall Legend Micro 17), con mucho cuidado se eliminó el sobrenadante por decantación y el tubo con el precipitado de ADN se colocó invertido sobre una hoja limpia de papel absorbente para eliminar al máximo el remanente de isopropanol. Posteriormente, la pastilla de ADN se lavó con 500 µL de etanol frío al 70%, se secó en un concentrador de vacío (Vacufuge Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y finalmente se resuspendió con 50 µL de agua estéril.

Posteriormente, se amplificaron 350 pb del gen mitocondrial *coxI* que codifica para la subunidad I de la citocromo oxidasa *c* con los siguientes primers: *mICOLintf* (5'-GGW ACW GGW TGA ACW GTW TAY CCY CC-3') y *HCO2198* (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') modificados y conteniendo los adaptadores para la plataforma de secuenciación de Illumina (CA, USA) y una etiqueta de 8 nucleótidos (Tabla 1) que se usó posteriormente para identificar las secuencias provenientes de las diferentes muestras. El protocolo de amplificación se realizó de acuerdo a Burns y cols. (2014). Los amplificados se purificaron con el uso del paquete de reactivos DNA Clean Concentrator de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Nippon Genetics, Tokio, Japón). Los productos de PCR purificados se cuantificaron con el kit PicoGreen dsDNA Kit (Invitrogen) utilizando un Fluoroespectrómetro Nanodrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, MA, U.S.A.) y se combinaron en cantidades equimolares. La secuenciación se realizó en un MiSeq Illumina con el kit Paired-End 300 por Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

La calidad de las secuencias fue analizada en la pipeline QIIME v.1.9.0 disponible en www.qiime.org. Se obtuvo el consenso de las secuencias paired-end con el programa FastqJoin. A las secuencias consenso se le aplicaron filtros de calidad, i.e. se eliminaron las secuencias con

calidad PHRED <33 en un marco de 10 nt y con errores en las etiquetas y en los iniciadores. Posteriormente, se separaron de acuerdo a la etiqueta asignada para cada muestra. Se detectaron y eliminaron las quimeras y artefactos producidos durante la PCR usando el software Chimera Slayer dentro de QIIME.

Tabla 1. Procedencia de los ejemplares de donde se obtuvieron las muestras de tejido de *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* y la asignación de sus etiquetas moleculares.

| Id del ejemplar | Localidad | Estado | Etiqueta molecular |
|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| CRD3109 | Guanaceví | Durango | TAAGGCGATAGATCGC |
| CRD3130 | Guanaceví | Durango | CGTACTAGTAGATCGC |
| CRD3143 | Guanaceví | Durango | AGGCAGAATAGATCGC |
| CRD3172 | Guanaceví | Durango | TCCTGAGCTAGATCGC |
| CRD3180 | Guanaceví | Durango | GGACTCCTTAGATCGC |
| CRD3274 | Guanaceví | Durango | TAAGGCGACTCTCTAT |
| CRD3701 | Norogachi | Chihuahua | CGTACTAGCTCTCTAT |
| CRD3702 | Norogachi | Chihuahua | AGGCAGAACTCTCTAT |
| CRD4504 | Norogachi | Chihuahua | TCCTGAGCCTCTCTAT |
| CRD4501 | Norogachi | Chihuahua | GGACTCCTCTCTCTAT |
| CRD5455 | Guanaceví | Durango | TAAGGCGATATCCTCT |
| CRD6662 | Guanaceví | Durango | CGTACTAGTATCCTCT |
| CRD6667 | Guanaceví | Durango | AGGCAGAATATCCTCT |
| CRD6668 | Guanaceví | Durango | TCCTGAGCTATCCTCT |
| CRD8075 | Guanaceví | Durango | GGACTCCTTATCCTCT |
| CRD8062 | Guanaceví | Durango | TAAGGCGATAGATCGC |
| CRD8503 | Guanaceví | Durango | CGTACTAGTAGATCGC |
| VZG7 | La Pila de Lolo | Sonora | AGGCAGAATAGATCGC |
| VZG73 | El Álamo | Baja California | TCCTGAGCTAGATCGC |
| VZG78 | El Álamo | Baja California | GGACTCCTTAGATCGC |
| VZG132 | El Álamo | Baja California | TAAGGCGACTCTCTAT |
| VZG134 | El Álamo | Baja California | CGTACTAGCTCTCTAT |
| VZG144 | El Álamo | Baja California | AGGCAGAACTCTCTAT |
| VZG154 | La Pila de Lolo | Sonora | TCCTGAGCCTCTCTAT |
| VZG205 | La Pila de Lolo | Sonora | GGACTCCTCTCTCTAT |
| VZG611 | La Pila de Lolo | Sonora | TAAGGCGATATCCTCT |
| VZG524 | La Pila de Lolo | Sonora | CGTACTAGTATCCTCT |
| 2MCA280406 | Guanaceví | Durango | AGGCAGAATATCCTCT |
| 15MCIL50905 | Guanaceví | Durango | TCCTGAGCTATCCTCT |

| | | | |
|-------------|----------------------------|----------|------------------|
| 19MCA300406 | Guanaceví | Durango | GGACTCCTTATCCTCT |
| 23o20217 | PNLM | Tlaxcala | CGTACTAGTAGATCGC |
| 16o20217 | PNLM | Tlaxcala | AGGCAGAATAGATCGC |
| 22o20217 | PNLM | Tlaxcala | TCCTGAGCTAGATCGC |
| 1o21217 | PNLM | Tlaxcala | GGACTCCTTAGATCGC |
| 2o21217 | PNLM | Tlaxcala | TAAGGCGACTCTCTAT |
| 1o19317 | PNLM | Tlaxcala | CGTACTAGCTCTCTAT |
| 4o20317 | PNLM | Tlaxcala | AGGCAGAACTCTCTAT |
| 6o20317 | PNLM | Tlaxcala | TCCTGAGCCTCTCTAT |
| 8o20317 | PNLM | Tlaxcala | GGACTCCTCTCTCTAT |
| 3o29417 | PNLM | Tlaxcala | TAAGGCGATATCCTCT |
| 7o20517 | PNLM | Tlaxcala | CGTACTAGTATCCTCT |
| 1o19617 | PNLM | Tlaxcala | AGGCAGAATATCCTCT |
| 3o19617 | PNLM | Tlaxcala | TCCTGAGCTATCCTCT |
| 4o171117 | Comunidad de Plan de Ayala | Tlaxcala | GGACTCCTTATCCTCT |

Análisis de datos

Para determinar si existieron diferencias significativas en las características morfológicas y acústicas entre los miembros de *M. melanorhinus* y *M. californicus* se llevaron a cabo pruebas de *t* de Student debido a que los datos son independientes y presentaron distribución normal. Los análisis morfológicos se llevaron a cabo con el uso del paquete estadístico R (ver 3.5.0, R Core Team, 2018).

Las secuencias obtenidas en este estudio, secuencias de *coxI* de *M. melanorhinus* y *M. californicus* y como grupo externo secuencias de *Eptesicus fuscus*, *Corynorhinus townsendii* y *Aeorestes cinereus* de la base de datos de GenBank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/); número de acceso GU723116, GU723120, KP734221, JF498646, JF498645, GU723175, GU723176, MF990081 y MF990080) se alinearon utilizando el módulo CLUSTAL W (Thompson y cols. 1994) implementado en MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura y cols. 2007) con el uso de los parámetros definidos en el programa. Se realizó un análisis de parsimonia mediante los métodos de búsqueda heurístico y de bifurcación mediante el programa informático PAUP versión 4.0b10 (Swofford 2001). Para evaluar la confianza en los patrones de ramificación, se realizaron análisis bootstrap de 1, 000 repeticiones (Felsenstein 1985). Se hizo uso del programa informático jModelTest 2.1.10 (Darriba y Posada

2014) para determinar el modelo de mejor ajuste evolutivo para los datos de las secuencias de *coxI*. El modelo sugerido, HKY + I (Hasegawa, Kishino y Yano 1985), se usó para calcular las distancias genéticas por pares entre taxones y como base para árboles de máxima verosimilitud generados en PAUP.

RESULTADOS

Identificación morfológica y acústica

Se obtuvieron datos morfológicos y acústicos de 44 individuos de las dos especies, de los cuales, 29 fueron capturados en dos localidades en el estado de Tlaxcala y 15 fueron obtenidos de la colección de mamíferos del CIDDIR, Durango (Tabla 2).

Tabla 2. Género, especie, sexo, número de individuos y localidad donde fueron obtenidos los datos morfológicos y acústicos.

| Género | Especie | Sexo | | <i>n</i> | Localidad |
|---------------|---------------------|------|---|----------|--|
| | | M | H | | |
| <i>Myotis</i> | <i>melanorhinus</i> | 10 | 1 | 11 | Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala |
| | <i>californicus</i> | 17 | 0 | 17 | |
| <i>Myotis</i> | <i>melanorhinus</i> | 1 | 0 | 1 | Comunidad de Plan de Ayala, Tlaxcala |
| <i>Myotis</i> | <i>californicus</i> | 6 | 2 | 8 | Municipio de Caborca, Ejido Quitovak, Durango. |
| <i>Myotis</i> | <i>californicus</i> | 3 | 1 | 4 | Misión San Juan de Velicata, Reserva Los Cirios, Baja California |
| <i>Myotis</i> | <i>californicus</i> | 3 | 0 | 3 | Ojito Colorado, Durango |

Se reveló que los miembros de *M. melanorhinus* son de mayor tamaño que sus congéneres (Tabla 3), en donde se encontraron diferencias significativas en el peso ($t_{12}=-3.49, p < 0.001$; Fig. 3A) y en la longitud del antebrazo ($t_{12}=4.63, p < 0.001$; Fig. 3B). Se puede observar que los datos del peso para los individuos de *M. melanorhinus* se encuentran entre los 4.2 y 5.6 g. No obstante, un individuo de esta especie presentó un valor atípico en esta medida (7 g). Se reveló que los miembros de *M. californicus* presentaron valores de peso de entre 2 y 6 g (Fig. 3A). Los valores de la longitud del antebrazo para los miembros de *M. melanorhinus* oscilan entre los 33.2 y 41.9 mm, mientras que para *M. californicus* se sitúan entre los 29.8 y 36.7 mm (Fig. 3B).

Tabla 3. Promedio de peso corporal (g) y longitud del antebrazo (mm) de 12 individuos de *Myotis melanorhinus* y 32 de *M. californicus* capturados en el norte y centro de México.

| | <i>M. melanorhinus</i> | <i>M. californicus</i> |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| | Promedio | Promedio |
| Peso corporal (g) | 5.38 ± 0.91 | 4.11 ± 0.92 |
| Longitud del antebrazo (mm) | 35.97 ± 2.4 | 32.66 ± 1.5 |

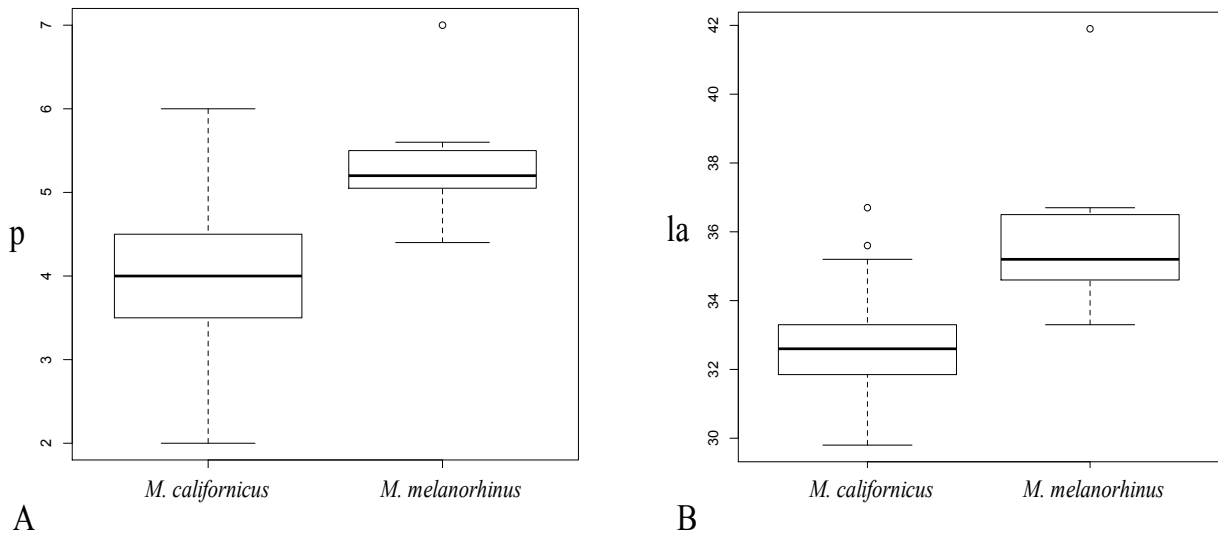


Fig. 3. Diagrama de cajas y bigotes de los parámetros morfológicos utilizados para describir las diferencias entre *Myotis melanorhinus* y *M. californicus*. A) En el eje de las “y” se indica el peso (p) en g y en el eje de las “x” se muestran los individuos de cada especie. La línea negra dentro de las cajas representa la mediana = 5.1 y 4, rango = 2.8 y 4, para *M. melanorhinus* y *M. californicus* respectivamente. B) En el eje de las “y” se indica la longitud del antebrazo (la) en mm y en el eje de las “x” los individuos de cada especie, la mediana = 35 y 32.45, rango = 8.7 y 6.9 para *M. melanorhinus* y *M. californicus* respectivamente. Los tamaños de muestra para *M. melanorhinus* y *M. californicus*, respectivamente, fueron 12 y 32.

En cuanto a las características acústicas, todos los valores de la cd, fc, hf, lf, sf y ef fueron muy similares (Tabla 4). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la lf de los ultrasonidos emitidos por las dos especies de murciélagos ($t_{30}=2.59$, $p=0.01$). En la figura 4 se puede apreciar que los miembros de *M. melanorhinus* presentaron valores menores en este parámetro, siendo estos de entre 32.4 y 42.1 kHz. De manera contraria *M. californicus* es una especie que emite valores mayores en esta característica, los cuales oscilan entre 40.2 y 50.8 kHz.

Tabla 4. Características acústicas, promedio de la duración de la llamada (cd), frecuencia característica (fc), frecuencia máxima (hf), frecuencia mínima (lf), frecuencia inicial (sf) y frecuencia final (ef) de 12 individuos de *Myotis melanorhinus* y 32 de *M. californicus*.

| | <i>M. melanorhinus</i> | <i>M. californicus</i> |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| | Promedio | Promedio |
| Duración de la llamada (cd) | 3.5 ± 1.1 | 3.0 ± 1.7 |
| Frecuencia característica (fc) | 44.1 ± 2.9 | 48.7 ± 4.4 |
| Frecuencia máxima (hf) | 83.3 ± 8.7 | 82.5 ± 11.2 |
| Frecuencia mínima (lf) | 37.8 ± 3.0 | 43.8 ± 4.3 |
| Frecuencia inicial (sf) | 83.3 ± 8.7 | 82.5 ± 11.2 |
| Frecuencia final (ef) | 37.8 ± 3.0 | 43.8 ± 4.3 |

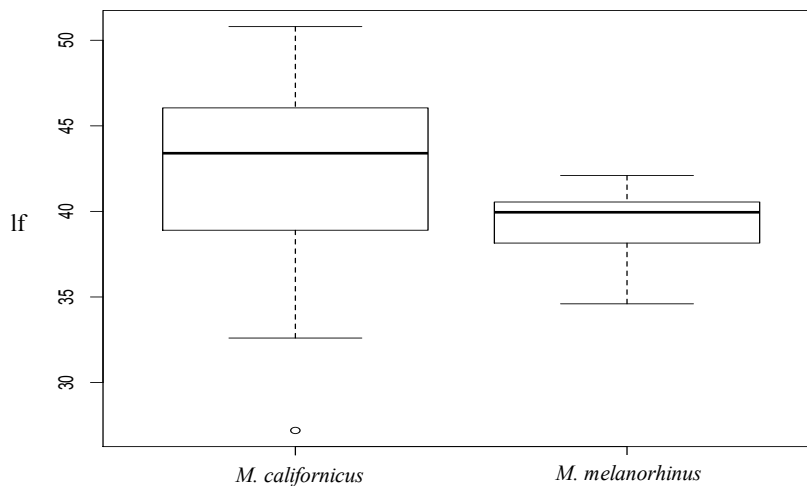


Fig. 4. Diagrama de caja y bigotes de la frecuencia mínima (lf) representada en el eje de las “y” para describir las diferencias entre los individuos *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* representados en el eje de las “x”. La línea negra dentro de las cajas representa la mediana = 37.9 y 44.7, rango = 9.7 y 20.3 para *M. melanorhinus* y *M. californicus* respectivamente. Los tamaños de muestra para *M. melanorhinus* y *M. californicus*, respectivamente, fueron 12 y 32.

Identificación molecular

Se obtuvieron secuencias de 350 pb del gen *coxI* de 45 individuos (17 de *M. melanorhinus* y 28 de *M. californicus*) de 5 estados del Norte y Centro de México (Tabla 1), de los cuales 206 caracteres fueron constantes, 19 caracteres fueron parsimoniosos no informativos y 97 fueron parsimoniosos informativos. El análisis de parsimonia del gen *coxI* con el método de búsqueda heurístico produjo un árbol único más parsimonioso (L = 231 pasos; Fig. 5A) con un índice de

consistencia (CI) = 0.7143 y un índice de retención (RI) = 0.7684. El método de búsqueda de bifurcación produjo topologías similares en todos los análisis parsimoniosos. Los análisis de parsimonia no produjeron una topología que diferenciara entre *M. melanorhinus* y *M. californicus*. El análisis bootstrap apoyó fuertemente la exclusión de *E. fuscus*, *C. townsendii* y *A. cinereus*, pero no logró agrupar a los miembros de *M. melanorhinus* y *M. californicus* de este estudio (Fig. 5A). Se calcularon las distancias genéticas en PAUP mediante el uso del modelo evolutivo HKY + I (Hasegawa, Kishino y Yano 1985) con una proporción de transiciones (25) y transversiones (14) = 1.8, la composición nucleotídica fue: A = 0.263, C = 0.258, G = 0.147 y T = 0.332. La distancia media de la divergencia de secuencias mediante el mismo modelo dentro de las especies fue de 1.7% mientras que la divergencia media entre los congéneres fue de 2.4 %. Los valores porcentuales de la divergencia interespecífica e intraespecífica para *M. californicus* y *M. melanorhinus* fueron casi idénticos (Tabla 5). Se produjo un árbol de máxima verosimilitud (ln L = 1495.526) basado en el gen *coxI* con el uso del modelo evolutivo HKY + I que fue similar en topología al árbol más parsimonioso (Fig. 5B).

Tabla 5. Porcentaje de coincidencia con la secuencia de la especie de mayor similitud depositada en GenBank, distancia genética dentro y entre las especies y asignación taxonómica.

| Id. Secuencia representativa ^a | Organismo con mayor coincidencia (% de Similitud) | No. Acceso GenBank | Disgen-de ^b | Disgen-ee ^c | Asignación taxonómica |
|---|--|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| NCL11_denovo250 | <i>M.</i> ^d <i>californicus</i> (97.76) | GU723118 | 0.0224 | 0.0259 | <i>M. californicus</i> |
| NCL12_denovo188 | <i>M. californicus</i> (97.76) | GU723118 | 0.0224 | 0.0226 | <i>M. californicus</i> |
| NCL10_denovo86 | <i>M. californicus</i> (98.09) | GU723118 | 0.0191 | 0.0194 | <i>M. californicus</i> |
| NCL12_denovo240 | <i>M. californicus</i> (98.09) | GU723118 | 0.0191 | 0.0194 | <i>M. californicus</i> |
| NCL11_denovo304 | <i>M. melanorhinus</i> (98.08) | KP734221 | 0.0192 | 0.0257 | <i>M. melanorhinus</i> |
| NCL12_denovo223 | <i>M. melanorhinus</i> (97.40) | KP734221 | 0.0260 | 0.0395 | <i>M. melanorhinus</i> |
| NCL11_denovo285 | <i>M. melanorhinus</i> (97.74) | KP734221 | 0.0226 | 0.0258 | <i>M. melanorhinus</i> |
| NCL10_denovo29 | <i>M. melanorhinus</i> (97.40) | KP734221 | 0.0260 | 0.0291 | <i>M. melanorhinus</i> |
| NCL10_denovo54 | <i>M. melanorhinus</i> (99.06) | KP734221 | 0.0094 | 0.0258 | <i>M. melanorhinus</i> |

^a Secuencias idénticas provenientes de diferentes individuos; ^b distancia genética dentro de las especies; ^c distancia genética entre especies; ^d *Myotis*.

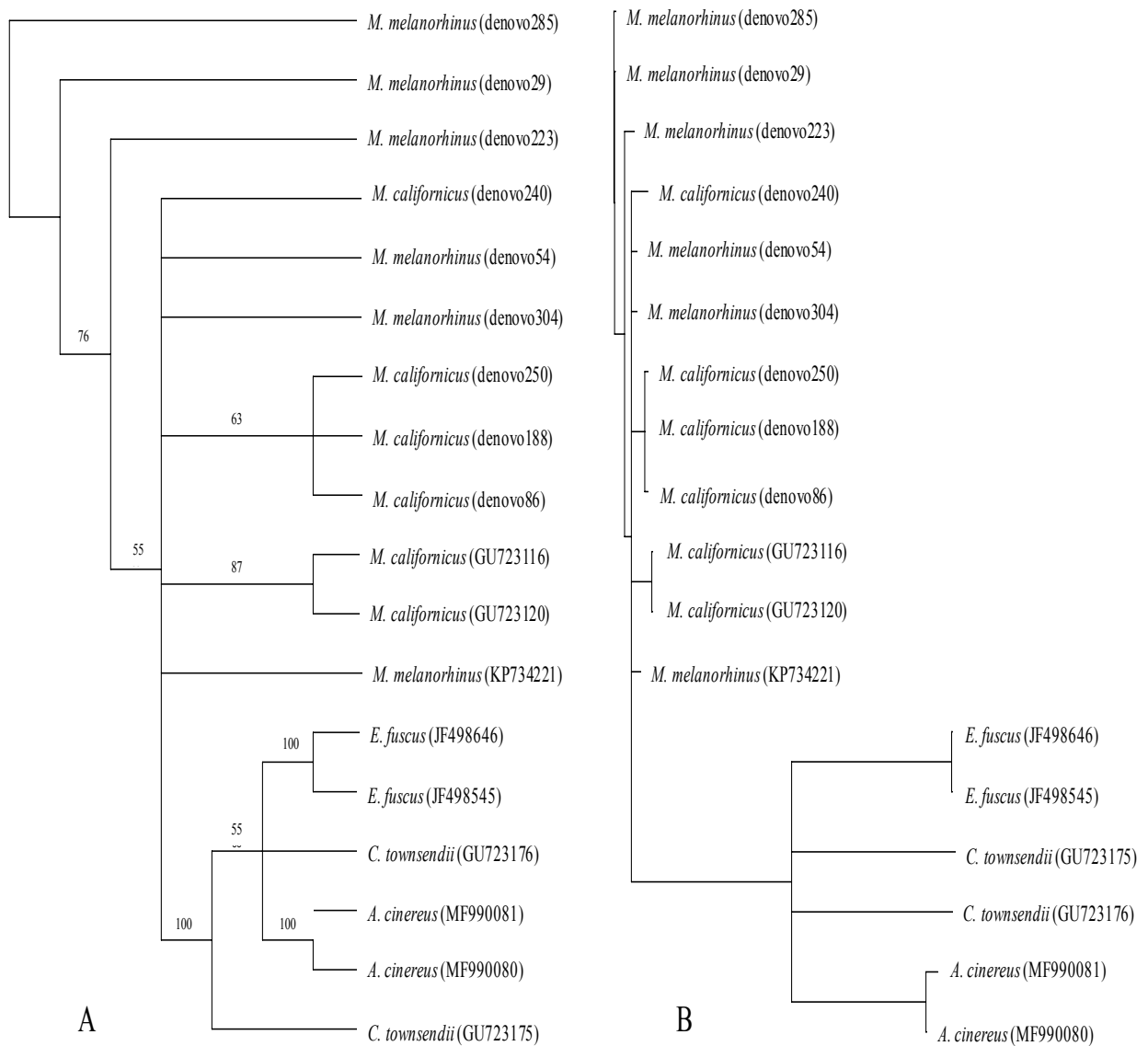


Fig. 5. Análisis de parsimonia y máxima verosimilitud de un fragmento de secuencia del gen *coxI* de 45 individuos de *Myotis*. A) Árbol más parsimonioso (L = 231, CI = 0.7143, RI = 0.7684). Los números sobre las ramas son los valores bootstrap de 1, 000 repeticiones >50. B) Árbol de máxima verosimilitud basado en el modelo de evolución HKY + I (ln L = 1495.526).

DISCUSIÓN

Identificación de las especies por características morfológicas y acústicas

En este trabajo se encontraron diferencias significativas en el tamaño corporal (i.e., el peso corporal y la longitud del antebrazo) de los individuos de *M. melanorhinus* y *M. californicus* (Tabla 3), en donde *M. melanorhinus* presentó valores de peso corporal y longitud de antebrazo relativamente mayores (peso= 5.38 ± 0.91 , longitud del antebrazo= 35.97 ± 2.4 y peso= 4.11 ± 0.92 , longitud del antebrazo 32.66 ± 1.5 para *M. melanorhinus* y *M. californicus* respectivamente). Estas diferencias son poco claras en otras regiones del continente (de ahí la problemática de distinguirlos por medio de rasgos morfológicos). Por ejemplo, Van Zyll de Jong (1985) mostraron que los miembros de *M. californicus* que se distribuyen en las regiones más norteñas del continente (Columbia Británica, Canadá) presentaron valores en el peso corporal de entre 3.3-5.4 g y una longitud del antebrazo de entre 33.3-34.2 mm. Lo mismo sucedió con los miembros de *M. melanorhinus* que habitan estas regiones (Columbia Británica, Saskatchewan, Canadá), los cuales presentaron valores de peso corporal y longitud del antebrazo de entre 3.3-5.9 g y 31.2-35.7 mm respectivamente (Hall 1981).

Estos resultados han generado controversia a lo largo de los años para asignar medidas estándares en la identificación de estas dos especies. Un caso similar ocurre con los miembros de *M. ciliolabrum*, donde los individuos son más grandes en el sur de los Estados Unidos que en el norte de los Estados Unidos o Canadá (Van Zyll de Jong 1985). Nuestros resultados sugieren que existe menos variación geográfica interespecífica en tamaño entre *M. melanorhinus* y *M. californicus* que habitan el centro y noreste de México con respecto a las poblaciones del norte del continente. Esto podría ser explicado por la regla ecogeográfica propuesta por Bergmann (1846), la cual propone que dentro de un género de vertebrados endotermos, las especies más grandes se encuentran en ambientes más fríos. Bergmann (1846) argumenta que un tamaño más grande se ve favorecido en ambientes más fríos porque proporciona una disminución relativa en la relación área de superficie-masa, lo que resulta en una menor pérdida de calor por unidad de masa (Mayr 1963). Esta explicación ha sido controversial y los fisiólogos han sugerido que el aislamiento y otros mecanismos de

conservación del calor deberían ser más importantes que los cambios en el tamaño corporal (Irving 1957, McNab 1971).

Los resultados de modelos biofísicos combinados con datos empíricos, sugieren una interacción entre las características de pelaje y el tamaño corporal de los individuos para su termorregulación (Steudel y cols. 1994). De acuerdo con estos estudios, los mamíferos más grandes deberían explicar los cambios en la temperatura con cambios en las características del pelaje. Por el contrario, los mamíferos más pequeños deberían compensar los cambios de temperatura con los cambios en el tamaño corporal. Por lo tanto, sobre la base del modelado de los efectos relativos de los cambios en el pelaje contra el tamaño para contrarrestar la pérdida de calor, los mamíferos más pequeños deberían seguir la regla de Bergmann con mayor regularidad que los mamíferos más grandes. Mayr (1963) restringió la regla de Bergmann a la variación dentro de las especies y sugirió que las regla ecogeográfica solo tienen validez en el nivel intraespecífico, desde ese momento la regla ha sido generalmente aceptada.

De acuerdo a los estudios mencionados, resulta congruente que las poblaciones de *M. melanorhinus* y *M. californicus* de nuestro estudio presenten menos variación geográfica inter e intraespecífica en tamaño, debido a que la temperatura de nuestros sitios de muestreo en México es más estable. No obstante, en este trabajo no se evaluó si existen diferencias significativas en la temperatura de los sitios de muestreo. Sin embargo respaldamos nuestra hipótesis en los resultados de estudios previos donde se encontró una correlación entre el tamaño corporal de varios grupos de mamíferos y la latitud (Owen y cols. 1984, Loy y cols. 1996, Worthy y cols. 1996). Por ejemplo, Rensch (1936) reportó que el 81% de las especies de mamíferos de América del Norte y el 60% de las especies europeas de mamíferos son más grandes en latitudes más altas. Esto podría explicar, porqué resulta más complicado distinguir entre estas dos especies mediante caracteres morfológicos en zonas de Estados Unidos y Canadá, donde las temperaturas son más frías (Bogan 1975, van Zyll de long 1985).

En cuanto a la identificación de *M. melanorhinus* y *M. californicus* por rasgos acústicos, se encontraron diferencias significativas en la *lf* la cual es mayor para *M. californicus* que para *M. melanorhinus*. Estos resultados concuerdan con estudios similares desarrollados con las mismas especies. Ryan y cols. (2001), en individuos capturados en el norte de México (Chihuahua, Sonora) observaron que *M. melanorhinus* presentó una *lf* menor (40.55) a *M.*

californicus (45.66). Estos resultados nos podrían brindar un mayor grado de certidumbre en este parámetro acústico para distinguir entre ambas especies. El hecho de que *M. melanorhinus* presente un valor de la l_f mayor a *M. californicus* puede ser explicado con estudios previos donde se ha demostrado que los murciélagos de mayor tamaño presentan una frecuencia mínima menor (Bogdanowicz y cols. 1999, Jones et al, 2000). Y esto a su vez concuerda con el resultado obtenido en este estudio donde se demostró que *M. melanorhinus* es relativamente de mayor tamaño que *M. californicus*.

Identificación molecular

El código de barras de ADN ha servido para identificar especies potencialmente crípticas en varios grupos animales incluyendo a los murciélagos (Clare y cols. 2007, Hernández y cols. 2012), no obstante, las descripciones de las especies derivadas de este método son relativamente escasas, debido a que no se pueden interpretar fácilmente sin la ayuda de la evaluación morfológica tradicional en el contexto de una revisión taxonómica (Cleare y cols. 2007). En este estudio, los análisis de parsimonia y máxima verosimilitud de las secuencias del gen *coxI* no ilustraron ningún patrón claro de monofilia dentro de las especies de este estudio (Fig. 1). Las topologías mostradas por ambos análisis fueron similares, las cuales mostraron patrones de polifilia, este patrón sugiere una divergencia reciente para *M. melanorhinus* y *M. californicus*. La divergencia de secuencias del *coxI* dentro y entre *M. melanorhinus* y *M. californicus* fue muy similar (Tabla 5). El promedio general interespecífico fue de 2.4%, mientras que los valores intraespecíficos promedio fueron de 2.1% y 1.5% para *M. melanorhinus* y *M. californicus* respectivamente. Este resultado es contrastante con otros estudios previos en murciélagos (Clare y cols. 2006, Hernández y cols. 2012), en donde se encontraron distancias interespecíficas mayores a 8.8% para el *coxI*, mientras que los valores intraespecíficos fueron generalmente menores a 2%.

Bradley y Baker (2001), señalaron que entre especies de murciélagos hermanas, la distancia genética promedio eran de alrededor del 6.83% y para una sola especie de murciélago los valores promediaban 3.0 %. De manera más específica, para el género *Myotis*, Ruedi y Mayer (2001), encontraron que las divergencias generalmente promediaban valores >10.10% entre especies, y los valores intraespecíficos eran generalmente <5.0%. El resultado obtenido en

este estudio es más consistente con valores intraespecíficos basados en los estudios mencionados anteriormente, lo que sugiere que *M. melanorhinus* y *M. californicus* han tenido un grado de divergencia diferente al de otras especies de murciélagos y de manera más específica a otras especies del género *Myotis*.

Roy y cols. (2007) sugirieron que dentro del género *Myotis* podrían estar ocurriendo algunos de los siguientes procesos: 1) transferencia horizontal de genes, 2) hibridación introgresiva y 3) clasificación incompleta del linaje. Se cree que la transferencia horizontal de genes es rara en eucariotes, sin embargo este fenómeno se ha documentado en murciélagos vespertilionidos pertenecientes al género *Myotis* (Pritham y Feschotte 2007). La hibridación en murciélagos puede ser relativamente común dada su tendencia a generar grupos en las cuevas con fines de reproducción. En el género *Myotis* Europeo, la formación de grupos ha permitido altos grados de hibridación entre *M. brandtii*, *M. mystacinus* y *M. alcaethoe* (Bogdanowicz y cols. 2012). La hibridación podría influir significativamente en las filogenias del género *Myotis* de una manera que conduce a una señal conflictiva entre los genomas nucleares y mitocondriales. Un posible escenario que podría explicar el resultado obtenido en este estudio sugiere una divergencia reciente entre *M. melanorhinus* y *M. californicus*. Esto concuerda con datos que indican que la divergencia del género *Myotis* se ha dado en aproximadamente 5-10 millones de años atrás (Lack y cols. 2010).

Se sugiere incluir marcadores nucleares en conjunto con mitocondriales para incrementar el nivel de certidumbre en la identificación molecular entre *M. melanorhinus* y *M. californicus*. Sin embargo, Roy y cols. (2017) revelaron que los genomas nucleares y mitocondriales del género *Myotis* han tenido distintas historias evolutivas. Estas observaciones indican que la discordancia entre los tipos de marcadores es mucho mayor que dentro del tipo de marcador. El conflicto entre los datos mitocondriales y nucleares puede deberse a un error en la estimación filogenética o puede reflejar discordancia genuina entre los dos tipos de marcadores. Además, se ha visto que dentro del género *Myotis*, los marcadores nucleares son más difíciles de obtener y proporcionan menos sitios informativos que en otras especies de murciélagos de otros géneros (Haynie y cols. 2016).

CONCLUSIÓN

A pesar de que diversos estudios desarrollados en Estados Unidos y Canadá han encontrado que es complicado identificar y distinguir entre los miembros de *Myotis melanorhinus* y *M. californicus* mediante medidas morfológicas debido a que estas se superponen dependiendo del sitio de muestreo donde se hayan colectado, en este estudio se encontró que en México es posible determinar la identidad de *M. melanorhinus* y *M. californicus* por características morfológicas. Sin embargo, es importante considerar que las diferencias en estos parámetros son mínimas y que esta condición podría seguir generando confusión en campo al momento de asignar una identidad de los individuos por rasgos morfológicos.

En este trabajo también se encontró que las especies se pueden identificar mediante características acústicas (a través de la medición de la *lf*). No obstante, la variación intraespecífica en las llamadas de ecolocación puede generar que este parámetro no sea considerado como una media estándar para distinguir a *M. melanorhinus* y *M. californicus* en regiones más al norte del continente; por lo que se sugiere explorar otros parámetros acústicos y/o otras metodologías de grabación de los individuos.

Se ha reportado que la divergencia de especies dentro del género *Myotis* es muy reciente (en aproximadamente 5-10 millones de años atrás), este fenómeno evolutivo puede explicar el porqué la información que aportaron las secuencias del *coxI* no fue suficiente para discriminar entre ambas especies de manera certera. Se sugiere ahondar más en descripciones morfológicas y acústicas para distinguir estas dos especies de murciélagos.

En conclusión, en este trabajo fue posible determinar la identidad de *M. melanorhinus* y *M. californicus* por características morfológicas y ultrasónicas. Sin embargo, los análisis de parsimonia y máxima verosimilitud del fragmento del gen *coxI* no proporcionaron información clara para identificar las dos especies. Los resultados de este estudio sugieren incluir características morfológicas y acústicas en conjunto para la identificación de especies de murciélagos que sean crípticas.

PERSPECTIVAS

Debido a los resultados obtenidos, se sugiere ampliar el esfuerzo de muestreo a más regiones del centro y norte del país con la finalidad de evaluar si se siguen presentando diferencias significativas en la morfología y llamadas de ecolocación en ambas especies, ya que este resultado podría representar tener al fin una medida estándar para la correcta identificación de *M. californicus* y *M. melanorhinus* en México. Además, se sugiere la secuenciación de genes nucleares adicionales de las 2 especies para tener poder obtener un mayor grado de certidumbre en la identificación de estas dos especies mediante técnicas moleculares.



Fig. 6. Individuo de *Myotis melanorhinus*, macho, adulto capturado en el PNLM.



Fig. 7. Individuo de *Myotis californicus*, macho, adulto capturado en el PNLM.

REFERENCIAS

1. Ahlen, I., and Baagøe, H. J. 1999. Use of ultrasound detectors for bat studies in Europe: experiences from field identification, surveys, and monitoring. *Acta Chiropterologica*, 1(2), 137-150.
2. Barclay, R. M. 1999. Bats are not birds, a cautionary note on using echolocation calls to identify bats: a comment. *Journal of Mammalogy*, 80(1), 290-296.
3. Bianconi, G. V., and Pedro, W. A. 2007. Familia Vespertilionidae. *Morcegos do Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina*, 167-195.
4. Bogan, M. A. 1975. Geographic variation in *Myotis californicus* in the southwestern United States and Mexico (No. 3). US Fish and Wildlife Service.
5. Borisenko, A. V., Lim, B. K., Ivanova, N. V., Hanner, R. H., and Hebert, P. D. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*, 8(3), 471-479.
6. Boyles, J. G., Cryan, P. M., McCracken, G. F., and Kunz, T. H. 2011. Economic importance of bats in agriculture. *Science*, 332(6025), 41-42.
7. Bogdanowicz, W., Fenton, M. B., and Daleszczyk, K. 1999. The relationships between echolocation calls, morphology and diet in insectivorous bats. *Journal of Zoology*, 247(3), 381-393.

8. Bogdanowicz, W., Piksa, K., and Tereba, A. 2012. Hybridization hotspots at bat swarming sites. *Plos one*, 7(12), e53334.
9. Bradley, R. D., and Baker, R. J. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, 82(4), 960-973.
10. Broders, H., Burns, L., and Lowe, A. 2013. Perhaps tissue samples for DNA analysis of bats should not be taken from the tail membrane. *Bat Research News*, 54, 25-26.
11. Burns, L. E., Frasier, T. R., and Broders, H. G. 2014. Genetic connectivity among swarming sites in the wide ranging and recently declining little brown bat (*Myotis lucifugus*). *Ecology and evolution*, 4(21), 4130-4149.
12. Clare, E. L., Lim, B. K., Engstrom, M. D., Eger, J. L., and Hebert, P. D. 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, 7(2), 184-190.
13. Clare, E. L., Lim, B. K., Fenton, M. B., and Hebert, P. D. 2011. Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes. *PloS one*, 6(7), e22648.
14. Constantine, D. G. 1998. An overlooked external character to differentiate *Myotis californicus* and *Myotis ciliolabrum* (Vespertilionidae). *Journal of Mammalogy*, 79(2), 624-630.
15. Darriba, D., and Posada, D. 2014. jModelTest 2.0 Manual v. 0.1. 1. Available at <http://evomics.org/learning/phylogenetics/jmodeltest/>
16. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
17. Fenton M. B. 1994 Echolocation: its impact on the behavior and ecology of bats. *Ecoscience* 1(1): 21-30.
18. Fenton, M. B., and Bell, G. P. 1981. Recognition of species of insectivorous bats by their echolocation calls. *Journal of Mammalogy*, 62(2), 233-243.
19. Fukui, D., Agetsuma, N., and Hill, D. A. 2004. Acoustic identification of eight species of bat (Mammalia: Chiroptera) inhabiting forests of southern Hokkaido, Japan: potential for conservation monitoring. *Zoological Science*, 21(9), 947-955.
20. Griffin, D. R., Webster, F. A., and Michael, C. R. 1960. The echolocation of flying insects by bats. *Animal behaviour*, 8(3-4), 141-154.
21. Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, T. A. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22(2), 160-174.
22. Haynie, M. L., Tsuchiya, M. T., Ospina-Garcés, S. M., Arroyo-Cabrales, J., Medellín, R. A., Polaco, O. J., and Maldonado, J. E. 2016. Placement of the rediscovered *Myotis planiceps* (Chiroptera: Vespertilionidae) within the *Myotis* phylogeny. *Journal of Mammalogy*, 97(3), 701-712.
23. Hebert, P. D., Cywinska, A., and Ball, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
24. Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.

25. Hernández-Dávila, A., Vargas, J. A., Martínez-Méndez, N., Lim, B. K., Engstrom, M. D., and Ortega, J. 2012. DNA barcoding and genetic diversity of phyllostomid bats from the Yucatan Peninsula with comparisons to Central America. *Molecular ecology resources*, 12(4), 590-597.
26. Irving, L. 1957. The usefulness of Scholander's views on adaptive insulation of animals. *Evolution* 11:257–260.
27. Johnsen, A., Rindal, E., Ericson, P. G., Zuccon, D., Kerr, K. C., Stoeckle, M. Y., and Liffeld, J. T. 2010. DNA barcoding of Scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal of Ornithology*, 151(3), 565-578.
28. Jones, G., Gordon, T., and Nightingale, J. 1992. Sex and age differences in the echolocation calls of the lesser horseshoe bat, *Rhinolophus hipposideros*. *Mammalia*, 56(2), 189-194.
29. Jones, G., Vaughan, N., and Parsons, S. 2000. Acoustic identification of bats from directly sampled and time expanded recordings of vocalizations. *Acta Chiropterologica*, 2(2), 155-170.
30. Jones, G., and Teeling, E. C. 2006. The evolution of echolocation in bats. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(3), 149-156.
31. Jones, G., and Bogdanowicz, W. 2009. Skull morphology of two cryptic bat species: *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus* a 3D geometric morphometrics approach with landmark reconstruction. *Acta Chiropterologica*, 11(1), 113-126.
32. Kalko, E. K. 1995. Insect pursuit, prey capture and echolocation in pipistrelle bats (Microchiroptera). *Animal Behaviour*, 50(4), 861-880.
33. Kunz, T. H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., and Fleming, T. H. 2011. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223(1), 1-38.
34. Kwiecinski, G. G., German, J. D., and Cannon, J. T. (2013). Bat facial and lip projections: unique integumentary morphology. In *Bat Evolution, Ecology, and Conservation* (pp. 93-109). Springer, New York, NY.
35. Lack, J. B., Roehrs, Z. P., Stanley Jr, C. E., Ruedi, M., and Van Den Bussche, R. A. 2010. Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). *Journal of Mammalogy*, 91(4), 976-992.
36. Loy, A., Di Martino, S., and Capolongo, D. 1996. Patterns of geographic variation of *Talpa romana* Thomas (Insectivora, Talpidae). Preliminary results derived from a geometric morphometrics approach. *Mammalia*, 60(1), 77-90.
37. Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem.
38. Mayr, E. 1982. The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance. Harvard University Press.
39. McNab, B. K. 1971. On the ecological significance of Bergmann's rule. *Ecology*, 52(5), 845-854.
40. Medellín, R. A., Arita, H. T., y Sanchez-Herrera, O. 1997. *Identificación de los murciélagos de México: clave de campo* (No. Sirsi) i9789709192100). Asociación Mexicana de Mastozoología.
41. Michener, C. D. 1970. Diverse approaches to systematics. *Evol. Biol.* 4:1–38.

42. Murray, K. L., Britzke, E. R., and Robbins, L. W. 2001. Variation in search-phase calls of bats. *Journal of Mammalogy*, 82(3), 728-737.
43. Nowak, R. M., Walker, E. P., Kunz, T. H., and Pierson, E. D. 1994. Walker's bats of the world. JHU Press.
44. Obrist, M. K. 1995. Flexible bat echolocation: the influence of individual, habitat and conspecifics on sonar signal design. *Behavioral ecology and sociobiology*, 36(3), 207-219.
45. O'Farrell, M. J., and Gannon, W. L. 1999. A comparison of acoustic versus capture techniques for the inventory of bats. *Journal of Mammalogy*, 80(1), 24-30.
46. Owen, J. G., Schmidly, D. J., and Davis, W. B. 1984. A morphometric analysis of three species of *Carollia* (Chiroptera, Glossophaginae) from Middle America. *Mammalia*, 48(1), 85-94.
47. Parsons, S., and Jones, G. 2000. Acoustic identification of twelve species of echolocating bat by discriminant function analysis and artificial neural networks. *Journal of Experimental Biology*, 203(17), 2641-2656.
48. Platt, R. N., Faircloth, B. C., Sullivan, K. A., Kieran, T. J., Glenn, T. C., Vandewege, M. W., and Ray, D. A. 2017. Conflicting evolutionary histories of the mitochondrial and nuclear genomes in New World *Myotis* bats. *Systematic biology*, 67(2), 236-249.
49. Pollock, T., Moreno, C. R., Sánchez, L., Ceballos-Vasquez, A., Faure, P. A., and Mora, E. C. 2016. Wound healing in the flight membranes of wild big brown bats. *The Journal of Wildlife Management*, 80(1), 19-26.
50. Pritham, E. J., and Feschotte, C. 2007. Massive amplification of rolling-circle transposons in the lineage of the bat *Myotis lucifugus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), 1895-1900.
51. ISO 690
52. Rensch, B. 1936. Studien über klimatische Parallelität der Merkmalsausprägung bei Vögeln und Säugern. *Archiv Fuer Naturgeschichte (NF)*, 5, 317-363.
53. Rodriguez, R. M., and Ammerman, L. K. 2004. Mitochondrial DNA divergence does not reflect morphological difference between *Myotis californicus* and *Myotis ciliolabrum*. *Journal of Mammalogy*, 85(5), 842-851.
54. Ruedi, M., and Mayer, F. 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 21(3), 436-448.
55. Russo, D., Jones, G., and Mucedda, M. 2001. Influence of age, sex and body size on echolocation calls of Mediterranean and Mehely's horseshoe bats, *Rhinolophus euryale* and *R. mehelyi* (Chiroptera: Rhinolophidae). *Mammalia*, 65(4), 429-436.
56. Russo, D., and Jones, G. 2002. Identification of twenty-two bat species (Mammalia: Chiroptera) from Italy by analysis of time-expanded recordings of echolocation calls. *Journal of Zoology*, 258(1), 91-103.
57. Schnitzler, H. U., and Kalko, E. K. 2001. Echolocation by Insect-Eating Bats: We define four distinct functional groups of bats and find differences in signal structure that correlate with the typical echolocation tasks faced by each group. *AIBS Bulletin*, 51(7), 557-569.
58. Simmons, N. B. 2005. An Eocene big bang for bats. *Science*, 307(5709), 527-528.
59. Simmons, N. B. 2009. Origen y evolución de los murciélagos. *Investigación y ciencia*, (390), 64-72.

60. Simmons, J. A., Fenton, M. B., and O'Farrell, M. J. 1979. Echolocation and pursuit of prey by bats. *Science*, 203(4375), 16-21.
61. Sneath, P. H., and Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco.
62. Sokal, R. R., and Crovello, T. J. 1970. The biological species concept: A critical evaluation. *Am. Nat.* 104:127-153.
63. Steudel, K., Porter, W. P., and Sher, D. 1994. The biophysics of Bergmann's rule: a comparison of the effects of pelage and body size variation on metabolic rate. *Canadian Journal of Zoology*, 72(1), 70-77.
64. Swofford, D. L. 2001. Paup*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4.0. B5.
65. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1596-1599.
66. Thomas, D. W., Bell, G. P., and Fenton, M. B. 1987. Variation in echolocation call frequencies recorded from North American vespertilionid bats: a cautionary note. *Journal of Mammalogy*, 68(4), 842-847.
67. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
68. Van Zyll, D. J. C., and Jong, C. 1985. Handbook of Canadian mammals. 2. *Bats*. Ottawa, ON: National Museums of Canada.
69. Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., and Hebert, P. D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
70. Worthy, T. H., Daniel, M. J., and Hill, J. E. 1996. An analysis of skeletal size variation in *Mystacina robusta* Dwyer, 1962 (Chiroptera: Mystacinidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 23(2), 99-110.