



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**FILOGENIA DEL MURCIÉLAGO ENDÉMICO**  
*Myotis peninsularis* (CHIROPTERA,  
VESPERTILIONIDAE) CON ADN MITOCONDRIAL  
Y ANÁLISIS DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
Orientación: Ecología de Zonas Áridas

P r e s e n t a

**Laura Alejandra Nájera Cortazar**

La Paz, Baja California Sur, 20 de Septiembre del 2013

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 6 del Mes de Septiembre del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Filogenia del murciélago endémico *Myotis peninsularis* (Chiroptera, Vespertilionide) con ADN mitocondrial y análisis de morfometría geométrica"**

Presentada por el alumno:

**Laura Alejandra Nájera Cortazar**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Ecología de Zonas Áridas**


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISION REVISORA



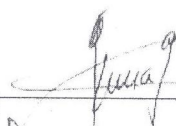
---

Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda  
DIRECTOR DE TESIS



---

Dr. Pedro Cruz Hernández  
CO-TUTOR



---

Dr. Efraín de Luna  
CO-TUTOR



---

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

### **Director de Tesis**

Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

### **Co-tutor**

Dr. Pedro Cruz Hernández  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

### **Co-tutor**

Dr. Efraín de Luna  
Instituto de Ecología, A. C.

## JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Pedro Cruz Hernández  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Efraín de Luna  
Instituto de Ecología, A. C.

### **Suplente**

Dr. Pedro Peña Garcillán  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

## RESUMEN

*Myotis peninsularis*, es un murciélago endémico a la región de los Cabos, Baja California Sur, México, para el que actualmente no se tiene clara su situación filogenética. Anteriormente, era considerado como subespecie de *M. velifer*. Con la finalidad de conocer su identidad taxonómica, se realiza un estudio sobre las relaciones filogenéticas de *Myotis peninsularis* a partir de datos moleculares y de morfometría geométrica. Se utilizaron dos genes mitocondriales, el citocromo oxidasa subunidad I (COI) y el citocromo *b* (Cyt. *b*). Los análisis filogenéticos (Máxima Verosimilitud, Máxima Parsimonia, Inferencia Bayesiana, Neighbor-Joining) muestran que los individuos de *M. peninsularis* y *M. velifer* son grupos hermanos, y en conjunto pertenecen a un clado monofilético. La especie hermana fue *M. yumanensis*. En el análisis de distancias genéticas se obtuvieron en promedio porcentajes menores al 2%, valores entre los intervalos de subespecie. Los análisis de morfometría geométrica demostraron la existencia de variación en la forma craneal, entre *M. peninsularis*, dos subespecies de *M. velifer* y *M. yumanensis*. Se obtienen cuatro morfotipos distintos que se corresponden con la distribución de procedencia. Las diferencias más importantes se ubicaron en la zona de la caja craneal así como en la robustez del arco zigomático en las tres vistas (ventral, dorsal y lateral). La vista lateral, fue la más discriminante. La cresta sagital en *M. peninsularis* es más procumbente en la parte anterior que la posterior de la caja craneal y *M. velifer* de forma contraria. La pendiente de la línea rostral es más abrupta en *M. velifer*. Morfológicamente, los tres linajes poseen una variación que tiende a la existente entre las poblaciones mexicanas de *M. velifer*, pero con morfotipo específico, asociados a la distribución. En resultados filogenéticos combinados y de configuración de marcas, la forma ancestral se corresponde con una forma intermedia entre *M. peninsularis* y *M. velifer*; presentando variación similar a la que se muestra intra-específicamente en *M. velifer*. Debido a los resultados obtenidos, se propone considerar a *M. peninsularis* como una población de *M. velifer*.

**Palabras Clave:** Cráneo, filogenia, morfometría geométrica, *Myotis peninsularis*.

## ABSTRACT

*Myotis peninsularis*, an endemic bat from the Cape Region, in Baja California Sur, Mexico, has currently no clear his phylogenetic status. Previously, it used to be considered as a subspecies of *M. velifer*. In order to know its taxonomic identity, a study was performed on the phylogenetic relationships of *Myotis peninsularis*, from molecular and geometric morphometric data. Two mitochondrial genes where analyzed: Cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome *b* (Cyt. *b*). Phylogenetic analysis (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian Inference, and Neighbor-Joining) shows that *M. peninsularis* and *M. velifer* are sister groups, and together belongs to a monophyletic clade. The sister species was *M. yumanensis*. In the distance analysis, average percentages were less than 2%, right between subspecies intervals. The geometric morphometrics analysis showed the existence of variation in skull shape between *M. peninsularis*, two subspecies of *M. velifer* and *M. yumanensis*. It was obtained four different morphotypes, corresponding to their distribution. The most important differences were located in the area of the braincase and the robustness of the zygomatic arch in the three views (ventral, dorsal and lateral). The lateral view was the most discriminating. The sagittal crest in *M. peninsularis* is more procumbent in the front than the rear of the braincase, while in *M. velifer* is in the opposite way. The slope line at the rostral side view is more abrupt in *M. velifer*. Morphologically, the three lineages have a tendency to vary as in between Mexican populations of *M. velifer*, but each having a specific morphotype, associated to their distribution. In combined phylogenetic and landmarks configurations results, the ancestral shape correspond to an intermediate shape between *M. peninsularis* and *M. velifer*, showing variation as an intra-specific variation in respect to *M. velifer*. Because the results obtained, it is proposed to consider *M. peninsularis* as a population of *M. velifer*.

**Key words:** Geometric morphometrics, *Myotis peninsularis*, phylogeny, skull.

## **DEDICATORIA**

A mi madre y mi tía. A mi familia y seres queridos, todos quienes me apoyaron.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por la oportunidad brindada, así como a CONACYT por la beca otorgada, con número 415169, para mis estudios de posgrado.

A mi director el Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda por las facilidades mostradas, el aprendizaje y apoyo obtenido durante el desarrollo de mi posgrado. A mi co-tutor, el Dr. Pedro Cruz Hernández por sus recomendaciones y motivación en mi trabajo de tesis. Al Dr. Efraín de Luna por sus conocimientos brindados y por mostrarme otras dimensiones.

A las facilidades provistas por los curadores de las colecciones mastozoológicas visitadas: al Dr. Fernando Cervantes de la Colección Nacional de Mamíferos; Dra. Livia León Paniagua de la Facultad de Ciencias, (Universidad Nacional Autónoma de México); al M. en C. Juan Carlos López Vidal del Instituto Politécnico Nacional y al Dr. Noé González Ruiz por proporcionar fotografías de ejemplares depositados en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Al laboratorio de mastozoología del CIBNOR, a Mayra de La Paz e Izmene Gutiérrez por la ayuda en el laboratorio y consejos brindados. A Griselda Gallegos por su ayuda con los análisis moleculares. Al Dr. Ignacio Leyva Valencia por sus consejos y ayuda en los análisis morfológicos y filogenéticos; al Dr. Enrique Morales Bojórquez por la ayuda con los análisis estadísticos, y al Dr. Pedro Peña Garcillán por las recomendaciones ofrecidas y las predicciones cumplidas.

A mis compañeros de maestría, por las aventuras, aprendizaje y apoyo compartido.

Al personal del laboratorio de cómputo, de la biblioteca, personal de posgrado e integrantes de la academia de Ecología de Zonas áridas, y en general al CIBNOR, por todas las atenciones y facilidades brindadas, bajo un ambiente de trabajo e investigación de excelencia.

## COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

### **Director de Tesis**

Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

### **Co-tutor**

Dr. Pedro Cruz Hernández  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

### **Co-tutor**

Dr. Efraín de Luna  
Instituto de Ecología, A. C.

## JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Pedro Cruz Hernández  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Efraín de Luna  
Instituto de Ecología, A. C.

### **Suplente**

Dr. Pedro Peña Garcillán  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.



## RESUMEN

*Myotis peninsularis*, es un murciélago endémico a la región de los Cabos, Baja California Sur, México, para el que actualmente no se tiene clara su situación filogenética. Anteriormente, era considerado como subespecie de *M. velifer*. Con la finalidad de conocer su identidad taxonómica, se realiza un estudio sobre las relaciones filogenéticas de *Myotis peninsularis* a partir de datos moleculares y de morfometría geométrica. Se utilizaron dos genes mitocondriales, el citocromo oxidasa subunidad I (COI) y el citocromo *b* (Cyt. *b*). Los análisis filogenéticos (Máxima Verosimilitud, Máxima Parsimonia, Inferencia Bayesiana, Neighbor-Joining) muestran que los individuos de *M. peninsularis* y *M. velifer* son grupos hermanos, y en conjunto pertenecen a un clado monofilético. La especie hermana fue *M. yumanensis*. En el análisis de distancias genéticas se obtuvieron en promedio porcentajes menores al 2%, valores entre los intervalos de subespecie. Los análisis de morfometría geométrica demostraron la existencia de variación en la forma craneal, entre *M. peninsularis*, dos subespecies de *M. velifer* y *M. yumanensis*. Se obtienen cuatro morfotipos distintos que se corresponden con la distribución de procedencia. Las diferencias más importantes se ubicaron en la zona de la caja craneal así como en la robustez del arco zigomático en las tres vistas (ventral, dorsal y lateral). La vista lateral, fue la más discriminante. La cresta sagital en *M. peninsularis* es más procumbente en la parte anterior que la posterior de la caja craneal y *M. velifer* de forma contraria. La pendiente de la línea rostral es más abrupta en *M. velifer*. Morfológicamente, los tres linajes poseen una variación que tiende a la existente entre las poblaciones mexicanas de *M. velifer*, pero con morfotipo específico, asociados a la distribución. En resultados filogenéticos combinados y de configuración de marcas, la forma ancestral se corresponde con una forma intermedia entre *M. peninsularis* y *M. velifer*; presentando variación similar a la que se muestra intra-específicamente en *M. velifer*. Debido a los resultados obtenidos, se propone considerar a *M. peninsularis* como una población de *M. velifer*.

**Palabras Clave:** Cráneo, filogenia, morfometría geométrica, *Myotis peninsularis*.

## ABSTRACT

*Myotis peninsularis*, an endemic bat from the Cape Region, in Baja California Sur, Mexico, has currently no clear his phylogenetic status. Previously, it used to be considered as a subspecies of *M. velifer*. In order to know its taxonomic identity, a study was performed on the phylogenetic relationships of *Myotis peninsularis*, from molecular and geometric morphometric data. Two mitochondrial genes where analyzed: Cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome *b* (Cyt. *b*). Phylogenetic analysis (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Bayesian Inference, and Neighbor-Joining) shows that *M. peninsularis* and *M. velifer* are sister groups, and together belongs to a monophyletic clade. The sister species was *M. yumanensis*. In the distance analysis, average percentages were less than 2%, right between subspecies intervals. The geometric morphometrics analysis showed the existence of variation in skull shape between *M. peninsularis*, two subspecies of *M. velifer* and *M. yumanensis*. It was obtained four different morphotypes, corresponding to their distribution. The most important differences were located in the area of the braincase and the robustness of the zygomatic arch in the three views (ventral, dorsal and lateral). The lateral view was the most discriminating. The sagittal crest in *M. peninsularis* is more procumbent in the front than the rear of the braincase, while in *M. velifer* is in the opposite way. The slope line at the rostral side view is more abrupt in *M. velifer*. Morphologically, the three lineages have a tendency to vary as in between Mexican populations of *M. velifer*, but each having a specific morphotype, associated to their distribution. In combined phylogenetic and landmarks configurations results, the ancestral shape correspond to an intermediate shape between *M. peninsularis* and *M. velifer*, showing variation as an intra-specific variation in respect to *M. velifer*. Because the results obtained, it is proposed to consider *M. peninsularis* as a population of *M. velifer*.

**Key words:** Geometric morphometrics, *Myotis peninsularis*, phylogeny, skull.

## **DEDICATORIA**

A mi madre y mi tía. A mi familia y seres queridos, todos quienes me apoyaron.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por la oportunidad brindada, así como a CONACYT por la beca otorgada, con número 415169, para mis estudios de posgrado.

A mi director el Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda por las facilidades mostradas, el aprendizaje y apoyo obtenido durante el desarrollo de mi posgrado. A mi co-tutor, el Dr. Pedro Cruz Hernández por sus recomendaciones y motivación en mi trabajo de tesis. Al Dr. Efraín de Luna por sus conocimientos brindados y por mostrarme otras dimensiones.

A las facilidades provistas por los curadores de las colecciones mastozoológicas visitadas: al Dr. Fernando Cervantes de la Colección Nacional de Mamíferos; Dra. Livia León Paniagua de la Facultad de Ciencias, (Universidad Nacional Autónoma de México); al M. en C. Juan Carlos López Vidal del Instituto Politécnico Nacional y al Dr. Noé González Ruiz por proporcionar fotografías de ejemplares depositados en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Al laboratorio de mastozoología del CIBNOR, a Mayra de La Paz e Izmene Gutiérrez por la ayuda en el laboratorio y consejos brindados. A Griselda Gallegos por su ayuda con los análisis moleculares. Al Dr. Ignacio Leyva Valencia por sus consejos y ayuda en los análisis morfológicos y filogenéticos; al Dr. Enrique Morales Bojórquez por la ayuda con los análisis estadísticos, y al Dr. Pedro Peña Garcillán por las recomendaciones ofrecidas y las predicciones cumplidas.

A mis compañeros de maestría, por las aventuras, aprendizaje y apoyo compartido.

Al personal del laboratorio de cómputo, de la biblioteca, personal de posgrado e integrantes de la academia de Ecología de Zonas áridas, y en general al CIBNOR, por todas las atenciones y facilidades brindadas, bajo un ambiente de trabajo e investigación de excelencia.

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE APÉNDICES .....	vi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Taxonomía y distribución.....	7
2.2 Descripción del género <i>Myotis</i> .....	8
2.4 Relaciones filogenéticas de las especies del género <i>Myotis</i> .....	9
2.5 Distancia genética.....	11
2.6 Morfometría geométrica.....	12
2.7 Disparidad.....	13
2.8 Morfometría geométrica y filogenia.....	14
2.9 Respuestas al ambiente.....	15
2.10 Conservación .....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
6. 1 Área de estudio .....	21
6.1.1 Vegetación .....	21
6.1.2 Clima.....	22
6.2 Ejemplares analizados .....	22
6.3 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN .....	23
6.4 Alineación de secuencias.....	24
6.5 Selección de modelos de sustitución .....	25
6.6 Análisis filogenéticos .....	25

6.6.1	Análisis de verosimilitud .....	25
6.6.2	Análisis con parsimonia .....	26
6.6.3	Análisis bayesianos .....	27
6.6.4	Análisis de distancias .....	28
6.5	Análisis de morfometría geométrica.....	28
6.5.1	Registro de la forma.....	29
6.5.2	Análisis generalizado de Procrustes.....	31
6.5.3	Variación de la forma intra-específica de <i>M. velifer</i> .....	32
6.5.4	Variación de la forma entre <i>M. peninsularis</i> y <i>M. velifer</i> .....	33
6.5.5	Disparidad .....	34
6.5.6	Filogenia y formas ancestrales .....	34
7.	RESULTADOS .....	35
7.1	Análisis filogenéticos .....	35
7.1.1	Análisis de verosimilitud .....	35
7.1.2	Análisis con parsimonia .....	37
7.1.3	Análisis bayesianos .....	39
7.1.4	Análisis de distancias .....	41
7.2	Análisis de morfometría geométrica.....	43
7.2.1	Variación intra-específica de <i>M. velifer</i> .....	43
7.2.2	Variación de la forma entre <i>M. peninsularis</i> y <i>M. velifer</i> .....	48
7.2.3	Disparidad .....	58
7.2.4	Filogenia y formas ancestrales .....	60
8.	DISCUSIÓN.....	63
9.	CONCLUSIÓN .....	70
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	72

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribución de *M. peninsularis* en azul (cuadro izq.) y *M. velifer* (der.), con la distribución de *M. v. velifer* en verde, *M. v. incautus* en café, *M. v. grandis* y *magnamolaris* en rojo y *M. v. brevis* en amarillo (Google, 2013). .....4
- Figura 2. Ejemplares del género *Myotis* de la colección mastozoológica del CIB. De izquierda a derecha, a) *M. velifer*, b) *M. peninsularis* y c) *M. yumanensis*. .....5
- Figura 3. Árbol de Jones *et al.* (2002) del género *Myotis* (sección *n*) y ampliaciones de la politomía dónde se encuentran las tres especies del presente estudio (*M. peninsularis*, *M. velifer* y *M. yumanensis*, subrayados). Son parte del árbol de la familia Vespertilionidae y ésta a su vez, parte del árbol del orden Chiroptera. .... 10
- Figura 4. Relaciones filogenéticas del género *Myotis* para las especies del continente americano del árbol filogenético de máxima parsimonia con Cyt. *b*, que denota los subclados Neotropical, Paleártico y Neártico. *Myotis velifer* y *M. yumanensis* (subrayado) se encuentran el en subclado Neotropical, como especies hermanas (Modificado de Stadelmann *et al.*, 2007). ..... 11
- Figura 5. Vegetación principal de la Región del Cabo. ....21
- Figura 6. Vista a) ventral, b) lateral y c) dorsal del cráneo de *Myotis peninsularis* con sus correspondientes 16, 14 y 10 marcas o puntos de referencia digitalizados. ....31
- Figura 7. Árboles filogenéticos de COI (arriba) y Cyt. *b* (abajo) bajo el criterio de Máxima Verosimilitud (ML) realizados en PAUP y GARLI de las secuencias de de *Myotis*. El número en las ramas es el soporte estadístico de bootstrap para cada clado, PAUP (arriba de rama) Garli (bajo de rama). No se muestran valores <50%. Visualizado en FigTree. ....36
- Figura 8. Topología de los árboles obtenidos con los marcadores COI (arriba) y Cyt. *b* (abajo) con el método de Máxima Parsimonia realizados en PAUP. El número en las ramas es el soporte estadístico de bootstrap. No se muestran valores <50%. Visualizado en FigTree. ....37
- Figura 9. Topología de los árboles obtenidos con los marcadores COI (arriba), y Cyt. *b* (abajo) con el método de MP realizados en WinClada. El número en el lado superior de la rama es el soporte estadístico de bootstrap, y de lado inferior es de Jackknife. Visualizado en FigTree. ....39
- Figura 10. Topología del árbol obtenido con Inferencia Bayesiana con el marcador COI (arriba) y Cyt. *b* (abajo). Soporte estadístico de bootstrap se muestra en las ramas. No se muestran valores <50%. Árbol visualizado en FigTree. ....40
- Figura 11. Árboles de distancias con el marcador COI (arriba) y Cyt. *b* (abajo) hechos con el método de NJ en PAUP. Se muestran el porcentaje de distancia (sobre la rama) y el valor de Bootstrap (bajo la rama). Visualizado en FigTree. ....42

- Figura 12. Planos de ordenación (izq.) de los primeros dos componentes principales de las subespecies de *M. velifer*, de las caras ventral (a) lateral (b) y dorsal (c), con sus respectivas deformaciones promedio (der.), y la imagen del cráneo. ....45
- Figura 13. Planos de ordenación (izq.) de las variables canónicas que visualizan la conformación establecida a priori de las subespecies *M. v. incautus* y *M. v. velifer*. Se observan la vista ventral (a), y dorsal (b) (la lateral no fue significativa), con sus respectivas gradillas de deformación promedio (der.).....47
- Figura 14. Planos de ordenación de componentes principales de la vista ventral. Plano de ordenación con 2 ejes (a) obtenido en PCAGen. El segundo plano (b) muestra tres dimensiones (realizado en CoordGen), permitiendo visualizar la localización de *M. yumanensis* en comparación a la de los individuos de las otras dos especies. ....50
- Figura 15. Planos de ordenación de los primeros dos componentes principales de la vista lateral (a) y dorsal (b) en PCAGen.....51
- Figura 16. Gráfica del ANOVA del tamaño centroide obtenido con los Partial Warps del AVC. Los intervalos de confianza se representan en las barras verticales de cada especie, a los lados del promedio.....52
- Figura 17. Planos de ordenación de variables canónicas de las vistas a) ventral, b) lateral, y c) dorsal de los cuatro grupos analizados. Se muestra una gráfica de promedios con su intervalo de confianza del 0.95% (barras verticales) por cada uno de los tres ejes significativos. En las tres vistas, de arriba hacia abajo, se muestran las gráficas de las primeras tres variables canónicas. ..54
- Figura 18. Gradillas de deformación de la vista ventral. Los vectores muestran la dirección e intensidad de la deformación de las estructuras. Se denotan una gradilla por cuadrante para observar los cambios en el cráneo según la posición de los ejemplares. ....55
- Figura 19. Gradillas de deformación de la vista lateral. Los vectores muestran la dirección e intensidad de la deformación de las estructuras. Se denotan una gradilla por cuadrante para observar los cambios en el cráneo según la posición de los ejemplares. ....56
- Figura 20. Gradillas de deformación de la vista dorsal. Los vectores muestran la dirección e intensidad de la deformación de las estructuras. Se denotan una gradilla por cuadrante para observar los cambios en el cráneo según la posición de los ejemplares. ....57
- Figura 21. Disparidad de los cuatro grupos analizados basados en distancias procrustes .....59
- Figura 22. Árboles filogenéticos obtenidos en TNT con un mapeo del promedio de las configuraciones de marcas y de una forma ancestral inferida en cada uno de los nodos ancestrales. Configuración ventral (a), lateral (b) y dorsal (c).....62



## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Número de haplotipos de cada especie del género <i>Myotis</i> por secuencias analizadas. ....	24
Tabla II. Tabla de porcentaje de distancias genéticas por marcador entre las especies de <i>Myotis</i> . Parámetro de distancia Kimura 2 parameter (Kimura, 1981) con bootstrap de 1000 repeticiones. Distancias genéticas mediante el modelo correspondiente a cada marcador. Se muestra el promedio ( <i>prom.</i> ) de la distancia genética obtenida por los tres haplotipos de <i>M. velifer</i> con respecto a <i>M. peninsularis</i> y a <i>M. yumanensis</i> .....	41
Tabla III. Porcentaje de varianza explicada obtenida por el primer componente principal (CP1) y el componente principal 2 (CP2) en el análisis de variación de la forma intra-específica de <i>M. velifer</i> .....	43
Tabla IV. Análisis de asignación de ejemplares a un grupo definido a priori mediante el método de Jackknife en CVAGen para las comparaciones entre las <i>M. peninsularis</i> , las subespecies de <i>M. velifer</i> y <i>M. yumanensis</i> , en las tres vistas de los cráneos. Los valores en comparación, son el porcentaje del total por especie de cada vista. ....	48
Tabla V. Porcentaje de varianza explicada obtenida por el componente principal 1 (CP1) y el componente principal 2 (CP2) en el análisis de variación de la forma entre <i>M. peninsularis</i> , las subespecies de <i>M. velifer</i> y <i>M. yumanensis</i> .....	49
Tabla VI. Valores obtenidos en el análisis de significancia con MANOVA realizado en CVAGen. ....	53
Tabla VII. Disparidad de los cuatro grupos basados en distancias Procrustes con el método de Foote. Se realizaron también análisis de Bootstrap como soporte estadístico y para obtener los intervalos de confianza.....	58
Tabla VIII. Contribución por especie a la disparidad medida con distancias procrustes.....	60

## LISTA DE APÉNDICES

Apéndice i. Lista de los ejemplares utilizados para los análisis filogenéticos con COI y Cyt. <i>b</i> . En caso de que no estuvieran sometidas en GenBank o en Bold Systems (The barcode of Life), se les colocó ND (No Datos). Las abreviaciones de las instituciones son las siguientes: CIBNOR ( <i>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste</i> ), COFE ( <i>Centre of Expertise For Rabies, Ottawa Laboratory Fallowfield (OLF) Canadian Food Inspection Agency</i> ), ECO-SC ( <i>El Colegio de la Frontera Sur</i> ), DR. M. FORSTNER ( <i>Dr. M. Forstner's tissue collection</i> ), MVZ ( <i>The Museum of Vertebrate Zoology of Berkeley</i> ), OSE ( <i>Odum School of Ecology, University of Georgia, USA</i> ) Texas Tech ( <i>The Museum of Texas Tech University</i> ). Las abreviaciones para los estados utilizados son: BCS (Baja California Sur), CHPS (Chiapas), Ca. (California, U. S. A.), COH (Coahuila), NL (Nuevo León), SON (Sonora). .....	87
Apéndice ii. Cráneos examinados. Las colecciones mastozoológicas visitadas se abrevian como se lista en materiales y métodos. Los estados de la República Mexicana se listan al inicio de sus ejemplares.....	89

## 1. INTRODUCCIÓN

México es un país considerado como megadiverso (Toledo, 1988; Ramamoorthy, 1993; Cantú *et al.*, 2004), debido a la complejidad de su topografía, sus elementos biológicos y su ubicación en dos regiones biogeográficas (Neártica y Neotropical). México está entre el segundo y tercer lugar en riqueza de mamíferos a nivel mundial, con aproximadamente el 32% de ellos endémicos (Ceballos *et al.*, 1998) incluyendo a 15 especies de murciélagos (Ceballos *et al.*, 2002a; Medellín, 2003). Debido a la gran cantidad de elementos endémicos, la importancia de la investigación para la conservación de las especies en México es vital. La preservación de la integridad biológica y ambiental es tan importante como los estudios sobre la diversidad genética y molecular de las especies y poblaciones. Para ello se utilizan numerosas herramientas moleculares, como los análisis filogenéticos. La diversidad filogenética evalúa la historia evolutiva entre los organismos, siendo también una forma de valorar la diversidad más relevante y menos afectable por la variación en la clasificación taxonómica de la riqueza de especies (Schipper *et al.*, 2008). Como en otros organismos, el conocimiento de la filogenia y biogeografía de los murciélagos, es esencial para el conocimiento de las diferencias en la distribución y composición de las especies (Kalko, 1994).

Actualmente, el ADN mitocondrial (ADNmt) es ampliamente utilizado en los estudios moleculares para la investigación en vertebrados, especialmente en mamíferos (Waits *et al.*, 1998; Ditchfield, 2000; Teeling *et al.*, 2005; Tobe *et al.*, 2010; Meganathan *et al.*, 2012). La falta de intrones, la herencia vía materna (haploide), la no recombinación sexual, entre otras características, permiten al ADNmt ser una de las herramientas más informativas para la estimación de filogenias (Hebert *et al.*, 2003). El citocromo *b* (Cyt *b*), se utiliza en la mayoría de los análisis moleculares en mamíferos (Avise *et al.*, 1987; Bradley y Baker, 2001; Xiao-Ming *et al.*, 2008; Alvarez-Castañeda y Cortés-Calva, 2011; Larsen *et al.*, 2012a), ha mostrado ser particularmente útil como marcador filogenético. El citocromo oxidasa subunidad I (COI) es otro de los genes mitocondriales utilizados para la investigación molecular en vertebrados (Hebert *et al.*, 2003; Clare *et al.*, 2007, 2011; Francis *et al.*, 2010). Parece poseer un mayor intervalo de

señales filogenéticas que otros genes mitocondriales (Hebert *et al.*, 2003). También puede ser usado para estimar la riqueza de especies, elegido por ello para proyectos de gran magnitud como el código de barras de la vida (Clare *et al.*, 2007; Ratnasingham y Hebert, 2007; Francis *et al.*, 2010).

El estudio cuantitativo de los caracteres morfológicos ha consistido tradicionalmente en comparar la variación en términos de distancias, ángulos y en el tamaño relativo de estructuras determinadas (Bogdanowicz *et al.*, 2005; Mancina y Balseiro, 2010). Una de las mayores ventajas de los análisis morfológicos es el acceso a la gran cantidad de especímenes de colecciones que existen y que recopilan información desde el tiempo en que se comenzaron a hacer este tipo de preservación de muestras (Wiens, 2000). Esto permite un mayor número de ejemplares analizados, de varias localidades y de distintas épocas. El estudio de la forma mediante morfometría geométrica representa una nueva herramienta basada en coordenadas obtenidas con puntos de referencia en las estructuras analizadas (Bookstein, 1999; Zelditch *et al.*, 2004). Estos análisis permiten visualizar los cambios en la forma de los organismos omitiendo la variación por ubicación, rotación y escala. Gracias a esto, se puede obtener por separado la variación en la forma y tamaño que una especie puede presentar al responder a diferentes historias filogenéticas, presiones selectivas o roles funcionales; incluso a nivel poblacional (Bookstein, 1999; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004).

Actualmente, determinar una categoría taxonómica mediante un solo método provee de menor nivel de información. Cuando se trata de especies de gran variación inter e intra-específica, amplio espectro de distribución, filogenéticamente cercanas o que comparten un mismo ambiente (Barčiová, 2009; Evin *et al.*, 2011; Marchán-Rivadeneira *et al.*, 2012), la integración de varias técnicas resulta más efectivo. La variación morfológica de los organismos depende tanto de la señal filogenética, como de la presión adaptativa al ambiente que habitan (Caumul y Polly, 2005; Barčiová, 2009; Moratelli y Oliveira, 2011). Los morfotipos de las especies resultan de herencia filogenética o de la adaptación de éstas a su ambiente, por lo que se considera que cada especie es distinguible morfológicamente, distinguiéndose en correspondencia a su ambiente en particular. Numerosos trabajos recomiendan combinar datos moleculares y morfológicos para una identificación más eficiente y precisa de las especies de

murciélagos (Caumul y Polly, 2005; Stadelmann *et al.*, 2007; Clare *et al.*, 2011; Larsen *et al.*, 2012a), así como de las adaptaciones evolutivas y ambientales (Monteiro y Nogueira, 2010; Marchán-Rivadeneira *et al.*, 2012).

El entendimiento de la distribución espacial de los fenotipos y sus asociaciones con los ambientes locales pueden proveer de descubrimientos importantes para la historia evolutiva y dinámica ecológica de las especies (Marchán-Rivadeneira *et al.*, 2012), así como sus relaciones filogenéticas (DeSalle y Amato, 2004; Allendorf, W. y Luikart, 2007). El endemismo puede permitir proteger el ambiente, mediante el estudio de estas especies (entre otras) se sustentan labores de protección y conservación (Margules y Pressey, 2000; DeSalle y Amato, 2004). También puede permitir poner en la mira a poblaciones cuyo número de individuos puede estar en riesgo a disminuir drásticamente, usualmente debido a su distribución restringida y poco número de individuos. Los estudios filogenéticos y morfológicos permiten esclarecer la riqueza de una zona (Francis *et al.*, 2010) y determinar qué elementos de esa riqueza necesitan ser protegidos debido a su estado de importancia taxonómica e incluso a su vulnerabilidad potencial. La investigación a mayor detalle y diferentes escalas son de vital importancia para la preservación de los recursos y la creación de estrategias de conservación.

El género *Myotis* pertenece a la familia Vespertilionidae, la más grande y de las más diversas del orden Chiroptera. Este género es de complicada diferenciación taxonómica debido a la similitud que existe entre sus especies (LaVal, 1973; Ruedi y Mayer, 2001; Dewey, 2006; Stadelmann *et al.*, 2007; Evin *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2012b). Es poco usual que presenten especializaciones morfológicas que permitan hacer una distinción clara entre especies (LaVal, 1973). Debido a la variación propia del género en función de procesos históricos, genéticos y a su amplio espectro de distribución, la variación inter e intra-específica es bastante extensa.

*Myotis peninsularis* fue descrito por Miller (1898) como una especie nueva de la Baja California, morfológicamente similar a *M. velifer*, pero más pequeño. Revisiones taxonómicas posteriores posicionaron a *M. peninsularis* como subespecie de *M. velifer* (Miller y Allen, 1928; Hall, 1981). Hayward (1970) lo separa de nuevo como especie, debido principalmente a su distinta talla y diferente distribución. No tiene subespecies y es de distribución restringida a la región del Cabo (Figura 1), en el Sur de la península de Baja California (Ríos y Álvarez-

Castañeda, 2010). En contraste, *Myotis velifer* tiene una amplia distribución en Norteamérica, con cinco subespecies reconocidas (Simmons, 2005; Wilson y Reeder, 2007): *M. v. brevis*, *M. v. grandis*, *M. v. incautus*, *M. v. magnamolaris* y *M. v. velifer*. En el trabajo dónde describe *M. velifer brevis* (Vaughan, 1954), que se distribuye en California y Arizona, menciona a *M. peninsularis* como subespecie de *M. velifer*. Ambas especies (*M. velifer* y *M. peninsularis*) son de los *Myotis* más grandes de Norteamérica (Alvarez-Castañeda y Patton, 1999).

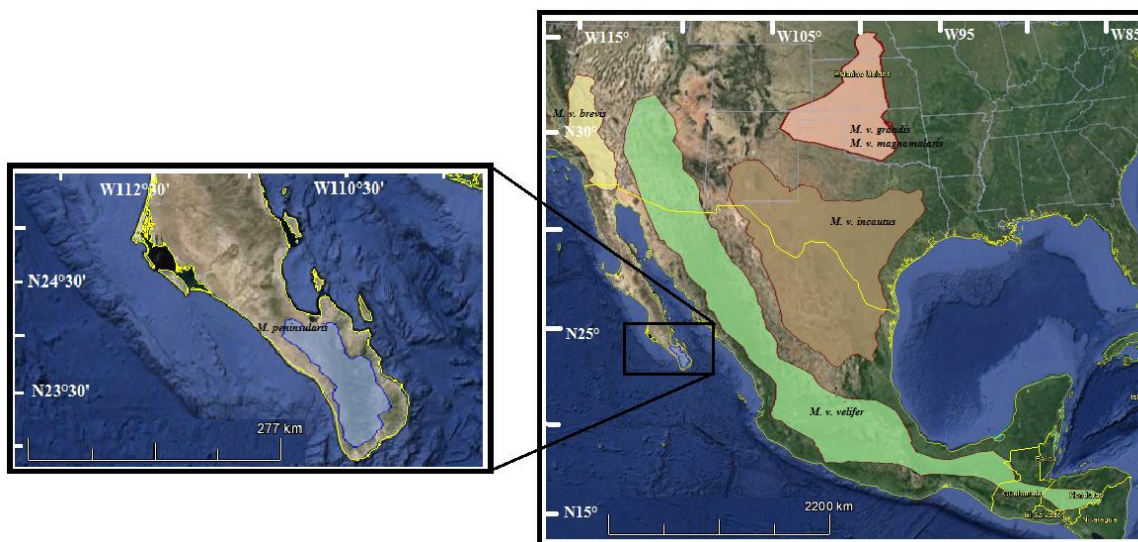


Figura 1. Distribución de *M. peninsularis* en azul (cuadro izq.) y *M. velifer* (der.), con la distribución de *M. v. velifer* en verde, *M. v. incautus* en café, *M. v. grandis* y *magnamolaris* en rojo y *M. v. brevis* en amarillo (Google, 2013).

El pelaje dorsal de *M. peninsularis* es café arenoso (Figura 2b), la base del pelo es de grisácea a café amarillenta (Alvarez-Castañeda y Bogan, 1998; Bogan, 1999). En la parte ventral es más claro con la base del pelo café oliva y las puntas amarillo-doradas. El pelaje de *M. velifer* (Figura 2a) posee un gradiente de tonalidades que van desde el café claro hasta el café oscuro, casi negro (Hayward, 1970; Fitch *et al.*, 1981) con base del pelo bicolores y a veces tricolores. En el noroeste del país, es dorsalmente café bronceado y ventralmente gris (Bogan, 1999). Ambos presentan una región desnuda entre los omoplatos (Figura 2), aunque no en todos los individuos se aprecia claramente (Alvarez-Castañeda y Bogan, 1998; Bogan, 1999). Uropatagio sin flecos de pelos, el calcáneo está bien desarrollado en *M. peninsularis*, terminando en un pequeño lóbulo,

pero no quillado (Alvarez-Castañeda y Bogan, 1998). Ambas especies poseen cráneo con cresta sagital fuertemente desarrollada y rostro amplio; la fórmula dental:  $i\ 2/3, c\ 1/1, p\ 3/3, m\ 3/3 = 38$  (Fitch *et al.*, 1981; Alvarez-Castañeda y Bogan, 1998). En general, *M. peninsularis* posee medidas longitudinales menores que *M. velifer* (Alvarez-Castañeda y Bogan, 1998; Bogan, 1999).



Figura 2. Ejemplares del género *Myotis* de la colección mastozoológica del CIB. De izquierda a derecha, a) *M. velifer*, b) *M. peninsularis* y c) *M. yumanensis*.

En algunos estudios moleculares recientes del género *Myotis* (Ruedi y Mayer, 2001; Dewey, 2006; Stadelmann *et al.*, 2007; Larsen *et al.*, 2012a), *M. peninsularis* no figura en las historias filogenéticas reconstruidas. En un trabajo molecular y morfológico de Chiroptera, *M. peninsularis* se incluye en una politomía con varias especies (*M. abei*, *M. aelleni*, *M. albescens*, *M. austroriparius*, *M. chiloensis*, *M. cobanensis*, *M. dasycneme*, *M. fortidens*, *M. grisescens*; *M. levis*, *M. lucifugus*, *M. montivagus*, *M. oxyotus*, *M. ricketti*, *M. velifer*, *M. volans* y *M. yumanensis*), pero eso fue debido a características morfológicas únicamente, en el caso de especies sin información molecular como *M. peninsularis* (Jones *et al.*, 2002).

En este trabajo se investigan las relaciones filogenéticas y la identidad taxonómica de *Myotis peninsularis* a partir de datos de dos marcadores moleculares y datos de morfometría geométrica.

### *Planteamiento del problema*

*Myotis peninsularis* fue considerado como especie diferente de *M. velifer* por Hayward en 1970 debido principalmente a su distribución distinta y menor tamaño. *M. velifer* tiene una amplia distribución continental, mientras que *M. peninsularis* se restringe a la Región del Cabo en la península de Baja California Sur. Se necesitan estudios moleculares y morfológicos para determinar la filogenia de *M. peninsularis*. La evaluación de la variación morfológica y molecular entre ambas especies permitirá elucidar si en efecto son dos especies distintas o son una misma, pero con morfotipos diferenciados. Esto implicaría que podría tratarse de un evento de importancia evolutiva para la sistemática y conservación del grupo.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Taxonomía y distribución

La familia Vespertilionidae tiene un amplio éxito ecológico y evolutivo, su rápida diversificación a llevado a un entendimiento ambiguo en las relaciones evolutivas en la familia (Roehrs *et al.*, 2010), que además presenta muchas convergencias ecomorfológicas (Ruedi y Mayer, 2001). Es una familia de relación filogenética problemática, ampliamente reconocida como parafilética (Jones *et al.*, 2002). Los trabajos moleculares y de cariotipos han demostrado hasta el momento que la familia hermana es Molossidae (Hooper *et al.*, 2003; Roehrs *et al.*, 2010). Aún cuando la familia tiene una gran diversidad morfológica (Hooper *et al.*, 2003; Van Den Bussche y Hooper, 2004; Roehrs *et al.*, 2010), se caracteriza por tener ojos usualmente pequeños, en su mayoría no poseen hoja nasal, a excepción de la subfamilia Nyctophilinae (Ceballos y Oliva, 2005; Medellín *et al.*, 2007). Las orejas son de tamaño moderado a grande, con trago presente y que es diferente entre las especies de la familia.; 1 Los dientes son tuberculosectoriales (que los dientes superiores se ocluyen con las bases trigonales de los dientes), con molariformes en forma de W, la fórmula dental es  $1-2/2-3, 1/1, 1-3/2-3, 3/3 = 28-38$ . En el cráneo, las partes del palatal en la premaxila tampoco están presentes y el frente del paladar tiene una abertura. El uropatagio suele envolver a la cola, en ocasiones dejando una pequeña porción de la misma libre. La ecolocación está bien desarrollada y les ayuda para conseguir su principal fuente de alimentación, los insectos (Vaughan, 2000).

Ecológicamente, los vespertilionidos del Noroeste de México comparten varias características exclusivas, ya sea porque están adaptados a la vida en áreas áridas o a las mésicas (montaña y tropical; Bogan, 1999). Para esta región, se conocen 30 especies de la familia Vespertilionidae, incluidas 15 especies del género *Myotis* (Bogan, 1999). México posee 15 especies endémicas de murciélagos de un total de 138 (Ceballos *et al.*, 2002b; Ceballos y Oliva, 2005). Tiene una gran diversidad de ambientes que tienen distintas influencias en las especies que habitan en ellos. Se distribuyen varios miembros endémicos, como *M. findleyi* (Isla Tres Marías),

*M. milleri* (norte de Baja California), *M. vivesi* (partes costeras del mar de Cortez) y *M. peninsularis* (región de Cabo). En la región de cabo se distribuyen cinco especies: *Myotis californicus*, *M. yumanensis*, *M. peninsularis*, *M. volans* y *M. evotis*. (Bogan, 1999; Ceballos y Oliva, 2005). La Región del Cabo es considerada como una ecorregión importante para la conservación debido a su alto número de endemismos de animales y plantas (León De la Luz *et al.*, 2000; González-Abraham *et al.*, 2010; Ramirez-Acosta *et al.*, 2012).

## 2.2 Descripción del género *Myotis*

El género *Myotis* incluye el 10% del total de especies de murciélagos con más de 100 especies (Simmons, 2005). Es monofilético dentro de la familia (Ruedi y Mayer, 2001; Jones *et al.*, 2002; Lack *et al.*, 2010). Estudios en *M. velifer*, demuestran que el género es cariotípicamente similar (Baker y Patton, 1967).

*Myotis peninsularis* y *M. velifer* pertenecen al subgénero *Leuconoe*, al igual que la mayoría de los representantes norteamericanos (Ruedi y Mayer, 2001). SE caracteriza por tener piernas y alas cortas, patas grandes, piernas con pelo, cráneo y dientes anchos, y mandíbula larga comparada con otros subgéneros (Dewey, 2006). Ambos pertenecen al grupo *grisecens* (Hall, 1981). *Myotis velifer* tiene un intervalo de distribución continental muy amplio (Figura 1), que va desde Estados Unidos hasta Honduras (Hayward, 1970; Fitch *et al.*, 1981; Hall, 1981; Krutzsch, 2009). En el noroeste del país, se puede encontrar en la parte continental, en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit (Fitch *et al.*, 1981; Hall, 1981; Bogan, 1999). Habita desde las zonas costeras hasta los 2,000 m de altura (Bogan, 1999). No hay registros oficiales de esta especie en la península de Baja California, salvo en la parte norte que colinda con Estados Unidos, donde existen registros de la subespecie *M. v. brevis*. Es moderadamente grande dentro del género, alcanzando tallas más grandes conforme se acercan al norte. Tiene pelaje poblado, aunque el pelo esta pobremente distribuido en la parte dorsal, con una porción sin pelaje entre el cuello y la cabeza, lo que causa un característico punto desnudo en la especie. Tiende a perchar en colonias con muchos individuos (usualmente entre 2,000 y 5,000), generalmente en cuevas y minas (Bogan, 1999). Su gran intervalo de distribución le permite tener estabilidad en sus poblaciones. En contraparte, la condición endémica de *M. peninsularis* le confiere mayor interés desde el

punto de vista de la conservación. Esta especie se distribuye sobre el matorral de desierto, el bosque tropical caducifolio y bosques de pino-encino de la Región de Cabo (Alvarez-Castañeda y Bogan, 1998). Se ha reportado estar asociado con las cuevas de maternidad de *Tadarida brasiliensis* (Alvarez-Castañeda y Bogan, 1998).

En la revisión de Fitch *et al.* (1981) de *M. velifer* se incluyeron tres subespecies, aún cuando *M. v. brevis* fue agregada por Vaughan (1954) ampliando la distribución de la especie, al sureste de California. En la revisión más reciente (Simmons, 2005), se reconocen cinco subespecies: *M. v. brevis*, *M. v. grandis*, *M. v. incautus*, *M. v. magnamolaris* y *M. v. velifer*.

En la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), catalogan como en peligro a *Myotis peninsularis* (Alvarez-Castañeda y Arroyo-Cabrales, 2008). Al contrario, *M. velifer* (Peres, 2008) se considera en la categoría de baja preocupación. Ninguna de las dos especies figura en la Norma Oficial Mexicana (SEMARNAT, 2010).

## **2.4 Relaciones filogenéticas de las especies del género *Myotis***

Las reconstrucciones filogenéticas que se basan en datos moleculares han revelado una convergencia morfológica recurrente durante la evolución de las especies del género *Myotis* (Stadelmann *et al.*, 2004). En el trabajo de Jones *et al.*, (2002), se realizó un “super-árbol” filogenético, incluyendo cualquier dato molecular o morfológico publicado, de todas aquellas especies de murciélagos hasta entonces, donde *M. velifer* y *M. peninsularis* se posicionan en una politomía en conjunto con otras 10 especies más (Figura 3). Esto debido a que la intención del trabajo fue encontrar una filogenia que incluyera a todas las especies analizadas, permitiendo así tener una base sobre la localización filogenética de la mayoría de los integrantes del orden Chiroptera, como *M. peninsularis*.

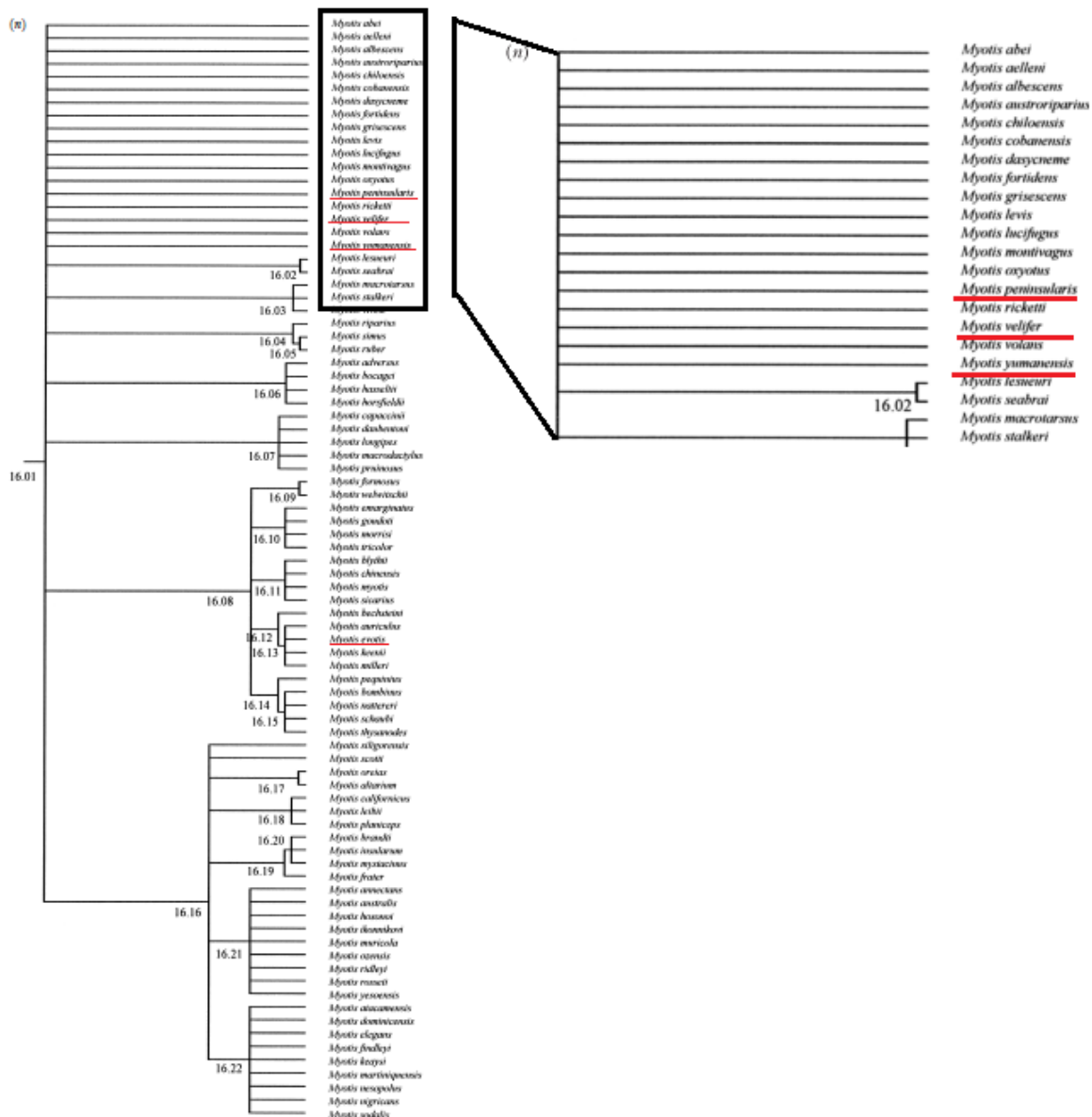


Figura 3. Árbol de Jones *et al.* (2002) del género *Myotis* (sección *n*) y ampliaciones de la politomía dónde se encuentran las tres especies del presente estudio (*M. peninsularis*, *M. velifer* y *M. yumanensis*, subrayados). Son parte del árbol de la familia Vespertilionidae y ésta a su vez, parte del árbol del orden Chiroptera.

En el estudio de Stadelmann *et al.* (2007), se utilizó un gen mitocondrial (citocromo b) para realizar la filogenia del género *Myotis*, además de uno nuclear (Rag2) como complementación. Dividen principalmente al clado de éste género en dos: los *Myotis* del nuevo

mundo (continente americano) y los del viejo mundo (resto de los continentes, Figura 4). Así mismo, en el clado del nuevo mundo, se aprecian tres subclados: paleártico, neártico y neotropical. *M. velifer* se ubica en el clado neotropical, con *M. yumanensis* como especie hermana, *M. peninsularis* no figura en este estudio porque no lo lograron obtener tejidos para los análisis (Stadelmann *et al.*, 2007).

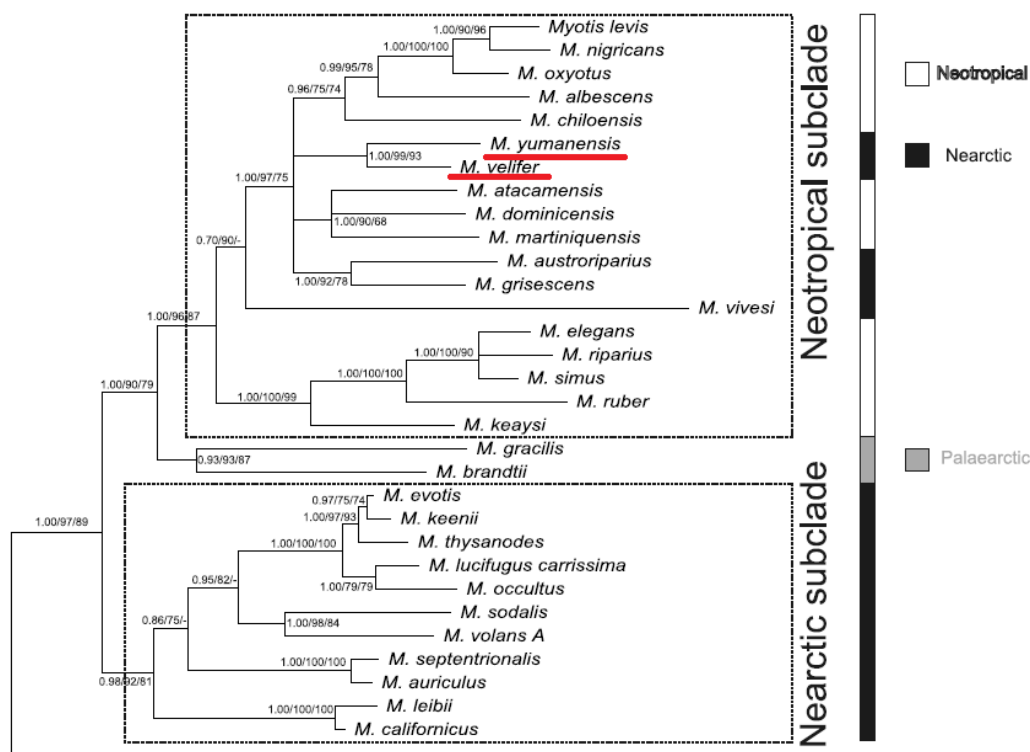


Figura 4. Relaciones filogenéticas del género *Myotis* para las especies del continente americano del árbol filogenético de máxima parsimonia con *Cyt. b*, que denota los subclados Neotropical, Paleártico y Neártico. *Myotis velifer* y *M. yumanensis* (subrayado) se encuentran en el subclado Neotropical, como especies hermanas (Modificado de Stadelmann *et al.*, 2007).

## 2.5 Distancia genética

Las diferencias entre secuencias de nucleótidos se pueden comparar mediante distancias genéticas (Johns y Avise, 1998). El gen mitocondrial citocromo *b* (*Cyt. b*) es probablemente el más utilizado para este propósito, debido a que su dinámica evolutiva y la bioquímica de su proteína producto son mejor caracterizados que las de otros sistemas moleculares (Johns y Avise, 1998). Su propósito era tener una perspectiva comparativa y no tanto de relaciones cladísticas. En

el trabajo de Bradley y Baker (2001) se analizaron los niveles de variación entre secuencias de Cyt. *b*, para proveer un punto de referencia para la toma de decisiones en la diferenciación a nivel de especie. Utilizaron el modelo de Kimura 2 parámetro (K2P), los valores específicos de distancias genéticas obtenidos menores al 2% fueron indicativos de variación intra-específica; entre el 2% y el 11% con alta probabilidad de pertenecer a poblaciones conspecíficas o especies válidas con estudios adicionales; y valores mayores al 11% indicaron reconocimiento específico congénico (Bradley y Baker, 2001). Se obtuvieron valores intra-subespecíficos para murciélagos de 0.00 al 4.21%; intra-específicos de entre 0.09 a 8.70%, y entre especies hermanas de un 2.50 a un 16.42% (Bradley y Baker, 2001).

Este enfoque también se ha utilizado con otro de los genes mitocondriales utilizados para análisis filogenéticos: citocromo oxidasa I. Clare *et al.* (2011), bajo el mismo modelo de sustitución (K2P), compararon las distancias genéticas obtenidas entre varias especies de murciélagos. La proporción de distancias genéticas en los linajes reportados en este trabajo son similares a los obtenidos por Bradley y Baker (2001). También se menciona que las divergencias de secuencias intra-específicas deben ser cuantificadas para proveer otra forma complementaria de medir la biodiversidad (Clare *et al.*, 2011).

En el trabajo de Ditchfield (2000), se realizó la comparación de la diversidad nucleotídica de especies de quirópteros, roedores y marsupiales con Cyt. *b*. En el caso de murciélagos, se hicieron evaluaciones intra-específicas con especímenes de distinta distribución, obteniendo porcentajes de entre el 1 al 4% de distancia genética, llegando a un 9% entre subespecies localizadas a una distancia muy amplia (entre 1,000 y 3,000 km.). Los *Myotis* analizados obtuvieron porcentajes del 0.3% (*M. riparius*) y < 4% (*M. nigricans*). Los resultados también reflejaron muchas características ecológicas compartidas, potencial de dispersión y la oportunidad de documentar los eventos climáticos y geológicos en la región de estudio (Ditchfield, 2000).

## **2.6 Morfometría geométrica**

Los datos de la morfometría geométrica han sido muy útiles para el análisis de organismos, ya sea el todo o sus partes (Bookstein, 1999; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004). También se ha utilizado en estudios para evaluar las relaciones filogenéticas y filogeográficas (Bogdanowicz *et al.*, 2005; Barčiová, 2009; Soto-Vivas *et al.*, 2011), las adaptaciones al ambiente (Evin *et al.*, 2011; Martínez y Di Cola, 2011; Moratelli *et al.*, 2011; Marchán-Rivadeneira *et al.*, 2012), detectar variaciones geográficas, discriminación entre especies, entre otros. Los análisis de morfometría geométrica, ayudan a separar el factor “tamaño” de un espécimen para comparar sólo la forma de este y así ver diferencias morfológicas, en términos de las diferencias en la forma (Bookstein, 1999; Zelditch *et al.*, 2004). Éstas diferencias pueden señalar diferentes roles funcionales realizadas por las mismas partes, distintas respuestas a las mismas presiones selectivas (Zelditch *et al.*, 2004). Es una excelente herramienta para comparar especímenes, entender las causas de variación e indagar en la taxonomía actual de las especies. Los estudios con morfometría geométrica también se han utilizado para la creación de hipótesis cladísticas, siendo útiles para el reconocimiento de grupos monofiléticos (Guerrero *et al.*, 2003; Soto-Vivas *et al.*, 2011).

La forma, es toda la información geométrica que queda cuando los efectos de localización, escala y rotación de las partes a evaluar son eliminados para su análisis (Zelditch *et al.*, 2004). El método más ampliamente utilizado en morfometría geométrica es basado en marcas (Catalano *et al.*, 2010), que son puntos sobre posiciones anatómicas discretas reconocidos como “iguales” en todos los especímenes del estudio (Zelditch *et al.*, 2004). El grupo de marcas que representa la forma de una estructura para estudiar cada espécimen forman una configuración. Los métodos de superposición alinean dos configuraciones de marcas, para eliminar las diferencias antes mencionadas (localización, rotación y talla). Las diferencias en la forma entonces son determinados por los cambios en la posición relativa de cada marca individual (Adams *et al.*, 2004; Catalano *et al.*, 2010).

## **2.7 Disparidad**

La disparidad en la morfometría, se puede definir como el grado de diferenciación morfológica entre taxa (Rodrigues *et al.*, 2011), es una medida de la divergencia y variedad de los

organismos (Goswami y Polly, 2010). Mediante morfometría geométrica, es una forma de detectar y comparar el nivel de la variación que presentan los organismos de una forma estandarizada, de manera que estadísticamente pueden ser comparados distintos organismos. La disparidad, es medida con distancias Procrustes entre cada espécimen y la forma promedio (Goswami y Polly, 2010) de un organismo o módulo del mismo. La disparidad morfológica y la ocupación de morfoespacios son ampliamente utilizadas en estudios macroevolutivos. Las investigaciones más comunes son sobre utilizar valores de diversidad y disparidad dentro de linajes (Rodrigues *et al.*, 2011). Entre los trabajos que han utilizado la disparidad como método de investigación, se encuentran aquellos que comparan fósiles, organismos extintos y existentes, ya sea en conjunto o por separado, especialmente en estructuras homologas, mediante comparación por módulos. La disparidad total de un módulo se define como la suma de las distancias parciales Procrustes para todos los especímenes, solamente de las marcas pertenecientes a cada módulo (Goswami y Polly, 2010). Se ha comparado la dieta mediante la evaluación de módulos con morfometría geométrica, en primates y carnívoros, así como la disparidad de esta entre ellos (Goswami y Polly, 2010). Se realizaron comparaciones de murciélagos entre otros grupos, donde la variación intra-grupal obtenida (con ejemplares de Microhiroptera y Macrochiroptera), donde la disparidad promedio (con distancias Aitchison) exhibida fue menor que en otros grupos con diversidad taxonómica más alta (Rodrigues *et al.*, 2011). También se han realizado comparaciones en la composición del morfoespacio del vuelo, mediante proporciones de las extremidades de vertebrados voladores (Rodrigues *et al.*, 2011).

## **2.8 Morfometría geométrica y filogenia**

El objetivo principal de los estudios filogenéticos es inferir las relaciones evolutivas y de parentesco entre organismos (Harrison y Langdale, 2006). Se puede realizar mediante cualquier tipo de datos, comúnmente moleculares y morfológicos. La evidencia para la inferencia filogenética es primeramente la homología (*sensu* De Pinna, 1991; Catalano *et al.*, 2010), es decir, las relaciones entre individuos se pueden definir por homologías compartidas entre ellos (De Pinna, 1999). Así, el reconocimiento de homologías entre taxones (Guerrero *et al.*, 2003; Soto-Vivas *et al.*, 2011) es uno de los principales objetivos de la morfometría geométrica bajo un



enfoque filogenético. Estas comparaciones se obtienen evaluando la “forma” en partes o módulos, pero no los individuos completos. Los grados relativos de similitud son utilizados para establecer homología entre configuraciones de marcas (Catalano *et al.*, 2010).

Un método para introducir datos morfométricos dentro de un análisis filogenético es estimando optimizaciones directas con las variables continuas de la forma, utilizando criterios de parsimonia. Esta aproximación busca la configuración ancestral de marcas que minimice el desplazamiento de los puntos entre los nodos ancestro/descendiente a lo largo de las ramas del árbol. Esto da como resultado la ubicación de los cambios en la forma a través de la filogenia (Catalano *et al.*, 2010). Los ancestros se obtienen al asignar los valores óptimos a esos caracteres y trasladarlos a los datos de coordenadas originales (Catalano *et al.*, 2010). Los árboles son elegidos con el objetivo de minimizar las diferencias entre ancestros y descendientes (parsimonia). Esta aproximación filogenética con datos de morfometría geométrica permite combinar cualquier otro tipo de datos a los estudios filogenéticos, por ejemplo las secuencias de ADN (caracteres discretos), y la utilización de otros datos continuos (distancias) dados por la variación inherente a los datos morfométricos (Catalano *et al.*, 2010).

## **2.9 Respuestas al ambiente**

Se han realizado múltiples estudios con micro-hábitats probando la influencia de la migración, en características fenotípicas correlacionadas con polimorfismos cromosómicos a niveles intra-específicos, con descriptores geométricos (Fornel *et al.*, 2010). El aislamiento por distancia explica que en ausencia de selección, hay una correspondencia significativa entre la distancia geográfica y la variación genética (Fornel *et al.*, 2010). Bajo esta premisa, la similitud genética entre poblaciones decrecerá exponencialmente como la distancia geográfica entre ellos se incremente como resultado del limitado flujo génico (Fornel *et al.*, 2010).

La movilidad de los murciélagos y el bajo costo del vuelo hacen que sea poco visible el enlace entre los murciélagos y su hábitat (Fenton, 1997), así como se espera que exista mayor variación genética que morfológica a razón de la alta vagilidad que muestra el grupo. La heterogeneidad ambiental sobre el área de distribución de las especies puede también actuar

como factor selectivo produciendo diferencias fenotípicas que se pueden examinar geométricamente (Fornel *et al.*, 2010). En cuanto a la variación de distancias genéticas intra-específicas, se ha presentado variación de hasta el 4% en intervalos de distinta distribución de hasta 1,000 y 3,000 km. (Ditchfield, 2000) como se puntualizó en el apartado de distancias genéticas.

Se ha documentado un “efecto insular” en el tamaño del cuerpo en los organismos que habitan islas o penínsulas, principalmente. Se suele presentar un tipo de enanismo o gigantismo por parte de los habitantes de las islas (Case, 1978) comparados con su contraparte continental. Sin embargo, esto puede variar según el grupo de vertebrados que se esté investigando. Case (1978) obtiene que grupos como lagomorfos, serpientes y murciélagos entre otros, suelen disminuir su tamaño en islas, mientras que roedores, iguanas y tortugas, suelen aumentar su tamaño. Existen varias teorías que tienen que ver principalmente con la disponibilidad de alimentos y la cantidad de depredadores (Case, 1978; Taylor y Regal, 1978), e incluso que si el éxito del organismo en un ambiente nuevo no depende de competitividad o de alimento en particular, estos tienden a aumentar su tamaño en islas (Case, 1978). Estudios con roedores han obtenido que suelen aumentar su tamaño (Taylor y Regal, 1978; Lomolino *et al.*, 2012). Sin embargo, en estudios recientes se ha llegado a conclusión de que son una combinación de factores los que llevan a que se presente un gigantismo o enanismo y no una condición en específico (Evin *et al.*, 2011; Lomolino *et al.*, 2012).

En el trabajo de Evin *et al.* (2008) con morfometría geométrica, obtienen que existe una diferenciación entre los *Myotis* insulares y los continentales en forma; los murciélagos insulares presentan un cráneo más corto y angosto que los continentales. Incluso, mencionan que en el trabajo de Castella *et al.* (2000), análisis nucleares y mitocondriales revelan un grado de divergencia entre las poblaciones continentales (Europa) y las del mediterráneo (Evin *et al.*, 2008).

## **2.10 Conservación**

La aplicación de la ciencia para resolver los problemas que afectan a las especies y su entorno, es necesaria para preservación de los recursos naturales de las perturbaciones directas o indirectas de la actividad humana y de otros factores (Soulé, 2007). La importancia de la conservación en la integridad individual de cada organismo, su entorno y su material genético es en extremo primordial para la viabilidad a largo plazo de los sistemas ecológicos. El análisis filogenético permite reconstruir e investigar aspectos intra-específicos de una especie, su historia evolutiva reciente en un contexto geográfico, incluyendo eventos de aislamiento y divergencia, expansión de rango, etc. (Avice, 2000; Godoy, 2009).

La fragmentación en la distribución de las especies de vertebrados, así como el declive de las poblaciones, ya sea por causas naturales o humanas, es una consideración también importante para la biología de la conservación (Armstrong, 2006). Se han documentado cambios genéticos que las poblaciones sufren como resultado de estos factores, y así mismo se han confirmado las consecuencias negativas de éstos para la viabilidad poblacional y la evolución adaptativa de las especies (Godoy, 2009). En el caso de muchos vertebrados terrestres, las características geográficas como montañas, ríos, penínsulas, lagunas oceánicas y límites entre hábitats también coinciden con discontinuidades genéticas intra-específicas (Riddle *et al.*, 2000; Armstrong, 2006).

Los roles funcionales de los murciélagos y su pertenencia a varios gremios tróficos, les confiere una actuación vital en el equilibrio de los ecosistemas. También, los atributos de las comunidades de murciélagos son considerados como indicadores de la salud ambiental debido a su gran abundancia y su gran diversidad ecológica y evolutiva (Medellín, 2003). La aplicación de los estudios con técnicas moleculares aporta información sobre la historia evolutiva, la ecología y el comportamiento de las especies, lo que permite evaluar riesgos, asignar prioridades, delimitar unidades de protección y el diseño de estrategias de conservación (Godoy, 2009). Las especies endémicas, están sujetas a un mayor riesgo de extinción debido al en número pequeño en los integrantes de sus poblaciones (o de población única en el caso de *M. peninsularis*). La investigación molecular y de campo es de vital importancia para elaborar planes de conservación y preservación de los mismos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La categoría taxonómica de *Myotis peninsularis* fue determinada por diferencias morfológicas y de distribución con respecto a *M. velifer*, por lo que la utilización de los análisis moleculares y de morfometría geométrica ayudará a elucidar su historia evolutiva y la relación con sus especies emparentadas. Podría tratarse de un evento de importancia evolutiva para la sistemática y conservación del grupo. Este trabajo contribuye al conocimiento de la situación del género y al grupo en general, y a la realización de propuestas y estrategias de protección y conservación para la diversidad poblacional de los recursos naturales en México.

## 4. OBJETIVOS

### General

Determinar la filogenia de *Myotis peninsularis* utilizando ADN mitocondrial y si ésta se relaciona con los morfotipos craneales mediante morfometría geométrica.

### Particulares

Determinar la filogenia de *Myotis peninsularis* utilizando los marcadores mitocondriales citocromo *b* y citocromo oxidasa I.

Determinar la variación morfológica craneal entre *M. peninsularis* y *M. velifer* mediante análisis de morfometría geométrica.

Evaluar si los morfotipos craneales se corresponden con la distribución distinta de cada grupo.

Determinar la filogenia de los morfotipos ancestrales mediante la filogenia combinada molecular y configuraciones de marcas.

## 5. HIPÓTESIS

El aislamiento geográfico entre *Myotis peninsularis* y *M. velifer* permitió una diferenciación morfológica, pero no molecular. Por esto, es posible esperar que sean la misma especie, pero con morfotipos distintos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Área de estudio

El extremo sur de la península de Baja California, es denominada Región del Cabo (León de la Luz *et al.*, 2000). Está localizada en las coordenadas 24 °N y -110 °W. Esta región, está localizada en confluencia de las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical (CONABIO 1997), lo que le confiere características muy particulares. La sección montañosa de la región tiene una elevación de 1,000 a 2,100 msnm y tiene una extensión de aproximadamente 3,000 km<sup>2</sup> (León de la Luz *et al.*, 2000).

#### 6.1.1 Vegetación

Según Rzedowski, (2006) la vegetación predominante en esta región es el bosque tropical caducifolio, seguido por matorral xerófito y luego de bosque de coníferas y *Quercus*. León de la Luz *et al.* (2000), subdivide a la vegetación de ésta región fisionómicamente en varias comunidades de plantas, que son: bosque de encino y pino, bosque tropical caducifolio, matorral sarcocaulé y matorral xerófito (Figura 5).

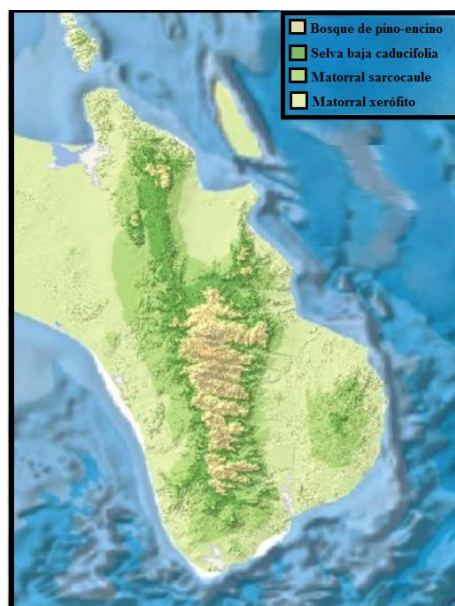


Figura 5. Vegetación principal de la Región del Cabo.

### 6.1.2 Clima

Los climas presentes en esta región son principalmente secos, donde domina el clima muy seco semicálido, la parte oriental de la región está dominada por un clima muy seco, muy cálido y cálido; la parte del occidente posee un clima muy seco templado, así como en el centro de la región además de clima seco templado (INEGI 2011). La temperatura del área ocupada por el bosque tropical caducifolio oscila entre los 22 °C y los 24 °C; el tipo de clima de acuerdo a la clasificación de Köppen va desde cálido y seco hasta muy cálido y muy seco (León de la Luz *et al.*, 2000). La precipitación ocurre principalmente en verano y otoño con un rango de entre 100 y 200 mm anuales (León de la Luz *et al.*, 2000).

### 6.2 Ejemplares analizados

Para la obtención de los datos moleculares se utilizaron tejidos de ejemplares de *Myotis peninsularis* depositados en la colección mastozoológica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB; Apéndice i). En cuanto a las siete especies restantes de *Myotis* utilizadas (*M. elegans*, *M. evotis*, *M. keaysi*, *M. thysanodes*, *M. velifer*, *M. volans*, *M. yumanensis*), se obtuvieron tejidos tanto de la colección mastozoológica del CIB, de la colección mastozoológica de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) y GenBank (NCBI, 2009). Las secuencias obtenidas en el CIB (Álvarez-Castañeda *et al.*, 2012), y en ECOSUR (Cervantes *et al.*, 2010) fueron publicadas en el código de barras de la vida (Ratnasingham y Hebert, 2007). De GenBank se obtuvieron las secuencias faltantes: para COI, *M. thysanodes*, (GU723125) generada el trabajo de Streicker *et al.*, (2010); y *M. volans* (HM486595) en el trabajo de Nadin-Davis *et al.*, (2010). Para el marcador Cyt. *b*, *M. elegans* (AM261891) del trabajo de Stadelmann *et al.*, (2007); en el trabajo de Larsen *et al.*, (2012a) se obtuvo *M. keaysi* (JX130525); *M. velifer* (EU680295) en (Parlos *et al.*, 2008); y por último *M. yumanensis* (AF376875) en Ruedi y Mayer, (2001b). La información de los tejidos, secuencias y procedencia de los ejemplares utilizados se listan en el Apéndice ii.

Para la obtención de los datos morfométricos se utilizaron cráneos provenientes de cinco colecciones mastozoológicas de México: el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB), el Instituto Politécnico Nacional (ENCB), la Universidad Autónoma Metropolitana (UAMI) y la Facultad de Ciencias (FC-UNAM) y el Instituto de Biología (CNAM)



pertenecientes a la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ejemplares pertenecen a diversas partes de la república (Apéndice ii).

### 6.3 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Las muestras colectadas fueron inmediatamente fijadas y conservadas en alcohol de 96°. El ADN genómico total fue extraído de órganos tales como el corazón, hígado y riñón. Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.7 ml, adicionando 410 µl de un búfer de lisis (100mM NaCl, 100mM EDTA pH 8.0 y 50mM Tris pH 8.0) y 90 µl de SDS 10%, las muestras fueron maceradas, se les adicionó 20 µl de proteinasa K a una concentración de 10mg/ml (Sigma, No. Cat. P-2308), posteriormente la mezcla se incubó a 65°C durante 3 hrs. Continuando con la centrifugación de las muestras a 10 mil RPM, se recolectó el sobrenadante en tubos nuevos al cual se le adicionó 200 µl de NaCl saturado (~6M). Después de mezclar fueron incubadas las muestras en baño de hielo por 10 min, centrifugando de nuevo, el sobrenadante recuperado fue colocado en un tubo nuevo para realizar un lavado con Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1). Al sobrenadante se le adicionó etanol absoluto para realizar la precipitación del ADN, fue centrifugado para obtener una pastilla que después fue disuelta en agua grado molecular, (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la amplificación del marcador COI (800 pb), se realizó siguiendo el protocolo del Canadian Center of DNA Barcoding (Ivanova y Grainger, 2007). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue desarrollada en reacciones de 18 µl, para lo cual se utilizó 9.4 µl de Trehalosa 10%, 4.34 µl de H<sub>2</sub>O GM, 1.0 µl MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.1 µl dNTPs 10mM, 1.85 µl Buffer PCR 10X, mezcla de varios oligos (Mammal Cocktail) 0.19 µl C\_VF1LFt1 10 µM y 0.19 µl C\_VR1LRt1 10 µM, 0.09 µl Taq polimerasa 5 U/µl y 1.0 µl de ADN 100ng. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler PRO. El programa de termociclado utilizado fue el recomendado por CCDB, (Ivanova y Grainger, 2007). La reacción de PCR para la amplificación del gen de Cyt-*b* (700 pb), se realizó en reacciones de 18 µl, para lo cual se utilizó 11.0 µl de H<sub>2</sub>O GM, 0.7 µl MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1.0 µl dNTPs 2.5mM, 1.7 µl Buffer PCR 10X, 0.9 µl MVZ05 10 µM, 0.9 µl MVZ16 10 µM, 0.1 µl Taq polimerasa 5 U/µl y 1.0 µl de ADN 100ng. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf

Mastercycler PRO. El programa utilizado fue de un ciclo de 96°C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 50 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 min y por ultimo un ciclo de 72 °C por 5 min (Sambrook *et al.*, 1989).

Los productos de PCR fueron leídos en gel de agarosa 2%, revisados y enviados posteriormente para su secuenciación. Las muestras a secuenciar de COI fueron enviadas al Biodiversity Institute of Ontario, Canadá. En el caso del Cyt-*b*, fueron enviadas a la Universidad de Berkeley, USA.

#### 6.4 Alineación de secuencias

Se realizó la alineación de 24 secuencias correspondientes a ocho especies, con 650 pares de bases para el marcador COI, de las cuales se manejaron sólo 10 haplotipos (Tabla 1), eligiéndose un haplotipo por especie (cuando tenían más de uno), a excepción de *M. velifer* cuyos tres haplotipos distintos también se incluyeron. De las nueve secuencias de *M. peninsularis* se obtuvo un mismo haplotipo, se utilizaron tres secuencias para el análisis, haciendo un total de 12 secuencias analizadas. De la misma forma, se realizó la alineación de 12 secuencias de 800 pares de bases con el marcador Cyt. *b*, mediante el programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) y MEGA ver. 5 (Tamura *et al.*, 2011). También se utilizaron tres secuencias del mismo haplotipo para *M. peninsularis* y tres secuencias (tres haplotipos) para *M. velifer*.

Tabla I. Número de haplotipos de cada especie del género *Myotis* por secuencias analizadas.

Marcador	Especie	Haplotipos COI / Cyt. <i>b</i>	Núm. de secuencias por haplotipo, COI / Cyt. <i>b</i>
COI/Cyt. <i>b</i>	<i>M. elegans</i>	1/1	2/1
COI/Cyt. <i>b</i>	<i>M. keaysi</i>	3/1	1-2/1
COI/Cyt. <i>b</i>	<i>M. peninsularis</i>	1/1	9/3
COI/Cyt. <i>b</i>	<i>M. velifer</i>	3/3	1-2/1
COI/Cyt. <i>b</i>	<i>M. yumanensis</i>	1/1	1/1
COI/Cyt. <i>b</i>	<i>M. evotis</i>	1/1	1/1
COI/Cyt. <i>b</i>	<i>M. thysanodes</i>	1/1	1/1
COI/Cyt. <i>b</i>	<i>M. volans</i>	1/1	1/1

## 6.5 Selección de modelos de sustitución

Se determinó el modelo evolutivo que mejor se ajustara a cada set de datos (Cyt. *b*, COI) basado en el criterio de información de AKAIK (AIC) mediante Modeltest ver. 3.7 (Posada y Crandall, 2005). Para el marcador COI, el mejor modelo evolutivo fue el Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985) con distribución gama (HKY + G), cuyas características principales son: frecuencia de bases variable (0.2674, 0.2386, 0.1628), tasas de una transición y una transversión de bases por sitio, con un parámetro de tasa de intercambio de dos (NTS = 2). Parámetro de forma de 0.1954. El mejor modelo de sustitución para el Cyt. *b* fue el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) con una proporción de sitios invariables (0.6265; TrN + I): frecuencia de bases variable (0.2897, 0.2742, 0.1386), una tasa fija de transiciones y tasa variable de transversiones; cuyo parámetro de tasa de intercambio es de seis (NTS=6).

## 6.6 Análisis filogenéticos

Para obtener las relaciones filogenéticas de *M. peninsularis* se efectuaron análisis con los marcadores mitocondriales citocromo *b* (Cyt. *b*) y citocromo oxidasa I (COI). Se realizaron análisis separados con cada uno de los marcadores. Se utilizaron cuatro tipos de reconstrucciones filogenéticas para comparar los resultados obtenidos: máxima verosimilitud (MV), máxima parsimonia (MP), inferencia bayesiana (IB) y un análisis de distancias con neighbor-joining (NJ). La elección de las especies para estos análisis se realizó en base al trabajo de Stadelmann *et al.* (2007), así como la elección de los grupos externos: *M. evotis*, *M. thysanodes* y *M. volans*.

### 6.6.1 Análisis de verosimilitud

La verosimilitud es la probabilidad condicional de obtener los datos observados si un árbol fuera verdadero (Felsenstein, 2004). Se realiza una multiplicación (matriz de datos de eventos compuestos) que cuantifica la probabilidad de observar el conjunto de similitudes, si la filogenia específica (árbol) fuera verdadera bajo las suposiciones de un modelo de cambios y valores de parámetros particulares. El árbol que implica la más alta probabilidad de haber generado los datos

observados es el de la máxima verosimilitud (Huelsenbeck y Crandall, 1997; Steel y Penny, 2000).

Se utilizaron los modelos evolutivos obtenidos, con ModeTest para cada set de datos específicamente para este análisis, utilizando el modelo HKY + G para COI y TrN +I para *Cyt. b*. Se realizó una búsqueda heurística con el algoritmo de “stepwise” usando adición de secuencias con adición aleatoria con 1000 repeticiones, usando también re-arreglos del tipo “bisección y reconexión de árbol” (TBR, Tree Bisection and Reconnection) en el programa PAUP ver. 4.0b10 (Swofford, 2001). También se realizó una prueba de soporte estadístico “Bootstrap” de 100 rep. Además se realizó el mismo análisis utilizando el programa GARLI ver. 2.0 (Zwickl, 2006) bajo los mismos parámetros y modelo evolutivo. En ambos programas se utilizaron los grupos externos establecidos previamente (*M. evotis*, *M. thysanodes* y *M. volans* y en el caso del análisis en GARLI, solo *M. volans*). Los resultados fueron visualizados en FigTree (Rambaut, 2009).

### 6.6.2 Análisis con parsimonia

El criterio de parsimonia permite el examen lógico de la congruencia entre cada columna de la matriz de datos y revela la colección máxima de hipótesis de homología táxica y transformacional (Farris, 1983; de Luna, 1996; Kitching *et al.*, 1998). La interacción lógica de varias similitudes particulares (columnas en la matriz de datos) congruentes entre sí, selecciona el conjunto de hipótesis de homología putativas y distingue las similitudes homoplásicas (Kluge, 1999). La hipótesis de relaciones filogenéticas asociada al mayor conjunto lógico de homologías contiene a su vez el menor número de homoplasias (De Luna *et al.*, 2005). Los métodos cladísticos basados en modelos de parsimonia estiman la distancia patrística calculando la suma del número de cambios de estado (pasos) en cada rama (De Luna *et al.*, 2005). El árbol óptimo es aquel que mide el mínimo de pasos y provee de la más simple explicación de los datos (Goloboff, 2003).

Se realizó una búsqueda heurística de 10,000 repeticiones realizado en PAUP (Swofford, 2001). Se utilizaron arreglos del tipo “bisección y reconexión de árbol” (TBR, Tree Bisection and Reconnection) con 1,000 réplicas para obtener soporte de bootstrap en los nodos del árbol

obtenido. Como grupo externo se utilizaron las tres especies de *Myotis* anteriormente especificadas: *M. evotis*, *M. thysanodes* y *M. volans*. De igual forma, se realizó el mismo análisis utilizando el programa de WinClada ver. 1.00.08 (Nixon, 2004), colocándose los mismos parámetros y añadiendo el algoritmo “Rachet” que se utiliza cuando los arreglos TBR se estancan, utilizando ese árbol como punto de inicio, y usando ese árbol para buscar bajo los datos originales (Goloboff, 2002). Como grupo externo sólo se utilizó *M. volans*. Se realizó análisis de soporte estadístico de Bootstrap y Jackknife de 10,000 réplicas cada uno.

### 6.6.3 Análisis bayesianos

Mientras que la verosimilitud mide la probabilidad de los datos dado un árbol, el enfoque Bayesiano calcula las “probabilidades posteriores” de los árboles (Huelsenbeck *et al.*, 2002; Holder y Lewis, 2003; De Luna *et al.*, 2005). La probabilidad Bayesiana o probabilidad posterior se define como la probabilidad condicional de una hipótesis dados los datos observados (probabilidad posterior). La probabilidad posterior es proporcional al producto de la verosimilitud de los datos condicionada a que un árbol es correcto y la probabilidad a priori de la hipótesis (prob. previa) antes de recolectar los datos (De Luna *et al.*, 2005). Se explora el espacio de los árboles visitando muchas combinaciones de valores de los parámetros implícitos en árboles diferentes mediante rutas azarosas modeladas por Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Si se exploran árboles de muchas “generaciones” y se repiten varias cadenas, el análisis eventualmente se estabiliza (De Luna *et al.*, 2005). A partir de que se llega a un punto de equilibrio, MCMC visita árboles frecuentemente en proporción de su probabilidad posterior (Huelsenbeck *et al.*, 2002). El árbol de consenso de mayoría derivado de los árboles visitados en la fase de equilibrio compila las probabilidades posteriores de cada rama muestreada y calculada (De Luna *et al.*, 2005). Las probabilidades posteriores de las ramas se han interpretado como la probabilidad de que el clado es confiable dado un modelo particular, las probabilidades previas heterogéneas y los datos (Huelsenbeck *et al.*, 2002).

El análisis se realizó en MrBayes ver. 3.7 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), utilizando los modelos evolutivos obtenidos en ModelTest. Se calcularon probabilidades bayesianas posteriores para cada set de datos con su correspondiente modelo evolutivo de HKY + G para COI y TrN + I

para Cyt. *b*, con 3,000,000 de generaciones, y un calentamiento (burning) de 1,000 repeticiones generando árboles de inferencias bayesianas cada 1,000 muestreos. Los árboles obtenidos se visualizaron en el programa FigTree ver. 1.3.1 (Rambaut, 2009). Se utilizó sólo un grupo externo en ambos análisis de IB: *M. volans*.

#### **6.6.4 Análisis de distancias**

El método llamado “vecino más cercano” (Neighbor-Joining, NJ) se utiliza para la reconstrucción de árboles filogenéticos a partir de datos de la distancia evolutiva. El principio es encontrar pares de unidades taxonómicas operacionales (OTU's por sus siglas en inglés) que reducen al mínimo la longitud total de la rama en cada etapa de la agrupación de OTU's, empezando por un árbol señal (Saitou y Nei, 1987). Es decir, construye un árbol por la búsqueda de pares conectados por un nodo interior, con la mínima diferencia entre ellos. Se obtuvo un árbol de distancias (NJ) para visualizar la topología mediante FigTree (Rambaut, 2009). Se utilizaron las tres especies designadas como grupo externo (*M. evotis*, *M. thysanodes* y *M. volans*).

Se realizaron análisis de distancias (MEGA y PAUP) con los modelos evolutivos obtenidos por ModelTest (HKY + G para COI y TrN + I para Cyt. *b*) para obtener una matriz de datos de las distancias genéticas. También se calculó mediante el método de Kimura-2-parameter (Kimura, 1981), debido a fines comparativos, ya que dicho modelo es el más comúnmente usado para calcular niveles de divergencia (Baker y Bradley, 2006; Ríos y Álvarez-Castañeda, 2010; Clare *et al.*, 2011) por lo que permite hacer comparaciones de distancia genética entre diversos trabajos con murciélagos.

#### **6.5 Análisis de morfometría geométrica**

Para determinar la variación en la forma de los cráneos de los *Myotis* analizados, se utilizaron técnicas de morfometría geométrica. Además de los especímenes de *M. peninsularis* y *M. velifer*, se utilizó como grupo externo a *M. yumanensis* (Figura 2c, Figura 4). El grupo externo

se eligió en base a su cercanía filogenética con *M. velifer*, además de ser una especie cuya situación taxonómica no tiene dudas.

Las fotografías se obtuvieron con una cámara Fujifilm Finepix S4000 (Fotógrafa: LANC) y una Canon EOS Rebel xsi (Fotógrafo: NGR, de la UAMI). De cada cráneo se fotografiaron tres vistas: ventral, lateral y dorsal. Cada imagen posee la misma escala (1 cm). Debido al estado de los cráneos, del total de 235 ejemplares y 705 fotografías, la *n* cambió según el análisis de la cara correspondiente: ventral, 176 ejemplares, 43 pertenecientes a *M. peninsularis*, 107 a *M. velifer*, (16 para *M. v. incautus* y 91 para *M. v. velifer*) y 26 de *M. yumanensis*. Para la cara lateral, se analizaron 130 cráneos: 37 de *M. peninsularis*, 8 de *M. v. incautus*, y 58 de *M. v. velifer* y 27 de *M. yumanensis*. Por último, para el análisis del lado dorsal se utilizaron 171 cráneos, 41 de *M. peninsularis*, 102 de *M. velifer* (13 para *M. v. incautus* y 89 para *M. v. velifer*) y 28 de *M. yumanensis*.

### 6.5.1 Registro de la forma

Los programas TPSutil ver. 1.44 y (Rohlf, 2009) y TPSdig ver. 2.12 (Rohlf, 2008) se utilizaron para registrar las coordenadas *x*, *y* de las configuraciones de cada lado craneal a partir de las fotografías. Se posicionaron puntos anatómicos de referencia (marcas) puntos específicos en las fotografías de los cráneos. Esto para evaluar la variación en la forma debido a su ubicación en partes del cráneo que corresponden a estructuras fácilmente reconocibles y con similitud topológica en todos los individuos, permitiendo más precisión para su colocación.

Las marcas fueron ubicadas en base a tres aspectos: 1, estructuras utilizadas en claves morfológicas para la descripción de la especie en cuestión; 2, estructuras en las que difieren los organismos a comparar mediante revisión previa de ejemplares e imágenes; y 3, puntos que permiten describir la forma total del cráneo, algunos previamente utilizados en estudios publicados de otros murciélagos (Bogdanowicz *et al.*, 2005; Caumul y Polly, 2005; Evin *et al.*, 2008).

Para la vista ventral se registraron 16 marcas (Figura 6.a) posicionadas en las siguientes estructuras: punto medio más posterior del lado occipital del *foramen magnum* (1); punto más

extremo hacia el paraoccipital del *foramen magnum* (2); unión del proceso paraoccipital y el hueso exoccipital (3); conjunción de la parte externa anterior del inicio del arco zigomático y el escuamosal, al inicio del arco zigomático (4); conjunción de la parte interna posterior del inicio del arco zigomático y el escuamosal (5); punto más anterior del foramen oval (6); punto más posterior del foramen oval (7); punto más posterior del foramen esfenopalatinoidal (8); punto más anterior del foramen esfenopalatinoidal (9); punto del escuamosal perpendicular al punto más anterior (marca 15) entre los canales esfenopterigoides (10); punto posterior más extremo de la curvatura de la cresta pterigopalatinoidal (11); punto entre el primer premolar y el canino (12); punto más anterior de la premaxila en unión con el incisivo (13); extremo medio anterior de la sutura intermaxilar (14); y punto medio más anterior entre los canales esfenopterigoides o canales nasales dentro de la faringe nasal (15); y punto medio más anterior del foramen magnum pegado al basioccipital (16).

Para la vista lateral fueron 14 marcas (Figura 6b): el punto más externo del proceso paraoccipital (1); la curvatura interna más extrema del proceso paraoccipital junto a la cresta lamboidea (2); el punto más alto del cráneo en la cresta sagital, obtenido por una línea perpendicular a una recta (recta base) dibujada entre los marcas 1 y 11 (3); a partir de la recta base, punto a 90° a la altura del extremo derecho de la bulla mastoidal (4); a partir de la recta base, punto a 90° a la altura del punto extremo izquierdo del yugal (5); a partir de la recta base, punto a 90° a la altura del punto extremo interno del arco zigomático (6); a partir de la recta base, punto a 90° a la altura de la unión del segundo y tercer molar (7); a partir de la recta base, punto a 90° a la altura de la unión del primer y segundo molar (8); a partir de la recta base, punto de intersección a 90° a la altura de la unión del tercer premolar y el primer molar (9); el punto más extremo del nasal y la premaxila (10); el punto más extremo del nasal y el inicio del primer incisivo (11); la parte más extrema de la mandíbula junto al arco zigomático (12); punto interior extremo en la máxima curvatura del proceso zigomático (13) y punto más posterior del arco zigomático pegado al escuamosal (14).

Para la vista dorsal (Figura 6c) se digitalizaron 10 marcas: punto medio extremo de la sutura interparietal en el occipucio (1); punto posterior más extremo de la unión de la sutura interparietal y el escuamosal (2); punto más extremo de la caja craneal a la altura del margen



entre el escamosal y el orificio externo auditivo (3); punto externo posterior del arco zigomático (4); punto interno posterior del arco zigomático (5); punto en el frontal en la conjunción de la constricción interorbital y el arco zigomático (6); curvatura siguiente a la muesca más próxima de la parte anterior del arco zigomático (7); punto más anterior de la premaxila y el incisivo (8); extremo medio anterior de la abertura internasal (9); y punto medio en el frontal perpendicular a la marca 6 (10).

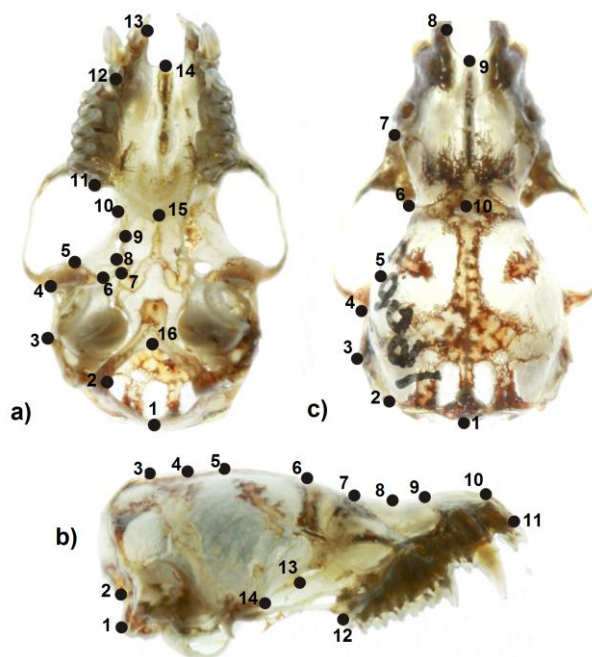


Figura 6. Vista a) ventral, b) lateral y c) dorsal del cráneo de *Myotis peninsularis* con sus correspondientes 16, 14 y 10 marcas o puntos de referencia digitalizados.

### 6.5.2 Análisis generalizado de Procrustes

Para el procesamiento de los datos de configuraciones de coordenadas geométricas obtenidos, se utilizó el paquete de Integrated Morphometrics Package (IMP) versión 7 (Rohlf y Sheets, 2004). Con esta matriz de configuraciones geométricas se realizó una superimposición Procrustes utilizando CoordGen ver. 7a (Sheets, 2011a), extrayendo una matriz con variables de conformación (llamadas Partial warps) y tamaño centroide para su posterior uso en otros programas del IMP. Este procedimiento eliminó efectos de tamaño, posición y escala, obteniendo variación biológica en los datos únicamente (Klingenberg, 2002; Ospina Garcés, 2010).

La variación de cada individuo se describe mediante las distancias (distancias procrustes) entre las marcas de cada configuración con respecto a la configuración consenso en el espacio multivariado. Éstas distancias se utilizan para probar el efecto del tamaño sobre la conformación de los datos, corresponden a la raíz cuadrada de la suma de las distancias cuadradas entre marcas homólogas (Zelditch *et al.*, 2004). La deformación de los ejemplares se puede visualizar con respecto a la configuración consenso, mediante un algoritmo llamado “deformación de placas delgadas” o TPS (“Thin Plate Spline”) (Ospina Garcés, 2010). El tamaño del centroide es una medida de talla o tamaño, generalmente correlacionada con la forma, pero matemáticamente independiente de ella (Zelditch *et al.*, 2004). Sirve para evaluar las relaciones entre forma y tamaño utilizando métodos estadísticos convencionales aplicables en ambos casos.

Las conformaciones de coordenadas Procrustes se utilizaron para realizar análisis multivariados y explorar los patrones que se obtengan de los datos. Mediante ellos se describen patrones de variación entre los individuos y diferenciaciones entre grupos (Zelditch *et al.*, 2004). Es por ello que se realizarán análisis de componentes principales (ACP) y análisis de variables canónicas (AVC) en los datos.

### **6.5.3 Variación de la forma intra-específica de *M. velifer***

Para evaluar la variación de la forma craneal que existe entre los individuos de las subespecies de *M. velifer* (*M. v. velifer* y *M. v. incautus*) se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en el programa PCAGen ver. 7a (Sheets, 2011b) utilizando la matriz de conformación multivariada Procrustes. En este mismo, se evaluaron las diferencias significativas en los componentes principales mediante el Test de Morrison (Morrison, 1967), con el cual se calcula una expresión del estadístico Chi cuadrada ( $\chi^2$ ) para determinar si un par de componentes principales son significativamente distintos uno de otro (nivel de significancia  $\chi^2 < 5.99$ ). Esto indica el componente principal más alto (empezando con los componentes 1 y 2, 2 y 3, y así sucesivamente), hasta que un par de componentes no son estadísticamente diferentes al 5% usando el estadístico  $\chi^2$ .

Se realizó un análisis de discriminación de sexos en CVAGen para evaluar si existen diferencias en la forma entre los ejemplares machos y hembras analizados. Mediante este análisis se podrá inferir si la variación existente está influenciada o no por un posible dimorfismo sexual.

Para evaluar las diferencias de la forma entre los grupos se realizó un análisis de variables canónicas (AVC) con el programa CVAGen ver. 7b (Sheets, 2011c). Aquí mismo se realizó un test de significancia con AMOVA, que determina cuantos ejes distintos existen (nivel de significancia  $p < 0.05$ ) en los datos y computa las variables canónicas que serán visualizadas en los planos de ordenación. Mediante distancias Mahalanobis, asigna cada espécimen a uno de los grupos establecidos a priori. Estos grupos (cada subespecie), se visualizaron en el espacio morfométrico mediante los planos de ordenación de las variables canónicas. También se realizó un procedimiento de validación de los grupos a posteriori mediante porcentaje de asignación (índice de Jackknife), y la visualización de las gradillas de deformación que explican los cambios más significativos en la forma del cráneo de los grupos.

#### **6.5.4 Variación de la forma entre *M. peninsularis* y *M. velifer***

Se evaluó de la variación en la forma entre *M. peninsularis*, *M. v. velifer* y *M. v. incautus* de la misma manera, utilizando los mismos análisis de ACP y AVC anteriormente descritos. En este caso, se añadió a *M. yumanensis* como grupo externo, debido a que es especie hermana de *M. velifer* y para fungir como referencia para dichos análisis. Además, *M. yumanensis*, no presenta controversias en cuanto a su taxonomía, permitiendo entonces establecer un intervalo de variación entre especies y subespecies. También se hizo la evaluación de la forma entre sexos.

Se le puso mayor peso al análisis de variables canónicas en cuanto a la observación de la deformación, debido a que se busca la variación entre especies (grupos). Se analizaron las gradillas de deformación obtenidas con CVAGen, además de la realización de ANOVA's en STATISTICA (StatSoft, 2004) con los puntajes obtenidos en este análisis. En el mismo programa, se realizó un análisis de diferencias de talla mediante el tamaño centroide obtenido con los partial warps de los análisis de variables canónicas.

### 6.5.5 Disparidad

Se realizó un análisis para calcular la diversidad morfológica de todos los grupos (*M. peninsularis*, subespecies de *M. velifer* y grupo externo) mediante la utilización de los puntos anatómicos de referencia dentro del enfoque de morfometría geométrica. Se utilizó el software del IMP, DisparityBox ver. 7 (Sheets y Zelditch, 2010), para estandarizar la medición de estos niveles de variabilidad. Esto permitió hacer comparaciones entre todos los grupos y vistas craneales analizadas. La distancia métrica utilizada es también la distancia procrustes, calculada mediante la media de cada grupo con respecto a los promedios de las medias de todos los grupos. También se efectuó un análisis de confianza con Bootstrap de 400 repeticiones. Se realizaron análisis por vista, por grupo (1, *M. peninsularis*; 2, *M. v. velifer*; 3, *M. v. incautus*, y 4, *M. yumanensis*), y de multi-grupo, y la contribución de cada especie a la variación del mismo.

### 6.5.6 Filogenia y formas ancestrales

Se efectuaron análisis filogenéticos mediante el programa TNT: Tree Analysis Using New Technology (Goloboff *et al.*, 2003, 2008) bajo el criterio de parsimonia (Goloboff, 2003). Se implementó en estos análisis el algoritmo “Ratchet”, que implementa métodos de búsqueda heurística (Nixon, 1999; Goloboff, 2002), cuya finalidad es encontrar el mejor árbol aplicando el proceso de cadenas de Markov a la búsqueda. Inicia buscando el mejor árbol mediante parsimonia, después re-muestra los datos (con Jackknife) limitando nodos al azar. Vuelve a buscar en base a los nuevos parámetros definidos, entonces regresa a los parámetros originales y repite todo el proceso múltiples veces (Matzke, 2010).

Se utilizaron como terminales moleculares las secuencias de *M. peninsularis*, *M. yumanensis* y *M. velifer* (dos haplotipos, correspondientes por distribución a *M. v. velifer* y a *M. v. incautus*), alineadas en MEGA, de los marcadores COI y Cyt. *b*. Para los análisis de configuraciones de marcas, se utilizaron los promedios de las tres vistas craneales (ventral, dorsal y lateral) de los cuatro grupos (*M. peninsularis*, *M. v. velifer*, *M. v. incautus* y *M. yumanensis*) de los análisis de morfometría geométrica. Las configuraciones ancestrales se visualizaron con el mismo programa, colocadas en su respectivo nodo ancestral de cada árbol por vista.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis filogenéticos

#### 7.1.1 Análisis de verosimilitud

Se obtuvieron topologías similares para ambos marcadores, con la diferencia de la presencia de los haplotipos de *M. velifer* en el caso del marcador COI (Figura 7). Las frecuencias de las bases para el marcador COI (HKY + G) fueron: A = 0.2546, C = 0.2429, G = 0.1692 y T = 0.3334; el parámetro de distribución de forma gama fue de 0.1900. En cuanto a Cyt. *b* (TrN + I), las frecuencias de bases fueron: A = 0.2897, C = 0.2742, G = 0.1386 y T = 0.2976; con una proporción de sitios invariables de 0.6265. Los puntajes (scores) para cada árbol fueron 1,873.64 y 2,453.25, respectivamente.

El resultado con el programa GARLI, después del análisis de bootstrap, se obtuvieron las siguientes frecuencias para COI: A = 0.2588, C = 0.2433, G = 0.1566 y T = 0.3412; parámetro de distribución gama de 0.1775. Para Cyt. *b*, las frecuencias de bases fueron: A = 0.2763, C = 0.2804, G = 0.1222 y T = 0.3212; con un parámetro de gama de 0.1556 y sin proporción de sitios invariables. Para ambos marcadores se obtuvo la misma topología que la utilizada en PAUP para el marcador COI (Figura 7a), con diferencias mínimas en la longitud de las ramas. En el caso del marcador Cyt. *b*, existe una diferencia en el acomodo o rotación de las ramas de los grupos externos, puesto que *M. volans* fue el único grupo externo asignado en GARLI.

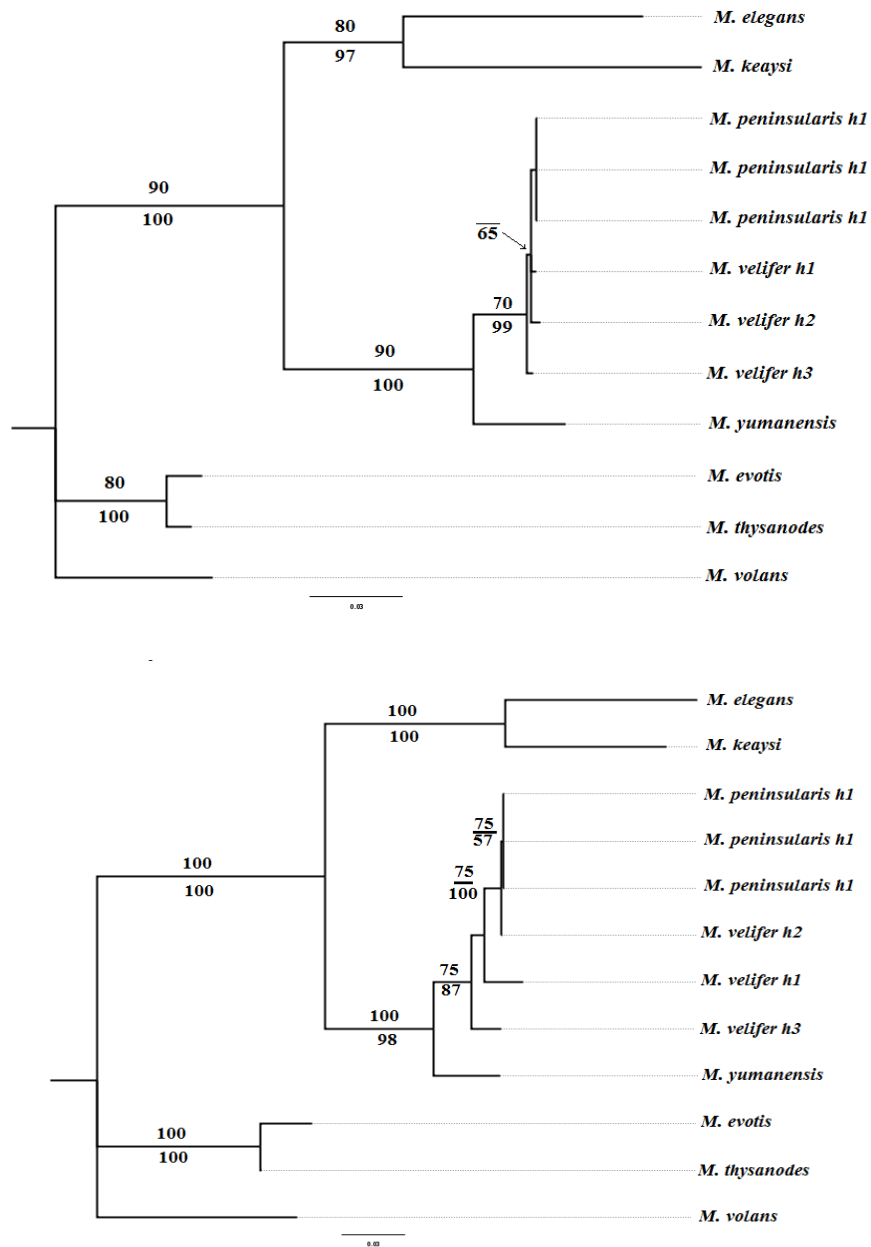


Figura 7. Árboles filogenéticos de COI (arriba) y Cyt. *b* (abajo) bajo el criterio de Máxima Verosimilitud (ML) realizados en PAUP y GARLI de las secuencias de de *Myotis*. El número en las ramas es el soporte estadístico de bootstrap para cada clado, PAUP (arriba de rama) Garli (bajo de rama). No se muestran valores <50%. Visualizado en FigTree.

### 7.1.2 Análisis con parsimonia

En este análisis se aprecia de nuevo la misma topología que se ha obtenido en todos los casos (Figura 8). Las únicas diferencias aparecen en el acomodo de *M. volans* y los soportes estadísticos de bootstrap con cada marcador.

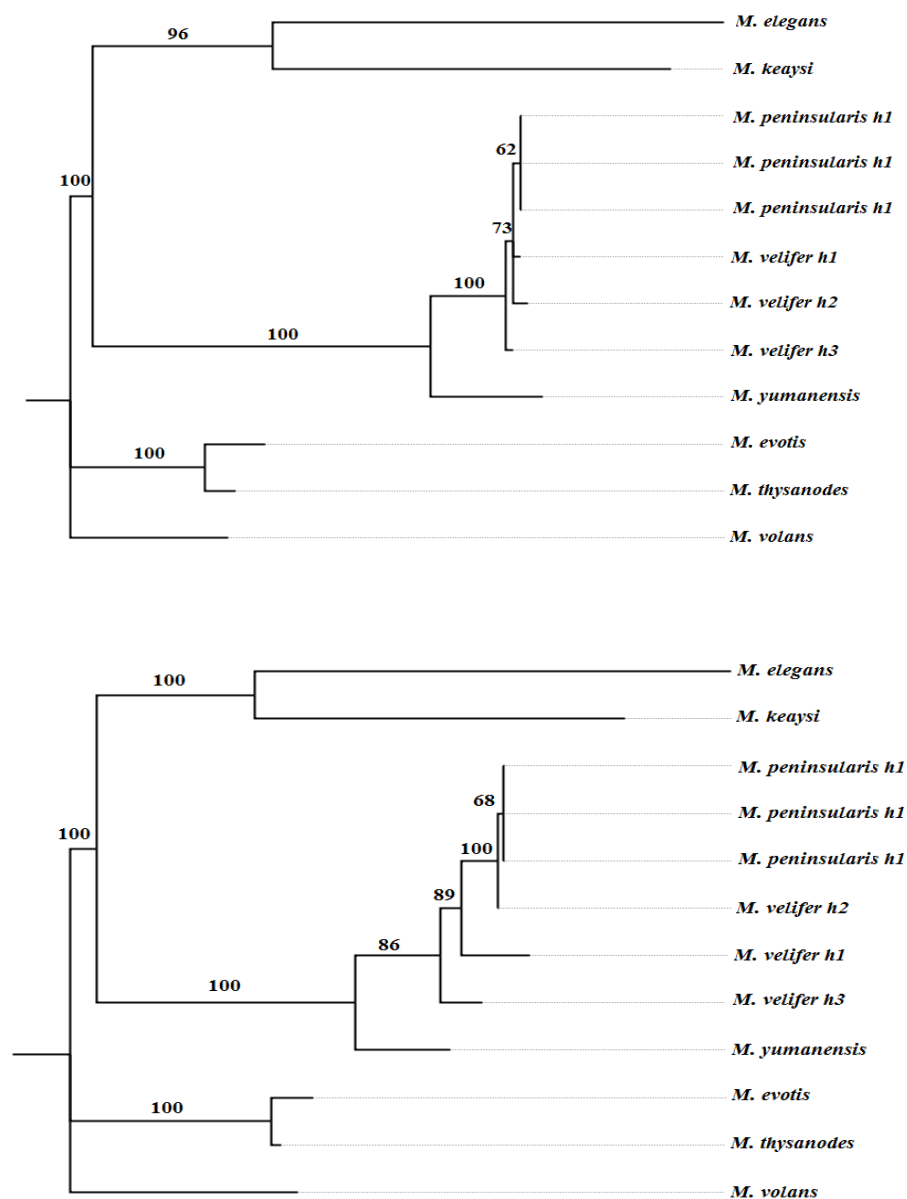


Figura 8. Topología de los árboles obtenidos con los marcadores COI (arriba) y Cyt. *b* (abajo) con el método de Máxima Parsimonia realizados en PAUP. El número en las ramas es el soporte estadístico de bootstrap. No se muestran valores <50%. Visualizado en FigTree.

Como se puede observar, el soporte del clado que engloba a *M. peninsularis*, *M. velifer* y *M. yumanensis* obtuvo un 100% en ambos casos. De igual forma, para el clado de *M. peninsularis* y *M. velifer* también se obtuvo el mismo porcentaje en los dos árboles.

El análisis realizado con WinClada, se obtuvieron tres y cuatro árboles para el marcador COI y Cyt. *b*, respectivamente. Se formaron árboles consenso de los mismos y son los que se presentan en la Figura 9. Los resultados fueron bastante similares, pero en este caso, sólo se utilizó un grupo externo (*M. volans*) como se especificó en la sección de materiales y métodos.

En el caso de COI, dónde tenemos tres haplotipos de *M. velifer*, en uno de los árboles más parsimoniosos se aprecian como clados terminales a *M. peninsularis* con *M. velifer* h1 (haplotipo 1), y en otro clado a los otros haplotipos de *M. velifer*. En el árbol consenso, ambos nodos colapsan para dejar un clado en conjunto para las cuatro terminales (Figura 9a). Para Cyt. *b*, sólo de igual forma se obtiene que el haplotipo más cercano a *M. peninsularis* es el dos. En todos los casos, *M. peninsularis* y *M. velifer* aparecen como grupos hermanos.



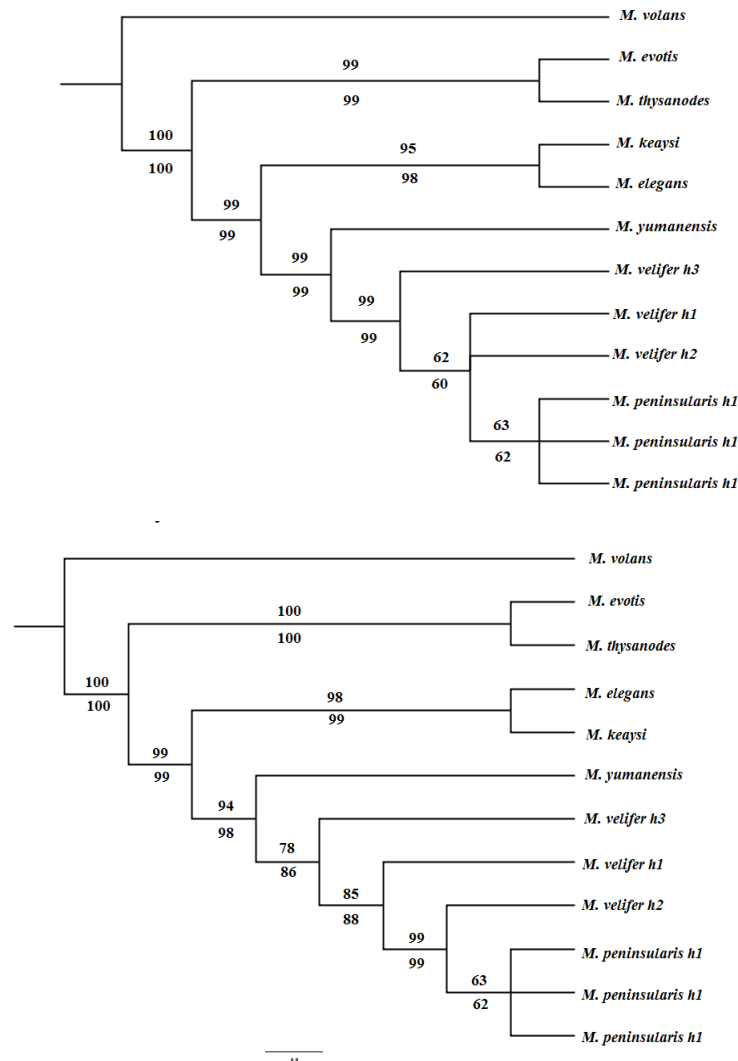


Figura 9. Topología de los árboles obtenidos con los marcadores COI (arriba), y Cyt. *b* (abajo) con el método de MP realizados en WinClada. El número en el lado superior de la rama es el soporte estadístico de bootstrap, y de lado inferior es de Jackknife. Visualizado en FigTree.

### 7.1.3 Análisis bayesianos

El análisis de inferencias bayesianas de los genes COI y Cyt. *b*, arrojaron topologías muy similares (Figura 10), dónde la mayoría de los clados con ambos marcadores poseen un soporte estadístico alto (Bootstrap >90%). En ambos casos, el clado dónde se sitúan *M. peninsularis*, *M. velifer* y *M. yumanensis* tiene un 100% de bootstrap.

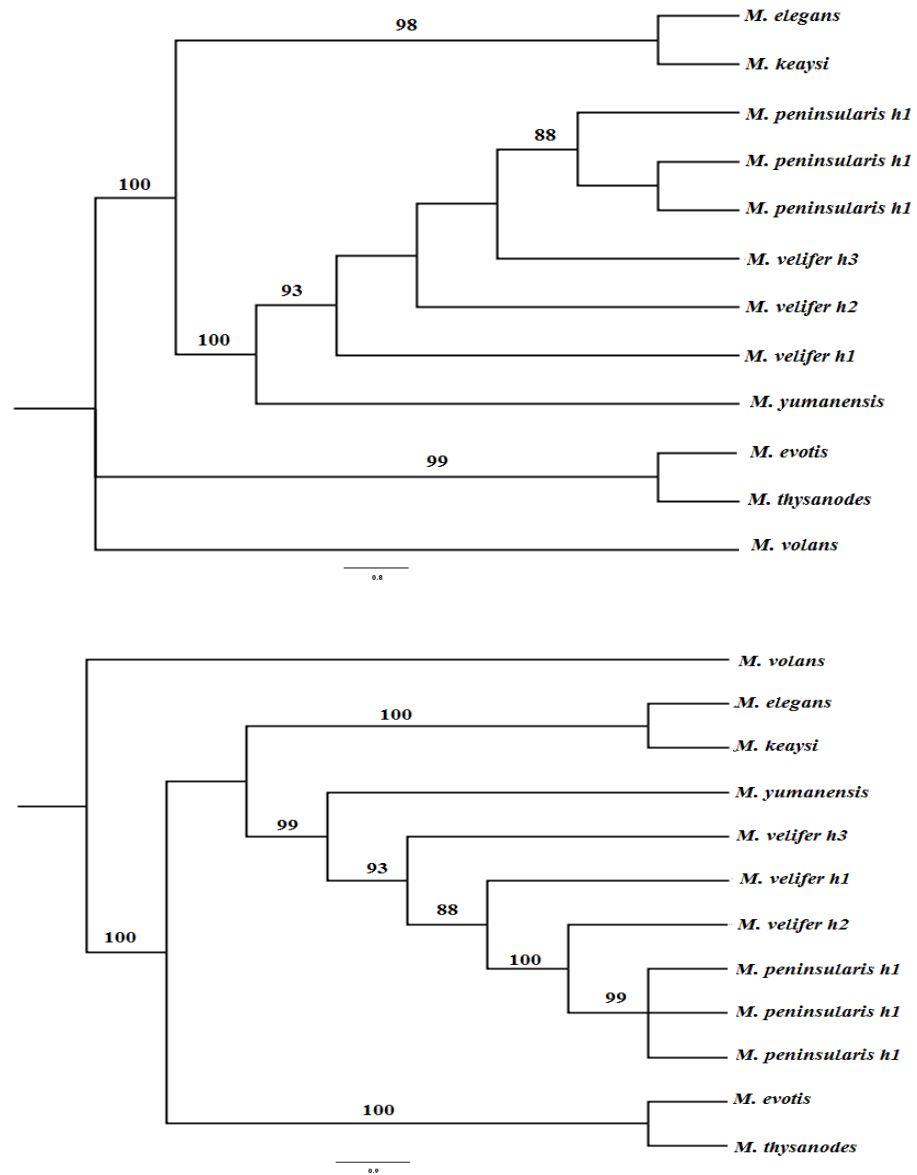


Figura 10. Topología del árbol obtenido con Inferencia Bayesiana con el marcador COI (arriba) y Cyt. *b* (abajo). Soporte estadístico de bootstrap se muestra en las ramas. No se muestran valores <50%. Árbol visualizado en FigTree.

### 7.1.4 Análisis de distancias

Los resultados del análisis de distancia genética arrojaron porcentajes muy bajos entre *M. peninsularis* y *M. velifer* (Tabla II). También se muestra la distancia con respecto a *M. yumanensis*, para evaluar el porcentaje obtenido con la especie hermana de *M. velifer*.

Tabla II. Tabla de porcentaje de distancias genéticas por marcador entre las especies de *Myotis*. Parámetro de distancia Kimura 2 parameter (Kimura, 1981) con bootstrap de 1000 repeticiones.

Distancias genéticas mediante el modelo correspondiente a cada marcador. Se muestra el promedio (*prom.*) de la distancia genética obtenida por los tres haplotipos de *M. velifer* con respecto a *M. peninsularis* y a *M. yumanensis*.

% DISTANCIA GENÉTICA				
	K2P (BT)		HKY + G	TrN + I
	COI	Cyt. <i>b</i>	COI	Cyt. <i>b</i>
<b><i>M. peninsularis</i> vs <i>M. velifer</i> (<i>prom.</i>)</b>	<b>0.40</b>	<b>1.69</b>	<b>0.41</b>	<b>1.69</b>
<i>M. velifer</i> haplotipo 1	0.32	2.69	0.31	2.62
<i>M. velifer</i> haplotipo 2	0.48	0.12	0.46	0.12
<i>M. velifer</i> haplotipo 3	0.49	2.27	0.46	2.32
<b><i>M. peninsularis</i> vs <i>M. yumanensis</i></b>	<b>4.43</b>	<b>5.53</b>	<b>4.26</b>	<b>5.25</b>
<b><i>M. velifer</i> vs <i>M. yumanensis</i> (<i>prom.</i>)</b>	<b>4.43</b>	<b>5.63</b>	<b>4.26</b>	<b>5.34</b>
<i>M. velifer</i> haplotipo 1	4.43	6.5	4.42	6.12
<i>M. velifer</i> haplotipo 2	4.26	5.4	4.26	5.12
<i>M. velifer</i> haplotipo 3	4.6	5.0	4.11	4.78

El porcentaje de distancia genética promedio entre *M. peninsularis* y *M. velifer* fue de 0.40% para COI (el promedio de la distancia de los tres haplotipos de *M. velifer*) y de 1.69% para Cyt. *b*, promedios que coincidieron con los tres modelos de sustitución utilizados. La distancia genética entre *M. yumanensis* y *M. peninsularis* fue de entre el 4.26% hasta el 5.55% también con los tres métodos y ambos marcadores. Porcentajes muy similares en promedio entre *M. yumanensis* y *M. velifer* (Tabla II). La especie más cercana a *M. peninsularis* y a *M. velifer* en cuanto a distancias genéticas, por leves diferencias, fue *M. yumanensis*.

También se obtuvo un árbol de distancias para cada set de datos utilizando el método de NJ en PAUP (Swofford, 2001). Para visualizar las agrupaciones en base a la distancia existente entre cada uno de los *Myotis* analizados, se muestra el árbol obtenido con el marcador COI (Figura 11), siendo ambos de la misma topología, pero variando en las distancias obtenidas.

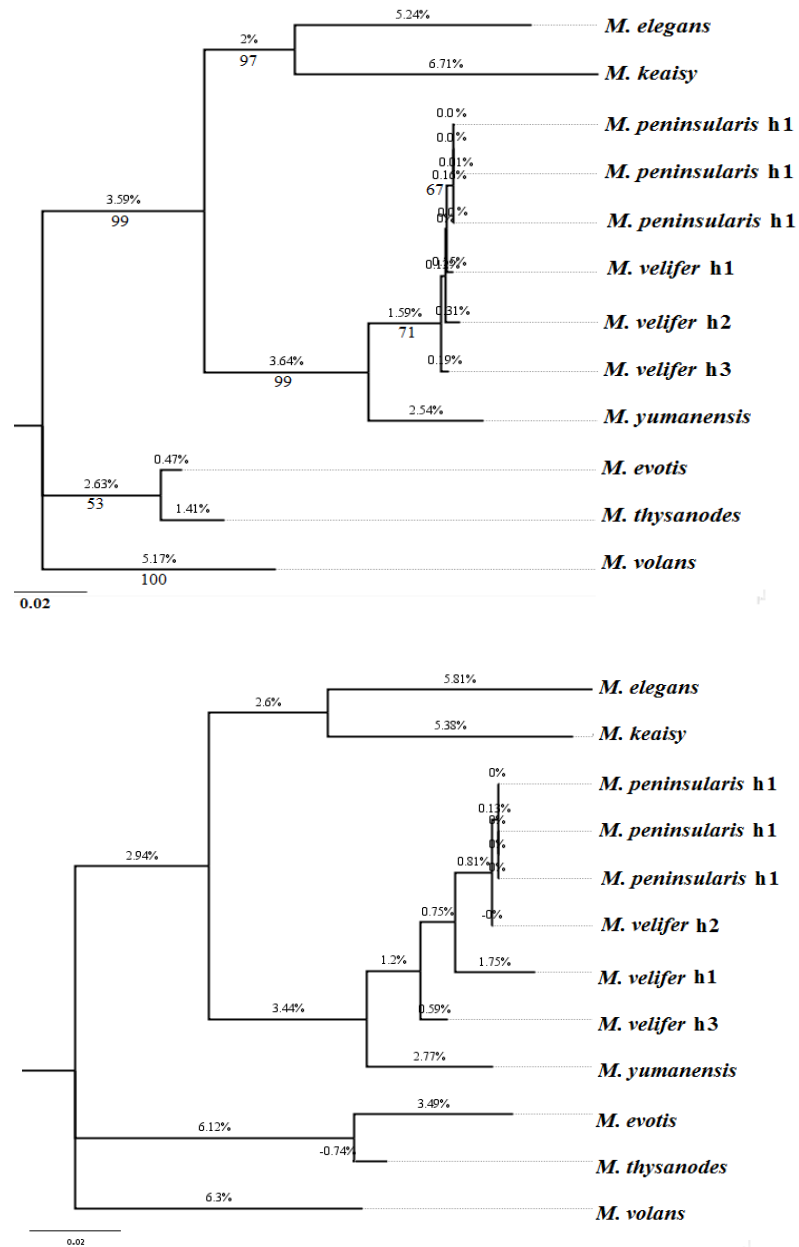


Figura 11. Árboles de distancias con el marcador COI (arriba) y Cyt. *b* (abajo) hechos con el método de NJ en PAUP. Se muestran el porcentaje de distancia (sobre la rama) y el valor de Bootstrap (bajo la rama). Visualizado en FigTree.

## 7.2 Análisis de morfometría geométrica

### 7.2.1 Variación intra-específica de *M. velifer*

El análisis de componentes principales de los datos de morfología geométrica (ACP) con el test de Morrison, (1967) entre *M. v incautus* y *M. v. velifer* no dio resultados significativos en diferencias entre los componentes principales para la cara ventral ( $X^2 = 3.55$ ,  $X^2 < 5.99$ ) ni dorsal ( $x^2 = 2.42$ ,  $X^2 < 5.99$ ), pero si en la vista lateral ( $x^2 = 11.5$ ,  $X^2 < 5.99$ ). En el plano de ordenación de los componentes principales se observa una dispersión algo uniforme de las variables. Los individuos de la cara ventral presentan una variación explicada por los primeros dos componentes principales del 36.05%, la cara lateral un 45.64% y la dorsal de un 41.26% (Tabla 3).

Tabla III. Porcentaje de varianza explicada obtenida por el primer componente principal (CP1) y el componente principal 2 (CP2) en el análisis de variación de la forma intra-específica de *M. velifer*.

	% CP1	% CP2	% Acumulada
<b>Ventral</b>	21.01	15.04	36.05
<b>Lateral</b>	32.01	13.63	45.64
<b>Dorsal</b>	23.81	17.45	41.26

Los planos de ordenación obtenidos por las respectivas vistas, indican que los individuos están muy dispersos en el espacio multivariado, por lo que presentan diferencias significativas en la forma entre sí en las tres vistas. La mayor variación de la cara ventral se observa en la sección media del cráneo, en la zona del arco zigomático. En la vista dorsal se observa una variación uniforme, todas las estructuras (denotadas por las marcas) cambian en una intensidad similar (Figura 12c), a excepción de la marca tres, que denota cambios en la caja craneal, mostrando variación en términos de robustez del cráneo.

La mayor variación explicada por forma con los primeros dos componentes principales se aprecia en la cara lateral. En las tres vistas, la zona en la que todos los individuos presentan más cambios es en el arco zigomático y en la anchura de la caja craneal (Figura 12). La distribución de los especímenes utilizados para este análisis es amplia (Apéndice ii), por lo tanto, el tipo de ambiente en el que habitaron también es muy diverso. La fluctuación de la forma intra-específica de *M. velifer* se observa como se esperaba de una especie con un gran intervalo de distribución.

Las diferencias laterales entre los individuos de las subespecies de *M. velifer* se ubicaron principalmente en la posición del arco zigomático (Figura 12) y de la cresta sagital. El cráneo de *M. v. incautus* es más ancho que de *M. v. velifer*, también posee un rostro más chato, su línea rostral tiene una pendiente más abrupta (Figura 12b).

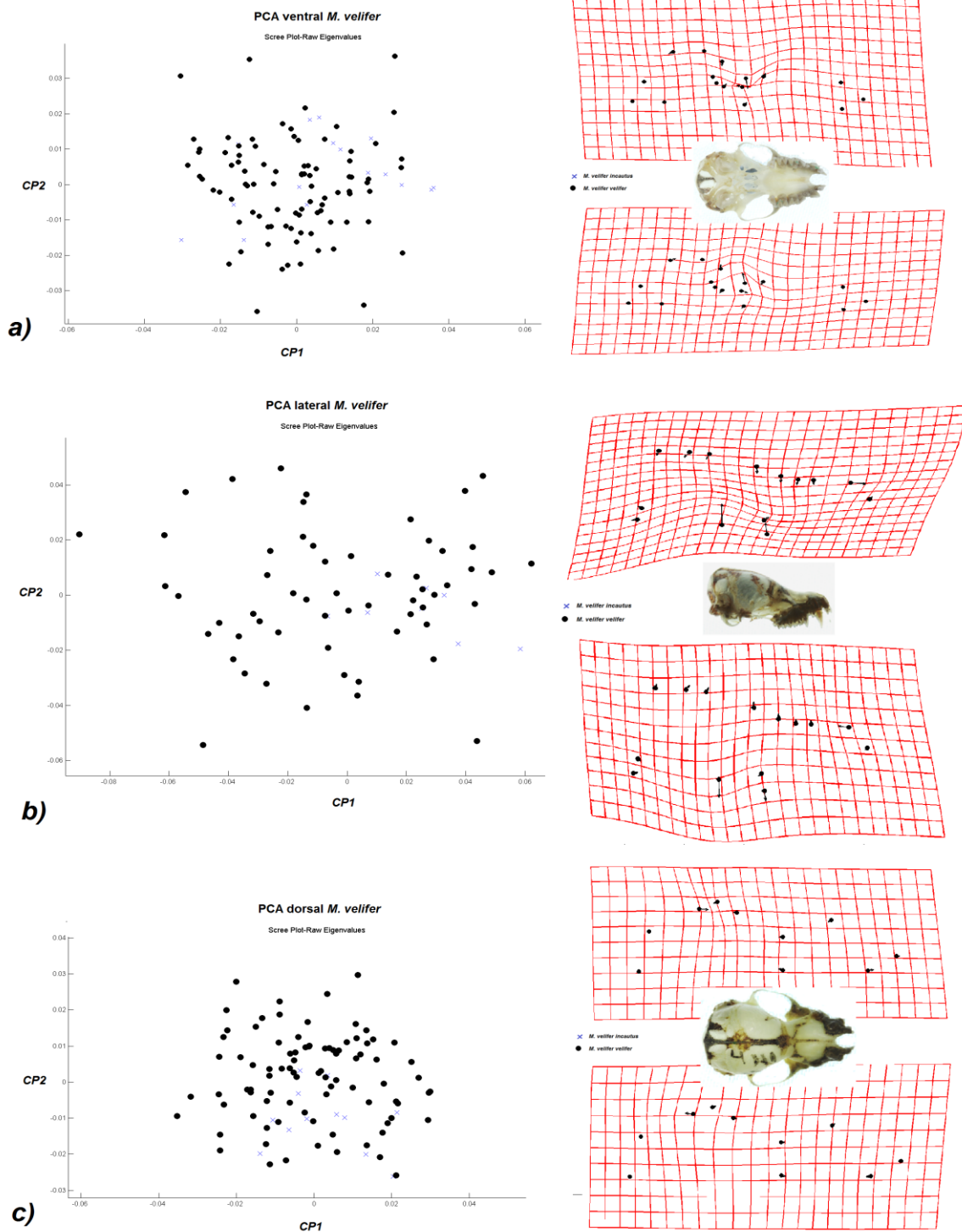


Figura 12. Planos de ordenación (izq.) de los primeros dos componentes principales de las subespecies de *M. velifer*, de las caras ventral (a) lateral (b) y dorsal (c), con sus respectivas deformaciones promedio (der.), y la imagen del cráneo.

El MANOVA realizado en CVAGen, mostró resultados significativos en diferencias de la forma para la cara ventral:  $\lambda = 0.62$ ,  $x^2 = 43.18$ , g. l. = 28,  $P < 0.03$  y dorsal:  $\lambda = 0.71$ ,  $x^2 = 31.50$ , g. l. = 16,  $P < 0.011$ ). El análisis lateral no fue significativo ( $P = 0.4$ ), por lo que no existen diferencias significativas en las formas del cráneo en vista lateral entre ambas subespecies. El estadístico lambda  $\lambda$  fue relativamente alto en ambas vistas restantes, lo que implica poca diferenciación.

Los planos de ordenación de las tres vistas mostraron una dispersión similar. Los tres espacios en la primera variable canónica (eje  $x$ ) muestran una conformación que tiende más a una esfera, es decir, no existe tanta diferenciación grupal. Esto indica que las características de la mayoría de los integrantes de los grupos son cercanos a la media de los grupos (poca distancia procrustes al promedio). En la siguiente figura (Figura 13) se observan los planos de la vista ventral (a) y dorsal (b), junto con sus gradillas de deformación (el plano de la vista lateral presenta la misma dispersión, pero no se muestra debido a que su análisis no fue significativo). El cráneo de *M. v. incautus* es más chato (más corto longitudinalmente) que el de *M. v. velifer*, pero más amplio (alto, verticalmente), diferencias indicadas por los vectores en las gradillas de deformación. En general, *M. v. velifer* tiene una silueta más estilizada que *M. v. incautus*.



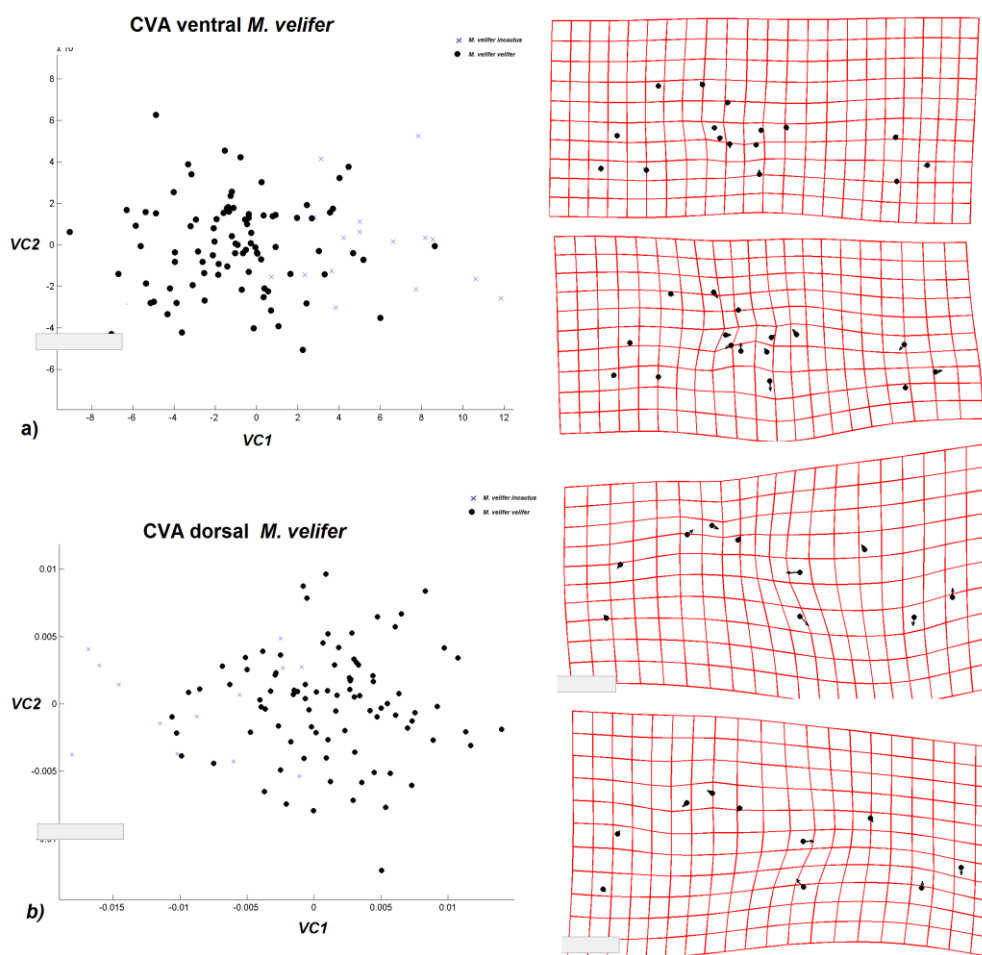


Figura 13. Planos de ordenación (izq.) de las variables canónicas que visualizan la conformación establecida a priori de las subespecies *M. v. incautus* y *M. v. velifer*. Se observan la vista ventral (a), y dorsal (b) (la lateral no fue significativa), con sus respectivas gradillas de deformación promedio (der.).

El análisis de asignación de grupos de Jackknife mediante las distancias Mahalanobis, mostró relativamente un porcentaje bajo de asignaciones correctas comparadas con las asignaciones a priori. Para la vista ventral, se obtuvieron un 76.16% de asignaciones correctas, para la vista lateral un 12.12% y para la vista dorsal un 72.55%. El porcentaje tan bajo obtenido en la vista lateral indica que no hay una completa discriminación con los grupos establecidos a priori, es por ello que existen muchos traslapes entre los individuos de *M. v. incautus* con los de *M. v. velifer*. Con las características de forma analizadas en la cara ventral y dorsal si se puede

hacer una distinción entre los grupos asignados previamente. La descripción del análisis de asignación con los cuatro grupos (Tabla 4) nos permite visualizar los traslapes entre grupos a priori y la pertenecía de los mismos mediante Jackknife.

Tabla IV. Análisis de asignación de ejemplares a un grupo definido a priori mediante el método de Jackknife en CVAGen para las comparaciones entre las *M. peninsularis*, las subespecies de *M. velifer* y *M. yumanensis*, en las tres vistas de los cráneos. Los valores en comparación, son el porcentaje del total por especie de cada vista.

<b>ANÁLISIS DE ASIGNACIÓN DE GRUPOS DE JACK KNIFE</b>				
	<i>%I</i>	<i>%II</i>	<i>%III</i>	<i>%IV</i>
Ventral 73.3% correctas				
<i>M. peninsularis (I)</i>	72	14	14	0
<i>M. v. velifer (II)</i>	15	71	14	0
<i>M. v. incautus (III)</i>	15	39	46	0
<i>M. yumanensis (IV)</i>	0	0	4	96
Lateral 77.7% correctas				
<i>M. peninsularis (I)</i>	92	0	8	0
<i>M. v. velifer (II)</i>	0	60	40	0
<i>M. v. incautus (III)</i>	0	14	86	0
<i>M. yumanensis (IV)</i>	4	0	0	96
Dorsal 78.9% correctas				
<i>M. peninsularis (I)</i>	85	15	0	0
<i>M. v. velifer (II)</i>	77	74	19	0
<i>M. v. incautus (III)</i>	0	55	45	0
<i>M. yumanensis (IV)</i>	0	0	0	100

### 7.2.2 Variación de la forma entre *M. peninsularis* y *M. velifer*

Se realizó un análisis exploratorio en PCAGen con *M. peninsularis*, las subespecies de *M. velifer* y *M. yumanensis*. En el test de Morrison (1967) realizado en PCAGen, las diferencias entre los CP entre *M. peninsularis*, las subespecies de *M. velifer* y *M. yumanensis* se obtuvieron resultados significativos para todas las vistas. Para la vista ventral se obtuvieron dos componentes significativos ( $\chi^2 = 19.25$  y  $11.77$ ,  $X^2 < 5.99$ ), y un componente significativo para la lateral ( $\chi^2 = 15.53$ ,  $X^2 < 5.99$ ) y dorsal ( $\chi^2 = 23.36$ ,  $X^2 < 5.99$ ).

El porcentaje de variación explicada por los primeros dos componentes principales se lista en la Tabla V. En su conjunto representan la máxima variación de las variables analizadas. En la

vista ventral, el CP1 y el CP2 fueron significativos, lo que implica que las características de ambos componentes son importantes para la diferenciación de la forma de los individuos, es por ello que la variación explicada por ambos componentes es muy parecida. La vista dorsal fue la que mejor explicó la variación de los individuos con las características del primer componente, porcentajes similares a los obtenidos en la vista lateral. El análisis de la forma entre individuos no se muestra (gradillas de deformación), debido a que el objetivo de éste análisis es encontrar variación entre grupos, además de la introducción de *M. yumanensis* (grupo externo). En los análisis de disparidad, se obtienen porcentajes de diferenciación de la forma, comparables para todos los grupos.

Tabla V. Porcentaje de varianza explicada obtenida por el componente principal 1 (CP1) y el componente principal 2 (CP2) en el análisis de variación de la forma entre *M. peninsularis*, las subespecies de *M. velifer* y *M. yumanensis*.

	<b>% CP1</b>	<b>% CP2</b>	<b>% Acumulado</b>
<b>Ventral</b>	21.01	15.04	36.05
<b>Lateral</b>	32.41	16.08	48.49
<b>Dorsal</b>	35.22	16.64	51.86

En el caso del plano de ordenación de la vista ventral, se obtuvieron dos CP significativos. La introducción de *M. yumanensis* al presente análisis permite minimizar visualmente las diferencias entre los individuos de *M. velifer* y *M. peninsularis*, como podemos observar en las conformaciones obtenidas con los componentes principales. La posición en el espacio multivariado refleja que los individuos (características) de éstas especies se colocan más cercanos al promedio, mientras que los individuos de *M. yumanensis* se localizan en otro sector del espacio multivariado. En la Figura 14b, se observa una representación en 3D de las variables obtenidas en el ACP ventral, dónde se intenta visualizar la localización de los ejemplares de *M. yumanensis* (Del 115 al 123, del 129 al 132 y del 164 al 176).

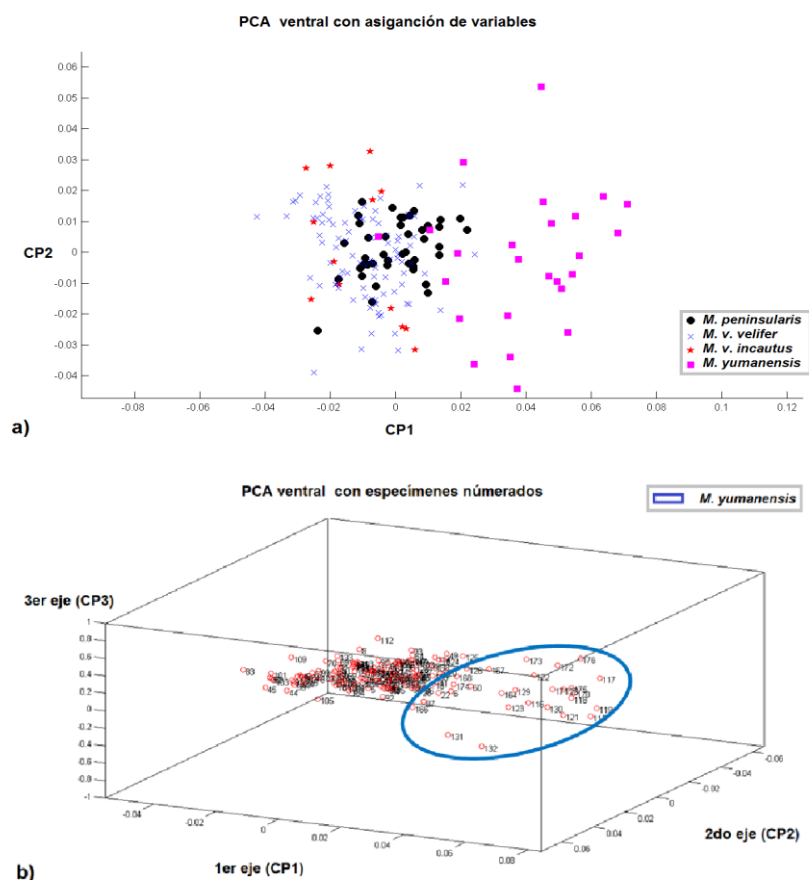


Figura 14. Planos de ordenación de componentes principales de la vista ventral. Plano de ordenación con 2 ejes (a) obtenido en PCAGen. El segundo plano (b) muestra tres dimensiones (realizado en CoordGen), permitiendo visualizar la localización de *M. yumanensis* en comparación a la de los individuos de las otras dos especies.

La cara lateral y la dorsal ofrecen altos valores de variación explicada (48.49% y 51.86%, respectivamente) con los primeros dos componentes principales (Tabla V). Estos valores indican que la variación explicada por el 1er. CP permiten distinguir mejor las variables, estructurando mas su localización. Por esto se puede visualizar una tendencia de localización en las conformaciones de variables. En el espacio multivariado (Figura 15) se observa que los individuos de *M. peninsularis* y *M. velifer* se ubican cerca del centro del cuadrante para el CP1 (eje  $x$ ). Esto indica que la forma de estos individuos es muy cercana al promedio. En cambio, *M. yumanensis* se distribuye hacia el lado negativo en la cara lateral y hacia el positivo en la cara dorsal.

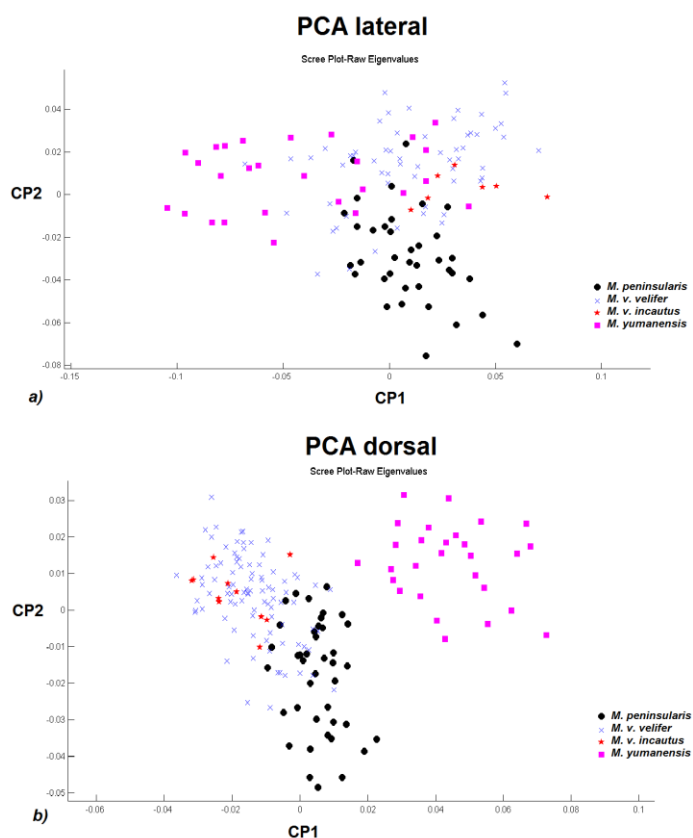


Figura 15. Planos de ordenación de los primeros dos componentes principales de la vista lateral (a) y dorsal (b) en PCAGen.

Debido a que uno de los principales objetivos es encontrar la variación existente entre *M. peninsularis* y *M. velifer*, el análisis de variación entre grupos de CVAGen es más relevante para este set de datos. Se realizó un análisis de discriminación en CVAGen, utilizando como asignación de grupos a hembras y machos para evaluar si existe dimorfismo sexual significativo en los análisis de forma. En ninguna de las tres vistas se obtuvo un resultado significativo ( $P < 0.05$ ): ventral,  $P = 0.08$ ; lateral,  $P = 0.9$ ; dorsal,  $P = 0.4$ . El ANOVA utilizado para realizar el análisis de significancia en el tamaño centroide, arrojó resultados significativos con una Wilk's Lambda  $\lambda = 0.003$  ( $F=12750$ ,  $P > 0.05$ ) como intercepción y  $\lambda = 0.3$  ( $F = 21$ ,  $P < 0.5$ ). En la gráfica del tamaño centroide (Figura 16) se observan las diferencias en el tamaño entre los cuatro grupos. La vista ventral (rojo) es la que posee la menor variación, incluso para *M. v. incautus* que fue el grupo que más variación presentó.

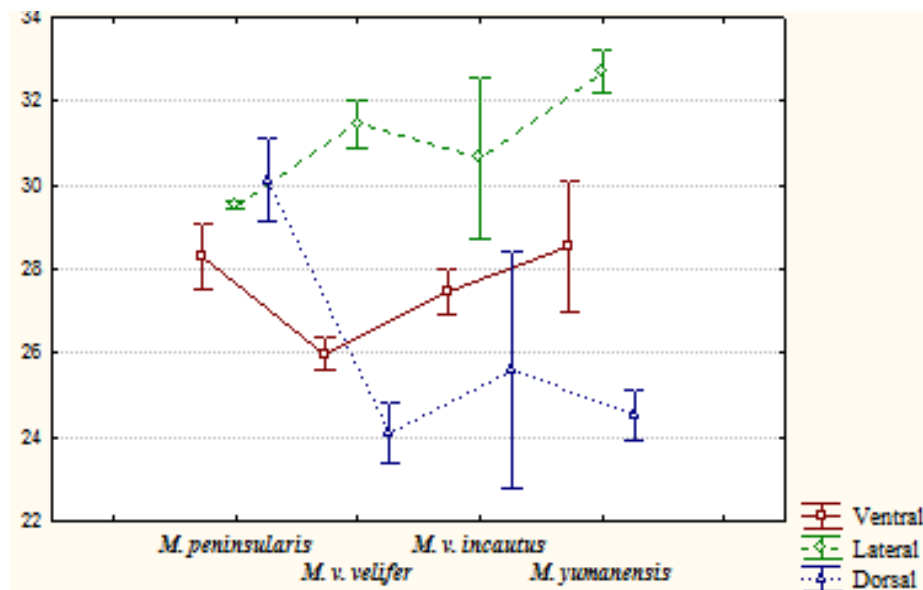


Figura 16. Gráfica del ANOVA del tamaño centroide obtenido con los Partial Warps del AVC. Los intervalos de confianza se representan en las barras verticales de cada especie, a los lados del promedio.

El MANOVA mostró resultados significativos en diferencias de la forma para todas las vistas (Tabla VI). Así mismo, existe una gran discriminación con lambda para el grupo de *M. yumanensis* con respecto a los demás, como grupo externo, es el más diferente. En la cara ventral, se obtuvieron tres ejes distintos (Figura 17a), lo que permitió separar a todos los grupos establecidos a priori: primer eje (separa a *M. yumanensis* del resto):  $\lambda = 0.05$ ,  $x^2 = 451.26$ , g. l. = 84,  $P < 2.22 \times 10^{-16}$ ; segundo eje (separa a *M. peninsularis* de las subespecies de *M. velifer*):  $\lambda = 0.46$ ,  $x^2 = 120$ , g. l. = 54,  $P < 5.15 \times 10^{-07}$ ; y tercer eje (separa a las subespecies de *M. velifer* entre sí):  $\lambda = 0.76$ ,  $x^2 = 42.44$ , g. l. = 26,  $P < 0.02$ . En las gráficas obtenidas mediante el ANOVA, podemos observar como cada uno de los ejes discrimina a los grupos establecidos, iniciando con el más diferente (*M. yumanensis*) definido por el primer eje o variable canónica del análisis (Figura 17), seguido por la discriminación de *M. peninsularis* de las subespecies de *M. velifer*, y luego de *M. v. incautus* (con el tercer eje) de *M. v. velifer*. El orden en la discriminación de los grupos ocurrió de la misma forma en los tres análisis.

Tabla VI. Valores obtenidos en el análisis de significancia con MANOVA realizado en CVAGen.

VALORES DEL ANÁLISIS DE SIGNIFICANCIA DE MANOVA					
Vista	Eje	Lambda $\lambda$	$x^2$	G.L.	$P < 0.05$
Ventral	1	0.05	451.26	84	$2.22 \times 10^{-16}$
	2	0.46	120.74	54	$5.15 \times 10^{-07}$
	3	0.76	42.44	26	0.02
Lateral	1	0.02	413.71	72	$2.22 \times 10^{-16}$
	2	0.21	175.54	46	$2.22 \times 10^{-16}$
Dorsal	1	0.04	494.46	48	$2.22 \times 10^{-16}$
	2	0.36	159.37	30	$2.22 \times 10^{-16}$
	3	0.81	32.77	14	0.003

En la cara dorsal (Figura 17c), también se obtuvieron tres ejes distintos lo que permitió separar a todos los grupos establecidos a priori: el primer eje (separa a *M. yumanensis* del resto)  $\lambda = 0.04$ ,  $x^2 = 494.46$ , g. l. = 48,  $P < 2.22 \times 10^{-16}$ ; segundo eje (separa a *M. peninsularis* de las subespecies de *M. velifer*)  $\lambda = 0.36$ ,  $x^2 = 30$ , g. l. = 54,  $P < 2.22 \times 10^{-16}$ ; y tercer eje (separa a las subespecies de *M. velifer* entre sí)  $\lambda = 0.81$ ,  $x^2 = 32.77$ , g. l. = 14,  $P < 0.003$ . Esta vista ofrece una mayor discriminación de *M. peninsularis* con respecto a *M. velifer* ( $\lambda = 0.36$ ), lo que implica que *M. peninsularis* tiene características en la vista dorsal que permiten hacer una diferenciación en la forma mejor que en la cara ventral.

La vista lateral fue la que mejor discriminó (jerárquicamente) a *M. yumanensis* y a *M. peninsularis* de *M. velifer*. Se obtuvieron dos variables canónicas en este análisis, no hubo diferenciación significativa para las subespecies de *M. velifer* (análisis intra-específico). En el análisis MANOVA se obtuvo para el primer eje (*M. yumanensis*)  $\lambda = 0.02$ ,  $x^2 = 413.71$ , g. l. = 72,  $P < 2.22 \times 10^{-16}$ ; y para el segundo eje (*M. peninsularis*)  $\lambda = 0.21$ ,  $x^2 = 175.54$ , g. l. = 46,  $P < 2.22 \times 10^{-16}$ . En este caso, la tercera variable canónica mediante un ANOVA realizado en STATISTICA alcanzó a detectar diferencias entre las subespecies de *M. velifer* (Figura 17b).

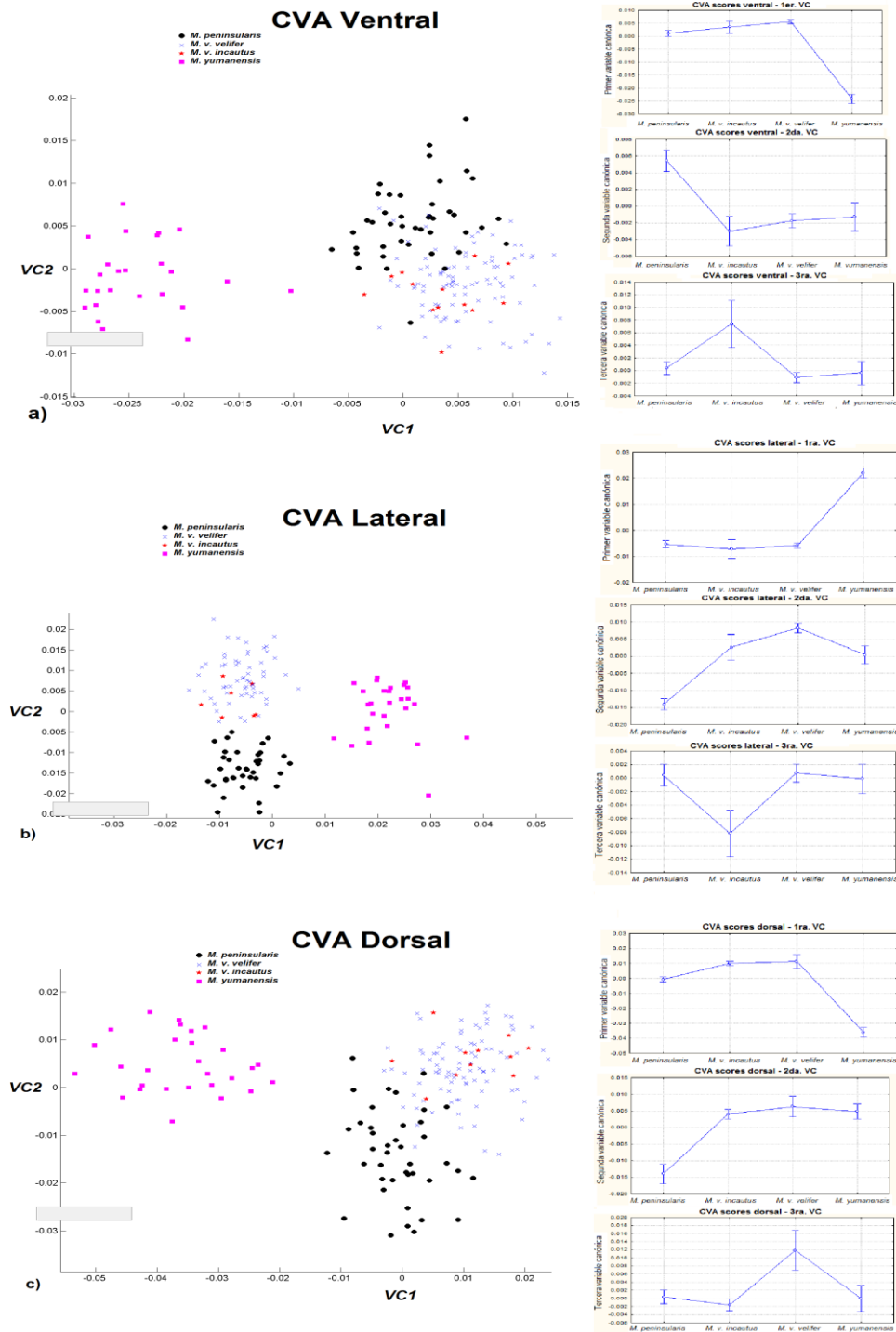


Figura 17. Planos de ordenación de variables canónicas de las vistas a) ventral, b) lateral, y c) dorsal de los cuatro grupos analizados. Se muestra una gráfica de promedios con su intervalo de confianza del 0.95% (barras verticales) por cada uno de los tres ejes significativos. En las tres vistas, de arriba hacia abajo, se muestran las gráficas de las primeras tres variables canónicas.



Las características ventrales que diferencian a *M. peninsularis* de *M. velifer* se concentran principalmente en la zona media del cráneo, que se visualizan mediante las gradillas de deformación del eje canónico y (Figura 18). Los ejemplares de *M. peninsularis* tienen un cráneo más globoso y angosto, mientras que en general, los miembros de *M. velifer* tienen la sección de la caja craneal que está pegada al inicio del arco zigomático más ancha y “cuadrada” (Figura 18). La sección media del cráneo en *M. peninsularis* tiene los forámenes esfenopterigoidales (Figura 6) más amplios que *M. velifer*, de igual forma que el basiesfenoide. El módulo nasal, se muestra más delgado y angosto en *M. peninsularis* que en *M. velifer*. La abertura de la premaxila en *M. peninsularis* posee una forma triangular mientras que en *M. velifer* tiende más a ser curva, aun cuando posee mucha variación entre todos los individuos. Las diferencias de *M. yumanensis* con respecto a los demás grupos se aprecian con la gradilla VC1, sección negativa del eje.

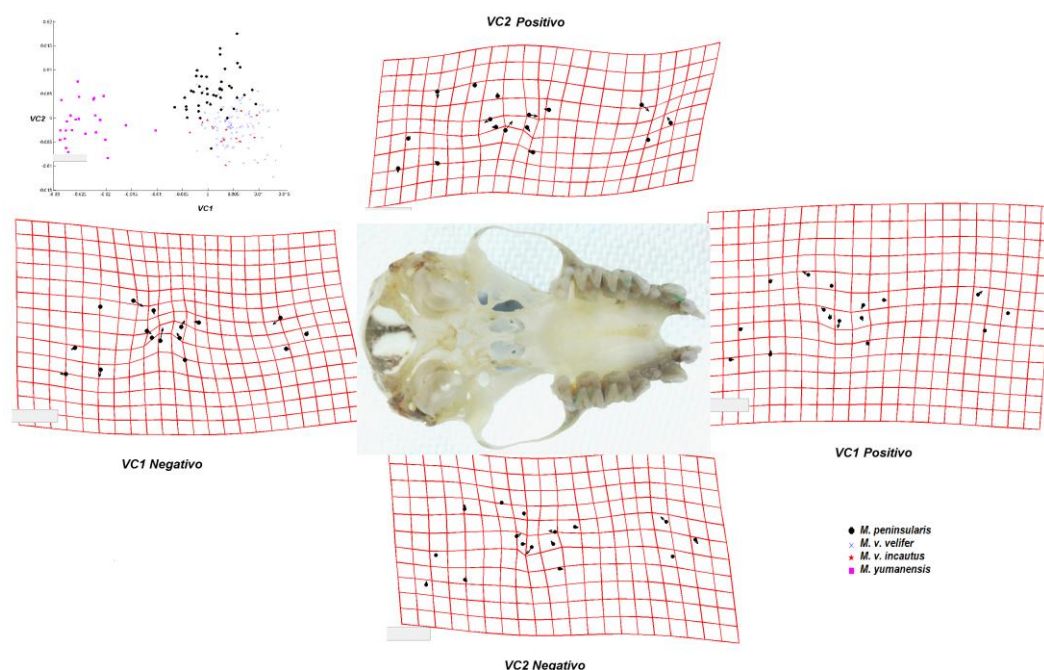


Figura 18. Gradillas de deformación de la vista ventral. Los vectores muestran la dirección e intensidad de la deformación de las estructuras. Se denotan una gradilla por cuadrante para observar los cambios en el cráneo según la posición de los ejemplares.

La vista lateral posee las características que mejor discriminan por la forma a *M. peninsularis* de *M. velifer*. En el plano de ordenación de esta vista, *M. peninsularis* se separa

totalmente de los otros grupos (Figura 17). Las diferencias se pueden apreciar con las gradillas obtenidas de la VC2, de los cuadrantes negativos y positivos. La zona posterior del cráneo presenta la mayor diferenciación en la parte superior del mismo, en la cresta sagital. En *M. peninsularis*, esta zona es más procumbente en la parte anterior de la cresta que en la parte superior. En contraparte, *M. velifer* es más procumbente en la parte posterior que en la anterior (marcas 3, 4 y 5; Figura 6). En el área media - inferior del cráneo, se observan diferencias en la amplitud del arco zigomático, que es mayor en *M. velifer*. En cuanto a la altura del cráneo, *M. peninsularis* es en general más alto que *M. velifer*, por lo que el rostro de *M. peninsularis* es más obtuso que el de *M. velifer*. El límite rostral suave también define la figura estilizada de *M. peninsularis*, ya que la pendiente rostral en *M. velifer* es más abrupta. En general, es más largo que ancho en el caso de *M. peninsularis* y al contrario con *M. velifer* (Figura 19).

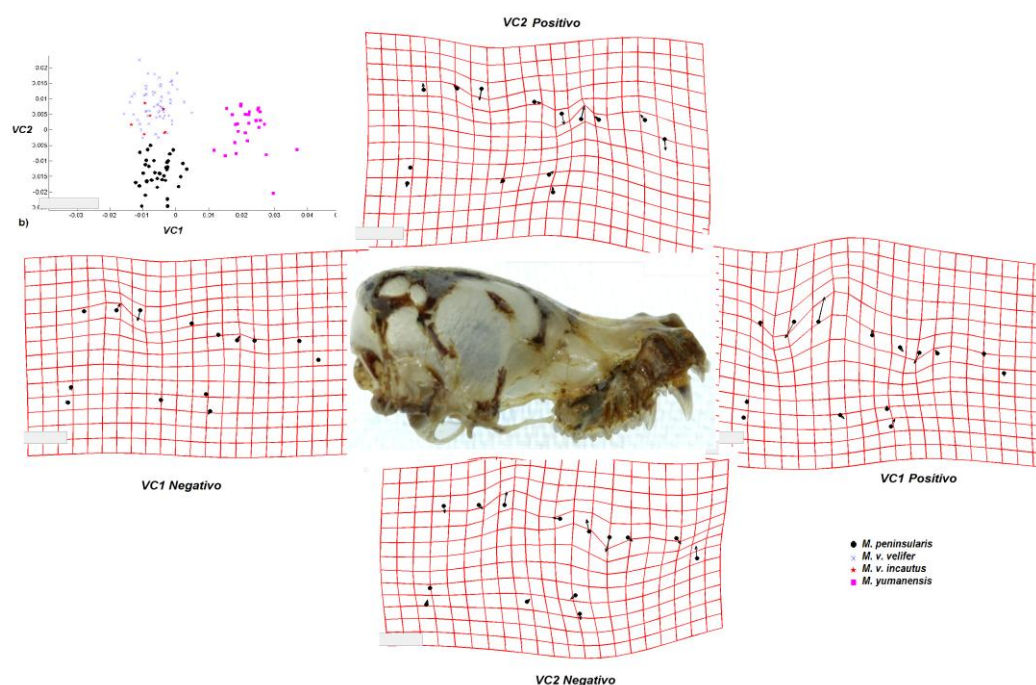


Figura 19. Gradillas de deformación de la vista lateral. Los vectores muestran la dirección e intensidad de la deformación de las estructuras. Se denotan una gradilla por cuadrante para observar los cambios en el cráneo según la posición de los ejemplares.

En el plano de ordenación de la vista dorsal (Figura 17), se presenta una dispersión similar que en la ventral, sólo que en cuadrantes distintos. En general, se observan características

discriminantes principalmente en la forma del área de la caja craneal y el área rostral. La sección posterior del cráneo es más ancha en *M. velifer* (gradilla VC2 positivo); pero en la sección media, al inicio del arco zigomático en el escamosal (marcas 3 - 5), se comprime creando un contorno craneal cuadrado en comparación a *M. peninsularis* (Figura 20). La sección del arco zigomático, particularmente en el inicio del escamosal, es más gruesa y pronunciada en *M. velifer* que en *M. peninsularis*. Por último, la sección del rostro se muestra más angosta y larga en *M. peninsularis* (VC2 negativo).

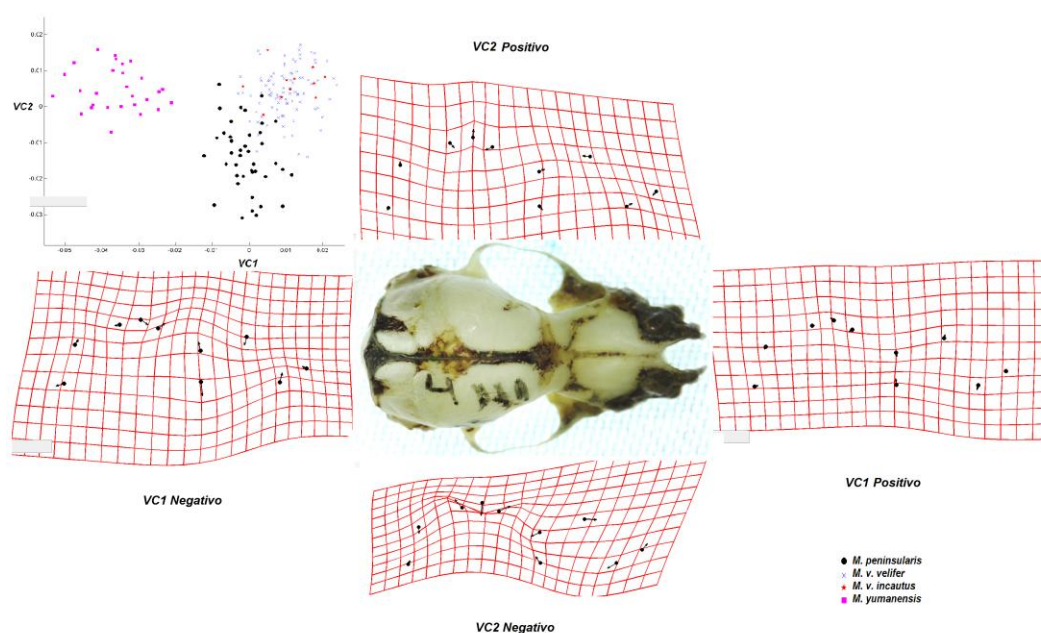


Figura 20. Gradillas de deformación de la vista dorsal. Los vectores muestran la dirección e intensidad de la deformación de las estructuras. Se denotan una gradilla por cuadrante para observar los cambios en el cráneo según la posición de los ejemplares.

El análisis de asignación de Jackknife para los cuatro grupos incluidos en este análisis (Tabla IV), mostró resultados mayores al 70% de asignaciones correctas para todas las vistas. En la vista ventral, se obtuvieron un 73.30% de asignaciones correctas, para la vista lateral un 77.69% y para la vista dorsal un 78.95%. Los grupos que más se traslapan entre sí son las subespecies de *M. velifer*. También ocurre con *M. peninsularis*, el cual posee algunos traslapes con alguna de estas dos subespecies.

### 7.2.3 Disparidad

El análisis de disparidad (DisparityBox, Sheets y Zelditch, 2010) arrojó resultados estandarizados que permitieron hacer una comparación del total de los datos morfométricos obtenidos (Tabla VII). Básicamente, nos permite analizar la variación de todos los datos analizados y visualizar cuáles de ellos fueron los más variables. Los grupos analizados (se utiliza el número asignado correspondiente a su especie o subespecie, como se denota en la tabla VII) conservan el mismo orden con el que se han tratado en todos los set de análisis. La mayor variación en cuanto a lado de digitalización del cráneo se obtuvo en el análisis de la vista lateral, en específico del grupo 4 (0.0039) y del 2 (0.0037). En la vista dorsal se obtuvieron los valores más bajos (grupo 2, 0.0009; y grupo 3, 0.0008) de variación. Los valores de los análisis ventrales y dorsales fueron muy similares debido a que básicamente, las estructuras que fueron comparadas obedecen a la línea de la silueta del cráneo.

Tabla VII. Disparidad de los cuatro grupos basados en distancias Procrustes con el método de Foote. Se realizaron también análisis de Bootstrap como soporte estadístico y para obtener los intervalos de confianza.

<b>DISPARIDAD DE GRUPOS BASADOS EN DISTANCIAS (FOOTE) PROCRUSTES</b>						
<b>Vista</b>	<b>Especie</b>	<b>Distancia procrustes</b>	<b>Disparidad (Bootstrap 200 rep.)</b>	<b>Intervalo mín. y máx. con el 95% de confianza sobre BT</b>		<b>Error estándar</b>
<b>Ventral</b>	<i>M. peninsularis</i> (1)	0.00090	0.00085	0.00066	0.00094	0.00007
	<i>M. v. velifer</i> (2)	0.00130	0.00127	0.00101	0.00157	0.00015
	<i>M. v. incautus</i> (3)	0.00170	0.00174	0.00097	0.00217	0.00030
	<i>M. yumanensis</i> (4)	0.00200	0.00203	0.00148	0.00253	0.00028
<b>Lateral</b>	<i>M. peninsularis</i> (1)	0.00270	0.00271	0.00204	0.00319	0.00030
	<i>M. v. velifer</i> (2)	0.00370	0.00370	0.00299	0.00426	0.00031
	<i>M. v. incautus</i> (3)	0.00190	0.00189	0.00078	0.00193	0.00032
	<i>M. yumanensis</i> (4)	0.00390	0.00392	0.00289	0.00473	0.00042
<b>Dorsal</b>	<i>M. peninsularis</i> (1)	0.00120	0.00116	0.00091	0.00135	0.00010
	<i>M. v. velifer</i> (2)	0.00090	0.00090	0.00080	0.00097	0.00004
	<i>M. v. incautus</i> (3)	0.00080	0.00082	0.00049	0.00096	0.00012
	<i>M. yumanensis</i> (4)	0.00110	0.00108	0.00077	0.00138	0.00014

Las diferencias más importantes encontradas en estas vistas siempre se refirieron a la forma de la caja craneal y a la amplitud del rostro con respecto a cada grupo. La vista dorsal presenta valores menores debido a que registró la variación de la forma de menos estructuras que la ventral, por ejemplo, la forma del foramen magnum. En el caso de la vista lateral, se registra la mayor variación debido a que esta vista demostró ser la que mejor discrimina a las especies analizadas.

Analizando los datos por especie, se observa que la vista lateral es la que presenta mayor variación (Tabla VII, Figura 21) en todas las vistas. La vista ventral posee valores de disparidad cercanos entre los cuatro grupos, los intervalos de confianza obtenidos con las réplicas de bootstrap se conectan entre sí, a excepción de *M. peninsularis*, cuyos valores de confianza son muy cercanos al promedio. La vista dorsal es la que presenta menor variación y es la más homogénea de todos los análisis. El grupo que mayor disparidad presenta es el de *M. yumanensis* (4), seguido por *M. v. incautus* (2), *M. peninsularis* (1), y al último (3) el más homogéneo, *M. v. velifer* (Tabla VI, Figura 21).

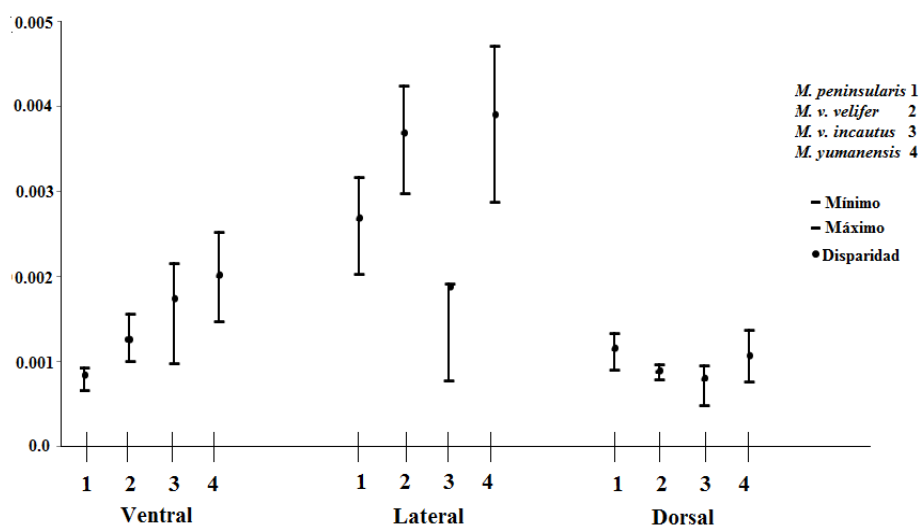


Figura 21. Disparidad de los cuatro grupos analizados basados en distancias procrustes

El análisis multi-grupal, muestra que la variación total de la disparidad (en distancias procrustes) de la forma en la vista ventral, es de 0.00069 (intervalo al 95% de confianza: 0.00057 - 0.0014), lateral de 0.0018 (0.0014 - 0.0026), y dorsal de 0.0011 (0.0007 - 0.0013).

Considerando los cuatro grupos, existe mayor nivel de la variación intra-grupal (Tabla VII) que entre grupos, es decir, es poco el nivel de variación grupal.

En cuanto a la contribución de cada especie a la disparidad en forma (Tabla VIII), se observa que los niveles de variación más altos se presentan para *M. yumanensis*. Este resultado se esperaba puesto que al ser el grupo externo y el más diferente, es la especie que más contribuye al nivel de variación. Entre *M. velifer* y *M. peninsularis* se obtuvieron tanto niveles altos como bajos (entre ellos de variación), según la vista del cráneo utilizada. Por ejemplo, el que mayor disparidad mostró fue *M. peninsularis* en la vista lateral, *M. v. incautus* en la vista ventral y dorsal. El que obtuvo los valores más homogéneos fue *M. v. velifer*.

Tabla VIII. Contribución por especie a la disparidad medida con distancias procrustes.

<b>CONTRIBUCIÓN DE CADA ESPECIE A LA DISPARIDAD GEOMÉTRICA DE LA FORMA (DISTANCIAS PROCRUSTES)</b>				
	<i>M. peninsularis</i>	<i>M. v. velifer</i>	<i>M. v. incautus</i>	<i>M. yumanensis</i>
	(1)	(2)	(3)	(4)
<b>Vista</b>				
Ventral	0.00004	0.00008	0.00012	0.00045
Lateral	0.00033	0.00016	0.0004	0.00093
Dorsal	0.00014	0.00012	0.00025	0.00059

#### 7.2.4 Filogenia y formas ancestrales

Los resultados obtenidos con el programa TNT arrojaron las relaciones esperadas, comparadas con las ya obtenidas con los análisis filogenéticos moleculares. En este caso, la poca cantidad de terminales no permitió hacer más comparaciones con respecto a topologías. Los tres árboles presentaron la misma conformación de clados y taxas optimizadas (Figura 22). Mediante éstos se puede comparar a simple vista las diferencias que presentan las configuraciones de cada taxa y su forma ancestral, en el nodo de ancestro común. En el análisis ventral, las configuraciones ancestrales localizadas en el nodo de las subespecies de *M. velifer* y del nodo de este clado con la rama de *M. peninsularis* no muestran grandes cambios. La configuración

promedio de esas especies, mostradas en el inciso a) de la Figura 22, es muy similar por lo que no se pueden apreciar grandes cambios, si no hasta la configuración de *M. yumanensis*, que cambia en la forma de la caja craneal y el rostro.

En la vista lateral (b), el ancestro de las subespecies de *M. velifer* con el común de estas y *M. peninsularis* muestra una tendencia intermedia en varias secciones del cráneo, principalmente en la pendiente rostral y en la cresta sagital, coincidiendo con las variación morfológica obtenida en las gradillas de deformación de los AVC (Figura 19).

Por último, en el árbol con las configuraciones de marcas de la vista dorsal, también se aprecia la variación entre el ancestro de las subespecies de *M. velifer*, y la del ancestro común de *M. peninsularis* y el clado de *M. velifer* (inciso c). Las principales diferencias entre ambas configuraciones ancestrales son las situadas en la caja craneal, en el borde del arco zigomático (Figura 20), y en la anchura del rostro. De igual forma, las configuraciones ancestrales son la forma intermedia entre ellos.

En general, las formas ancestrales inferidas muestran pocos cambios, a excepción de *M. yumanensis* donde si es más perceptible el morfotipo distinto, principalmente en el análisis lateral. La forma de *M. peninsularis* se parece más al ancestro común tanto de los dos grupos de *M. velifer* como al de éstos con *M. peninsularis*.

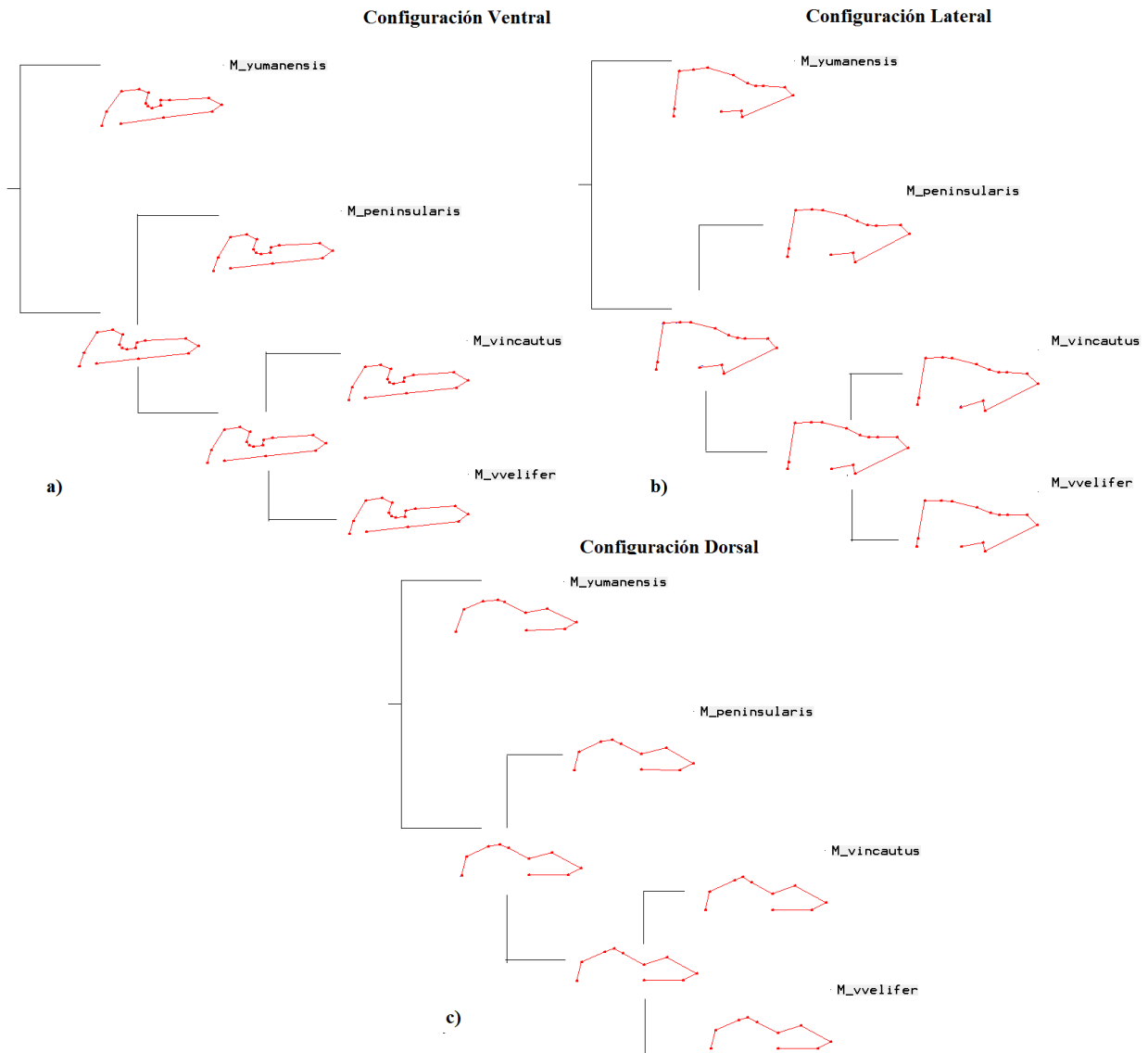


Figura 22. Árboles filogenéticos obtenidos en TNT con un mapeo del promedio de las configuraciones de marcas y de una forma ancestral inferida en cada uno de los nodos ancestrales. Configuración ventral (a), lateral (b) y dorsal (c).



## 8. DISCUSIÓN

Todos los análisis filogenéticos con los marcadores COI y Cyt. *b* muestran al grupo de *M. peninsularis* y al de *M. velifer* como grupos hermanos, que en conjunto son monofiléticos. Así mismo, *M. yumanensis* aparece en el clado contiguo, como la especie con el ancestro común más cercano a *M. peninsularis* y *M. velifer*, que corresponde a las filogenias realizadas por otros trabajos (Ruedi y Mayer, 2001; Clare *et al.*, 2011; Larsen *et al.*, 2012a). En el caso de *M. velifer*, los tres haplotipos obtenidos por cada gen se corresponden a la distribución de la que provienen. Solo un haplotipo se presentó para *M. peninsularis*, correspondiente a la región del Cabo. Las topologías de los árboles filogenéticos resultantes son similares entre sí. La diferencia principal entre los resultados de un marcador u otro en cuanto al clado de interés (el conjunto de *M. peninsularis*, *M. velifer* y *M. yumanensis*) es únicamente el origen de los haplotipos distintos de *M. velifer* entre ambos marcadores. El soporte estadístico de Bootstrap (además de Jackknife en análisis de MP, en WINCLADA), presentó altos porcentajes de confiabilidad para este clado en todos los análisis (Figura 7 - Figura 11). Los cambios en las topologías según el método filogenético utilizado ocurren principalmente en la posición de los grupos externos. Debido a que cada análisis (y programa) posee distintos algoritmos, y cantidad específica de ejemplares como grupo externo, esto era de esperarse. Sin embargo, cabe recalcar que el clado de interés resultó igual para ambos marcadores, con cualquier método. La utilización de más de un método para la inferencia de estos análisis permitió reforzar los resultados obtenidos. La longitud de las ramas en los análisis de MV, MP y NJ de PAUP, nos permiten visualizar la cercanía obtenida entre los haplotipos de *M. peninsularis* y los de *M. velifer* en los análisis filogenéticos. El tamaño obtenido de las ramas entre *M. peninsularis* y *M. velifer* son cortos en correspondencia con las longitudes obtenidas entre los haplotipos de *M. velifer*.

Los análisis de distancias utilizando los modelos evolutivos que mejor ajustan a cada set de datos (COI, HKY + G; Cyt. *b*, TrN + I) y el K2P, ofrecieron distancias muy similares, difiriendo por un intervalo de  $\pm 0.07$  entre marcadores y modelos evolutivos. Con la finalidad de hacer una comparación de los resultados con ambos genes, se utilizará el modelo de K2P para discutir las

distancias obtenidas. La distancia genética entre *M. peninsularis* y *M. velifer* con el marcador COI una distancia genética mínima de 0.32% (Sonora) y máxima de 0.48% (Nuevo León), mientras que con *Cyt. b*, resultó de una distancia mínima de 0.12% (California, U. S. A.) y máxima de 2.69% (Nuevo León, Tabla II). En murciélagos, la variación intra-específica tiene en promedio del 2.5 al 3% de divergencia (Bradley y Baker, 2001; Clare *et al.*, 2007, 2011). El valor máximo obtenido de 2.69% de divergencia cae en el intervalo de diferenciación intra-específica (Bradley y Baker, 2001). La distancia obtenida por el marcador COI es menor y más uniforme que la obtenida por *Cyt. b* en lo que respecta a las poblaciones mexicanas. La distancia de 0.12% obtenida por el haplotipo dos (H2) en *Cyt. b*, no tiene comparación en COI. Para COI, el H1 de *M. velifer* fue el que presentó la distancia más corta (0.32%). En términos de distancia genética y distribución, los organismos localizados en California (0.12% *Cyt. b*) y los de Sonora (0.32% COI) son los más próximos a *M. peninsularis* (Tabla II). Esto se relaciona con la distribución de los ejemplares de dónde se obtuvieron las secuencias (Apéndice ii). La distancia genética entre *M. yumanensis* y *M. peninsularis* tanto para COI como para *Cyt. b* fueron muy similares a las de *M. yumanensis* con *M. velifer* (Tabla II). Esto implica, que la especie más cercana a *M. peninsularis* y a *M. velifer* tanto en los análisis filogenéticos como en las distancias genéticas obtenidas, fue *M. yumanensis*. La distancia genética entre haplotipos de *M. peninsularis* y *M. velifer* es proporcional a la distancia geográfica en línea recta, a excepción de la secuencia de *Cyt. b*, proveniente de California, Estados Unidos, que de manera lineal es la más lejana de todas las analizadas, pero que posee la menor distancia genética de todas (0.12%, Tabla II). En términos de dispersión, la Península de Baja California no posee limitantes geográficos tan determinantes para un organismo volador como los murciélagos. En cuanto a la parte continental mexicana, es probable que las distancias genéticas obtenidas se deban a la amplitud dificultad de la dispersión con respecto a las barreras geográficas existentes (Golfo de California, Sierra Madre Occidental, etc.) y por ende, al flujo génico entre ellas.

El cálculo de la divergencia entre estas secuencias permite cuantificar la relación intra-específica (Clare *et al.*, 2011) dándonos un panorama de su situación en la biodiversidad de su género. *Myotis* es un género monofilético (Ruedi y Mayer, 2001; Stadelmann *et al.*, 2007; Lack *et al.*, 2010), con un intervalo mundial de distribución, lo que le confiere suficiente variación tanto morfológica como molecular.

Existen diferencias en la talla (tamaño centroide) de todos los grupos analizados, tanto intra-específico como intra-grupal. No se presenta dimorfismo sexual en la forma del cráneo. En cuanto a la variación de la forma, la apreciación de las diferencias intra-específicas de *M. velifer* es poco disyuntiva. La variación mediante componentes principales entre las dos subespecies de *M. velifer* permitió observar que el intervalo de variación morfológica entre los individuos en el cráneo es bastante amplio. Prácticamente, este análisis (ACP) permite diferenciar a *M. v. velifer* de *M. v. incautus* por poseer un rostro robusto, más chato, y una pendiente rostral que tiene a ser abrupta. El intervalo de distribución de *M. velifer* es bastante amplio, en una vasta variedad de condiciones ambientales, gradientes altitudinales y latitudinales (Vaughan, 1954; Fitch *et al.*, 1981), por lo que se considera que exista una gran variación morfológica. Es por ello que en los análisis de componentes principales observamos a los individuos con una dispersión amplia pero uniforme.

Al hacer la comparación de la forma por grupos para estas dos subespecies, aparecen dos morfotipos distintos en los análisis ventral y dorsal (Figura 13), pero no en la lateral. Los valores de significancia ( $\lambda$ ) son cercanos a uno (0.62 y 0.71, respectivamente), lo que implica poca diferenciación entre grupos (pero significativa). Ventral y dorsalmente, *M. velifer* presenta diferencias anatómicas debido a su distribución (que corresponden a la subespecie asignada). Lateralmente, las diferencias no son suficientes para discriminarlos como grupos. Básicamente, el morfotipo de *M. v. velifer* tiene una silueta más estilizada que el de *M. v. incautus.*, por lo que es el que posee más similitudes con respecto a la forma de *M. peninsularis*. Esto se corresponde también con la cercanía geográfica. El porcentaje tan bajo de discriminación con el índice de Jackknife (12.2% Tabla IV) obtenido en la vista lateral indica que no hay una completa discriminación con los grupos establecidos a priori, es por ello que existen muchos traslapes entre los individuos de *M. v. incautus* con los de *M. v. velifer*. Análisis de morfometría tradicionales (Vaughan, 1954) para las subespecies de *M. velifer*, muestran que existe una gran variación intra-específica, por lo que se esperaban estos resultados. La variación en la forma también se presenta entonces en las subespecies de *M. velifer*.

El análisis de la forma que incluye a *M. peninsularis*, las subespecies de *M. velifer* y al grupo externo *M. yumanensis* se describe de manera distinta. En el ACP (entre individuos), se

pueden visualizar las tendencias de los individuos a poseer características específicas que alejan a la mayoría del promedio. En el caso de la vista lateral y dorsal se aprecia claramente con el eje x (CP1) de los planos de ordenación (Figura 15). La variación de cada individuo es explicado en relación a la variación de los otros individuos, independientemente de la especie de origen. El gradiente de variación mostrado por la cercanía entre individuos (variación similar entre sí) permite una apreciación estructurada en los planos de ordenación, es por ello que *M. yumanensis* (grupo externo) se define bien en una conformación específica, mientras que *M. peninsularis* y *M. velifer* se traslapan en ciertos puntos de su conformación. La vista dorsal es la que mejor explica la variación entre individuos. En el caso de la vista ventral, se obtuvieron dos ejes significativos, por lo que la máxima variación de todos los individuos esta explicada por ambas dimensiones (Figura 14). Variación que está totalmente dirigida hacia los individuos de *M. yumanensis*, Los individuos de *M. peninsularis* y de *M. velifer* tienen una variación similar en esta cara. Aún cuando la variación de la forma entre individuos no es tan interpretativa para este caso, es importante notar que si existen similitudes que les permite localizarse específicamente en el espacio multivariado.

El AVC arrojó la significancia de todos los grupos establecidos en la vista ventral y dorsal. Esto implica la presencia de cuatro morfotipos distintos. La única que muestra solo tres morfotipos, es la vista lateral, dejando a las subespecies de *M. velifer* como un sólo morfotipo (mismo resultado que en su análisis intra-específico). Sin embargo, esta fue la vista que mejor discriminó a *M. peninsularis* de *M. velifer*. Las características que permitieron dicho resultado se centraron en la cresta sagital y en la pendiente rostral. La cresta sagital de *M. peninsularis* es más procumbente en la parte anterior que la posterior, caso contrario en *M. velifer*. La pendiente rostral de *M. velifer* es más abrupta que la de *M. peninsularis*, modificando también el rostro, volviendo la parte del nasal menos procumbente en éste último, y en *M. peninsularis* (marcas 10 y 11) más respingado.

En todas las visualizaciones del despliegue de variables canónicas, se observa una clara agrupación de *M. yumanensis*. La mayor variación tanto en los ACP como en los AVC se explican en el primer eje por ésta especie, puesto que es la más diferente. Lo mismo se obtiene con los análisis de disparidad, donde la mayor variación la presenta *M. yumanensis*, seguida por

*M. v. velifer*. Esto sugiere que estos grupos en particular, poseen un nivel de variación amplio para cualquiera de los análisis, incluso en éste último, donde se estandarizan los datos de manera en que se puede obtener el nivel de la variación de estos grupos sometidos. No presenta traslape alguno en ninguna vista (Figura 17). Por el contrario, *M. peninsularis* y *M. velifer* si presentan regiones de traslape, principalmente cercanas al promedio (0,0).

En todos los casos, *M. v. incautus* y *M. v. velifer* se sobreponen en la visualización que se presenta aquí de dos dimensiones del espacio multivariado, pero sólo la cara lateral (Figura 17a) no presenta diferencias significativas que permitan discriminar los grupos establecidos. En esta vista tampoco existe traslape entre *M. peninsularis* y *M. velifer*. La cara lateral fue la que más diferencias presentó en general. Su nivel de variación también fue el mayor en el caso del análisis de disparidad (si tomamos en cuenta las vistas). El nivel de variación de *M. yumanensis* en la cara lateral fue el mayor de todos los obtenidos (Tabla VII). La clara visualización de agrupaciones en este análisis también se refleja en el porcentaje de asignación de Jackknife (Tabla IV), la vista dorsal es la que mayor porcentaje de asignaciones correctas presenta (79%). Los grupos que más se traslapan entre sí son las subespecies de *M. velifer*. También ocurre con *M. peninsularis*, esto debido a que en promedio, los individuos de la población peninsular tanto como los de las poblaciones continentales son altamente similares.

Los patrones de disparidad entre todas las vistas y los cuatro grupos analizados, se explican debido a su distribución. Tanto *M. yumanensis* como *M. velifer* son de amplia distribución, por lo que se puede esperar ese intervalo de variación. En el caso de la subespecie *M. v. incautus* (grupo tres), el tamaño de muestra es muy pequeño (13 para la vista ventral, siete para la lateral y 11 para la dorsal), lo que restringe la distribución de éstos especímenes incrementando la disparidad de su variación. Por el contrario, *M. v. velifer* es el que mayor número de especímenes posee en la mayoría de las vistas, así como una distribución de los mismos más amplia. En el caso de *M. peninsularis*, se observa menos variación ventral con respecto a la que presentan los otros grupos, y menor incluso que la dorsal. Ésta última varía más que la ventral en los grupos dos, tres y cuatro (Figura 21). Debido a la distribución estrecha y restringida de *M. peninsularis*, es posible que la vista ventral sea la que represente adaptaciones a

ambientes distintos y la razón de mayores valores en las otras especies de amplia distribución Figura 1.

Morfológicamente, *M. peninsularis* y *M. velifer* poseen sus respectivos morfotipos (talla, forma y aspecto), pero es una variación que también se observa entre las subespecies de *M. velifer*. Genéticamente, es muy poca la distancia que poseen entre ellos, quedando en el intervalo de diferenciación intra-específica (Bradley y Baker, 2001), que funge como parámetro de intervalos de divergencia genética entre especies. Inclusive, el análisis para inferir la forma ancestral mediante filogenia y configuraciones de marcas refleja que, tanto molecularmente como morfométricamente, *M. peninsularis* y *M. velifer* comparten un ancestro común cuya forma consta de características intermedias (Figura 22).

Algunos trabajos argumentan que las diferencias en talla (Nossal *et al.*, 2004; Soto-Vivas *et al.*, 2011) surgen ante la divergencia entre linajes, siendo modificados principalmente por las adaptaciones a ambientes distintos, cambiando en el transcurso de la evolución y respondiendo a su historia filogenética y su entorno. Así, las variaciones en tallas se pueden presentar incluso entre miembros de la misma especie, principalmente aquellos cuya distribución es muy amplia (Larsen *et al.*, 2012a).

En los miembros de un género tan diverso como *Myotis*, la variación en el tamaño puede estar relacionada con las interacciones con el entorno. Se ha documentado que los murciélagos y roedores que poseen individuos de la misma especie en áreas insulares pueden llegar a presentar enanismo en comparación con su contraparte continental (Case, 1978), además de diferencias en otros caracteres morfológicos (Caumul y Polly, 2005; Evin *et al.*, 2011; Marchán-Rivadeneira *et al.*, 2012). En el grupo de *M. velifer*, *M. peninsularis* es el miembro de talla más pequeña (Alvarez-Castañeda y Bogan, 1998). En los resultados obtenidos para la forma del cráneo, es el que posee el contorno más “estilizado”. Es necesaria una combinación de factores para que se presente una condición de enanismo o gigantismo (Lomolino *et al.*, 2012). Lo que sí está comprobado (morfometría geométrica) comparado con otros estudios de murciélagos insulares y continentales (Evin *et al.*, 2011) es la diferenciación en la forma, donde los murciélagos insulares presentan un cráneo más corto y angosto que los continentales, como sucedió con *M. peninsularis*.

Las diferencias en la forma pueden estar respondiendo a la adaptación que presentan los individuos de *M. peninsularis* a un entorno endémico; por ejemplo, la disponibilidad de alimentos y la cantidad de depredadores (Case, 1978; Taylor y Regal, 1978). Sin embargo, tanto para la población de *M. peninsularis* como para las de *M. velifer*, la distribución sigue siendo altamente significativa para las diferencias que presentan. Se ha reportado que existe una correspondencia entre la distancia geográfica y la genética en el caso de roedores (Fornel *et al.*, 2010). Para murciélagos, su capacidad de dispersión es ampliamente distinta, y por lo tanto eso le confiere una gran variación morfológica y genética, además de que poseen mayor número de barreras limitantes en comparación con roedores y otros organismos no voladores. Pero existen otras barreras que pueden aislar a un grupo como tal y permitirle entonces adaptarse a su ambiente específico. El área en dónde distribuye *M. peninsularis* es principalmente selva baja caducifolia (Alvarez-Castañeda y Arroyo-Cabrales, 2008), que se restringe a la porción final de la península, dejando climas y ecosistemas extremadamente distintos, al posible grado de fungir como limitante para la dispersión de éstos individuos. Como se demostró con la distancia genética obtenida con respecto al haplotipo de California, es probable que exista flujo génico entre ellos. Debido a que no se conoce hacia dónde migra *M. peninsularis* en invierno, esto es algo que por el momento no se puede analizar.

## 9. CONCLUSIÓN

Cuando se determinó que la subespecie *M. velifer peninsularis* (Miller y Allen, 1928) debía ser considerada como especie (Hayward, 1970), la distribución endémica y la talla de éstos individuos fueron los factores determinantes. El criterio usado por Hayward para considerar a *M. peninsularis* una especie distinta de *M. velifer* es, actualmente, poco suficiente. La distribución endémica de *M. peninsularis* le ha conferido diferencias en la talla probablemente debido al ambiente particular en el que habita (Hall, 1981).

La filogenia de *M. peninsularis* con los marcadores moleculares citocromo *b* y citocromo oxidasa I muestra a éste como grupo hermano de *M. velifer*, en conjunto son monofiléticos. Así mismo, la longitud de las ramas observadas entre *M. peninsularis* y los haplotipos de *M. velifer* en los análisis filogenéticos, es muy corta y de longitud comparable con la mostrada entre los haplotipos de *M. velifer*, dentro del clado. El análisis de distancias entre ambas especies refleja la poca divergencia genética existente entre ellos. El intervalo de variación genética obtenido por los haplotipos de *M. velifer* (intra-específicamente y con respecto a *M. peninsularis*), se puede explicar como una correspondencia significativa entre la distribución geográfica y la variación genética.

La variación morfométrica que se presenta en la forma de los cráneos de estos grupos de *Myotis* se corresponde con la distribución de los ejemplares. Las diferencias morfológicas que poseen entran en el intervalo intra-específico, la cual se ha reportado como existente en *M. velifer* debido a adaptaciones a la variación geográfica en la distribución que posee (Vaughan, 1954). El amplio intervalo de distribución de *M. velifer* le provee de una gran diversidad de ambientes. Existe mayor disparidad dentro de cada grupo que entre los grupos. Esto implica la oportunidad de presentar una gran diversidad de adaptaciones que se reflejen tanto morfométrica como morfológicamente (Fornel *et al.*, 2010). La comparación con *M. yumanensis* como grupo externo, permite observar una diferenciación morfométrica de mayor magnitud, ofreciendo un parámetro de comparación, dónde las diferencias morfométricas entre las subespecies de *M. velifer* y *M. peninsularis*, aunque significativas, son más cercanas entre sí que la especie hermana de *M. velifer*. La variación morfológica de los organismos depende tanto de la señal filogenética, como



de la presión adaptativa al ambiente que habitan (Caumul y Polly, 2005; Barčiová, 2009; Moratelli y Oliveira, 2011).

Los análisis de filogenia combinada y configuraciones de marcas entre los cuatro grupos arrojaron un árbol que se corresponde con el obtenido en los análisis filogenéticos por cada marcador. Así mismo, ofrecieron la forma ancestral de *M. peninsularis* y las subespecies de *M. velifer* como una forma intermedia entre ellos, diferenciándose de la de *M. yumanensis*. Mismo resultado que el obtenido con la configuración ancestral entre *M. v. velifer* y *M. v. incautus*. Grados relativos de similitud son utilizados para establecer homología (Catalano *et al.*, 2010). Al evaluar las similitudes y diferencias de características entre taxones se está obteniendo su grado de semejanza (Guerrero *et al.*, 2003; Soto-Vivas *et al.*, 2011). Esto es uno de los principales objetivos en la morfometría geométrica bajo un enfoque filogenético. Con los resultados de la filogenia y las configuraciones de forma obtenidas con los análisis de morfometría geométrica, se obtuvo la forma ancestral común de *M. peninsularis* y *M. velifer*, cuya configuración tiene características intermedias de ambas especies.

Con el conjunto de análisis moleculares y de morfometría geométrica, se permite formular que *M. peninsularis* y las dos subespecies analizadas de *M. velifer*, poseen morfotipos diferentes con alta similitud entre sí. La diferenciación genética existente, entra en el intervalo intra-específico. Las diferencias morfológicas y genéticas se deben al aislamiento geográfico de *M. peninsularis* y a las adaptaciones a los ambientes distintos en los que habitan. Por todo lo anterior y los resultados del presente trabajo de investigación, se considera a la población localizada en la región de los Cabos, en Baja California Sur, como parte de las poblaciones de *M. velifer*, propuesta como *M. velifer peninsularis*.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.C., F.J. Rohlf, y D.E. Slice 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the “revolution.” *Italian Journal of Zoology*. 71(1):5–16.
- Allendorf, W. y Luikart, G.H. 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, 639p.
- Alvarez-Castañeda, S.T. y J. Arroyo-Cabrales 2008. *Myotis peninsularis*. IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2, 1p.
- Alvarez-Castañeda, S.T. y M.A. Bogan 1998. *Myotis peninsularis*. *Mammalian Species*. *Journal of Mammalogy*. (573):1–2.
- Alvarez-Castañeda, S.T. y P. Cortés-Calva 2011. Genetic evaluation of the Baja California rock squirrel *Otospermophilus atricapillus* (Rodentia: Sciuridae). *Zootaxa*. 51:35–51.
- Alvarez-Castañeda, S.T. y J.L. Patton 1999. *Mamíferos del Noroeste de México*. México. 237p.
- Armstrong, K.N. 2006. Phylogeographic structure in *Rhinonictes aurantia* (Chiroptera: Hipposideridae): implications for conservation. *Acta Chiropterologica*. 8(1):63–81.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 447p.
- Avice, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, T. Lambt, J.E. Neigel, A. Carol, y N.C. Saunders 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews Ecology Systematics*. 18:489–522.
- Baker, J.R. y J.L. Patton 1967. Karyotypes and karyotypic variation of North American vespertilionid bats. *Journal of Mammalogy*. 48(2):270–286.

- Baker, R.J. y R.D. Bradley 2006. Speciation in Mammals and the Genetic Species Concept. *Journal of mammalogy*. 87(4):643–662.
- Barčiová, L. 2009. Advances in insectivore and rodent systematics due to geometric morphometrics. *Mammal Review*. 39(2):80–91.
- Bogan, M.A. 1999. Family Vespertilionidae. En: Alvarez-Castañeda S.T. y Patton J.L. (eds.) *Mamíferos del Noroeste de Mexico*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., Baja California Sur, Mexico. 237p.
- Bogdanowicz, W., J. Juste, y R.D. Owen 2005. Geometric morphometrics and cladistics : testing evolutionary relationships in mega- and microbats relationships in mega- and microbats. *Acta Chiropterologica*. 7(1):39–49.
- Bookstein, F.L. 1999. Morphometric Tools for Landmark Data : Geometry and Biology. *Journal of the Royal Statistical Society*, 48, 279p.
- Bradley, R.D. y R.J. Baker 2001. A test of the genetic species concept : cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*. 82(4):960–973.
- Van Den Bussche, R. y S.R. Hooper 2004. Phylogenetic relationships among recent chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa. *Journal of Mammalogy*. 85(2):321–330.
- Cantú, C., R.G. Wright, J.M. Scott, y E. Strand 2004. Assessment of current and proposed nature reserves of Mexico based on their capacity to protect geophysical features and biodiversity. *Biological Conservation*. 115(3):411–417.
- Case, T.J. 1978. A General Explanation for Insular Body Size Trends in Terrestrial Vertebrates. *Ecology*. 59(1):1–18.

- Castella, V., M. Ruedi, L. Excoffier, C. Ibanez, R. Arlettaz, y J. Hausser 2000. Is the Gibraltar Strait a barrier to gene flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)? *Ecology*. (9):1761–1772.
- Catalano, S. a., P. a. Goloboff, y N.P. Giannini 2010. Phylogenetic morphometrics (I): the use of landmark data in a phylogenetic framework. *Cladistics*. 26:539–549.
- Caumul, R. y P.D. Polly 2005. Phylogenetic and environmental components of morphological variation: skull, mandible, and molar shape in marmots (*Marmota*, Rodentia). *Evolution; international journal of organic evolution*. 59(11):2460–72.
- Ceballos, G., J. Arroyo-Cabrales, y R.A. Medellín 2002a. The mammals of Mexico: Composition, distribution, and conservation status. Museum of Texas Teach University. (218):1–28.
- Ceballos, G., J. Arroyo-Cabrales, y R.A. Medellín 2002b. Mamíferos de México. En: Ceballos G. y Simonetti J.A. (eds.) *Diversidad y Conservación de los Mamíferos Neotropicales*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Universidad Nacional Autónoma de México, México. 377–413p.
- Ceballos, G. y G. Oliva 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México. 988p.
- Ceballos, G., P. Rodriguez, y R.A. Medellín 1998. Assessing Conservation Priorities in Megadiverse Mexico : Mammalian Diversity, Endemicity, and Endangerment. *Ecological Applications*. 8(1):8–17.
- Clare, E.L., B.K. Lim, M.D. Engstrom, J.L. Eger, y P.D.N. Hebert 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*. 7(2):184–190.

- Clare, E.L., B.K. Lim, M.B. Fenton, y P.D.N. Hebert 2011. Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes. *PloS one*. 6(7):e22648.
- DeSalle, R. y G. Amato 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature reviews. Genetics*. 5(9):702–12.
- Dewey, A.T. 2006. Systematics and phylogeography of North American *Myotis* (Chiroptera : Vespertilionidae). University of Michigan,
- 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(9):1307–18.
- Evin, A., M. Baylac, M. Ruedi, M. Mucedda, y J.M. Pons 2008. Taxonomy, skull diversity and evolution in a species complex of *Myotis* ( Chiroptera : Vespertilionidae ): a geometric morphometric appraisal. *Biological Journal of the Linnean Society*. 95:529–538.
- Evin, A., I. Horáček, y P. Hulva 2011. Phenotypic diversification and island evolution of pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus* group) in the Mediterranean region inferred from geometric morphometrics and molecular phylogenetics. *Journal of Biogeography*. 38(11):2091–2105.
- Farris, J.S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. *Advances in Cladistics*. 2:7–35.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Massachusetts. 664p.
- Fenton, M.B. 1997. Science and the conservation of bats. *Journal of Mammalogy*. 78:1–14.
- Fitch, J.H., K.A.J. Shump, y A.U. Shump 1981. *Myotis velifer*. Mammalian Species. *Journal of Mammalogy*. (149):1–5.

- Fornel, R., P. Cordeiro-Estrela, y T.R.O. De Freitas 2010. Skull shape and size variation in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) in geographical, chromosomal polymorphism, and environmental contexts. *Biological Journal of the Linnean Society*. 101(3):705–720.
- Francis, C.M., A. V Borisenko, N. V Ivanova, J.L. Eger, B.K. Lim, A. Guillén-Servent, S. V Kruskop, I. Mackie, y P.D.N. Hebert 2010. The role of DNA barcodes in understanding and conservation of mammal diversity in southeast Asia. *PloS one*. 5(9):e12575.
- Godoy, J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*. 18(1):23–33.
- Goloboff, P.A. 2002. Techniques for Analyzing Large Data Sets. En: DeSalle R. (eds.) *Methods and Tools in Biosciences and Medicine, Techniques in molecular systematics and evolution*. Birkhauser Verlag Base, Switzerland. 70–79p.
- Goloboff, P.A. 2003. Parsimony, likelihood, and simplicity. *Cladistics*. 19(2):91–103.
- Goloboff, P.A., J.S. Farris, y K.C. Nixon 2003. T. N. T.: Tree Analysis Using New Technology. Program and documentation, available from the authors, and at [www.zmuc.dk/public/phylogeny](http://www.zmuc.dk/public/phylogeny).
- Goloboff, P.A., J.S. Farris, y K.C. Nixon 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*. 24:774–786.
- González-Abraham, C.E., P. Garcillán, y E. Ezcurra 2010. Ecorregiones de la península de Baja California: una síntesis. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. (87):69–82.
- Google 2013. Google Earth. Google Inc.
- Goswami, A. y P.D. Polly 2010. The influence of modularity on cranial morphological disparity in Carnivora and Primates (Mammalia). *PloS one*. 5(3):e9517.

- Guerrero, J.A., E. de Luna, y C. Sánchez-hernández 2003. Morphometrics in the quantification of character state identity for the assessment of primary homology : an analysis of character variation of the genus *Artibeus* ( Chiroptera : Phyllostomidae ). Biological Journal of the Linnean Society. 80:45–55.
- Hall, E.R. 1981. The mammals of North America. New York: Ronald Press, New York, USA.
- Harrison, C.J. y J.A. Langdale 2006. A step by step guide to phylogeny reconstruction. The Plant journal : for cell and molecular biology. 45(4):561–72.
- Hasegawa, M., H. Kishino, y T. Yano 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution. 22(2):160–174.
- Hayward, B.J. 1970. The natural history of the cave bat, *Myotis velifer*. Western New Mexico Univ. Res. Sci. (1):1–74.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, y J.R. DeWaard 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society. 270(1512):313–321.
- Holder, M. y P.O. Lewis 2003. Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. Nature Reviews. Genetics. 4:275–284.
- Hooper, S.R., S.A. Reeder, E.W. Hansen, R.A. Van Den Bussche, y R.A. Van Den Bussche 2003. Molecular phylogenetics and taxonomic review of noctilionid and vespertilionid bats (Chiroptera: Yangochiroptera). Journal of Mammalogy. 84(3):809–821.
- Huelsenbeck, J.P. y K.A. Crandall 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. Annual Reviews Ecology and Systematics. 28:437–466.
- Huelsenbeck, J.P., B. Larget, R.E. Miller, y F. Ronquist 2002. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. Systematic Biology. 51(5):673–688.
- Huelsenbeck, J.P. y F. Ronquist 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. 754–755p.

- Ivanova, N. V y C. Grainger 2007. CCDB Protocols. Primer Sets. Canadian Centre for DNA Barcoding. 1–2.
- Johns, G.C. y J.C. Avise 1998. A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Molecular Biology and Evolution*. 15(11):1481–1490.
- Jones, K.E., A. Purvis, A. MacLarnon, O.R.P. Bininda-Emonds, y N.B. Simmons 2002. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 77(2):223–59.
- Kalko, E.K. V 1994. Diversity in tropical bats. En: Ulrich H. (eds.) *Tropical Biodiversity and systematics. Proceedings of the International Symposium on Biodiversity and Systematics in Tropical Ecosystems*. Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Bonn.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78(1):454–458.
- Kitching, I.J., P.L. Forey, C.J. Humphries, y D.M. Williams 1998. *Cladistics. The theory and practice of parsimony analysis*. The Systematics Association Publication No 11. Oxford University Press, Oxford. 228p.
- Klingenberg, C.P. 2002. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*. 287(1-2):3–10.
- Kluge, A.G. 1999. The science of phylogenetic systematics: explanation, prediction, and test. *Cladistics*. 15:429–436.
- Krutzsch, P.H. 2009. The Reproductive Biology of the Cave *Myotis* (*Myotis velifer*). *Acta Chiropterologica*. 11(1):89–104.



- Lack, J.B., Z.P. Roehrs, C.E.J. Stanley, M. Ruedi, y R.A. Van Den Bussche 2010. Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). *Journal of Mammalogy*. 91(4):976–992.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, y D.G. Higgins 2007. Clustal W and Clustal X. 2947–2948p.
- Larsen, R.J., M.C. Knapp, H.H. Genoways, F.A.A. Khan, P. a Larsen, D.E. Wilson, y R.J. Baker 2012a. Genetic diversity of neotropical *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) with an emphasis on South American species. *PloS one*. 7(10):e46578.
- Larsen, R.J., P. a. Larsen, H.H. Genoways, F.M. Catzeflis, K. Geluso, G.G. Kwiecinski, S.C. Pedersen, F. Simal, y R.J. Baker 2012b. Evolutionary history of Caribbean species of *Myotis*, with evidence of a third Lesser Antillean endemic. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*. 77(2):124–134.
- LaVal, R.K. 1973. A revision of the Neotropical Bats of the Genus *Myotis*. Natural History Museum Los Angeles County. *Science Bulletin*. (15):1–54.
- León De la Luz, J.L., J.J. Navarro Pérez, y A. Breceda 2000. A transitional xerophytic tropical plant community of the Cape Region , Baja California. *Journal of Vegetation Science*. (1964):555–564.
- Lomolino, M. V, D.F. Sax, M.R. Palombo, y A. Van Der Geer 2012. Of mice and mammoths: evaluations of causal explanations for body size evolution in insular mammals. *Journal of Biogeography*. 39(5):842–854.
- De Luna, E. 1996. Epistemología de la investigación taxonómica: Inferencias filogenéticas y su evaluación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 58:43–53.

- De Luna, E., J.A. Guerrero, y T. Chew-Taracena 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica*. 15(3):351–370.
- Mancina, C.A. y F. Balseiro 2010. Variación en la forma de la mandíbula en la forma de la mandíbula en *Monophyllus redmani* (Chiroptera:Phyllostomidae): Análisis geométrico. *Mastozoología Neotropical*. 17(1):87–95.
- Marchán-Rivadeneira, M.R., P.A. Larsen, C.J. Phillips, R.E. Strauss, y R.J. Baker 2012. On the association between environmental gradients and skull size variation in the great fruit-eating bat, *Artibeus lituratus* (Chiroptera : Phyllostomidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 105:623–634.
- Margules, C.R. y R.L. Pressey 2000. Systematic conservation planning. *Nature*. 405(6783):243–53.
- Martínez, J.J. y V. Di Cola 2011. Geographic distribution and phenetic skull variation in two close species of *Graomys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*. 250(3):175–194.
- Matzke, N. 2010. Parsimony tree estimation with TNT. *Principles of Phylogenetics*. 1–5p.
- Medellín, R.A. 2003. Diversity and conservation of bats in Mexico: Research priorities, strategies, and actions. *Wildlife Society Bulletin*. 31(1):87–97.
- Medellín, R.A., H.T. Arita, y O. Sánchez 2007. Identificación de los murciélagos de México. Claves de Campo. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología., México.
- Meganathan, P.R., H.J.T. Pagan, E.S. McCulloch, R.D. Stevens, y D.A. Ray 2012. Complete mitochondrial genome sequences of three bats species and whole genome mitochondrial

- analyses reveal patterns of codon bias and lend support to a basal split in Chiroptera. *Gene*. 492(1):121–9.
- Miller, G.S. 1898. Description of a new bat from Lower California. *Journal of Natural History*. 2(8):124–125.
- Miller, G.S. y G.M. Allen 1928. The American bats of the genera *Myotis* and *Pizonyx*. *Bulletin, U. S. National Museum*. i-viii(144):1–218.
- Monteiro, L.R. y M.R. Nogueira 2010. Adaptive radiations, ecological specialization, and the evolutionary integration of complex morphological structures. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*. 64(3):724–44.
- Moratelli, R. y J.A. De Oliveira 2011. Morphometric and morphological variation in South American populations of *Myotis albescens* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Zoologia*. 28(6):789–802.
- Moratelli, R., A.L. Peracchi, D. Dias, y J. a. de Oliveira 2011. Geographic variation in South American populations of *Myotis nigricans* (Chiroptera, Vespertilionidae), with the description of two new species. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*. 76(5):592–607.
- Morrison, D.F. 1967. Significant Differences in PCA components. *Multivariate Statistical Methods*. 221–254p.
- Nadin-Davis, S.A., E. Guerrero, K. Knowles, y Y. Feng 2010. Use of DNA barcoding to facilitate bat species identification for use in the improved surveillance of bat-associated rabies across Canada. Direct submission. Centre of Expertise for Rabies, Ottawa Laboratory.
- NCBI 2009. GenBank. The National Center for Biotechnology Information, .
- Nixon, K.C. 1999. The Parsimony Ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics*. 15:407–414.

- Nixon, K.C. 2004. WinClada ASADO version1.7. <http://www.cladistics.comp>.
- Nossal, N.G., J.L. Franklin, E. Kutter, y J.W. Drake 2004. Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. *Genetics*. 168(3):1097–104.
- Ospina Garcés, S.M. 2010. Análisis ecomorfológico del aparato masticatorio de *Myotis vivesi* (Chiroptera: Vespertilionidae). Universidad Nacional Autónoma de México,
- Parlos, J.A., C.C. Nice, J.T. Baccus, y M.R.J. Forstner 2008. Population genetics of *Myotis velifer*. Direct submission. Biology, Texas State University-San Marcos.
- Perez, S. 2008. *Myotis velifer*. IUCN Red List of Threatened Species, .
- De Pinna, M.C.C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistics paradigm. *Cladistics*. 7:367–394.
- De Pinna, M.C.C. 1999. Species concepts and phylogenetics. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. (9):353–373.
- Posada, D. y K.A. Crandall 2005. Modeltest: testing the model of DNA substitution. [http://bioag.byu.edu/zoology/crandall\\_lab/modeltep](http://bioag.byu.edu/zoology/crandall_lab/modeltep).
- Ramamoorthy, T.P. 1993. Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press, 812p.
- Rambaut, A. 2009. FigTree. Tree Figure Drawing Tool. Version 1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/p>.
- Ramirez-Acosta, J., A. Castellanos, G. Arnaud, A. Breceda, y O. Rojas-Soto 2012. Conservation of Endemic Terrestrial Vertebrates in the Protected Areas of the Baja California Peninsula, Mexico. *Natural Areas Journal*. 32(1):15–30.

- Ratnasingham, S. y P.D.N. Hebert 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes*. 7:355–364.
- Ríos, E. y S.T. Álvarez-Castañeda 2010. Phylogeography and systematics of the San Diego pocket mouse (*Chaetodipus fallax*). *Journal of Mammalogy*. 91(2):293–301.
- Rodrigues, L.A., J. Daunís-l-Estadella, G. Mateu-Flgueras, y S. Thió-Henestrosa 2011. Flying in compositional morphospaces: evolution of limb proportions in flying vertebrates. En: Pawlowsky-Glahn V. y Buccianti A. (eds.) *Compositional Data Analysis: Theory and applications*. John Wiley & Sons, Ltd., 235–254p.
- Roehrs, Z.P., J.B. Lack, y R.A. Van Den Bussche 2010. Tribal phylogenetic relationships within Vespertilioninae ( Chiroptera : Vespertilionidae ) based on mitochondrial and nuclear sequence data. *Journal of Mammalogy*. 91(5):1073–1092.
- Rohlf, J. 2008. TPSDig ver. 2.12. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. National Science Foundation, <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>.
- Rohlf, J. 2009. TPSUtil ver. 1.44. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. National Science Foundation, <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>.
- Rohlf, J. y H.D. Sheets 2004. Integrated Morphometrics Package (IMP). Morphometrics Software. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Ruedi, M. y F. Mayer 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. *Molecular phylogenetics and evolution*. 21(3):436–48.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 504p.
- Saitou, N. y M. Nei 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 4(4):406–25.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, USA. 1626p.
- Schipper, J. *et al.* 2008. The status of the world's land and marine mammals: Diversity, threat, and knowledge. *Science*. 322(October):225–230.
- SEMARNAT 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Sheets, D.H. 2011a. CoordGen7a version 7. IMP7. sheets@canisius.edu.
- Sheets, D.H. 2011b. PCAGen7a version 7. IMP7. sheets@canisius.edu.
- Sheets, D.H. 2011c. CVAGen7b versión 7b. IMP7. sheets@canisius.edu.
- Sheets, D.H. y M.L. Zelditch 2010. Disparity Box version 7a. IMP7. sheets@canisius.edu.
- Simmons, N.B. 2005. Order Chiroptera. En: Wilson D.E. y Reeder D.M. (eds.) *Mammals of the World: a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, USA. 2142p.
- Soto-Vivas, A., J. Liria, y E. De Luna 2011. Morfometría geométrica y filogenia en *Rhodniini* (Hemiptera, Reduviidae) de Venezuela. *Acta Zoológica Mexicana*. 27(1):87–102.
- Soulé, M.E. 2007. What is Conservation Biology? *BioScience*. 35(11):727–734.
- Stadelmann, B., D.S. Jacobs, C. Schoeman, y M. Ruedi 2004. Phylogeny of African *Myotis* bats (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from cytochrome b sequences. *Acta Chiropterologica*. 6(2):177–192.

- Stadelmann, B., L.-K. Lin, T.H. Kunz, y M. Ruedi 2007. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. *Molecular phylogenetics and evolution*. 43(1):32–48.
- StatSoft, I. 2004. STATISTICA (Data analysis software system) version 6.
- Steel, M. y D. Penny 2000. Parsimony, likelihood, and the role of models in molecular phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*. 17(6):839–850.
- Streicker, D.G., A.S. Turmelle, M.J. Vonhof, I. V Kuzmin, G.F. McCracken, y C.E. Rupprecht 2010. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. *Science*. 329(5992):676–679.
- Swofford, D.L. 2001. PAUP $\alpha$  4.0: Phylogenetic Analyses Using Parsimony (and other methods). <http://paup.csit.fsu.edu/p>.
- Tamura, K. y M. Nei 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*. 10(3):512–526.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, y S. Kumar 2011. MEGA 5 Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2685–2686.
- Taylor, R.J. y P.J. Regal 1978. The Peninsular Effect on Species Diversity and the Biogeography of Baja California. *The American Naturalist*. 112(985):583–593.
- Teeling, E.C., M.S. Springer, O. Madsen, P. Bates, S.J. O'brien, y W.J. Murphy 2005. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science (New York, N.Y.)*. 307:580–584.

- Tobe, S.S., A.C. Kitchener, y A.M.T. Linacre 2010. Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome B and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PloS one*. 5(11):e14156.
- Toledo, V.M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. 81:17–30.
- Vaughan, T.A. 1954. A New Subspecies of Bat (*Myotis velifer*) from Southeastern California and Arizona. *University of Kansas Publications Museum of Natural History*. 7(8):507–512.
- Waits, L.P., S.L. Talbot, R.H. Ward, y G.F. Shields 1998. Mitochondrial DNA Phylogeography of the North American Brown Bear and Implications for Conservation. *Conservation Biology*. 12(2):408–417.
- Wiens, J.J. 2000. Phylogenetic analysis of morphological data. *Smithsonian Institution Press*, 220p.
- Wilson, D.E. y D.M. Reeder 2007. *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference*. *Johns Hopkins University Press, USA*. 824–830p.
- Xiao-Ming, G., H. Shu-Yan, y A. Lei 2008. Molecular phylogenetics among three families of bats (Chiroptera: Rhinolophidae, Hipposideridae, and Vespertilionidae) based on partial sequences of the mitochondrial 12S and 16S rRNA genes. *Zoological Studies*. 47(3):368–378.
- Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, D.H. Sheets, y W.L. Fink 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists: a primer*. *Elsevier Academic Press, Ney York, USA*. 419p.
- Zwickl, D.J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion.  
<http://www.bio.utexas.edu/faculty/antisense/garli/>.



## APÉNDICES

Apéndice i. Lista de los ejemplares utilizados para los análisis filogenéticos con COI y Cyt. *b*. En caso de que no estuvieran sometidas en GenBank o en Bold Systems (The barcode of Life), se les colocó ND (No Datos). Las abreviaciones de las instituciones son las siguientes: CIBNOR (*Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*), COFE (*Centre of Expertise For Rabies, Ottawa Laboratory Fallowfield (OLF) Canadian Food Inspection Agency*), ECO-SC (*El Colegio de la Frontera Sur*), DR. M. FORSTNER (*Dr. M. Forstner's tissue collection*), MVZ (*The Museum of Vertebrate Zoology of Berkeley*), OSE (*Odum School of Ecology, University of Georgia, USA*) Texas Tech (*The Museum of Texas Tech University*). Las abreviaciones para los estados utilizados son: BCS (Baja California Sur), CHPS (Chiapas), Ca. (California, U. S. A.), COH (Coahuila), NL (Nuevo León), SON (Sonora).

GEN	ESPECIE <i>Myotis</i>	CATÁLOGO	COLECCIÓN	HAPLO	LOCALIDAD	TEJIDO/CAT	BOLD SYST	GENBANK
COI	<i>elegans</i>	2029	ECOSUR	H1	15.788, -93.167 (CHPS)	2029	TOPO450-10	ND
COI	<i>evotis</i>	4884	CIBNOR	H1	26.031, -111.833 (BCS)	4884	MXTOP326-09	ND
COI	<i>keaysi</i>	1437	ECOSUR	H2	16.203, -91.308 (CHPS)	1437	TOPO453-10	ND
COI	<i>peninsularis</i>	10913	CIBNOR	H1	El Eden, 4 km N, 21 km W Santiago (BCS)	10913	MXTOP895-10	ND
COI	<i>peninsularis</i>	16346	CIBNOR	H1	Rancho Los Tezo, 9.7 km E, Santa Anita (BCS)	16346	MXTOP792-10	ND
COI	<i>peninsularis</i>	16347	CIBNOR	H1	Rancho Los Tezo, 9.7 km E, Santa Anita (BCS)	16347	MXTOP793-10	ND
COI	<i>thysanodes</i>	CA62	OSE	H1	California(Ca.), USA (Streicker <i>et al.</i> , 2010b)	62	ND	GU723125_mt
COI	<i>velifer</i>	18538	CIBNOR	H1	Rancho El Suareño, 1.18 km N 0.63 km E, Querobabi (SON)	18538	MXBRO159-11	ND
COI	<i>velifer</i>	8616	CIBNOR	H2	San Ignacio (NL)	8616	8616	ND
COI	<i>velifer</i>	4111	CIBNOR	H3	27.321, -102.418 5 km W Ocampo (COH)	4111	TOPO259-10	ND
COI	<i>volans</i>	04BC0617KE	COFE	H1	Canadá (Nadin-Davis <i>et al.</i> , 2012)	613	ND	HM486595_mv
COI	<i>yumanensis</i>	155859	MVZ	H1	Red Barn, National Seashore headquarters (Ca. U.S.A.)	1347	155859	ND
Cyt b	<i>elegans</i>	AM261891	ND	H1	(Stadelmann <i>et al.</i> , 2007)	AM261891	ND	AM261891

Cyt b	<i>keaysi</i>	JX130525	ND	H1	(Larsen <i>et al.</i> ,2012)	JX130525	ND	JX130525
Cyt b	<i>peninsularis</i>	10913	CIBNOR	H1	El Eden, 4 km N, 21 km W Santiago (BCS)	10913	MXTOP895- 10	ND
Cyt b	<i>peninsularis</i>	16346	CIBNOR	H1	Rancho Los Tezo, 9.7 km E, Santa Anita (BCS)	16346	MXTOP792- 10	ND
Cyt b	<i>peninsularis</i>	16347	CIBNOR	H1	Rancho Los Tezo, 9.7 km E, Santa Anita (BCS)	16347	MXTOP793- 10	ND
Cyt b	<i>velifer</i>	EU680295	DR. M. FORSTNER	H1	Mojave (Ca, U.S.A, Parlos <i>et al.</i> , 2010)	MF22698	ND	EU680295
Cyt b	<i>velifer</i>	18541	CIBNOR	H2	1.18 km N 0.63 km E, Querobabi (SON)	18541	ND	ND
Cyt b	<i>velifer</i>	16444	CIBNOR	H3	Santiago (NL)	16444	ND	ND
Cyt b	<i>yumanensis</i>	AF376875		H1	(Ruedi y Mayer, 2001)	AF376875	ND	AF376875
Cyt b	<i>evotis</i>	175811	U. M.	H1	ND	175811	ND	ND
Cyt b	<i>thysanodes</i>	8079	CIBNOR	H1	Tinaja de los Papagos,73 km NE Puerto Peñasco (SON)	8079	ND	ND
Cyt b	<i>volans</i>	81188	TEXAS TECH	H1	(Texas, U.S.A.)	84980	ND	AF376871

Apéndice ii. Cráneos examinados. Las colecciones mastozoológicas visitadas se abrevian como se lista en materiales y métodos. Los estados de la República Mexicana se listan al inicio de sus ejemplares.

*Myotis peninsularis* (n = 46)

**CIB:** Baja California Sur- Cueva de la Iglesia, 3 km carretera al Sur, La Paz (869,871-873, 876, 880, 883, 4904-4906, 10913, 15405,15406, 16345, 16897, 16905-16908, 15655-16657, 2078, 21742, 21743, 21736, 21737, 18962, 18963, 16346-16348, 16902, 16903). Las Cuevas, Fraccionamiento Universitario, La Paz (16898-16900). El Edén, 4 km N, 21 km W Santiago (16901, 16349-16354). Rancho Los Tezo, 9.7 km E, Santa Anita. (16904). **CNAM:** Baja California Sur- Rumbo Caduaño 23.35 S -109.75E (9853).

*M. velifer* (n = 147) **CIB:** Nuevo León- Santiago (16444-16445). **CNMA:** 23.0503, -109.6837 (30305). Coahuila- Rancho las Margaritas 920 msnm (2125). Presa de Don Martín, Monclova (13667, 13669). 8 Mi. N, 4 Mi W, 502 MsnM (2124). Durango- Bordo Chapalita, 1.25 KM. S 1.75 KM. W (39023). 10km. Mina Los Ramones (28892). 10 KM. Carr. N W del KM. 19 Carr. Durango-Mazatlan (19996-20001). Hidalgo- 19.9039, -99.3414 (473). Morelos- 1.5 KM. W Hacienda Chinameca (14570-14573). 2 KM. S 18.6022, -98.9961 (15573). 3 KM. S 18.5931, -98.9961 (17031, 18519). KM. 60.4 Carr. Mex-Cuernavaca (1491, 46027, 46028). Cerca de Cueva del Salitre (5154-5156). Cueva del Salitre, 3 km. S, 18.74, -99.17 (11474, 11475, 11477, 3730, 11484-11486). Cueva del Murciélago, cerro el Faile, 6.5 KM. N W (7156). Hacienda Cuauhixtla (13562-13569). Sonora- Caborca, Minas 30.9543, -112.3699 (28883-28884). Tamaulipas- Por Fernando, 24.8479, -98.1586 (2881). Zacatecas- Cañada de la Fragua, 8 KM. S W (19750). **ENCB:** Aguascalientes- Presa Plutarco Elias Calles (35070-35072). 4 KM. W Villa Juárez (41615). Chihuahua-10km. S (6740-6741). Distrito Federal- La Quinta 11km. S 2 KM. E (41216-41217). Estado de México- 2 KM. Ocoyoacan (2485-2487). 1.5km. S, 4 KM. W (20227). Ixtapán del Oro (32885-32887). Jalisco- 5.5 KM. N W San Marcos (29326). Michoacán- 3 KM. W La palma (22054-22056). 9.5 Km. S 2 KM. E (25326-25328). Morelos- Tepoztlán (2150-2152). Tlaxcala- (Puebla), 5 KM. San Miguel Canoa (30050-30051). Veracruz- 2 KM. N Nueva vavera (29913-29915). **FC-UNAM:** Distrito Federal- San Pablo Oztotepec (10649). Estado de México- Carretera Toluca-Querétaro, KM. 100. El Bosque (1070, 4380). Villa Nicolás Romero. Puentecillas (1341). Tonicoy, 5 KM. Grutas de la Estrella (9445). Hidalgo- Cerro Jarros, 1 KM. E El Sótano (7612). Oaxaca- Teotitlán del Camino, Iglesia (3685, 3687, 4488). Tamaulipas- Ejido Los Carricitos, 1.5 KM. SW (6359). Veracruz- Villa Nueva (11256). **UAMI:** Distrito Federal- Campus U.A.M.- Iztapalapa (4221). Durango- Reserva de la Biosfera de Mapími, 17 KM. E, 28 KM. N (5533-5534). Estado de México- Zoquiapan, 15 KM. SW Río Frío (889-890). 4 KM. W Caxhuacan (2730-2731). 11 KM. W, 3 KM. N Tepetzotlán (2739). 3 KM. S Tepetlaoxtoc (2740). Hidalgo- 8 KM. N E Singuilucan (2725-2726). Michoacán- Cerro El Ventero, 1 KM. N E Presa Pucuate (15302). Cueva La Olotera 7.5 KM. W Coalcoman (15303). Dos Aguas (15304-15306). La Nieve, 12 KM. E Dos Aguas (15307-15310). Iglesia de San Francisco Tzinzuntzan (16395-16396). Morelos- Cueva Los Arcos, 12 KM. N, 7 KM. E Cuernavaca (5535-5539). Nuevo León- Túnel Presa La Boca, 1 KM. SE

Santiago (9149). Cueva La Boca (Bese), 3 KM. S E Santiago (9150). Puebla-3 KM. S, 2 KM. E Tlatlauquitepec (1464-1472). Tlaxcala- El Túnel 10 KM. E Tlaxco (3091-3100). Veracruz- 3 KM. N, 5.5 KM. W Cuitláhuac (10318-10327).

*M. yumanensis* ( $n = 42$ ) **CIB**: Baja California Sur- 36 KM. S, 14 KM. W Santa Rosalía (8615-8617, 11736, 21474, 12230, 18541, 18526,18527). **CNMA**: Baja California Sur- Tzintzuntzan, 3KM. N E San Ignacio, Jalapan de la Sierra (21681). New México, U. S. A.- Apache N W R. Socorro (31453). *Oregon, U. S. A.*- U. Klamath Lake, Klamath (5006). **ENCB**: Aguascalientes- Palo Alto, Aguascalientes (35073). Chihuahua- 10KM. S, Chihuahua (6744-6749). Durango- 1.6KM. S W, La Peña. Durango (14236). Estado de México- Ixtapán del Oro (32891-32893). Jalisco- 0.5KM. Atenquique (29322-29324). 31.8KM. S 8.9 W. Huejuquilla el Alto (18958). Michoacán- 5KM. S Ciudad Hidalgo (30725). Morelos- 2KM. 5.4 S Yucatepec (24623). *San Luis Potosí*- 3KM. S. 6KM. W (32072). *Zacatecas*- 4.3KM. N S 4E San Juan capistrano (20424-20426). **FC-UNAM**: Hidalgo: El Coyol, 1KM. E. Pisaflores (7666, 9152). Puebla- Venta Salada, 3.8KM. S W, Coxcatlán (6707). Querétaro- Santa María de Guadalupe, Colon (4043, 4045). San Luis Potosí- San Nicolás de los Montones, Tamasopo (8858).