El aporte de la herramienta molecular en la diferenciación a nivel específico: El caso del género *Myotis* (Chiroptera-Mammalia) en el norte de Buenos Aires y Sur de Entre Ríos

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Diana Belén Acosta

El trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de:

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 3 de diciembre del 2014.

El aporte de la herramienta molecular en la diferenciación a nivel específico: El caso del género *Myotis* (Chiroptera-Mammalia) en el norte de Buenos Aires y Sur de Entre Ríos

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Diana Belén Acosta

Director:

Dr. Mariano L. Merino

Co-Director:

Dra. Gabriela P. Fernández

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 3 de diciembre del 2014.

El aporte de la herramienta molecular en la diferenciación a nivel específico: El caso del género *Myotis* (Chiroptera-Mammalia) en el norte de Buenos Aires y Sur de Entre Ríos

Trabajo final de grado de la alumna

Diana Belén Acosta

Aprobado por el tribunal evaluador			
Ing. Agr. Susana Pistorale	Dra. María Ay	elén Lutz	Dra. María Inés Catalano
Dr. Mariano L	Merino	Dra. Gab	riela P. Fernández
Director		Co-Director	

Alumna

Diana Belén Acosta

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 3 de diciembre del 2014.

Agradecimientos

A Juana, por ser la luz de mis ojos.

A mi familia, fundamentalmente a Ema y mamá, por el apoyo incondicional y esfuerzos realizados para que pueda lograr todos mis sueños.

A todos mis compañeros, que hicieron que los días de clases se vuelvan en risas interminables.

A mis directores Mariano y Gabriela, por transmitirme sus conocimientos, apoyo y fundamentalmente confianza.

A mis hermanos de la familia Rusticiade (Mara, Charly, Luján y Cecilia), que me ayudaron en todo momento e hicieron que los días de más de 12 horas en el laboratorio se vuelvan muy divertidos.

A Andrés Lavore, por ayudarme a resolver todas mis dudas en el laboratorio.

A mis compañeros del CeBio, por el apoyo y trabajo brindado.

A Ayelén Lutz, que sin el aporte de sus muestras no podría haber conocido el maravilloso mundo de los murciélagos.

A Susana Pistorale, por hacer día a día que nuestra carrera tan querida esté mejor, y fundamentalmente por ser una gran persona.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	2
	1.1 Los Murciélagos	2
	1.2 Importancia de los murciélagos en los ecosistemas	7
	1.3 Familia Vespertilionidae: la más diversa de Argentina	9
	1.4 El género Myotis	11
	1.5 El ADN mitocondrial como marcador en estudios filogenéticos	15
2.	HIPÓTESIS	18
3.	OBJETIVOS	18
	3.1 Objetivo general	18
	3.2 Objetivos específicos	18
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
	4.1 Obtención de la muestra	20
	4.2 Extracción de ADN	22
	4.3 Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	22
	4.4 Secuenciación	24
	4.5 Análisis de datos	24
5.	RESULTADOS	27
	5.1 Análisis de la variabilidad genética	27
	5.2 Análisis filogenéticos	28
	5.3 Relaciones haplotípicas	29
6.	DISCUSIÓN	32
7.	CONCLUSIÓNES	36
8.	BIBLIOGRAFÍA	38
9.	RESÚMEN	44

<u>INTRODUCCIÓN</u>

1. Introducción

1.1 Los murciélagos

Los murciélagos pertenecen al orden Chiroptera (del griego *cheir* = mano, y *pteron* = ala), grupo de mamíferos voladores que comprende 18 familias, con algo más de 200 géneros y más de 1100 especies, siendo uno de los grupos de mamíferos más diversos y abundantes del mundo. Se estima que casi la cuarta parte de todas las especies conocidas de mamíferos en el mundo pertenecen a este orden (Laval y Rodríguez, 2002; González y Martínez Lanfranco, 2010).

El orden Chiroptera se divide en dos subórdenes: Megachiroptera y Microchiroptera. Los Megaquirópteros (Fig. 1) se distribuyen exclusivamente en el viejo mundo (Europa, Asia, África e Islas circundantes), con 170 especies pertenecientes a una sola familia, *Pteropodidae*, integrada por murciélagos de tamaño variado, comprendiendo un rango entre 1,7 kg (género *Macroglossus*) a 10 kg (género *Pteropus*) (Strahan, 1983; Laval y Rodríguez, 2002; González y Martínez Lanfranco, 2010).

Los Microquirópteros (Fig. 2) presentan una distribución mundial (salvo en los polos y algunas islas oceánicas), siendo muy abundantes en las Américas. A este suborden pertenecen cerca de 17 familias conformadas por 930 especies, las cuales varían desde tamaño pequeño a mediano, comprendiendo valores desde 1,5 g (*Craseonycteris thonglongyai*) a 200 g (*Chieromeles torquatus*), aunque podemos encontrar especies excepcionales con tamaño grande (Neuweiler, 2000; González y Martínez Lanfranco, 2010; Vaughan *et al.*, 2011). Cabe resaltar, que este taxón es muy dinámico en

cuanto a su sistemática, ya que anualmente se descubren y describen nuevas especies pertenecientes a este suborden (Laval y Rodríguez, 2002).

Los murciélagos son los únicos mamíferos que han desarrollado un sistema de vuelo activo, se desplazan mediante vuelo batido, pudiendo elevarse grandes alturas aún en ausencia de viento, realizando así desplazamientos a grandes distancias. Para ello, el ala se abre y se cierra acompañando el movimiento del brazo y el antebrazo en cada aleteo (González y Martínez Lanfranco, 2010).

A lo largo de su historia evolutiva, los murciélagos han experimentado un notable alargamiento de sus huesos, especialmente en los dedos de la mano. Esta adaptación es fundamental para la evolución del vuelo, debido a que proporciona el apoyo estructural a una doble membrana de piel delgada y flexible denominada plagiopatagio, así como a un punto de unión de los músculos, tendones y vasos sanguíneos necesarios para mover el ala (Fig. 3), por lo tanto, el ala se apoya en el miembro superior, el antebrazo y los dedos. El pulgar (o primer dedo) se extiende libremente desde el ala y sirve de soporte a una pequeña garra. El segundo dedo y tercer dedo generalmente están unidos en el extremo, dejando los dedos cuarto y quinto para mover la superfície misma del ala. Una diferencia entre estos dos subórdenes, es que los megaquirópteros poseen también el segundo dedo libre (González y Martínez Lanfranco, 2010).

La membrana de vuelo está compuesta por el quiropatagio, el propatagio, el plagiopatagio y el uropatagio (Fig. 3). Dependiendo de la especie y su estilo de vuelo, el uropatagio puede ser muy largo, muy reducido en

tamaño o estar ausente. Todos los murciélagos microquirópteros tienen orejas bien desarrolladas, que van desde las que apenas se extienden a la altura del pelo, hasta las enormes cuya longitud es igual al tamaño del cuerpo. En este suborden, hay dos estructuras dentro de la oreja llamadas trago y antetrago, que se utilizan para recibir los ecos (rebotes del sonido) provenientes de la ecolocalización que emite el murciélago. La ecolocalización, es un mecanismo que utilizan para orientarse y encontrar alimento, en donde al emitir ultrasonidos a su entorno, incluyendo presas, frutas y flores, reciben ecos que les suministran tanta información como si estuvieran viendo el objeto, aun en la oscuridad total. En lo que respecta a la hoja nasal, varía sustancialmente de tamaño y forma entre las diferentes especies (González y Martínez Lanfranco, 2010).

Durante el proceso evolutivo, la articulación de los murciélagos que une al fémur (en posición distal) y a la tibia (en porción proximal), sufrió una rotación de 180°, de manera que pueden doblar los miembros inferiores hacia el frente, contrariamente a lo que sucede en la mayoría de los mamíferos. Esto es esencial para un animal que cuelga cabeza abajo, porque le permite estar de frente en la dirección hacia la cual alzará vuelo. Una adaptación adicional son los tendones, que mantienen los dedos curvos en una posición de "agarre", de manera que el murciélago pueda estar colgado sin hacer ningún esfuerzo ni gastar energía. De hecho, algunas veces se pueden encontrar murciélagos muertos colgados (González y Martínez Lanfranco, 2010).

En los machos, los testículos están en el escroto solo durante la época reproductiva, el resto del tiempo son abdominales (por esta razón no son visibles externamente). Las mamas de las hembras (solo dos en la mayoría de

las especies) son laterales y están cercanas a las axilas. Los dientes deciduos de las crías tienen forma de gancho, para poder aferrarse al pezón de su madre, que no tiene como sostenerlas por sí sola. Generalmente nace una sola cría y las hembras tienen uno o dos partos a lo largo del año, dependiendo de la especie. Las crías al nacer, pesan alrededor de una cuarta o tercera parte del peso de la madre; a las 6 u 8 semanas pueden volar por si solas (González y Martínez Lanfranco, 2010).

El tipo de dentición está estrechamente relacionado con el hábito alimenticio del murciélago. Con respecto a ésta, se dividen en seis grupos: insectívoros, carnívoros, piscívoros, nectarívoros, frugívoros y hematófagos. (Dos Reis *et al.*, 2008).

Según el tipo de especie, los murciélagos tienden a vivir solitarios o en colonias, formado por decenas e incluso cientos de ellos. Por ser animales tan pequeños, son capaces de tener una vida larga; se han registrado edades de hasta 36 años (González y Martínez Lanfranco, 2010).



Figura 1. Murciélago megaquiróptero (Acerodon jubatus). Tomado de Soria, 2008.



Figura 2. Murciélago microquiróptero *(Corynorthinus townsendii)*. Tomado de Harvey *et al.*, 1999.

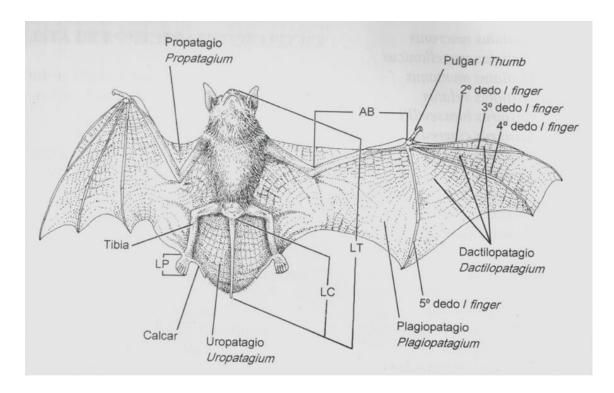


Figura 3. Morfología externa del murciélago. Vista ventral con detalle de las extremidades anteriores. Tomado de Barquez y Díaz 2009.

1.2 Importancia de los murciélagos en los ecosistemas

En las últimas décadas se ha reconocido la importancia de los murciélagos para los ecosistemas y el hombre. Los murciélagos insectívoros ejercen una importante actividad reguladora sobre poblaciones de insectos perjudiciales para la agricultura y para la economía humana, evitando que algunas especies se conviertan en plagas de cultivos o vectores de enfermedades humanas como malaria y fiebre amarilla, funcionando como control biológico (Barquez y Díaz, 2009).

Los murciélagos frugívoros actúan como dispersores de semillas ya que al alimentarse de frutos, las semillas pasan por el tubo digestivo y pueden ser defecadas en áreas distintas de donde las consumieron. El paso de las mismas a través del tubo digestivo, activa la capacidad de germinación, ya que digieren las capas del tegumento de las semillas (Fernández, 1997).

Los murciélagos nectarívoros cumplen un importante rol como agentes polinizadores, ya que al visitar flores e impregnarse con el polen, lo transmiten a otras flores mediante la deposición en los estigmas. Esto es el resultado de un proceso de coevolución entre las flores y los murciélagos que las polinizan (Fernández, 1997).

Los murciélagos hematófagos, comúnmente conocidos con el nombre de "vampiros", se distribuyen en tres géneros monoespecíficos: *Desmodus rotundus, Diphylla ecaudata y Diaemus youngii* (Marinkelle y Goose, 1972). Son vectores de patógenos, ya que éstos no son perjudiciales para ellos, pero sí para el hombre. Tal es el caso del protozoario *Trypanosoma cruzi* (causante del Mal de Chagas), virus de la rabia y virus del ébola, siendo el más

emblemático actualmente (Amasino *et al.*, 2003; Manjarrez Hernández *et al.*, 2003; Barquez y Díaz, 2009;).

Debido a la alta diversidad de los murciélagos, como al hecho de que ocupan varios niveles de la cadena alimenticia, los convierte en grandes reguladores de los procesos ecológicos, especialmente en los bosques tropicales, por lo que suelen ser utilizados como indicadores de niveles de disturbio en el hábitat, ofreciendo visión descriptiva del estado de conservación de esos ecosistemas (Barquez y Díaz, 2009).

Debido a su gran vulnerabilidad frente a hábitats modificados, como las bajas tasas de reproducción, muchas poblaciones de murciélagos se encuentran en declino, y algunas de ellas en peligro de extinción (Barquez y Díaz, 2009). Algunos de los factores relacionados con la amenaza de extinción de estas poblaciones, son el uso de de agroquímicos, el cambio climático, el creciente aumento de la población humana, y por último la matanza indiscriminada debido a las costumbres de algunas especies de usar como refugio estructuras hechas por los humanos, como por ejemplo los techos de las viviendas (Laval y Rodríguez, 2002).

Como consecuencia de esto se han desarrollado en los últimos años grupos de investigación sobre conservación de murciélagos a lo largo de Latinoamérica. Por ejemplo en Argentina, se ha creado el Programa de Conservación de los Murciélagos de Argentina (PCMA) que forma parte de la RELCOM (Red Latinoamericana de Conservación de Murciélagos) y que incluye todos los programas latinoamericanos, para consolidar objetivos

comunes sobre todo en especies migratorias compartidas entre países latinoamericanos (Barquez y Díaz, 2009).

1.3 Familia Vespertilionidae: la más diversa en Argentina

La República Argentina presenta una gran diversidad ambiental, y por consiguiente, una fauna muy heterogénea de murciélagos, incrementándose de forma notable a través de los años. Hasta el momento, Argentina presenta 61 especies de murciélagos distribuidos en cuatro familias: Vespertilionidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, y Molossidae (Barquez *et al.*, 1993; Barquez y Díaz, 2009).

La familia Vespertilionidae está distribuida en casi todo el mundo, abarcando 6 subfamilias, 34 géneros, y 315 especies. En el caso de Argentina, los vespertiliónidos son uno de los grupos más diversos, y se encuentran distribuidos en 5 géneros y 20 especies. Son exclusivamente insectívoros; algunos de ellos son migratorios, mientras que otros son hibernantes. Tienen tendencia a ocupar zonas urbanas o suburbanas, viviendas, puentes, fisuras de edificios y rocas, huecos de los árboles y cuevas (Barquez *et al.*, 1999).

Esta familia incluye especies de tamaño pequeño a mediano, con pesos que van desde 5 a 14 g (Coates-Estrada y Estrada, 1986). La cola está bien desarrollada y casi totalmente incluida en el uropatagio (Fig. 4). Carecen de hoja nasal y presentan una gran variación en el tamaño de las orejas, lo cual es utilizado como un carácter diagnóstico a nivel de género. El trago está bien desarrollado y el antitrago prácticamente ausente (Fig. 5). El cráneo presenta un paladar emarginado que separa a los incisivos de cada lado (Díaz y Barquez, 2002).

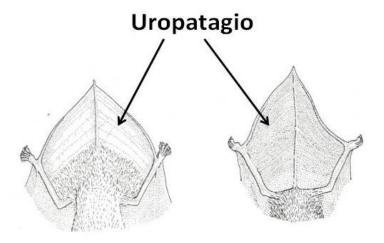


Figura 4. Uropatagios de murciélagos vespertiliónidos. La cola del murciélago se encuentra incluida totalmente en la membrana uropatagio, característica diferencial de la familia Vesperiolionidae. Díaz et al., 2011.

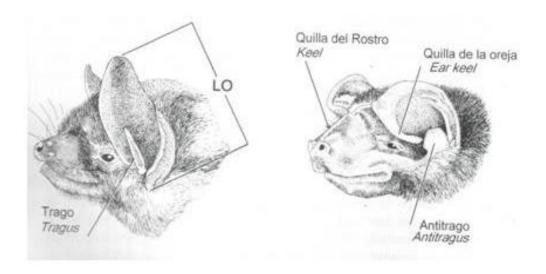


Figura 5. Estructura de rostro y oreja de vespertiliónidos. Tomado de Barquez y Díaz, 2009.

1.4 El género Myotis

Dentro de la familia Vespertilionidae, el género *Myotis* es el más variado, con 42 especies distribuidas en todo el mundo, 17 de éstas se encuentran en la región Neotropical y 10 habitan en Argentina (Laval, 1973; Simmons, 2005; Larsen *et al.*, 2012). Cinco especies del género son politípicas, entre ellas se destaca el complejo *Myotis levis*, conocido vulgarmente como "murcielaguillo amarillo". Su nombre específico fue asignado por I. Geoffroy St.-Hilaire en 1824 y finalmente descrito por La Val en 1973. Su distribución abarca el sur de Brasil, sur de Paraguay, Uruguay, Argentina y sur de Bolivia.

Inicialmente, Barquez y col. (1993 y 1999), reconocen que *Myotis levis* está representado por dos subespecies similares y con disposición alopátricas, llamadas *Myotis levis levis y Myotis levis dinellii*. Se distribuyen de manera desigual, en donde *Myotis levis levis* se encuentra en el centro y norte de Buenos Aires, Entre Ríos y Misiones, y *Myotis levis dinellii* en Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Neuquén, La Pampa, sur de Buenos aires, San Luis y Córdoba (Fig. 6). Los refugios naturales son poco conocidos pero se sabe que es un habitante común de viviendas, ya sea de forma solitaria o colonial (Barquez *et al.*, 1993).

Son difícil de distinguir entre sí, excepto por caracteres como el tamaño y coloración, en donde *M. l. levis* es más largo y robusto, con pelos dorsales bicoloreados, con las bases más oscuras en color marrón o negro y punta de los pelos marrón, mientras que *M. l. dinellii* es más pequeño y las puntas de los pelos son amarillentas. Ventralmente, ambos presentan pelos oscuros (Barquez *et al.*, 1999).

Barquez (2006) en base a las diferencias en la coloración de los pelos dorsales y en el ancho zigomático, reconoce a *Myotis dinellii* como especie plena (Miranda *et al.*, 2013). Particularmente, *Myotis dinellii* presenta las puntas de los pelos dorsales más claras, generalmente amarillentas y el ancho zigomático menor a 9 mm (Fig. 7), mientras que *Myotis levis* exhibe las puntas de los pelos dorsales marrones, y un ancho zigomático mayor a 9 mm (Fig. 8) (Barquez y Díaz, 2009). Por otra parte, debido al muestreo más intenso en otras regiones de Argentina, se han encontrado nuevas áreas de distribución, hallándose regiones de simpatría, como en el caso de Buenos Aires y Entre Ríos (Fig. 9).

Miranda y colaboradores (2013), mediante una perspectiva multivariada, han demostrado la diferenciación significativa en cuanto a otros caracteres morfológicos como ser: longitud del antebrazo, longitud del cráneo, coloración del pelaje dorsal y ventral, indicando así la diferenciación interespecífica entre *Myotis levis* y *Myotis dinellii*.

Debido a la gran intensificación en los muestreos a campo, tanto en regiones de simpatría como alopatría de *M. levis* y *M. dinellii*, se han podido encontrar ejemplares con características intermedias a las "dos especies", dificultando así la asignación a un taxón específico (Lutz, 2014).

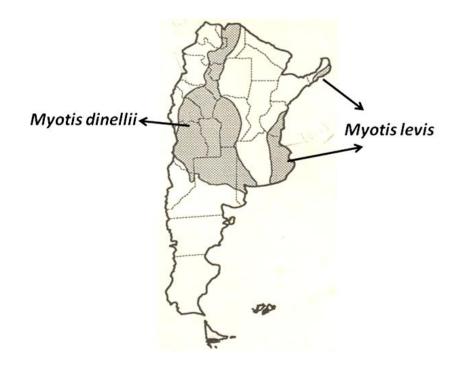


Figura 6. Distribución geográfica descrita para *Myotis levis y Myotis levis dinellii*. Tomado de Barquez *et al.*, 1993.



Figura 7. Vista externa de un ejemplar perteneciente a la especie *Myotis* dinellii.



Figura 8. Vista externa de un ejemplar perteneciente a la especie *Myotis levis*.

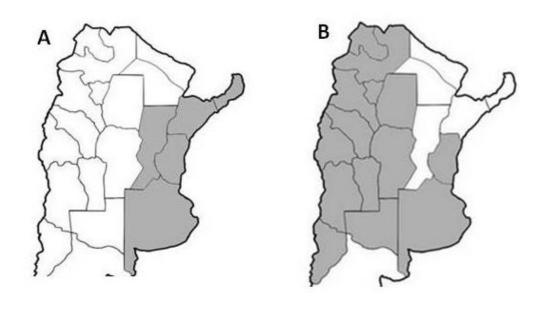


Figura 9. Distribución geográfica actual propuesta para *Myotis levis* (A) y *Myotis dinellii* (B). Barquez y Díaz, 2009.

1.5 El ADN mitocondrial como marcador en estudios filogenéticos

El ADN mitocondrial es una molécula circular, cerrada y de doble cadena, compuesta por 16569 pares de bases (pb) con distinta distribución en las dos cadenas (Fig. 10). La cadena pesada está constituida mayormente por purinas, mientras que la liviana por pirimidinas (Núñez Domingo, 2011).

Presenta dos regiones de ADN, una no codificante (región control o D-loop), que tiene como finalidad la regulación de la expresión del ADN mitocondrial, y una región codificante, que representa el 90% del genoma mitocondrial, formada por 37 genes, de los cuales 13 codifican para polipéptidos involucrados en la cadena de fosforilación oxidativa, mientras que el resto codifican para 22 moléculas de ARN de transferencia y 2 ARN ribosómicos (12S y 16S) (Núñez Domingo, 2011).

El ADN mitocondrial es una molécula ideal para estudiar las relaciones filogenéticas entre organismos, en particular los muy estrechamente relacionados. Particularmente en mamíferos, el gen citocromo b codifica para una proteína que forma parte del complejo III del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial (Hatefi, 1985), posee una tasa evolutiva elevada y a su vez contiene información filogenética tanto a nivel intraespecíficos a intergenéricos. Entre las principales ventajas de su uso, se puede destacar su mayor tasa de sustitución que el genoma nuclear, proporcionando una mayor señal filogenética, su tamaño efectivo es cuatro veces menor que el de un gen nuclear, lo que implica que la probabilidad de tener monofilia recíproca entre dos especies será mayor con el árbol de un gen mitocondrial que con uno nuclear y se fijarán nuevos alelos con mayor rapidez, está presente en un

número mayor de copias, se puede obtener a partir de muestras biológicas más degradadas y por último, el genoma mitocondrial se hereda como un único bloque porque no tiene recombinación, siendo de gran utilidad ya que la mayoría de los métodos de reconstrucción filogenética parten de la asunción de ausencia de recombinación (Castro, 2012).

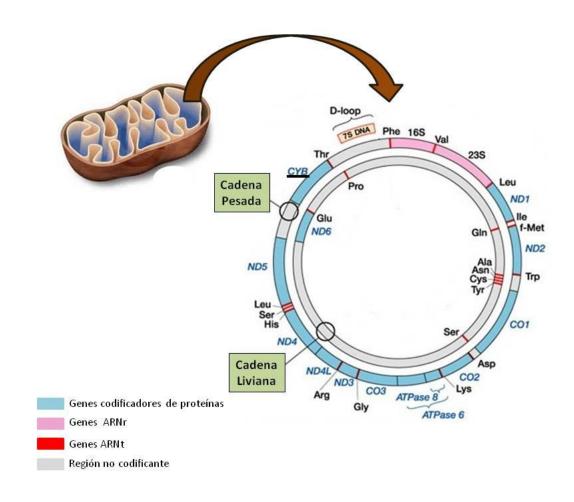


Figura 10. Estructura del ADN mitocondrial. Visualización de las cadenas pesada y liviana, como así también de las regiones codificantes y no codificantes, con sus respectivos genes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis

La hipótesis que se pone a prueba en este trabajo es que *Myotis levis* y *Myotis dinellii* son especies plenas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Caracterizar la variabilidad genética en base al marcador molecular citocromo b para una muestra de ejemplares asignados a las especies *Myotis* levis y *Myotis dinellii*.

3.2 Objetivos específicos

- Analizar la variabilidad de las secuencias de obtenidas para el gen del citocromo b mitocondrial.
- Realizar la asignación taxonómica de los individuos de *Myotis levis* y *Myotis dinellii* (Orden Chiroptera) colectados en el Norte de Buenos Aires y Sur de Entre Ríos, a partir del análisis de secuencias para el gen del citocromo b mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. Materiales y Métodos

4.1 Obtención de la muestra

Las muestras provienen de dos poblaciones pertenecientes a la Reserva "El Destino" (Partido de Magdalena, Buenos Aires) y "Quinta Arco Iris" (Departamento Islas del Ibicuy, Entre Ríos) colectados durante la tesis doctoral de la Dra Ayelén Lutz (Lutz, 2014) (Fig. 11).

La Reserva "El Destino" se encuentra dentro de los límites del Parque Costero del Sur, declarado por la UNESCO como reserva de Biosfera (35°08'S; 57°23'O) ubicada en el partido de Magdalena a 15 km de la ciudad cabecera. Esta reserva privada se establece en la estancia del mismo nombre y es administrada por la Fundación Elsa Shaw de Pearson. Está comprendida por varias edificaciones, en donde se pudieron colectar varios ejemplares de murciélagos, principalmente en una habitación que era usada como lugar de quema de basura (Lutz, 2014).

El departamento de Islas del Ibicuy se ubica en el extremo sudeste de la provincia de Entre Ríos y comprende 4500 km². Según los datos del censo de 2010 es el departamento con menor densidad de la provincia (INDEC, 2012). Tiene un escaso desarrollo urbano, por contraposición, el porcentaje de la población rural es alto. La quinta "Arco Iris" (33°47'S; 58°32'O) tiene una superficie de 40 hectáreas en donde se ubica un galpón. Algunos ejemplares fueron capturados dentro de la construcción, mientras que otros se capturaron con redes ubicadas a corta distancia de esa habitación (Lutz, 2014).

A los murciélagos capturados (n=16; 8 de cada localidad de estudio) se les tomó muestras de músculo y testículos, conservándolas en alcohol 70° y por último fueron marcados antes de ser liberados con una aguja de tatuaje de

once puntas, generando una cicatriz clara en el ala, permitiendo así registrar las recapturas.

De los ocho individuos colectados en el Partido de Magdalena, cinco de ellos fueron caracterizados como *M. dinellii* y tres como *M. levi*s, mientras que en el Departamento Islas del Ibicuy, se identificaron cuatro ejemplares pertenecientes a la especie *M. levi*s y cuatro a *M. dinellii*.

Las muestras se encuentran almacenadas en el Centro de Bioinvestigaciones de la UNNOBA.

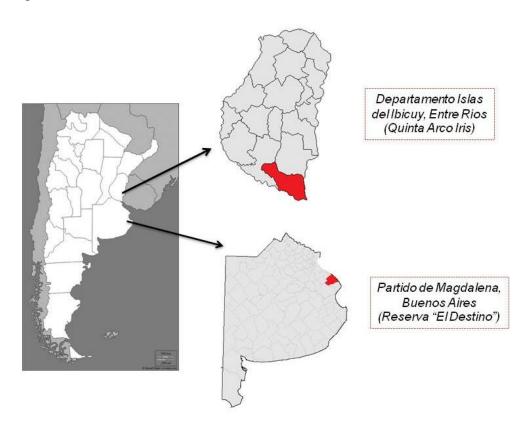


Figura 11. Región geográfica de colecta de muestra. En la parte superior se visualiza el Departamento Islas del Ibicuy (Entre Ríos), y en la inferior el Partido de Magdalena (Buenos Aires).

4.2 Extracción de ADN

El ADN de las muestras de tejido fue obtenido mediante el protocolo de extracción de ADN con Sal (NaCl), y en los casos donde la técnica no fue

eficiente (n= 9), se procedió al protocolo de extracción con Fenol Cloroformo-Alcohol isoamílico (Medrano *et al.*, 1990; Sambrook y Russel, 2001).

Para verificar la eficiencia en la extracción de ADN, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1% (1 g de agarosa/ 100 ml de TBE) teñido con bromuro de etidio, a 100 volts durante 40 minutos, y finalmente visualizado bajo luz ultravioleta. Las muestras se sembraron junto con el *buffer* de siembra DNA Dye (EZ-Vision Three, Amresco) con el fin de poder divisar el frente de corrida.

4.3 Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Para cada muestra se amplificó un fragmento de 649 pb del gen citocromo b mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Stadelmann *et al.*, 2004). Los primers utilizados fueron:

Forward: 5' GCAAGCTTCTACCATGAGGACAAATATC 3'

Reverse: 5' AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC 3'

La PCR se preparó en un volumen final de 20μl, conteniendo 25-100 ng de ADN, Cl2Mg 1,5 mM, *primer forward* 0,2μM, *primer reverse* 0,2μM, dNTPs 0,2mM, *buffer* de reacción 1X, Taq T-Plus DNA polimerasa (INBIO) 0,5U y agua estéril ultrapura.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos: 94°C durante 45 segundos, 45°C durante 45 segundos y 74°C durante 45 segundos; con un ciclo final de extensión a 74°C durante 5′.

El termociclador utilizado para llevar a cabo las reacciones de PCR fue el Gene Pro Thermal Cycler (Bioer Technology CO., LTD).

Los resultados de las amplificaciones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta. Las muestras se sembraron con el *buffer* de siembra DNA Dye (EZ-Visio Three, Amresco). Como parámetro de tamaño de los fragmentos obtenidos, se uso un marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L) (Fig. 12).

La cuantificación de ADN para cada fragmento amplificado se realizó usando el programa ImageJ (Abrámoff *et al.*, 2004).

Los productos amplificados fueron purificados utilizando 10U de Exonucleasa I (Thermo Scientific) y 1U de FastAP Fofatasa alcalina termosensible (Thermo Scientific) incubadas a 37°C por 15 minutos y luego a 85°C por otros 15 minutos para detener la reacción.

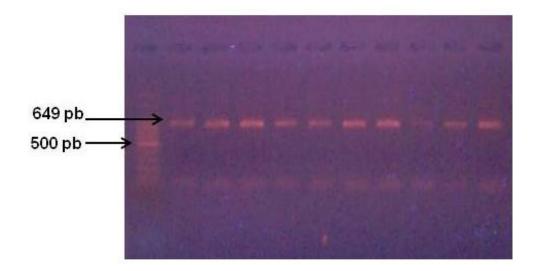


Figura 12. Determinación del tamaño de los fragmentos amplificados por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa (1%). Calle izquierda: marcador molecular (100 pb). Calles restantes: bandas de 649 pb correspondientes a los fragmentos amplificados.

4.4 Secuenciación

Los productos de PCR fueron secuenciados a través del secuenciador automatico ABI 3730XL (Applied Biosystems) por la empresa MACROGEN (Corea) mediante secuenciación estándar (*Standard-seq single*).

4.5 Análisis de los datos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas para el fragmento génico de interés fueron visualizadas y corregidas mediante el programa Chromas Lite 2.1.1 (www.technelysium.com.au). Una vez editadas las secuencias fueron alineadas utilizando la herramienta Clustalw disponible en el programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

El número de sitios variables (polimórficos), singletons y haplotípos, así como la diversidad nucleotídica y haplotípica, se calculó usando el programa informático DNASP5 (Librado y Rozas, 2009).

A partir del alineamiento se generaron árboles filogenéticos mediante dos metodologías de reconstrucción filogenética, *neighbor joining* (NJ) y máxima verosimilitud (MV) bajo el modelo Tamura-Nei, empleando las opciones recomendadas por el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). La determinación de los límites de confianza para monofilia de cada nodo, se realizó a través de un análisis *de bootstrap* con 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

Para el análisis filogenético, además del las 16 secuencias obtenidas, se utilizaron dos secuencias del citocromo b obtenidas del banco de datos genéticos *GenBank*. Una de ellas correspondiente a la especie *Myotis levis*, fue utilizada como secuencia nucleotídica de referencia, y la otra a *Myotis riparius*,

fue utilizada como *outgrup*, La elección de esta última como grupo externo se basa en que es una especie claramente diferenciada del grupo interno, que se distribuye en Argentina, Uruguay y Paraguay, y se la encuentra tanto en simpatría como en alopatría con las especies de interés (Laval y Rodríguez, 2002).

Para determinar las relaciones haplotípicas se utilizó el algoritmo Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999) a través del programa Network 4.6.1.2. (www.fluxus-engineering.com).

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Análisis de la variabilidad genética

El análisis mediante el programa informático DNASP5 de los 649 pb del gen citocromo b para las 16 muestras, más a la secuencia de *Myotis levis* de *GenBank*, arrojó un valor de 4 sitios variables (polimórficos) de los cuales dos se encuentran en las muestras en estudio y dos en *M. levis* de referencia. De todos ellos, 3 fueron sitios de mutación única (*singleton*).

A su vez, el programa DNASP5 los agrupó en 4 haplotípos, en donde los haplotípos 1, 2 y 3 abarcan a las muestras objetivo y el haplotípo 4 a *M. levi*s de *GenBank* (Tabla 1). La diversidad haplotípica (*Hd*) fue de 0,419, con una varianza de 0,01996 y desvío estándar de 0,141. La diversidad nucleotídica (*Pi*) fue de 0,00088, mientras que el número medio de diferencias nucleotídicas (*k*) fue de 0,574.

Con la inclusión de M. riparius al grupo de secuencias, se generó un nuevo haplotípo (Hpl5) (Tabla 1). El número medio de diferencias nucleotídicas obtenido para este set de secuencias aumentó en un orden de magnitud (k=8,307) dada la gran cantidad de mutaciones que diferencian la secuencia de M. riparius de las del ingroup (n = 64) (Fig. 14).

Tabla 1. Haplotípos obtenidos a partir del fragmento de citocomo b analizado (649 pb) para las secuencias de *M. levis*, *M. dinellii* y el grupo externo *M. riparius*; ER: Entre Ríos, BA: Buenos Aires.

	Nº de		
Haplotípos	secuencias	Identificación de las secuencias	
Hpl1	1	061_M. dinellii_ER	
Hpl2	13	085_M. levis ER, 114_M. levis ER, 149_M. levis BA, 160_M. dinellii BA, 165_M. levis BA, 113_M. dinellii ER, 131_M. dinellii BA, 135_M. dinellii BA, 151_M. levis BA, 155_M. levis ER, 166_M. levis ER, 174_M. dinellii ER, 177_M. dinellii ER	
Hpl3	2	123_M. dinellii BA, 137_M. dinellii BA	
Hpl4	1	M. levis GenBank	
Hpl5	1	M. riparius	

5.2 Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos obtenidos por las metodologías *neighbor joining* (NJ) y máxima verosimilitud (MV) fueron de idéntica topología, por ello sólo mostramos los resultados obtenidos a través de NJ (Fig. 13). Como puede visualizarse en la imagen, las secuencias fueron divididas en dos grupos, uno de ellos comprende a las muestras estudiadas junto con *M. levis* de referencia, mientras que el otro grupo incluye solo a *M. riparius*. Cabe resaltar, que dentro del primer grupo se observaron a su vez 2 subclados correspondientes a los haplotípos 3 y 4.

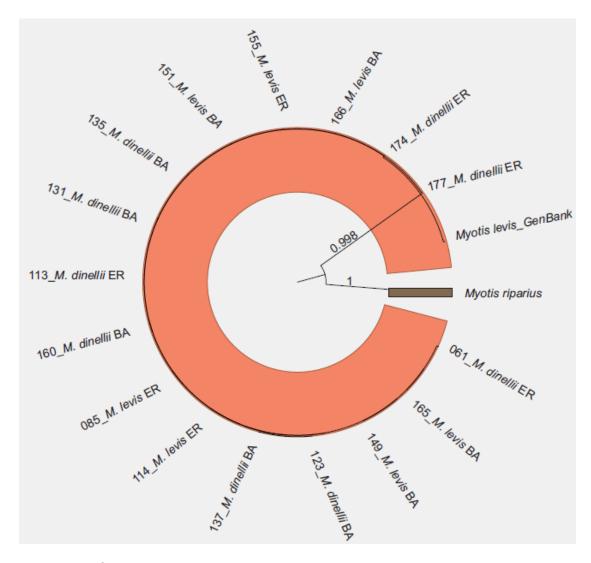


Figura 13. Árbol filogenético obtenido a partir del fragmento de citocomo b analizado (649 pb) para las secuencias de *M. levis*, *M. dinellii* y el grupo externo *M. riparius*, ER: Entre Ríos; BA: Buenos Aires., mediante el método de *neighbor joining*.

5.3 Relaciones haplotípicas

Como se mencionó anteriormente, a partir de las 18 secuencias analizadas se obtuvieron 5 haplotípos (Fig. 14). En la red de haplotípos puede observarse un bajo número de haplotípos (baja variabilidad genética para el marcador utilizado) así como baja diferenciación entre ellos: sólo una mutación con respecto al haplotípo ancestral (H2). Por otra parte puede verse un único

haplotípo central compartido por ambas especies (H2) y algunos haplotípos exclusivos de una u otra especie (H1, H3 y H4) lo que indica un bajo nivel de diferenciación entre *M. levis* y *M. dinellii*. El gran número de diferencias nucleotídicas encontrado entre las especies del *ingroup* con respecto a *M. riparius* (n=64) apoya la gran divergencia filogenética entre las mismas.

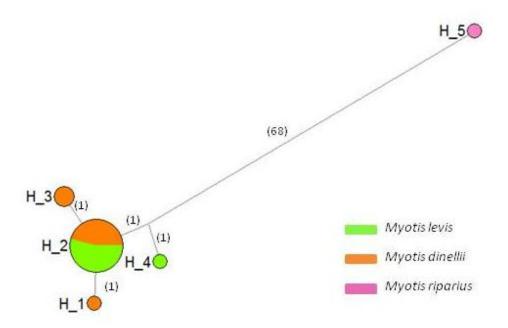


Figura 14. Relaciones haplotípicas obtenidas a partir del fragmento de citocromo b analizado (649 pb) para las especies *Myotis levis, M. dinelli* y la especie tomada como grupo externo (*M. riparius*). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia haplotípica, los colores indican las especies y los números sobre las ramas señalan el número de mutaciones entre los haplotípos

<u>DISCUSIÓN</u>

6 Discusión

La especie *Myotis levis*, fue descrita originalmente por Laval (1973), y se caracterizó por la presencia de dos subespecies denominadas *Myotis levis levis* y *Myotis levis dinellii*, que diferían tanto en su distribución espacial como en caracteres morfológicos (tamaño y coloración).

Posteriormete, Barquez (2006) elevo de categoría taxonómica a *Myotis dinelllii*, dejando así su rol de subespecie para transformarse en especie plena, en base a diferencias en la coloración del pelaje y tamaño del ancho zigomático. Además, en los últimos años debido al intenso muestreo en diversas regiones, se han encontrado nuevas áreas de distribución de ambas especies, encontrándose sectores comunes a las especies, produciendo una especiación simpátrica. Pero, a pesar de las discrepancias entre los ejemplares, se han encontrado individuos con características intermedias entre las "dos especies". Por ello, el objeto del trabajo de investigación es comparar la diversidad genética en base al marcador molecular citocromo b entre ejemplares asignados como *Myotis levis* y *Myotis dinellii*, en dos regiones de simpatría: Reserva "El Destino" (Partido de Magdalena, Buenos Aires) y "Quinta Arco Iris" (Departamento Islas del Ibicuy, Entre Ríos), para poder corroborar la hipótesis de que son especies plenas.

El trabajo realizado nos brinda un panorama de la variabilidad presente en las secuencias nucleotídicas del marcador molecular citocromo b, en las especies *Myotis levis* y *Myotis dinellii*.

Las 16 secuencias analizadas de los individuos de *M. levi*s y *M. dinellii* en las dos poblaciones estudiadas (Partido de Magdalena y Departamento Islas del Ibicuy) se agruparon en 3 haplotípos (Hpl1, Hpl2, Hpl3), presentando un

reducido grado de polimorfismo y baja diferenciación entre ellas, como así también en comparación con la secuencia de Myotis levis de referencia (GenBank). Estudios previos determinaron que se requiere un valor mayor o igual a 5% para el valor de número medio de diferencias nucleotídicas (k) para determinar la divergencia interespecífica, a partir del marcador molecular citocromo b (Larsen et al., 2012). Para la muestra analizada en el presente estudio se obtuvo un valor menor (k=0,574), sugiriendo la identidad genética de las especies. En contraposición, cuando se las comparó con Myotis riparius, se obtuvo un número medio de divergencias nucleotídicas mayor a 5% (k=8,307), verificando así la divergencia filogenética (esperada) con el grupo externo.

A su vez, se obtuvo un haplotípo (Hpl 2) representado por la mayoría de los individuos estudiados (n=13), pertenecientes tanto a las dos especies, como a las dos poblaciones en estudio.

En el estudio de los árboles filogenéticos, tanto *neighbor joining* (NJ) como máxima verosimilitud (MV), contemplaron dos grupos bien definidos, de los cuales uno contiene a *M. riparius* y el otro engloba a las restantes 17 secuencias. Este análisis ratifica los resultados obtenidos a partir de las relaciones haplotípicas (recuperadas a partir de parsimonia), ya que no identifica diferencias significativas entre las 16 muestras en estudio (más la secuencia de *M. levis* de referencia), colocándolas en un clado único. Esto también confirma la baja diferenciación entre los individuos muestreados como *M. levis* y *M. dinellii* en las dos poblaciones analizadas.

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Barquez (2006) y Miranda (2013), desde un análisis morfológico, los mismos son discordantes ya que las diferencias marcadas por estos autores no fueron detectadas en el análisis realizado. Por el contrario, nuestros resultados muestran una baja diferenciación entre los ejemplares asignados a *Myotis levis* y *Myotis dinellii*. Posiblemente un análisis genético más exhaustivo (por ejemplo utilizando el gen citocromo b completo), puede echar luz sobre las divergencias que sostienen este aspecto sistemático.

CONCLUSIONES

7 Conclusiones

En el presente trabajo no se observan las divergencias genéticas esperadas para los individuos asignados en base a caracteres morfológicos como *Myotis levis* y *Myotis dinellii* en dos regiones de simpatría.

En los resultados obtenidos se observó una baja diferenciación en los 645 pb del gen citocromo b en las secuencias bajo estudio, como así también un número bajo de haplotípos compartidos entre los individuos previamente identificados como *Myotis levis* y *Myotis dinellii*.

De esta forma las evidencias moleculares no apoyan la hipótesis planteada a partir de datos morfológicos, en la cual *Myotis levis* y *Myotis dinellii* serían especies plenas.

Asimismo se requieren estudios futuros para avanzar en la diferenciación de estas especies, en donde una vía posible es el análisis de la secuencia completa del gen de citocromo b (1440 pb), como así también el estudio de secuencias de ADN en individuos de *M. levis* y M. dinellii pertenecientes a otras regiones de simpatría o alopatría.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

Abrámoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11(7):36-42.

Amasino CF, Gury Dohmen F, De Gaetano J, Mena Segura C, Palazzolo A. 2003. Rabia debida a virus de murciélago en un gato de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz 22 (3), 1021-1027

Bandelt HJ, Foster P, Rohl A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48.

Barquez, RM. 2006. Orden Chiroptera, p. 56-86. En: Barquez RM, Diaz MM, Ojeda RA. Mamíferos de Argentina: Sistemática y Distribución. Sociedad Argentina para el estudio de Mamíferos. 1-359.

Barquez RB, Giannini NP, Mares MA. 1993. Bats of Argentina. Guía de los murciélagos de Argentina. Oklahoma museum of natural history university of Oklahoma. 1-119.

Barquez RM, Mares MA, Braun JK. 1999. The bats of Argentina. Special Publications. Museum of Texas Tech University 42: 1-275.

Barquez RB, Díaz MM. 2009. Los murciélagos de Argentina. Clave de identificación. Publicación especial número 1. PCMA 1-84.

Castro JI. 2012. Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos. Universidad de Barcelona. Facultad de biología. Departamento de genética. 1-178.

Coates-Estrada R, Estrada A. 1986. Manual de identificación de campo de los mamíferos de la Estación de Biología "Los Tuxtlas". Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Instituto de Biología, UNAM, biologia de la conservación, interacciones planta-animal, 1-151.

Díaz MM, Barquez RB. 2002. Los mamíferos de Jujuy, Argentina. Editorial L.O.L.A, Argentina. 1-326.

Díaz MM, Aguirre LF, Barquez RB. 2011. Clave de Identificación de los murciélagos del cono sur de Sudamérica. Centro de estudios en Biología Teórica y Aplicada. Cochabamba, Bolivia. 1-94.

Dos Reis NR, Peracchi AL, Dos Santos GASD. 2008. Ecología de morcegos. Technical books editora.1-148.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.

Fernández, MT. 1997. Los Murciélagos Ecología e Historia Natural. Programa Regional en Manejo de Vida Silvestre. Boletín informativo 4 (1): 1.10.

González EM, Martínez Lanfranco JA. 2010. Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Banda Oriental, MNHN y Vida Silvestre Uruguay. 1-464

Harvey MJ, Altenbach JS, Best TL. 1999. Bats of the Western United States. Arkansas Game and Fish Commission, Little Rock.

Hatefi Y. 1985. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorilation System. *Annual Review of Biochemistry*. (54):1015-69.

Larsen RJ, Knapp MC, Genoways HH, Khan FAA, Larsen PA, Wilson DE, Baker RJ. 2012 Genetic Diversity of Neotropical Myotis (Chiroptera: Vespertilionidae) with an Emphasis on South American Species. PLoS ONE 7(10):1-9.

Larsen RJ, Larsen PA, Genoways HH, Catzeflis FM, Geluso K, *et al.* 2012. Evolutionary history of Caribbean species of *Myotis*, whit evidence of a third Lasser Antillean endemic. Mamm Biol (77): 124-134.

Laval, RK. 1973. A revision of the Neotropical bats of the genus *Myotis*. Natural History Museum Los Angeles County (15): 1-54.

Laval RK, Rodríguez B. 2002. Murciélagos de Costa Rica BATS. Editorial INBio (Instituto Nacional de Biodiversidad).1-320.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. (25):1451-1452.

Lutz MA. 2014. Relación de los ensambles de murciélagos (MAMMALIA-CHIROPTERA) y el uso de la tierra en el noreste de la region pampeana de Argentina. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturals y Museo. 1-207.

Manjarrez Hernández HA, Parra SG, Vega Franco L. 2003. Virus Ebola haemorrhagic fever. All you must know. *Revista mexicana de pediatría.* 70 (6):299-302.

Marinkelle CJ, Goose ES. 1972. A review of bats as carriers of organism which are capable of infecting mano r domestic animals. *Mitl. Inst. Colombo-Aleman Invest Cient.* (6), 31-51.

Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*. 8(1): 43.

Miranda JMD, Bernadi IP, Sponchiado J, Passos FC. 2013. The taxonomic status of *Myotis levis and Myotis levis dinellii* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae). ZOOLOGIA 30 (5): 513–518

Neuweiler G. 2000. The Biology of Bats. Translated by Ellen Covey. Oxford University Press. 1-320.

Núñez Domingo C. 2011. Análisis de ADN mitocondrial y de polimorfismos genéticos de los cromosomas autosómicos y sexuales de la población mestiza de Nicaragua. Universidad de Zaragoza. Departamento de anatomía patológica, medicina legal y forense y toxicológica. 1-210.

Sambrook J, Russel DW. 2001. Rapid isolation of yeast DNA. En Sambrook J., Russel D. W. (Eds). *Molecular cloning, a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 631-632.

Simmons, NB. 2005. Order Chiroptera, p. 312-529. In: D.E. Wilson & D.M. Reeder (Eds). Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Baltimore, Johns Hopkins University Press. (1): 1-2142.

Soria MC. 2008. Murciélago zorro volador filipino (*Acerodon jubatus*). Versión electrónica. IUCN (International Union for Conservation of Nature).

Stadelmann B, Herrera LG, Arroyo-Cabrales J, Flores-Martinez JJ, May BP, Ruedi M. 2004. Molecular systematics of the fishing bat Myotis (pizonix) vivesi. Journal of Mammalogy, 85(1):133–139.

Strahan, R. 1983. The Australian Museum Complete Book of Australian Mammals. The National Photographic Index of Australian Wildlife. Angus & Robertson: Sydney xx 1-530.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12):2725-2729.

Vaughan TA, Ryan JM, Czaplewski NJ. 2011. *Mammalogy*. 5th ed. Journal of Mammalogy, 92(2):478–479.

RESUMEN

9 Resumen

Los murciélagos pertenecen al orden Chiroptera y es considerado uno de los mamíferos más diverso y abundante del mundo. En las últimas décadas se ha comenzado a reconocer su importancia para los ecosistemas y el hombre. El género Myotis, correspondiente a la familia Vespertilionidae, presenta cerca de 42 especies distribuidas en todo el mundo, siendo 10 las que habitan en Argentina. Cinco especies del género son politípicas y, entre ellas se destaca *Myotis levis*, que se distribuye en el sureste de Brasil, Uruguay y Argentina. Originalmente se propuso la designación de M. levis dinellii como una subespecie de *M. levi*s debido a su distribución alopátrica. Posteriormente, M. dinellii y M. levis se consideraron especies plenas en base a características morfológicas y, más recientemente, se han descripto zonas de simpatría como el norte de la provincia de Buenos Aires y el sur de Entre Ríos. El objetivo del presente trabajo es evaluar posibles diferencias a nivel molecular, en individuos asignados en base a características morfológicas, a las dos especies de Myotis (M. levis y M. dinellii) en dos áreas de simpatría, para constatar la hipótesis de que M. levis y M. dinellii son especies plenas. Para ello, se analizaron 16 muestras de tejido obtenidas a partir de individuos provenientes de las siguientes poblaciones: Reserva "El Destino" (Partido de Magdalena, Buenos Aires) y "Quinta Arco Iris" (Departamento Islas del Ibicuy, Entre Ríos), para los que fue secuenciado una región de 649 pares de bases (pb) del gen mitocondrial del Citocromo b. Para la inferencia filogenética se utilizaron secuencias tomadas del GenBank de M. levis, como así también de Myotis riparius (especie que se encuentra en alopatría y simpatría a las especies de interés). Para el set de secuencias obtenidas se observaron 4 sitios variables

(polimórficos), y 5 haplotípos. En el caso de la reconstrucción filogenética se produjeron dos grupos, uno está representado por todos los individuos previamente identificados como *M. levis* y *M. dinellii*, mientras que el otro está formado por *M. riparius*. De esta forma las evidencias moleculares no apoyan la hipótesis planteada a partir de datos morfológicos, en la cual *Myotis levis* y *Myotis dinellii* serían especies plenas.