

CARACTERIZACIÓN Y EVOLUCIÓN DE MICROSATÉLITES EN MURCIÉLAGOS (ORDEN: CHIROPTERA)

Jorge Ortega y Jesús E. Maldonado

Molecular Genetics Program/National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, 3001 Connecticut Ave., 20008 Washington DC, USA. artibeus2@aol.com

Resumen

En este trabajo se analizaron los datos de 113 microsatélites publicados hasta la fecha para 12 especies de murciélagos. Usamos estos datos para caracterizar su estructura con base en el tamaño del microsatélite, diversidad de los alelos, rango de alelos, heterocigosidad y finalmente la proporción de nucleótidos en la secuencia. Los datos muestran que los murciélagos son un grupo que va de mediana a altamente diversidad en microsatélites comparado con otros mamíferos. Estos datos coinciden con los publicados para especies con grandes densidades poblacionales. La evolución de los microsatélites concuerda con el modelo de mutación stepwise, en el sentido de que los microsatélites de mayor tamaño presentan el mayor número de alelos. Además se encontró que los microsatélites tienden a ser más polimórficos y de mayor tamaño en la especie en donde se desarrollaron que en los clados hermanos.

Palabras clave: amplificación, evolución, microsatélites, modelo stepwise, murciélagos, tendencia de ascertividad.

Abstract

We analyze 113 microsatellite data published for 12 bat species. We used this data to address the structure of the microsatellites based in six components: microsatellite length, allele dispersion, allele diversity, allele range, heterozygosity and number of bases per sequence. Our results showed that bats ranged between medium to high microsatellite diversity, compare with another mammals. These results are accord with the data presented in animals with large populations. Also, the group showed a mutational tendency according with the stepwise model, where larger microsatellites present a major number of alleles. Microsatellite evolution showed a decreasing tendency of

amplification and polymorphism from focal species toward the sister clades.

Key words: amplification, ascertainment bias, bats, evolution, microsatellite, stepwise model.

Introducción

Los microsatélites forman un componente importante y están ampliamente distribuidos en el genoma de los vertebrados. Estas repeticiones de secuencia simple están presentes tanto en la región codificadora como en la no codificadora y normalmente se caracterizan por su alto grado de polimorfismo. El origen de su polimorfismo no está aún clarificado, pero al parecer se debe a eventos de recombinación durante la replicación del ADN (Zane *et al.*, 2002). Los microsatélites han sido ampliamente utilizados en muchos campos desde su descubrimiento en 1989 y presentan enormes ventajas sobre otros métodos genéticos convencionales ya que son abundantes, polimórficos y permiten documentar el genotipo de un individuo en un locus simple (Balloux y Lugon-Moulin, 2002). Se ha probado que pueden ser una importante herramienta para describir el genoma de muchos organismos, se han utilizado para establecer casos en el área forense y de estudios fósiles, así como de igual forma han sido utilizados en el campo de la genética de poblaciones y en la conservación y manejo de recursos biológicos (Frankham *et al.*, 2002).

El mecanismo que dirige la evolución de los microsatélites es incierto, pero se ha demostrado que la distribución del tamaño de los microsatélites puede ser comparada entre especies. Una explicación potencial de la evolución de los microsatélites es la diferencia en la frecuencia de haplotipos de dos especies relacionadas, debido a la deriva génica y procesos de migración después de que divergieron de

un ancestro común (Hedrick, 1999). Como resultado se predice que el número de alelos y el número de bases que componen un microsatélite son mayores en la especie donde fueron desarrollados que en las especies cercanamente relacionadas a ésta, conociéndose esta regla como “tendencia de ascetividad” (Crawford *et al.*, 1998).

El orden Chiroptera representa casi un cuarto del total de especies de mamíferos existentes en el mundo. A pesar de su enorme radiación dentro de los mamíferos, sus relaciones evolutivas han sido poco estudiadas y el uso de microsatélites en ellos se restringe a unos pocos trabajos (Simmons, 2000). Los trabajos que incluyen microsatélites para estudiar murciélagos han servido para contestar preguntas relacionadas con parentesco y paternidad (*Plecotus auritus*—Burland *et al.*, 2001; *Cynopterus sphinx*—Storz *et al.*, 2001b; *Saccopteryx bilineata*—Heckel y von Helversen, 2002; *Artibeus jamaicensis*—Ortega *et al.*, 2003), estructura social (*Myotis bechsteinii*—Kerth y König, 1999; *Myotis myotis*—Castella *et al.*, 2001; *Cynopterus sphinx*—Storz *et al.*, 2001a) y genética poblacional (*Plecotus auritus*—Burland *et al.*, 1999; *Rhinolopus ferrumequinum*—Rossiter *et al.*, 2000). Se analizaron en este trabajo las secuencias de microsatélites publicadas para murciélagos con la finalidad de establecer su caracterización y cuáles son sus implicaciones en el contexto evolutivo del grupo. Pretendemos establecer si la estructura de los microsatélites varía entre las diferentes especies de murciélagos, utilizando para ello diferentes características convencionales utilizadas para su descripción. De igual forma queremos asentar si los microsatélites de mayor tamaño presentan mayores tasas de mutación, lo cual tiene implicaciones evolutivas dentro del grupo de los murciélagos.

Materiales y métodos

Para describir los microsatélites se obtuvieron los datos de la literatura así como de trabajos sin publicar. Basamos nuestro estudio en estos datos y los complementamos con las secuencias de los microsatélites que fueron tomadas de su versión electrónica en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para algunas especies las secuencias en la red electrónica aún no estaban disponibles hasta el 2003, por lo que los microsatélites se analizaron parcialmente.

Los microsatélites fueron analizados utilizando criterios similares para todas las especies de murciélagos. El estudio se centró únicamente en secuencias de microsatélites con repeticiones di y trinucleótidos, además de incluir únicamente *loci* polimórficos. El polimorfismo de los microsatélites fue considerado como una variable dependiente del número de individuos muestreados en una o más poblaciones. Cuando se contó con varias poblaciones, el polimorfismo fue calculado por separado para cada población y después se tomó un promedio de todos los valores obtenidos. Las características con las que se detallaron a los microsatélites fueron tomadas de Neff y Gross (2001) y a continuación se describen:

El tamaño del microsatélite fue determinado a partir de la longitud del alelo clonado. El número de repeticiones para el alelo clonado fue calculado como el número de repeticiones de dinucleótidos no interrumpidos por más de dos bases, es decir se consideraron repeticiones perfectas e imperfectas, pero no las repeticiones compuestas e interrumpidas (Hancock, 1999). La elección de dos bases como máxima separación en las repeticiones imperfectas fue debido a que éstas pueden mostrar la dinámica en el cambio del tamaño del microsatélite de igual forma que las repeticiones perfectas (Hancock, 1999). Para los alelos, definidos como el fragmento de PCR contenido en un locus determinado, se consideraron tres medidas principales: i) Diversidad de alelos expresados en los diferentes individuos y definida como el número de repeticiones diferentes localizadas en el mismo locus (Reich y Goldstein, 1999). ii) El intervalo de los alelos, calculado como la diferencia en tamaño entre el alelo más grande y el más pequeño expresado en número de bases. El límite inferior fue definido con un mínimo de dos repeticiones, mientras que el límite superior fue variable para cada especie como resultado de procesos de selección o mutación que actúan en forma diferente para las poblaciones (Chakraborty y Kimmel, 1999). iii) Dispersión de alelos, definida como el número de bases que separan a los alelos adyacentes en cada locus y se calculó dividiendo el rango entre número de alelos menos uno.

La heterocigosidad fue definida como la proporción de individuos con cromosomas homólogos pero con diferentes alelos. En todos los casos se consideró la heterocigosidad

esperada, que es calculada como uno menos la suma de las frecuencias de los alelos al cuadrado.

Proporción de cada uno de los cuatro diferentes nucleótidos contenidos en la secuencia del primer y microsatélite.

Para cada una de estas variables dependientes, se usaron análisis de varianza (ANOVA) con diseños sin balance entre los datos utilizando la suma de cuadrados del tipo III, para determinar si existían diferencias significativas entre las especies de murciélagos en estas características de los microsatélites. Los análisis estadísticos fueron realizados usando SPSS para Windows (versión 10.0).

Para establecer la evolución de los microsatélites se realizó una prueba de mutación dirigida, es decir se correlacionó el número de alelos con el tamaño del microsatélite. Esta medida está basada en función de que los microsatélites no presentan una tasa de ganancia/pérdida de nucleótidos del tipo simétrico por igual, sino que los microsatélites de mayor tamaño presentan un exceso de adiciones o mutaciones (Amos, 1999). Por otro lado, cuando los datos lo permitieron, se reportó la tendencia de ascertividad de los microsatélites o la amplificación cruzada de los microsatélites en especies hermanas, basándonos en el supuesto de que los microsatélites seleccionados evolucionan de una especie focal y disminuirán en tamaño y número de acuerdo con la sistemática del grupo (Ellegren *et al.*, 1995).

Resultados

Los datos corresponden a las siguientes 12 especies de murciélagos: *Cynopterus sphinx* (Storz, 2000), *Saccopteryx bilineata* (Heckel *et al.*, 2000), *Hipposideros turpis* (Echenique-Díaz *et al.*, 2002), *Rhinolopus ferrumequinum* (Rossiter *et al.*, 1999), *Artibeus jamaicensis* (Ortega *et al.*, 2002), *Tonatia silvicola* (Dechmann *et al.*, 2002), *Thyroptera tricolor* (Vonhof *et al.*, 2001), *Miniopterus schreibersii* (Miller-Butterworth *et al.*, 2002), *Nyctalus noctula* (Mayer *et al.*, 2000), *Eptesicus fuscus* (Veigel y McCracken, 2001; Vonhof *et al.*, 2002), *Myotis myotis* (Castella y Ruedi, 2000) y *Plecotus auritus* (Burland *et al.*, 1998).

De estas especies se han descrito hasta la fecha un total de 113 microsatélites, presentando un intervalo de 5 a 14 microsatélites por especie (Figura 1).

Las especies con microsatélites descritos corresponden

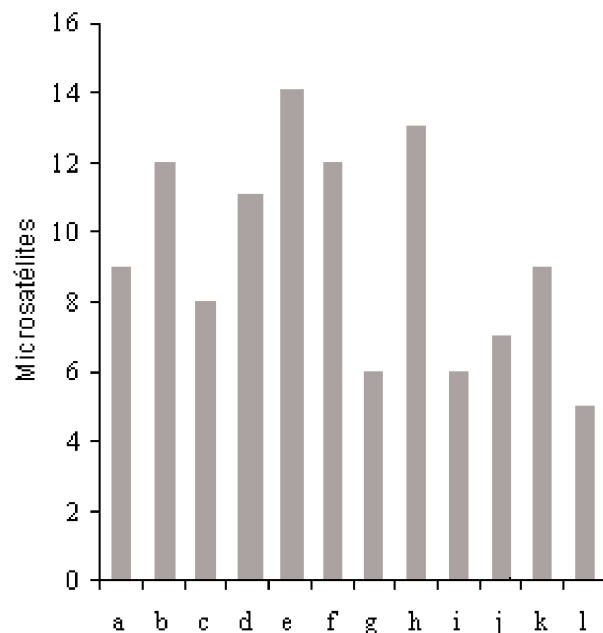


Figura 1. Rango del número de microsatélites desarrollados para las doce especies de murciélagos: *Cynopterus sphinx* (a), *Saccopteryx bilineata* (b), *Rhinolopus ferrumequinum* (c), *Thyroptera tricolor* (d), *Artibeus jamaicensis* (e), *Nyctalus noctula* (f), *Plecotus auritus* (g), *Myotis myotis* (h), *Hipposideros turpis* (i), *Tonatia silvicola* (j), *Eptesicus fuscus* (k), *Miniopterus schreibersii* (l).

únicamente al 1.3% del total de las especies de murciélagos en el mundo. Los microsatélites se encuentran distribuidos de la siguiente manera entre las diferentes familias de murciélagos, expresado como número de especies con microsatélites descritos/número total de especies en la familia (Jones *et al.*, 2002): Pteropodidae (1/158), Emballonuridae (1/47), Rhinolopidae (1/63), Hipposideridae (1/66), Thyropteridae (1/2), Phyllostomidae (2/145) y Vespertilionidae (5/314).

El 95% de los microsatélites fueron dinucleótidos con repetición de bases adenina (A) y citosina (C) y el 5% restante fueron trinucleótidos con diferentes combinaciones de repeticiones de guanina (G), tiamina (T) y C. Para este estudio únicamente se consideraron los microsatélites dinucleótidos. La media y el error estándar de las medidas consideradas se resumen en el Cuadro 1.

Se encontró que lo más relevante para cada medida fue que i) el polimorfismo mostrado por las especies de murciélagos fue relativamente alto (11.1 3.7) comparado con otras especies de vertebrados. El menor rango de ale-

Cuadro I

Características de los microsatélites desarrollados para murciélagos. Los datos pueden ser para una o varias poblaciones y se muestran con su promedio más el error estándar en paréntesis. En el caso de las bases nitrogenadas se expresa el porcentaje.

Especie	Tamaño	Alelos	Rango	Dispersión de los alelos	Heterocigosidad	Adenina	Citosina	Guanina	Timina
<i>Cynopterus sphinx</i>	13.0 ± 4.4	10.0 ± 4.2	38.0 ± 25.5	3.9 ± 1.5	0.6 ± 0.15	154.2 ± 29.1	111.3 ± 21.1	100.2 ± 25.8	150.2 ± 20.4
<i>Saccopteryx bilineata</i>	19.8 ± 3.7	12.4 ± 3.3	-	-	0.8 ± 0.09	39.9 ± 13.4	30.5 ± 13.0	33.6 ± 12.1	37.7 ± 10.2
<i>Hipposideros turpis</i>	21.6 ± 8.4	5.0 ± 2.0	10.3 ± 9.0	2.9 ± 2.2	0.5 ± 0.17	131.1 ± 52.3	106.8 ± 63.5	81.3 ± 36.0	127.5 ± 68.6
<i>Rhinolopus</i>									
<i>ferrumequinum</i>	20.6 ± 3.9	9.2 ± 4.4	23.0 ± 17.2	2.1 ± 0.4	0.6 ± 0.14	57.5 ± 17.0	62.7 ± 18.1	60.8 ± 18.6	69.6 ± 34.5
<i>Artibeus jamaicensis</i>	19.7 ± 8.0	8.1 ± 2.4	25.4 ± 9.4	3.5 ± 0.3	0.8 ± 0.08	49.7 ± 14.5	49.0 ± 19.3	35.7 ± 15.2	43.7 ± 20.0
<i>Tonatia silvicola</i>	22.1 ± 7.8	8.2 ± 1.3	19.7 ± 4.3	3.0 ± 1.5	0.6 ± 0.18	62.7 ± 31.9	48 ± 20.8	47.1 ± 13.6	61.0 ± 15.4
<i>Thyroptera tricolor</i>	14.9 ± 3.9	10.4 ± 5.2	22.5 ± 15.1	2.2 ± 0.5	0.7 ± 0.16	59.7 ± 12.7	32.3 ± 12.2	52.5 ± 16.5	72.3 ± 16.6
<i>Nyctalus noctula</i>	21.6 ± 8.0	12.2 ± 3.3	-	-	0.8 ± 0.05	110.4 ± 46.1	58.3 ± 29.8	61.6 ± 26.8	118.3 ± 56.1
<i>Eptesicus fuscus</i>	23.3 ± 7.8	15.8 ± 4.5	36.8 ± 12.9	2.4 ± 0.3	0.8 ± 0.02	43.1 ± 20.7	38.2 ± 26.3	59.7 ± 18.2	68.4 ± 17.4
<i>Miniopterus schreibersii</i>	20 ± 4.0	18.2 ± 1.3	37.2 ± 7.0	2.14 ± 1.2	0.8 ± 0.01	-	-	-	-
<i>Myotis myotis</i>	21.2 ± 6.6	10.5 ± 4.2	-	-	0.8 ± 0.23	143.5 ± 44.6	121.6 ± 33.3	120.7 ± 45.1	127.6 ± 44.9
<i>Plecotus auritus</i>	23.1 ± 8.8	14.1 ± 6.2	33.6 ± 15.5	2.6 ± 0.6	0.7 ± 0.19	80.3 ± 40.1	68.1 ± 37.3	68.6 ± 31.0	90.8 ± 43.6

los obtenido fue de 5 (*H. turpis*) y el mayor de 18 (*M. schreibersii*), siendo este último el de mayor posibilidad de recombinación y plasticidad. El tamaño de los microsatélites varió desde 14 bases como mínimo hasta 23 como máximo (20.07 5.2). Las especies de vespertiliónidos obtuvieron los valores más altos, mientras que *T. tricolor* mostró los más bajos;

ii) La diferencia entre el microsatélite de mayor y menor tamaño varió de 19 hasta 38 pares de bases. En *M. myotis* se encontró el microsatélite del límite inferior (7 bases), pero el valor de la medida no fue el menor debido a que esta especie presenta microsatélites de gran tamaño para compensar este efecto. El valor más bajo fue para *T. silvicola* debido a la uniformidad en tamaños entre los diferentes microsatélites, además de tener muy pocas secuencias descritas;

iii) la dispersión de los alelos fue relativamente alta y poco variable entre las diferentes especies de murciélagos (ANOVA: $r^2 = 0.10$, $F = 2.34$, $P = 0.19$). La dispersión fue más alta en los megaquirópteros que en los microquirópteros con excepción de *A. jamaicensis* que presenta un valor similar al de *C. sphinx*.

Todas las especies de murciélagos mostraron valores medios-altos de heterocigosidad con respecto al valor

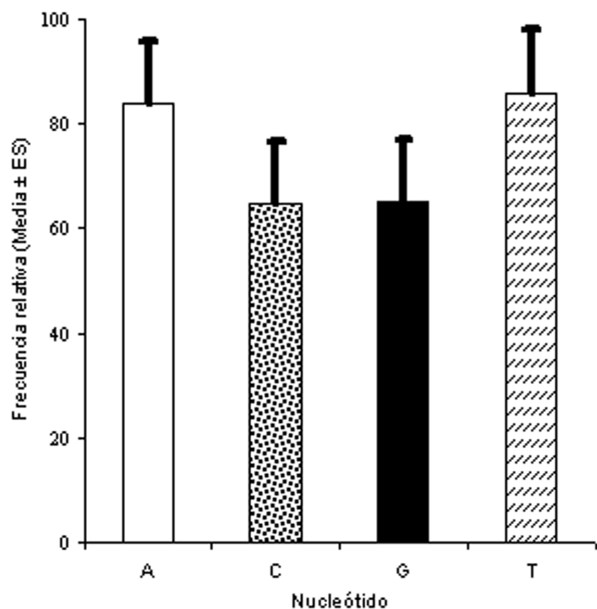


Figura 2. Distribución de los cuatro nucleótidos presentes en las secuencias de los microsatélites (a= adenosina, c= citosina, g= guanina y t= timina).

publicado para otras especies de vertebrados. Esta medida tuvo un rango de 0.5 hasta 0.8 (0.64 - 0.11).

A pesar de que las bibliotecas genómicas se encuentran enriquecidas con secuencias AC, la proporción de las cuatro bases de nucleótidos fue uniforme en los microsatélites para todas las especies de murciélagos (ANOVA: $r^2 = 0.07$, $F = 7.79$, $P > 0.05$, Figura 2). Cabe mencionar que esta uniformidad en el número de bases se puede deber a la inclusión de los primers que no son secuencias específicas, además de que muchos de los microsatélites son imperfectos y presentan bases ajenas al motivo AC.

Con respecto a la evolución de los microsatélites podemos decir que existe una fuerte mutación dirigida por parte de los microsatélites encontrados en murciélagos. Los datos muestran que los microsatélites con un mayor número de bases tienden a tener un mayor número de adiciones por lo que se correlacionaron positivamente con el número de alelos (Correlación múltiple: $r^2 = 0.40$, $gl = 106$, $P < 0.01$, Figura 3).

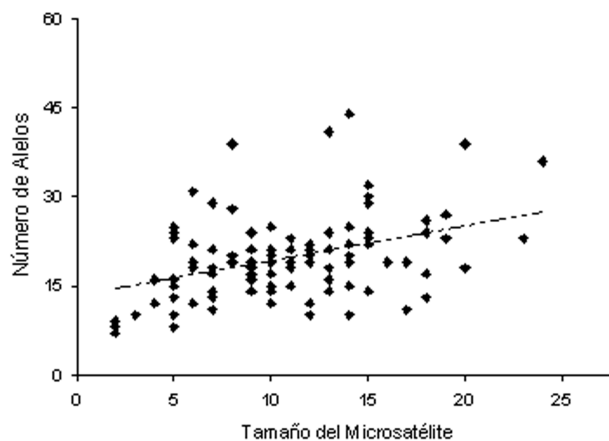


Figura 3. Correlación positiva entre el tamaño de los microsatélites de los murciélagos y el número de alelos presentes en cada uno de ellos.

La tendencia de ascetividad únicamente fue probada para ocho especies de murciélagos. Los datos en general muestran una tendencia en la disminución en el polimorfismo y número de alelos conforme se aleja del clado en donde se describieron los microsatélites. Para *C. sphinx* el 55% de los microsatélites amplificaron para *C. brachyotis* pero no fueron probados en las otras tres especies de

Cynopterus o en el clado hermano (*Dyacopterus spadiceus*). Los microsatélites de *S. bilineata* amplificaron casi en su totalidad para la especie hermana *S. leptura*. Sin embargo, amplificaron solamente en un 25% para *Centronycteris maximiliani* y para *Balantiopteryx plicata* que son los clados hermanos y en un 50% para *Rhynchonycteris naso* que está en un clado más alejado. Los microsatélites de *T. tricolor* amplificaron en casi 100% para *T. lavalii*, que es la única especie hermana, además de que fueron poco efectivos (< 20%) para los clados hermanos de las familias Furipteridae y Natalidae, y nulos para la familia Vespertilionidae. Los microsatélites de *A. jamaicensis* amplificaron en un 100% para las especies hermanas *A. lituratus*, *A. obscurus* y *A. planirostris*, en un 72% para los géneros hermanos *Koopmania* y *Dermanura*, entre un 57 y un 64% para las subfamilias hermanas Carollinae, Stenodermatinae y Glossophaginae, y en un 25% para la familia hermana Mormoopidae. Los microsatélites de *M. schreibersii* fueron probados con un 100% de efectividad en la especie hermana *M. fraterculus* y con un resultado del 40% para el clado hermano *Chaerophon* sp. Los microsatélites de *N. noctula* amplificaron en un 72% para la especie hermana *N. leisleri*, en un 63% para varias especies de *Pipistrellus*, *Eptesicus*, *Plecotus*, y fueron poco efectivos en dos especies de *Myotis*. Los microsatélites de *P. auritus* funcionaron en un 100% en *P. austriacus* y *Corynorhinus townsendi*, entre un 33 y 66% para varias especies de los clados hermanos de *Myotis* y *Pipistrellus*. Finalmente, los microsatélites desarrollados para *E. fuscus* muestran el siguiente gradiente diminutivo de amplificación para los siguientes géneros: *Antrozous pallidus* (88%), *C. townsendi* (88%), *Pipistrellus subflavus* (66%), *Lasionycteris notivagans* (55%), *Lasiurus* (2 especies, 44%) y *Myotis* (5 especies, 33%).

Discusión

Se analizaron 113 microsatélites correspondientes a 12 especies de murciélagos. Desde el descubrimiento de los microsatélites en 1989 hasta la fecha, son pocos los trabajos que se han desarrollado para murciélagos, comparados con otros grupos de mamíferos (e. g. felinos, cánidos, proboscideos, etc.) en donde por ser más carismáticos se han desarrollado una gran cantidad de microsatélites. La fami-

lia Vespertilionidae, que es una de las más diversas, contó con el mayor número de microsatélites descritos, pero algunas otras están pobremente representadas o no se ha descrito ningún microsatélite hasta la fecha (e. g. Molossidae, Mormoopidae, Noctilionidae, etc.). En este trabajo solamente se describieron las secuencias con un solo motivo (AC) que es el más común en vertebrados (Neff y Gross, 2001), pero es posible que microsatélites con diferentes motivos y tamaños sean desarrollados en un futuro para el grupo, lo cual complementaría la información existente.

Se encontró que los microsatélites son variables en estructura dentro de las diferentes especies de murciélagos y esto puede ser explicado por las diferentes historias de vida y procesos demográficos y ecológicos que son particulares para cada especie (Neff y Gross, 2001). Sin embargo, el rango de variación en estructura encontrado entre las diferentes especies de murciélagos no fue tan grande como cuando se comparan valores entre grupos más distantes como peces y mamíferos, o aves y anfibios (Neff y Gross, 2001). Como grupo se puede considerar que los microsatélites de los murciélagos presentaron valores medianos y altos comparados con otros mamíferos. Especies con altas densidades poblacionales presentan mayores valores en la estructura de los microsatélites que especies con bajas poblaciones. Se ha visto que especies que se encuentran en peligro de extinción como el elefante africano (*Loxodonta africana*—Nyakaana y Arctander, 1998), lobos europeos (*Canis lupus*—Flagstad *et al.*, 2003), mustela de patas negras (*Mustela nigripes*—Wisely *et al.*, 2002), leopardo oriental (Uphyrkina *et al.*, 2002), entre otros, presentan una baja variabilidad en microsatélites y bajos valores en sus características en general. Para las especies en donde se ha seguido el mismo tratamiento dado para los murciélagos en este trabajo, se ha encontrado que son especies en peligro de extinción presentan valores bajos (Neff y Gross, 2001). Eventos como cuellos de botella, pérdida de hábitat, deriva génica, caza excesiva, enfermedades con alta mortalidad en la población, bajas tasas reproductivas o poca movilidad de los individuos, provocan disminución en la variabilidad genética en general para la especie. Por otro lado, especies que presentan poblaciones grandes muestran elevados valores en las características de los micros-

télites (e. g. *Felis catus*—Menotti-Raymond y O'Brien, 1995; *Homo sapiens*—Beck *et al.*, 1996). Las especies de murciélagos en los que se han descrito los microsatélites no se encuentran en ninguna lista de categorías de riesgo, lo cual concuerda con nuestros altos valores correspondientes a poblaciones relativamente abundantes y sin algún problema relacionado con pérdida en la variabilidad genética.

En este trabajo se encontró que el tamaño del microsatélite es un factor importante en la tasa de mutación. En diferentes especies se ha demostrado que la tasa de mutación está relacionada con el tamaño de la secuencia (Pimmer *et al.*, 1998). Nuestro estudio apoya la idea de que entre más grande sea el microsatélite mayores serán las diferencias en el número de alelos expresados por locus, lo que trae como consecuencia un alto polimorfismo. Nosotros encontramos una correlación significativa entre el tamaño del microsatélite y el número de alelos encontrados, los cuales son consistentes con el modelo de mutación stepwise (Shriver *et al.*, 1993). Todos los murciélagos mostraron una diferencia de dos pares de bases entre un alelo, lo cual indica que solamente se añade un par de bases a la vez en cada paso concordando con el modelo de mutación arriba mencionado. La dispersión de los alelos se mostró particularmente alta en la única especie de megaquiróptero en donde se han desarrollado microsatélites (*C. sphinx*); sin embargo, sería conveniente probar si se conserva esta tendencia en otras especies del suborden o es un simple artefacto de la densidad poblacional. Para algunas especies que son particularmente abundantes como *Myotis myotis* no se encontraron valores tan altos, por lo que es posible que sea una característica particular para el suborden Megaquiróptera.

La evolución de los microsatélites en murciélagos apoya la hipótesis de la tendencia de ascertividad. La teoría predice que si existe una tendencia de ascertividad en los microsatélites, entonces el tamaño de los microsatélites en el clon (especie focal) debe ser más grande que en los clados hermanos (Schlötterer, 2000). En las especies en donde fue posible comparar la teoría, se vio que efectivamente los microsatélites fueron más grandes y polimórficos en las especies focales que en los clados hermanos. También se encontró que la amplificación de los microsaté-

lites disminuía conforme se alejaba del clado en donde fueron descritos. Es importante resaltar que es posible desarrollar microsatélites en especies abundantes y ser probados en especies hermanas que no son tan comunes o fáciles de capturar. Uphyrkina y colaboradores (2002) probaron la efectividad de microsatélites desarrollados en gatos domésticos, aplicándolos a especies en peligro de extinción como el leopardo oriental, el puma de Florida o chitas. En el caso particular de *A. jamaicensis*, nosotros probamos la efectividad de los microsatélites en especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo como *Leptonycteris nivalis*, o bien en especies en las que la taxonomía no está claramente definida como *A. obscurus*.

El uso de herramientas genéticas como los microsatélites tiene un gran impacto debido a su habilidad de resolver muchas preguntas relacionadas con genética de la conservación y evolución (Hedrick, 1999). En este trabajo describimos los microsatélites desarrollados para los murciélagos hasta la fecha y discutimos sobre sus posibles implicaciones evolutivas. Consideramos que esta herramienta científica ha sido utilizada en contadas ocasiones para un grupo tan grande como el de los murciélagos y que tiene un gran potencial para contestar preguntas relacionadas con los campos de la conducta, dinámica poblacional, conservación y taxonomía.

Agradecimientos

Apoyo financiero fue provisto por Abbott Foundation (SNZP). El primer autor recibió apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el proyecto número 33606-V. Agradecemos a M. Vonhof, D. K. N. Dechmann, y L. Echenique-Díaz por compartir sus datos aun antes de publicarlos. El Museum of Texas Tech University a través de R. Monk y R. Owen proveyeron de tejidos para probar la amplificación en algunas especies de murciélagos. Asimismo agradecemos al National Museum of Natural History por permitirnos tomar muestras de tejido de su colección, en especial a D. Wilson, J. Jacobs y S. Peurach.

Literatura citada

- Amos, W. 1999. A comparative approach to the study of microsatellite evolution. 66-79 pp. *In* Microsatellites: Evolution and applications. Goldstein, D. B., & C. Schlötterer (Edits). Oxford University Press UK.
- Balloux, F., & N. Lugin-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155-165.
- Beck, S., F. Badbanchi, M. Otto, N. Grzeschik, J. Kunz, N. Speich, M. Gessler, & K. H. Grzeschik. 1997. Six new polymorphic microsatellite markers used for the integration of genetic and physical maps of human chromosome 7. *Human Genetics* 97:842-844.
- Burland, T. M., E. M. Barratt, & P. A. Racey. 1998. Isolation and characterization of microsatellite *loci* in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*, and cross-species amplification within the family Vespertilionidae. *Molecular Ecology* 7:136-138.
- Burland T. M., E. M. Barrat, M. A. Beaumont, & P. A. Racey. 1999. Population genetic structure and gene flow in a gleaning bat, *Plecotus auritus*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 266:975-980.
- Burland, T. M., E. M. Barrat, R. A. Nichols, & P. A. Racey. 2001. Mating patterns, relatedness and the basis of natal philopatry in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*. *Molecular Ecology* 10:1309-1321.
- Castella, V., & M. Ruedi. 2000. Characterization of highly variable microsatellite *loci* in the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Molecular Ecology* 9:1000-1002.
- Castella, V., M. Ruedi, & L. Excoffier. 2001. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology* 14:708-720.
- Chakraborty, R., & M. Kimmel. Statistics of microsatellite *loci*: estimation of mutation rate and pattern of population expansion. 139-150 pp. *In* Microsatellites: Evolution and applications Goldstein, D. B., & C. Schlötterer (Edits). Oxford University Press, UK.
- Crawford, A. M., S. M. Kappes, K. A. Paterson, M. J. deGotari, K. G. Dodds, B. A. Freking, R. T. Stone, & C. W. Beattie. 1998. Microsatellite evolution: testing the ascertainment bias hypothesis. *Journal of Molecular Evolution* 46:256-260.
- Dechmann, D. K. N., E. Garbely, G. Kerth, & T. W. J. Garner. 2002. Highly polymorphic microsatellites for the study of the round-eared bat, *Tonatia silvicola* (d'Orbigny). *Conservation Genetics* 3:455-458.
- Echenique-Díaz, L., J. Yokoyama, M. Kawata, S. Abe, & Y. Ishibashi. 2002. Isolation and characterization of microsatellite *loci* in the Bang's leaf-nosed bat *Hipposideros turpis*. *Molecular Ecology Notes* 2:396-397.
- Ellegren, H., Primmer, C. R., & B. C. Sheldon. 1995. Microsatellite evolution: directionality or bias in locus selection. *Nature Genetics* 11:360-362.
- Flagstad, Ø., C. W. Walker, C. Vilà, A. K. Sundqvist, B. Fernholm, A. K. Hufhammer, Ø. Wiig, I. Koyola & H. Ellegren. 2003. Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular ecology*, 12:869-880.
- Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, UK.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. 1-9 pp. *In* Microsatellites: Evolution and applications. Goldstein, D. B., & C. Schlötterer (Edits). Oxford University Press, UK.
- Heckel, G., R. Achmann, & F. Mayer. 2000. Highly polymorphic microsatellite markers in the white-lined bat (*Saccopteryx bilineata*). *Molecular Ecology* 9:242-244.
- Heckel, G. R., & O. von Helversen. 2002. Male tactics and reproductive success in the harem polygynous bat *Saccopteryx bilineata*. *Behavioral Ecology* 6:750-756.
- Hedrick, P. W. 1999. Perspective: highly variable *loci* and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53:313-318.
- Jones, K. E., A. Purvis, A. MacLarnon, O. R. P. Bininda-Emonds, & N. B. Simmons. 2002. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biological review* 77:223-259.
- Kerth, G., & B. König. 1999. Fission, fusion and nonrandom associations in female Bechstein's bats (*Myotis bechsteini*). *Behaviour* 136:1187-1202.
- Mayer, F., C. Schlötterer, & D. Tautz. 2000. Polymorphic microsatellite *loci* in the vespertilionid bats isolate from the noctule bat *Nyctalus noctula*. *Molecular Ecology* 9:2208-2212.
- Menotti-Raymond, M. A., & S. J. O'Brien. 1995. Evolutionary conservation of ten microsatellite *loci* in four species of felidae. *Journal of Heredity* 86:319-322.
- Miller-Butterworth, C. M., D. S. Jacobs, & H. Harley. 2002. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite *loci* in Schreibers' long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Molecular Ecology Notes* 2:139-141.
- Neff, B. D., & M. R. Gross. 2001. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55:1717-1753.
- Nyakaana, S., & P. Arctander. 1998. Isolation and characterization of microsatellite *loci* in the African elephant, *Loxodonta africana*. *Molecular Ecology* 7:1436-1437.
- Ortega, J., J. E. Maldonado, H. T. Arita, G. S. Wilkinson, & R. C. Fleischer. 2002. Characterization of microsatellite *loci* in the Jamaican fruit-eating bat *Artibeus jamaicensis* and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 2:462-464.
- Ortega, J., J. E. Maldonado, G. S. Wilkinson, H. T. Arita, & R. C. Fleischer. 2003. Male dominance, paternity and relatedness in the Jamaican fruit-eating bat. *Molecular Ecology* 12:2409-2415.
- Primmer, C. R., N. Saino, A. P. Møller, & H. Ellegren. 1998. Unraveling the process of microsatellite evolution through analysis of germ line

- mutations in barn swallows *Hirundo rustica*. *Molecular Biology and Evolution* 15:1047-1054.
- Reich, D. E., & D. B. Goldstein. 1999. Estimating the age of mutations using variation at linked markers. 129-138 pp. *In* *Microsatellites: Evolution and applications*. Goldstein, D. B., & C. Schlötterer (Edits). Oxford University Press, UK.
- Rossiter, S. J., T. M. Burland, G. Jones, & E. M. Barrat. 1999. Characterization of microsatellite *loci* in the greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology* 8:1959-1960.
- Rossiter S. J., G. Jones, R. D. Ransome, & E. M. Barrat. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology* 9:1031-1035.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365-371.
- Shriver, M. D., L. Jin, R. Chakraborty, & E. Boerwinkle. 1993. VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model. *Genetics* 134:983-993.
- Storz, J. F. 2000. Variation at tri- and tetranucleotide repeat microsatellite *loci* in the fruit bat genus *Cynopterus* (Chiroptera: Pteropodidae). *Molecular Ecology* 9:2198-2200.
- Storz, J. F., H. R. Bhat, & T. H. Kunz. 2001a. Genetic consequences of polygyny and social structure in an Indian fruit bat, *Cynopterus sphinx* I. Inbreeding, outbreeding, and population subdivision. *Evolution* 55:1215-1223.
- Storz, J. F., H. R. Bhat, & T. H. Kunz. 2001b. Genetic consequences of polygyny and social structure in an Indian fruit bat, *Cynopterus sphinx* II. Variance in male mating success and effective population size. *Evolution* 55:1224-1232.
- Uphyrkina, O., D. Miquelle, H. Quigley, C. Driscoll, & S. J. O'Brien. 2002. Conservation genetics of the far eastern leopard (*Pantera pardus orientalis*). *The Journal of Heredity* 93:303-311.
- Vege, S., & G. F. McCracken. 2001. Microsatellite genotypes of big brown bats (*Eptesicus fuscus*: Vespertilionidae, Chiroptera) obtained from their feces. *Acta Chiropterologica* 3:237-244.
- Vonhof, M. J., C. S. Davis, C. Strobeck, & M. B. Fenton. 2001. Characterization of microsatellite *loci* in Spix's disk-winged bats (*Thyroptera tricolor*). *Molecular Ecology Notes* 1:73-75.
- Vonhof, M. J., C. S. Davis, M. B. Fenton, & C. Strobeck. 2002. Characterization of dinucleotide microsatellite *loci* in big brown bats (*Eptesicus fuscus*), and their use in other North American vespertilionid bats. *Molecular Ecology Notes* 2:167-169.
- Wisely, S. M., S. W. Buskirk, M. A. Fleming, D. B. McDonald, & E. A. Ostrander. 2002. Genetic diversity and fitness in Black-footed ferrets before and during a bottleneck. *The Journal of Heredity* 93:231-237.
- Zane, L., L. Barcelloni & T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.