

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas



Tesis presentada para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas

Patrones de diversificación genética en murciélagos del género *Molossus* de Argentina

Autora: Micaela Ana Chambi Velasquez


Director: Diego A. Caraballo

Codirector: Daniel M. Cisterna

Grupo de Investigación en Filogenias y Filogeografía (IEGEB, CONICET-UBA)

Servicio de Neurovirosis, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos Malbrán"

Agosto, 2023


Micaela Chambi


Diego A. Caraballo



Dr. Daniel M. Cisterna
Servicio de Neurovirosis
INEL-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán
(1282AFF) Av. Velez Sarsfield 563
Ciudad Autónoma de Buenos Aires -ARGENTINA
Tel +54 11 43025064 ext 213

AGRADECIMIENTOS

Cuando empecé con esta tesis sentía que este momento estaba muy lejano, y ahora que finalmente estoy en este punto me doy cuenta de que sería imperdonable no agradecer a aquellas personas que me acompañaron de distintas maneras e hicieron esto posible.

En primer lugar, quiero agradecerle a mi director, Diego Caraballo, por todo lo que me enseñó. Por darme la oportunidad de realizar este trabajo, siempre confiar en mí, darme palabras de aliento y acompañarme en todo momento de principio a fin.

También quiero agradecer a mi co-director, Daniel Cisterna, por abrirme las puertas del Malbrán. A las técnicas que trabajan ahí, que me enseñaron todo con una paciencia de hierro. A Guadalupe principalmente, que siempre tuvo predisposición para ayudarme y enseñarme, siempre con buena onda y paciencia. También quiero agradecer a Stella, de quien también aprendí muchas cosas y Daniela, por ayudarme a encontrar cada cosa del laboratorio.

Quiero darle las gracias a las chicas que me brindaron las muestras, Antonella Argoitia, Romina Pave, Eugenia Montani y Valeria Colombo, ya que sin su colaboración este trabajo no hubiera sido posible. Y también al Instituto de Zoonosis Luis Pasteur de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y al Museo Provincial Ángel Gallardo de Santa Fe.

Quiero agradecer a toda la gente que alguna vez conocí en exactas, que siempre tuvieron buena onda, con los que compartí largos y breves momentos, y a aquellos amigos que me llevó también. A los profesores que siempre fueron excelentes, y en general abiertos a cualquier opinión o pedido de ayuda.

Por último, quiero agradecer principalmente a mi familia. A mi mamá, Ana, y a mi papá, Salomón, sin cuyo esfuerzo y sacrificio nada de esto hubiera sido posible. A mis hermanas y a mi sobrina. A mis perritos, que me acompañaron todos estos años de estudio y carrera.

Patrones de diversificación genética en murciélagos del género *Molossus* de Argentina

RESUMEN

Conocer la diversidad de especies en una región determinada es crucial para el manejo y la conservación. En el caso de los murciélagos, la identificación de especies también es importante desde un punto de vista epidemiológico. Los murciélagos del género *Molossus* (orden Chiroptera) se distribuyen a lo largo del neotrópico continental e insular, desde el sudeste de Estados Unidos hasta Argentina. *Molossus* se caracteriza por tener especies crípticas y también especies morfológicamente diferenciables, pero genéticamente muy similares. En este trabajo se relevó la diversidad de *Molossus* en Argentina desde una perspectiva filogenética molecular. Para esto se obtuvieron secuencias de tres marcadores moleculares: dos mitocondriales (citocromo b y citocromo oxidasa I) y uno nuclear (β -fibrinógeno), de un set de muestras de 56 ejemplares. Se realizó un análisis filogenético para cada marcador, para los dos loci mitocondriales, y para el conjunto de loci concatenados, incluyendo secuencias representativas de toda la diversidad de especies del género. El análisis de los marcadores por separado mostró niveles variables de resolución filogenética, siendo el menos informativo el marcador nuclear. El análisis de los genes mitocondriales y el de los tres marcadores concatenados permitió obtener la mayor resolución topológica, con una mayor probabilidad posterior en los nodos. Se confirmó la presencia de cuatro especies y de un linaje críptico de amplia distribución, revelados como grupos recíprocamente monofiléticos. Estos resultados permitieron revisar los límites de distribución geográfica de las especies presentes en Argentina, extendiéndose las de *M. melini* y *M. fluminensis*. Se generó además un *dataset* que, sumado a otras fuentes de información, permite identificar a nivel de especies a cualquier individuo perteneciente al género sin la necesidad de recurrir a metodologías más complejas y costosas.

Genetic diversification patterns in bats of the genus *Molossus* from Argentina

Assessing species diversity in a given region is crucial for management and conservation. In the case of bats, species identification is also important from an epidemiological point of view. Bats of the genus *Molossus* (order Chiroptera) are distributed throughout the continental and insular Neotropics, from southeastern United States to southern Argentina. *Molossus* is characterized by having cryptic species and also morphologically distinguishable but genetically similar species. In this work, the diversity of *Molossus* in Argentina was surveyed from a molecular phylogenetic perspective. To this end, sequences of three molecular markers were obtained: two mitochondrial (cytochrome b and cytochrome oxidase I) and one nuclear (β -fibrinogen) locus, from a set of samples of 56 specimens. A phylogenetic analysis was performed for each marker, for the two mitochondrial loci, and for the set of concatenated loci, including representative sequences of the entire diversity of the genus. Analysis of each marker separately showed variable levels of phylogenetic resolution, with the nuclear marker being the least informative. The analysis of the mitochondrial genes and that of the three concatenated markers allowed to obtain the highest topological resolution, with a higher node posterior probability. The presence of four species and a widely distributed cryptic lineage were confirmed, revealed as reciprocally monophyletic groups. These results allowed reviewing the geographical distribution limits of the species present in Argentina, extending those of *M. melini* and *M. fluminensis*. A dataset was also generated that, added to other sources of information, allows the identification of any individual belonging to the genus at the species level without the need to resort to more complex and expensive methodologies.

INTRODUCCIÓN

Conocer los límites entre las especies que componen un género, así como actualizar la distribución geográfica que ocupa su diversidad genética ayuda a monitorear el estado de las poblaciones, brinda información sobre los rasgos de la historia de vida y es relevante al momento de tomar decisiones sobre la conservación y el manejo (Decker et al., 2020), sobre todo cuando se trata de especies crípticas o de divergencia reciente. Las especies crípticas tienen historias evolutivas independientes y pueden tener adaptaciones únicas, por lo que deben ser consideradas unidades biológicas distintas (Crandall et al., 2000), ya que el desentendimiento de las mismas puede generar errores en el biomonitoreo, en la evaluación de los riesgos de extinción, y en las decisiones de conservación (Trontelj & Fišer, 2009).

Los murciélagos (orden Chiroptera) mastines del género *Molossus* (Geoffroy, 1805) se distribuyen a lo largo del Neotrópico continental e insular, desde el sudeste de Estados Unidos hasta Argentina, incluidas las islas del Caribe y están presentes en una gran variedad de hábitats; desde bosques secos y húmedos, hasta selvas tropicales, pastizales y sabanas (Eger, 2008; Reid, 2009). Muchas especies de este género están bien adaptadas a las modificaciones antropogénicas y pueden ser numerosas en áreas urbanas y hábitats degradados (Taylor et al., 2012). Las especies de *Molossus* son no migratorias, pero algunas son generalistas ambientales y están ampliamente distribuidas. Por el contrario, otras especies del género están restringidas al continente o a las islas del Caribe y están adaptadas a tipos específicos de hábitats (Dolan, 1989; López-González & Presley, 2001; Taylor et al., 2019). Además, algunas de las especies de *Molossus* presentan distribuciones espaciales solapantes entre sí.

Los murciélagos son reservorios naturales de una gran variedad de patógenos, incluidos varios virus zoonóticos importantes que causan enfermedades graves tanto en humanos como en animales domésticos (Halpin et al., 2000; Leroy et al., 2005; Li et al., 2005; Rahman et al., 2010). En el caso de *Molossus* se han registrado reportes de virus tales como la rabia en algunas especies (Uieda et al., 1995; Sodré et al., 2010), y también se detectó en este género la circulación de ciertos linajes de alfacoronavirus (alfaCoV) (Salmier et al., 2017; Caraballo et al., 2022).

El género *Molossus* comprende varias especies cuya delimitación nunca fue sencilla de establecer. Lindsey & Ammerman (2016) hicieron una recapitulación de los cambios que hubo en la taxonomía y las relaciones filogenéticas de los linajes de *Molossus*. Desde las comparaciones morfológicas de Miller (1913) con especímenes del Museo Nacional de los Estados Unidos, hasta Gager y colaboradores (2016), empleando el uso de marcadores de

microsatélites y del gen mitocondrial citocromo oxidasa I, junto con datos morfológicos y acústicos, para distinguir entre especies morfológicamente similares. El dimorfismo sexual y la baja diferenciación morfológica a nivel de especie (Simmons et al., 2005) fueron los primeros inconvenientes con los que se encontraron estos autores en el intento de estructurar la taxonomía de este grupo, que tradicionalmente se basó en el análisis de la morfología externa o en el uso de medidas biométricas (Schmieder et al., 2015), a lo que posteriormente se le agregaría el análisis acústico de los patrones de ecolocalización (Gager et al., 2016).

La aparición de nuevas tecnologías, como la secuenciación genética por el método de Sanger, permitió realizar análisis filogenéticos que complementaron los estudios anteriores. Sin embargo, un nuevo problema se hizo presente al momento de establecer las relaciones taxonómicas: la discrepancia entre los niveles de similitud morfológica y genética. En el género *Molossus* hay dos patrones de variación genética contrastantes: por un lado, existen especies crípticas, por su alta similitud morfológica y una conspicua diferenciación genética, pero también hay especies muy divergentes a nivel morfológico que poseen niveles muy bajos de diferenciación genética (Loureiro et al., 2019). Todo esto contribuyó a la inestabilidad taxonómica dentro del grupo.

Los primeros trabajos dentro del género, desde una perspectiva molecular, se realizaron mediante el uso individual de marcadores mitocondriales, tales como citocromo b (cytb) o citocromo oxidasa I (COI), que fueron ampliamente utilizados para resolver las relaciones evolutivas en otros grupos de mamíferos, incluidos los quirópteros (May-Collado & Agnarsson, 2006; Agnarsson et al., 2010). Pero este tipo de enfoque puede resultar insuficiente para la identificación de algunas especies, debido a la ocurrencia de fenómenos tales como el reparto de linajes y/o hibridación e introgresión (Caraballo et al., 2020). Otra metodología consiste en la concatenación de genes mitocondriales y nucleares, lo que permitió corroborar la existencia de ciertos grupos, pero a su vez alertó sobre la falta de monofilia en grupos históricamente reconocidos y en la dificultad para resolver las relaciones entre especies estrechamente relacionadas (Loureiro et al., 2019).

Loureiro y colaboradores (2020) realizaron la primera filogenia del género aplicando la metodología de *RAD-Sequencing* (Figura 1), que implica generar una muestra representativa del genoma, proveyendo así de decenas de miles de *SNPs* (*single nucleotide polymorphisms*) y alcanzando un nivel de resolución filogenética muy superior a la obtenida mediante la concatenación de marcadores moleculares. Este estudio sirvió para confirmar los resultados del análisis de loci concatenados, pero también para detectar especies crípticas. De esta manera, elevaron el número de especies de 11 a 14, siendo estas: *M. alvarezi* (González-Ruiz et al.,

2011); *M. aztecus* (Saussure, 1860); *M. bondae* (Allen, 1904); *M. coibensis* (Allen, 1904); *M. currentium* (Thomas, 1901); *M. fentoni* (Loureiro et al., 2018b); *M. molossus* (Pallas, 1766); *M. milleri* (Johnson, 1952); *M. pretiosus* (Miller, 1902); *M. sinaloae* (Allen, 1906); *M. verrilli* (Allen, 1908); *M. rufus* (Geoffroy, 1805); *M. fluminensis* (Lataste, 1891) y *M. nigricans* (Miller, 1902). Estas últimas tres especies habían sido anteriormente tratadas como *M. rufus* y son un claro ejemplo de especies crípticas, cuya distribución no sería solapante (Loureiro et al., 2020). Montani y colaboradores (2021) describieron la última especie del género: *M. melini*, elevando el número de especies a 15.

Molossus melini es una de las cuatro especies presentes en Argentina y su distribución geográfica comprende las provincias de Santa Fe y Entre Ríos (Montani et al. 2021; Pavé et al., 2023) (Figura 2). Las otras tres especies del género *Molossus* presentes en el país son *M. molossus*, cuya distribución es la más amplia, comprendiendo Norte, Centro y Sudamérica y las Antillas Mayores. Particularmente en Argentina se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Misiones, Formosa, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán y Jujuy (Montani et al., 2019b) (Figura 2). Otra de las especies presentes en el país es *M. fluminensis* (ex *M. rufus*), cuya presencia se extiende desde el sudoeste de Brasil, Bolivia, Paraguay y Argentina, donde se la puede encontrar en las provincias de Formosa, Salta, Jujuy, Chaco, Córdoba, Misiones, Santa Fe y Corrientes (Díaz & Bárquez, 2019). Finalmente, *M. currentium* se distribuye por Sudamérica, incluido Paraguay, Uruguay, Brasil, Bolivia y Argentina, donde su presencia fue confirmada en Buenos Aires, Corrientes y Entre Ríos (Montani et al., 2019a) (Figura 2).

La identificación a nivel de especie de *Molossus* es un problema habitual, tanto en los laboratorios de zoonosis, en el trabajo de campo, como en las colecciones de especímenes que se ingresan a los museos. La mayoría de los ejemplares para los que no se logra una asignación de especie adecuada quedan catalogados como *Molossus* sp. o, lo que es peor, se les asigna un nombre de especie que a menudo resulta incorrecto (típicamente *M. molossus*). Esto puede deberse a la inexperiencia del operador/a, la dificultad que generan los bajos niveles de diferenciación morfológica, en el caso de las especies crípticas, la mala calidad de la muestra, entre otras causas.

La correcta identificación a nivel de especies es determinante durante el comienzo de un brote zoonótico (Schlottau et al., 2020), y también es crucial para llevar a cabo acciones de conservación, dado que una identificación correcta influye directamente sobre estimaciones de la distribución y abundancia de las especies (Racey et al., 2013). Si bien la filogenia de *RAD-Sequencing* es probablemente la que mejor refleje las relaciones biológicas entre las especies y

linajes de *Molossus*, esta metodología por lo general no puede ser llevada a cabo para la identificación rutinaria de especímenes debido a su alto costo, al tiempo que demanda y a la complejidad del análisis de resultados. Por estos motivos se vuelve necesario evaluar marcadores que puedan brindar la información suficiente para la identificación de especies de *Molossus*. Además, hasta el momento no hay trabajos que aborden la diversidad de los *Molossus* presentes en Argentina desde una perspectiva de marcadores múltiples.

En base a los antecedentes presentados, en este trabajo se plantean dos hipótesis: 1) en Argentina existen cuatro especies del género *Molossus* que forman grupos recíprocamente monofiléticos tanto para marcadores nucleares como mitocondriales y 2) el árbol de marcadores concatenados de *Molossus* reproduce las relaciones interespecíficas obtenidas en el análisis de *RAD-Sequencing*. En base a estas hipótesis los objetivos fueron establecer si las especies se recuperan como grupos recíprocamente monofiléticos y analizar el número mínimo de genes que permite identificar a las especies. Para esto se obtuvieron secuencias de dos genes mitocondriales y de un marcador nuclear a partir de muestras obtenidas dentro del rango de distribución de *Molossus* en Argentina. Se realizaron inferencias filogenéticas utilizando los marcadores por separado y también a través de los marcadores concatenados. Los resultados de este análisis servirán para revisar los límites distribucionales y el estatus taxonómico de los *Molossus* de Argentina.

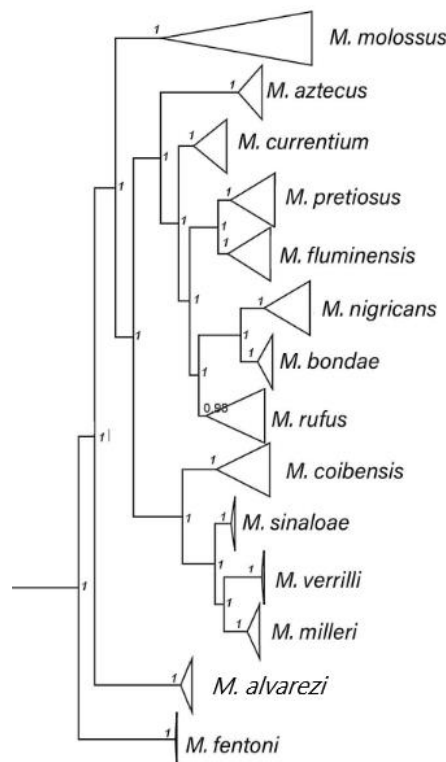


Figura 1. Filogenia de *Molossus* obtenida por *RAD-Sequencing* (Loureiro et al., 2020).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se partió de muestras de tejido (intestino, patagio y tejido muscular sin identificar) de 56 ejemplares de murciélagos del género *Molossus* de las regiones pampeana, noreste y noroeste de Argentina (Figura 2). Las muestras provienen de distintas fuentes como el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Ciudad Autónoma de Buenos Aires; muestras depositadas en el Museo Provincial Ángel Gallardo, Santa Fe, y muestras capturadas en campo provenientes de Corrientes, Entre Ríos y Santa Fe, que pertenecen a colecciones de las investigadoras Antonella Argoitía, Romina Pavé (colección INALI), Eugenia Montani y Valeria Colombo. Algunas de las muestras estaban fijadas en etanol y otras criopreservadas. Se utilizaron dos genes mitocondriales: citocromo b (cytb) y citocromo oxidasa I (COI); y un marcador nuclear: el intrón 7 del gen de β -fibrinógeno (β -fib). Los marcadores se amplificaron con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo el protocolo que indica la Tabla 1. Para cada muestra, cuando fue posible, se secuenciaron regiones parciales de los marcadores con cebadores en ambos sentidos.

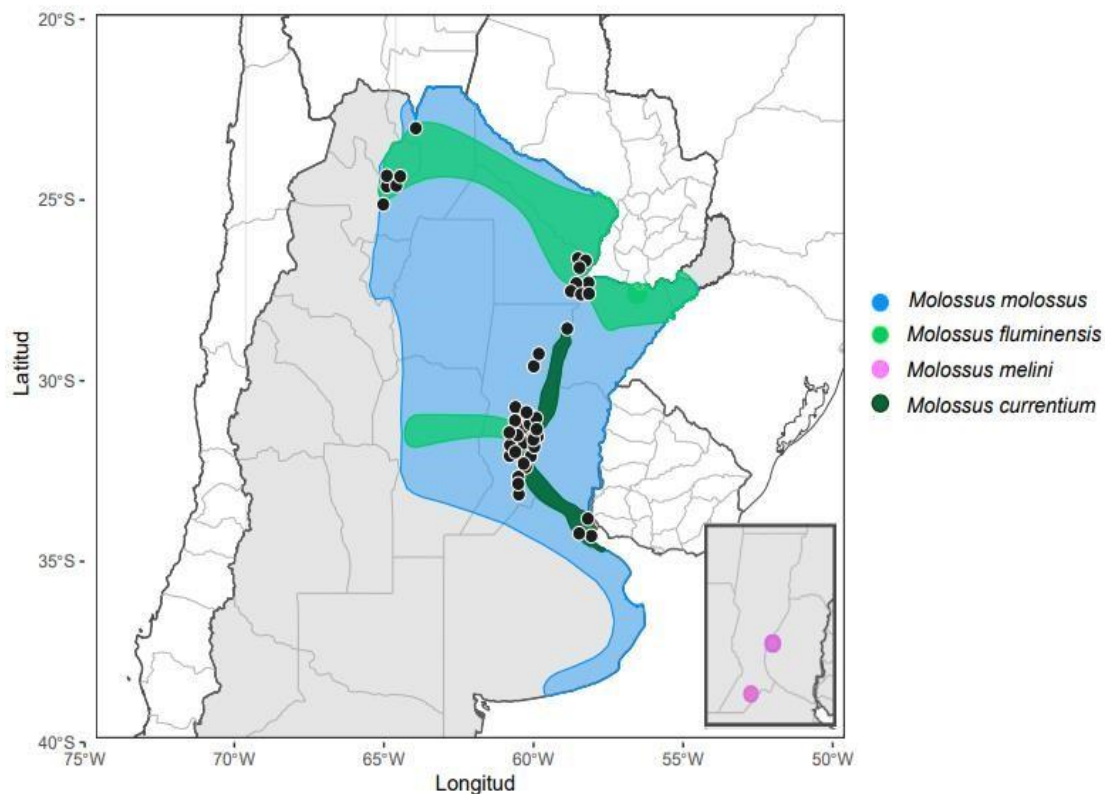


Figura 2. Mapa de Argentina. Los puntos negros indican los sitios de muestreo. El sombreado de colores muestra la zona de distribución de las especies presentes en Argentina. En el borde inferior derecho, se muestra la zona de distribución de *M. melini* (Díaz & Bárquez, 2019; Montani et al., 2019; Pavé et al., 2023).

Tabla 1. Cebadores y protocolos de *PCR* utilizados para cada uno de los marcadores obtenidos a partir de las muestras de *Molossus*.

Gen (fragmento)	Cebadores (5'→3')	Reacción PCR (1x)	Perfil térmico
Cytb (1140 pb)	Bat05A CGACTAATGACATGAAAAATCACCGTT G Bat 14 TATTCCCTTTGCCGGTTTACAAGACC (Martins et al., 2007)	5µl de buffer 10x, 1,5µl de MgCl2 50mM, 1µl de dNTPs 10µM, 5µl de cada uno de los cebadores 10µM, 0,4µl de TaqPol 5u/µl, 27,1µl de agua y 5 µl de ADN.	5 minutos a 94°C seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, 2 minutos 72°C, y al final 10 minutos a 72°C
COI (654 pb)	C_VF1LFt1-C_VR1LRt1 LepF1_t1 TGTA AACGACGGCCAGTATTCAACCA ATCATAAAGATATTGG VF1_t1 TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCA ACCACAAAGACATTGG VF1d_t1 TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCA ACCACAARGAYATYGG VF1i_t1 TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCA ACCAIAAIGAIAITIGG LepR1_t1 CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTG GATGTCCAAAAAATCA VR1d_t1 CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTG GGTGGCCRAARAAYCA VR1_t1 CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTG GGTGGCCAAAGAATCA VR1i_t1 CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTG GGTGICCIAAIAAICA (Ivanova et al., 2007)	5µl de buffer 5x, 2,5µl de MgCl2 50mM, 0,25µl de dNTPs 10mM, 0,5µl de cada uno de los cebadores (cóctel) 10µM, 0,25µl de TaqPol 5u/µl, 39µl de agua y 2 µl de ADN.	1 minuto a 94°C seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, y 1 minuto a 72°C, y finalmente 10 minutos a 72°C
β-fib (751 pb)	Fgb-17U GGGGAGAACAGAACCATGACCATCCAC Fgb-17L ACCCCAGTAFTATCTGCCATTCGGATT (Reeder y Bradley, 2007)	3,5µl de buffer 10x, 2µl de MgCl2 50mM, 0,2µl de dNTPs 25mM, 2µl de cada uno de los cebadores 100mM, 0,3µl de TaqPol 5u/µl, 24µl de agua y 1 µl de ADN.	2 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C, y por último 5 minutos a 72°C

Los electroferogramas correspondientes a las secuencias *forward* y *reverse* fueron revisados y corregidos en FinchTV 1.4.0 (Patterson et al., 2004) y alineados de a pares en BioEdit 7.0.9.0 (Hall, T.A. 1999). Las ambigüedades se resolvieron con la notación IUPAC y utilizando un gen de referencia (cytb: MH058076; COI: MH938593; β-fib: MF436735) para determinar la secuencia consenso de los fragmentos obtenidos de cada marcador. El alineamiento múltiple de las secuencias verificadas de cada marcador se realizó en ClustalX 2.0.8 (Larkin et al., 2007), borrando previamente los *gaps*. Se descartaron del análisis aquellas muestras que no dieron productos de PCR para ninguno de los tres marcadores empleados, aun variando las condiciones de reacción; y otras que habían sido identificadas incorrectamente, a partir de la morfología externa, y no pertenecían al género *Molossus*. El set de secuencias final comprendió un total de 47 individuos (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias obtenidas de las muestras usadas para la filogenia, con la especie propuesta a partir de la morfología externa, provincia y localidad de captura.

Muestra	Especie Tentativa	Provincia	Localidad/ Ciudad/ lugar de muestreo	Coordenadas Geográficas		Secuencias		
				Lat	Long	β -fib	COI	Cytb
P011	<i>M. molossus</i>	Jujuy	San Salvador de Jujuy	-24.19	-65.29	✓	–	✓
P105	<i>M. molossus</i>	Bs. As	Tigre	-34.42	-58.57	✓	✓	✓
P210	<i>M. molossus</i>	Bs. As	CABA	-34.57	-58.45	✓	✓	✓
P144	<i>M. molossus</i>	Salta	Salta	-24.79	-65.41	✓	-	-
P249	<i>M. molossus</i>	Jujuy	San Salvador de Jujuy	-24.19	-65.29	✓	✓	✓
P308	<i>M. molossus</i>	Jujuy	San Salvador de Jujuy	-24.19	-65.29	✓	✓	✓
P500-21	<i>M. molossus</i>	Bs As	San Martín	-34.57	-58.54	✓	–	✓
P565	<i>M. molossus</i>	Salta	Salta	-24.79	-65.41	✓	✓	✓
P772	<i>M. molossus</i>	Jujuy	San Salvador de Jujuy	-24.19	-65.29	✓	✓	✓
P961	<i>M. molossus</i>	Salta	Oran	-23.13	-64.32	–	–	✓
390-M	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Desvío Arijón	-31.98	-60.92	✓	✓	✓
512-M	<i>M. rufus</i>	Santa Fe	Paraná, Portal del Humedal	-28.50	-59.26	✓	✓	✓
A355-M	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe, Bv. Galvez y 25 de Mayo	-31.64	-60.70	✓	✓	✓
A457-M	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Estancia Las Gamas	-29.42	-60.38	✓	✓	✓
A588-M	<i>M. molossus</i>	Entre Ríos	Establecimiento Inchala	-31.75	-60.51	✓	✓	✓
A589-M	<i>M. molossus</i>	Entre Ríos	Establecimiento Inchala	-31.75	-60.51	–	–	✓
A635-M	<i>M. melini</i>	Entre Ríos	Ciudad de Paraná	-31.75	-60.52	✓	–	✓
129	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Esperanza	-31.43	-60.99	–	✓	✓
130	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Esperanza	-31.43	-60.99	–	✓	✓
177	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.66	-60.71	–	✓	✓
190	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.66	-60.71	–	✓	✓
192	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.63	-60.71	–	✓	✓
193	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.63	-60.71	✓	✓	✓
194	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.63	-60.71	–	–	✓
196	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.63	-60.71	✓	✓	✓
197	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.63	-60.71	✓	–	✓
198	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.63	-60.71	✓	–	✓
199	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.63	-60.71	✓	–	✓
MFA-ZV-M: 1413	<i>M. molossus</i>	Entre Ríos	Paraná	-31.75	-60.51	✓	✓	✓
MFA-ZV-M: 1414	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Rosario	-32.94	-60.64	✓	–	✓
MFA-ZV-M: 1423	<i>M. rufus</i>	Santa Fe	Vera	-29.46	-60.21	✓	✓	✓
MFA-ZV-M: 1431	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.66	-60.71	✓	✓	✓
MFA-ZV-M: 1435	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Santa Fe	-31.63	-60.71	✓	✓	✓
MG-ZV-M: 176	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Pueblo Andino	-32.67	-60.87	✓	✓	✓
MG-ZV-M: 208	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Zavalla	-33.03	-60.89	✓	–	✓
MG-ZV-M: 225	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Zavalla	-33.03	-60.89	✓	–	✓
MG-ZV-M: 296	<i>M. molossus</i>	Santa Fe	Rosario	-32.96	-60.72	✓	✓	✓
AMA-10	<i>M. molossus</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.47	-58.78	✓	✓	✓
AMA-15	<i>M. molossus</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.47	-58.78	–	✓	✓
AMA-26	<i>M. molossus</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.47	-58.78	✓	✓	✓
AMA-65	<i>M. molossus</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.47	-58.78	–	–	✓
AMA-107	<i>M. fluminensis</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.47	-58.78	✓	✓	✓
AMA-114	<i>M. fluminensis</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.47	-58.78	–	✓	✓
AMA-154	<i>M. fluminensis</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.47	-58.78	✓	✓	✓
AMA-155	<i>M. molossus</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.47	-58.78	✓	✓	✓
AMA-29	<i>M. fluminensis</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.46	-58.78	✓	–	–
AMA-30	<i>M. fluminensis</i>	Corrientes	Corrientes Capital	-27.46	-58.78	✓	–	–

Se realizó un análisis filogenético bayesiano para cada marcador por separado, uno para los marcadores mitocondriales y, por último, un análisis de los tres marcadores concatenados incluyendo todas las especies de *Molossus* actualmente reconocidas: *M. pretiosus*, *M. nigricans*, *M. rufus*, *M. fluminensis*, *M. coibensis*, *M. sinaloae*, *M. aztecus*, *M. currentium*, *M. bondae*, *M. melini*, *M. milleri*, *M. verrilli*, *M. alvarezi*, *M. fentoni* y las subespecies *M. molossus molossus* (Pallas, 1766) y *M. molossus daulensis* (Allen, 1916), cuyas distribuciones geográficas, hasta el momento, se especifican en la Figura 3. Como grupo externo se utilizaron secuencias de *Promops centralis* (Thomas, 1915) y *Eumops auripendulus* (Shaw, 1800).

Análisis de marcadores individuales

Se descargaron de GenBank secuencias de ADN de todas las especies mencionadas para cada uno de los marcadores, y se actualizaron los nombres de acuerdo con las propuestas de Loureiro et al., (2020) y Montani et al., (2021), en los casos donde fue posible, para el resto de las secuencias se mantuvo el nombre disponible en GenBank.

Para el análisis filogenético de los marcadores por separado se seleccionaron modelos de evolución nucleotídica usando el criterio de información de Akaike (Akaike, 1974) con MrModeltest2 (Nylander et al., 2004) en el programa PAUP v4.0 (Swofford, 2003). En ningún caso se fijaron los valores de los parámetros *a priori* para la selección de los modelos, pero sí se indicó el modelo que resultó seleccionado para cada locus. El modelo Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al. 1985), con una proporción de sitios invariables y distribución *gamma* (HKY)+I+G fue el que mejor ajustó a las secuencias de citocromo b. El modelo HKY+G, fue el seleccionado para citocromo oxidasa I, mientras que HKY+G fue el seleccionado para β -fibrinógeno. El análisis bayesiano se realizó utilizando MrBayes v 3.2.7 (Ronquist et al., 2012), por medio del servidor del Centro de Computación de Alto Desempeño de la Universidad Nacional de Córdoba (CCAD), que forma parte del SNCAD-MinCyT, Argentina. Para la corrida de las Cadenas de Markov Monte-Carlo (MCMC) se utilizó una cadena fría y tres calientes por 10.000.000 de generaciones para cada marcador, muestreando cada 1000 generaciones. En cada caso se descartó el periodo de *burnin*, tomando como referencia valores de desviación estándar mayores a 0,01, luego de lo cual se alcanzó el estado estacionario (el *burnin* debía ser menor al 25% de la corrida, de lo contrario se extendió el número de generaciones hasta que esta condición quedará satisfecha). Usando el programa TRACER v1.7.1 (Rambaut et al., 2018) se verificó que la estimación de los valores de los parámetros no estuviese influida por la autocorrelación entre generaciones cercanas entre sí, y permitieran

inferir esos valores con precisión. Para este fin se buscó que el tamaño muestral estimado (*ESS*) alcanzara valores mayores a 200. Finalmente, los árboles se visualizaron en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2018) y se editaron en Adobe Illustrator (Adobe Inc. 2019).

Elaboración de la matriz de loci concatenados

Además del análisis hecho para cada marcador por separado, se infirieron filogenias de los loci mitocondriales concatenados, por un lado, y de los tres loci, por otro. El análisis en conjunto de los genes citocromo b y citocromo oxidasa I se debe a que ambos son mitocondriales, por lo tanto, permiten reconstruir la misma historia evolutiva (Hurst & Jiggins, 2005). En cambio, las filogenias obtenidas con marcadores mitocondriales y nucleares pueden diferir entre sí (Spinks & Shaffer, 2009), debido a lo cual se destaca la necesidad de analizar ambos conjuntos de datos de forma independiente (Loureiro et al., 2019).

En varias ocasiones, aún luego de haberse descartado casos de error en la identificación, las secuencias de una misma especie resultaron polifiléticas para un marcador determinado. Esas secuencias representan linajes dentro de una especie, y se buscó que estos linajes estuviesen representados en el árbol de marcadores concatenados.

Para el análisis de los tres marcadores concatenados (β -fib, COI y cytb) se generó una matriz con el conjunto de datos. La matriz de la filogenia mitocondrial consistió en las mismas secuencias que para los tres marcadores concatenados, pero sin tener en cuenta las secuencias de β -fibrinógeno. En el caso de las secuencias obtenidas en GenBank, se utilizó, siempre que se pudo, un mismo individuo que tuviera secuencias para los tres marcadores, y en los casos en donde esto no fue posible se formaron quimeras (26 en total) (Tabla Suplementaria 1) respetando la especie, el linaje, y el origen geográfico de las secuencias. Solo se incluyeron en la matriz aquellos linajes que estaban presentes en las filogenias de al menos dos marcadores, a excepción de *M. currentium*, especie para la que solo encontramos disponibles en GenBank dos secuencias de COI, que fueron incluidas en el análisis. Esta excepción se debe a que *M. currentium* es una de las cuatro especies presentes en Argentina, y de no incluir estas secuencias, esta especie no se vería representada en el análisis (y no se podrían poner a prueba las hipótesis planteadas en esta tesis). Siempre que fue posible, se incluyeron al menos dos individuos de cada especie y linaje para probar la monofilia de los mismos. En el caso de las secuencias obtenidas para este trabajo, como criterio de inclusión se dio prioridad a los individuos que tenían más de un gen secuenciado, en particular a los ejemplares que reunían en conjunto a los genes mitocondriales, por lo cual se decidió quitar del análisis las muestras para

las que solo se obtuvo secuencia de β -fibrinógeno. Este criterio se basa en la observación del menor poder resolutivo del marcador β -fibrinógeno.

Análisis de marcadores concatenados

Las secuencias descargadas de GenBank y las obtenidas para este trabajo fueron alineadas en ClustalX 2.0.8 para cada marcador por separado. Para los genes mitocondriales se particionaron las posiciones nucleotídicas de cada codón y se seleccionó para cada partición un modelo de evolución nucleotídica (Tabla 3) según el criterio de información de Akaike por medio de MrModeltest en PAUP. Para β -fibrinógeno se utilizó un único modelo (HKY+G), por tratarse de una región intrónica. Luego, en MEGA11 (Tamura, Stecher y Kumar 2021) se concatenaron las secuencias de ADN, por un lado, la de los genes mitocondriales y por otro la de los tres marcadores. En ambos casos las secuencias faltantes se codificaron como datos ausentes dentro de la matriz.

Tabla 3. Modelos nucleotídicos de cada partición para cada gen mitocondrial: K80 (Kimura, 1980), modelo con proporción de sitios invariables. JC (Jukes & Cantor, 1969). SYM+G (Zharkikh, 1994) modelo con distribución *gamma*. HKY+I+G (Hasegawa et al. 1985), modelo con proporción de sitios invariables y distribución *gamma*. F81 (Felsenstein, 1981). GTR+I+G (Tavaré, 1986), modelo con proporción de sitios invariables y distribución *gamma*.

Gen	1era posición del codón	2da posición del codón	3era posición del codón
COI	K80+I	JC	HKY+G
Cytb	SYM+G	F81	GTR+I+G



Figura 3. Mapa del continente americano con las distribuciones geográficas de las especies actualmente reconocidas dentro del género *Molossus* (Barquez et al., 2015; Barquez & Diaz, 2016; Miller et al., 2016; Solari 2016; Solari, 2017; Sampaio & Peters, 2017; Solari, 2019; Loureiro et al., 2020; Montani et al., 2021; Pavé et al., 2023).

Criterios de interpretación

A continuación, se presentan los criterios que se utilizaron para poder interpretar los árboles filogenéticos, teniendo en cuenta los posibles errores en la asignación de nombre que pudieran presentarse:

- Actualización: en varios casos las secuencias disponibles en GenBank carecen de una actualización conforme fue cambiando la taxonomía del género. Una solución para esto es acudir a la taxonomía vigente y a las distribuciones geográficas asociadas a esa taxonomía, para detectar casos en los que la asignación de una secuencia a una determinada especie debiera ser corregida.
- Errores en la identificación por morfología externa: como se dijo en la Introducción, en el caso del género *Molossus* abundan las especies crípticas, con lo cual muchas veces resulta difícil determinar de forma correcta la especie en base a la morfología externa. Por este motivo es frecuente encontrar bajo el nombre de *M. molossus* (en general usado por defecto debido a su amplia distribución y a su gran similitud morfológica con otras especies dentro del género) individuos pertenecientes a otras especies, que son detectados *a posteriori* a través de la filogenia molecular. Una solución para esto es identificar *clusters* de especies a partir de los árboles basados en marcadores moleculares, que se revelan como grupos monofiléticos, puros o mayoritarios, y corroborar su adscripción a su vez con la distribución geográfica conocida para esa especie.

Se obtuvo un árbol filogenético individual para cada marcador, uno a partir de la concatenación de los genes mitocondriales y un quinto árbol a partir de los tres marcadores concatenados, cuya interpretación se realizó teniendo en cuenta los ítems anteriormente mencionados. Se consideró como alta probabilidad posterior bayesiana nodos con $\geq 0,95$ (nodos rojos en las figuras), una probabilidad posterior moderada valores entre 0,95-0,75 (nodos morados-celestes), y menores a 0,75 como baja probabilidad posterior (nodos verdes-amarillos).

Análisis de distancias genéticas

Para comparar las distancias intra e interespecíficas se generó una tabla de distancias a partir de la matriz de los tres marcadores concatenados. Las distancias genéticas de a pares se calcularon con MEGA11 (Tamura, Stecher y Kumar 2021). De las dos secuencias de *M. currentium*, una se consideró como *M. fluminensis* (MH185138), mientras que la otra se trató como *M. currentium* (MH185139), según los resultados de las filogenias obtenidas en este estudio (ver Figura 9).

RESULTADOS

Intrón 7 β -fibrinógeno

La matriz del intrón 7 del gen β -fibrinógeno, constó de 83 taxones, con una longitud de 770 nucleótidos, con 108 sitios variables, de los cuales 83 resultaron ser informativos para parsimonia. La filogenia obtenida (Figura 4, Figura Suplementaria 1) resultó poco resolutive, debido a la baja probabilidad posterior (pp) y a las múltiples politomías que presentó. Solo se recuperaron como grupos monofiléticos, las especies *M. fentoni* (pp = 1), *M. verrilli* (pp = 0,99), *M. milleri* (pp = 0,95) y *M. alvarezii* (pp = 1). El resto de las especies del género forman parte de una gran politomía, que, si bien podría decirse que muestra cierto nivel de estructura, los grupos que allí se distinguen tienen en general una baja probabilidad posterior.

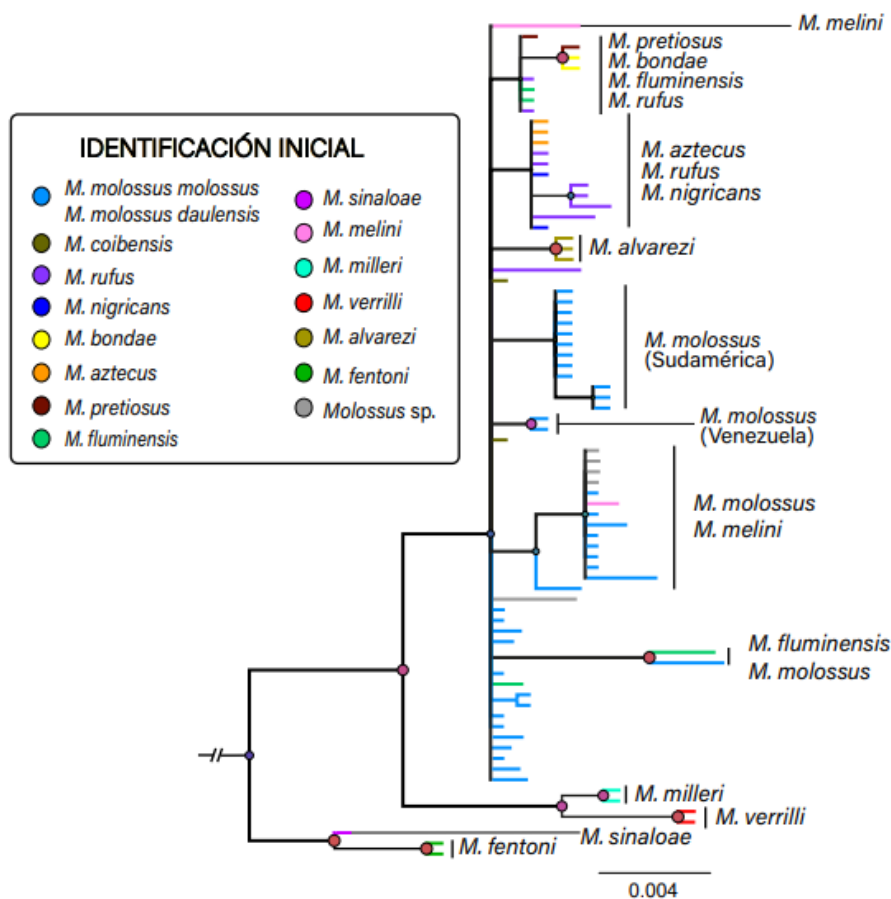


Figura 4. Árbol consenso de mayoría obtenido a partir de secuencias parciales del intrón 7 del gen β -fibrinógeno. Los colores de los terminales indican la especie a la que los individuos fueron asignación a partir de caracteres morfológicos (para el caso de las secuencias obtenidas para este trabajo) o según como estaban anotadas en GenBank. A la derecha se muestran los nombres de los grupos inferidos a partir de la filogenia. El tamaño de los nodos y el color es proporcional a su probabilidad posterior (rojo: 1-0,95; morado-celeste: 0,94-0,75; verde-amarillo: menor a 0,75). La escala está expresada en sustituciones por sitio.

Citocromo oxidasa I

La filogenia obtenida a partir del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (Figura 5, Figura Suplementaria 2) se realizó a partir de una matriz de 429 taxones, con una longitud de 697 nucleótidos, con 241 sitios variables, de los cuales 176 resultaron ser informativos para parsimonia. Esta filogenia presenta un mayor grado de resolución en comparación con la obtenida a partir del intrón 7 de β -fibrinógeno, pues tiene una mayor cantidad de nodos con probabilidad posterior alta.

Las especies *M. fentoni* (pp = 1), *M. alvarezi* (pp = 1), *M. verrilli* (pp = 1), *M. milleri* (pp = 1), *M. melini* (pp = 0,93) y *M. coibensis* (pp = 0,87) resultaron ser grupos monofiléticos. *Molossus alvarezi* quedó agrupado con individuos catalogados en Genbank como *M. sinaloae*, cuya distribución se restringe a la vertiente del Pacífico de México. No obstante, estas secuencias corresponden a especímenes colectados en Panamá, Guayana Francesa y Honduras, que se corresponden con la zona de distribución de *M. alvarezi*.

Algo similar ocurre en el clado de *M. milleri*, que se agrupa con individuos identificados como *M. molossus*. Esta última especie tiene una amplia distribución geográfica, comprendiendo Norte, Centro y Sudamérica y las Antillas Menores (Loureiro et al., 2020). Sin embargo, estos individuos fueron colectados en las Islas Caimán y Cuba, que junto a Jamaica comprenden el rango de distribución de *M. milleri*, que a su vez solapa con el de *M. molossus*.

Por otra parte, se sabe que *M. coibensis* habita en Centroamérica y Sudamérica (Loureiro et al., 2020). Se han obtenido secuencias de individuos de esta especie en Guayana Francesa, Ecuador, Perú, Panamá y Venezuela. Dentro del clado de *M. coibensis* se agrupan también especímenes de Venezuela, anotados en Genbank como *M. molossus*. Más tarde, las mismas secuencias serían catalogadas como *Molossus* sp. por Loureiro y colaboradores (apéndice I, 2019). También quedaron incluidos dentro del clado de *M. coibensis*, especímenes nombrados como *M. molossus* y *M. rufus* provenientes de Panamá, Ecuador y Guayana Francesa.

Las secuencias de *M. pretiosus* de Nicaragua, *M. aztecus* de México, *M. bondae* de Panamá y *M. nigricans* de El Salvador quedan agrupadas con algunos especímenes identificados como *M. molossus* de Ecuador y Panamá, aunque con una probabilidad posterior moderada (pp = 0,82). Este grupo forma parte de una gran politomía, compuesto mayoritariamente por las especies *M. fluminensis*, *M. nigricans* y *M. rufus*. Esta última especie forma, además, un grupo puro en el que se distinguen 11 secuencias (condensado en la Figura 5) con una alta probabilidad posterior (pp = 0,98). En el caso de *M. nigricans*, la mayoría de los individuos se agrupan en un clado (pp = 0,67) que además incluye un ejemplar identificado

como *M. currentium* de Paraguay y uno como *M. sinaloae* de México. Toda esta politomía tiene como grupo hermano a un clado de *M. fluminensis* de Brasil (pp = 1).

El clado de *M. melini* (pp = 0,93) incluye también individuos anotados en GenBank como *M. molossus* y *Molossus* sp. El grupo hermano de *M. melini* está compuesto por individuos colectados en Argentina e identificados como *M. molossus* (pp = 0,98). *Molossus molossus* quedó dividido en tres clados: el ya mencionado grupo de Argentina; un clado de Brasil y Panamá, que incluye una secuencia de *M. aztecus* de México, y un gran clado (203 terminales, condensado en la Figura 5) de Sudamérica (pp = 0,69), que incluye a la subespecie *M. molossus daulensis*.

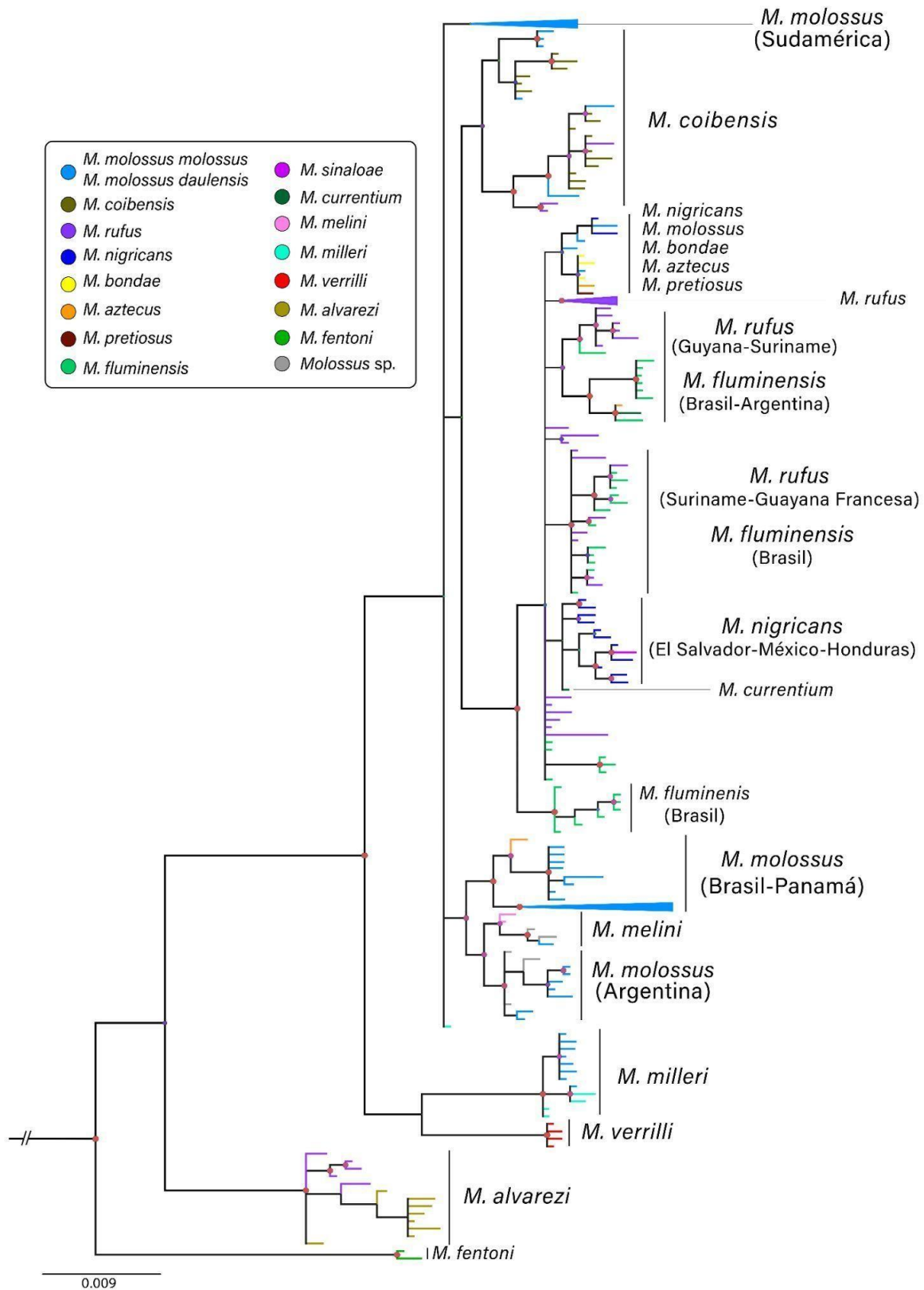


Figura 5. Árbol consenso de mayoría, obtenido a partir de secuencias parciales del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI). Los colores de los terminales indican la especie a la que los individuos fueron asignación a partir de caracteres morfológicos (para el caso de las secuencias obtenidas para este trabajo) o según como estaban anotadas en GenBank. A la derecha se muestran los nombres de los grupos inferidos a partir de la filogenia. El tamaño y color de los nodos es proporcional a su probabilidad posterior (rojo: 1-0,95; morado-celeste: 0,94-0,75; verde-amarillo: menor a 0,75). La escala está expresada en sustituciones por sitio.

Citocromo b

El análisis filogenético para este gen mitocondrial (Figura 6, Figura Suplementaria 3) se llevó a cabo a partir de una matriz que constó de 77 secuencias, con una longitud de 1140 nucleótidos, con 369 sitios variables, de los cuales 333 resultaron ser informativos para parsimonia. Esta filogenia tiene en general una mayor resolución y los nodos internos muestran valores más altos de probabilidad posterior en comparación a los marcadores anteriores.

Las especies *M. fentoni* (pp = 1), *M. alvarezzi* (pp = 1), *M. verrilli* (pp = 1), *M. milleri* (pp = 1), *M. melini* (pp = 1), *M. rufus* (pp = 0,75) y *M. sinaloae* (pp = 1) resultaron monofiléticas. *Molossus molossus* quedó dividido en dos clados. El clado mayoritario (condensado en la Figura 4) es de Sudamérica (pp = 0,60) e incluye a la subespecie *M. molossus daulensis*. El otro clado agrupa a *M. molossus* de Bolivia-Argentina con una alta probabilidad posterior (pp = 1).

Al igual que en el árbol obtenido con COI, el clado de *M. melini* incluye individuos anotados como *M. molossus* y *Molossus* sp., pero en este caso *M. melini* es grupo hermano del grupo mayoritario de *M. aztecus* de Brasil, que incluye individuos nombrados como *M. molossus* de ese mismo país. Hay otros dos individuos más de *M. aztecus*: uno de México, que se agrupa con *M. pretiosus* de Costa Rica, *M. bondae* y *M. molossus*, ambos de Ecuador, con una alta probabilidad posterior (pp = 1); el otro *M. aztecus* es de Brasil, y diverge respecto del clado de *M. rufus* (pp = 0,75), que a su vez incluye individuos anotados como *M. molossus* de Brasil, *M. pretiosus* de Nicaragua y *M. fluminensis* de Corrientes, Argentina.

El clado mayoritario de *M. fluminensis* (pp = 1) incluye también una secuencia anotada como *M. molossus* de Brasil y una anotada como *M. rufus* de Santa Fe, Argentina. Este clado se agrupa con una secuencia de *M. pretiosus*, aunque con una baja probabilidad posterior (pp = 0,66).

Por su parte, una de las secuencias de *M. nigricans* se agrupa con el clado de *M. sinaloae*. Las otras dos secuencias de *M. nigricans* se agrupan juntas con una alta probabilidad posterior (pp = 0,99) y pertenecen a Guatemala y México. Finalmente, *M. coibensis* se divide en dos clados con alta probabilidad posterior, uno de Venezuela (pp = 1) y otro de Ecuador-Perú (pp = 1).

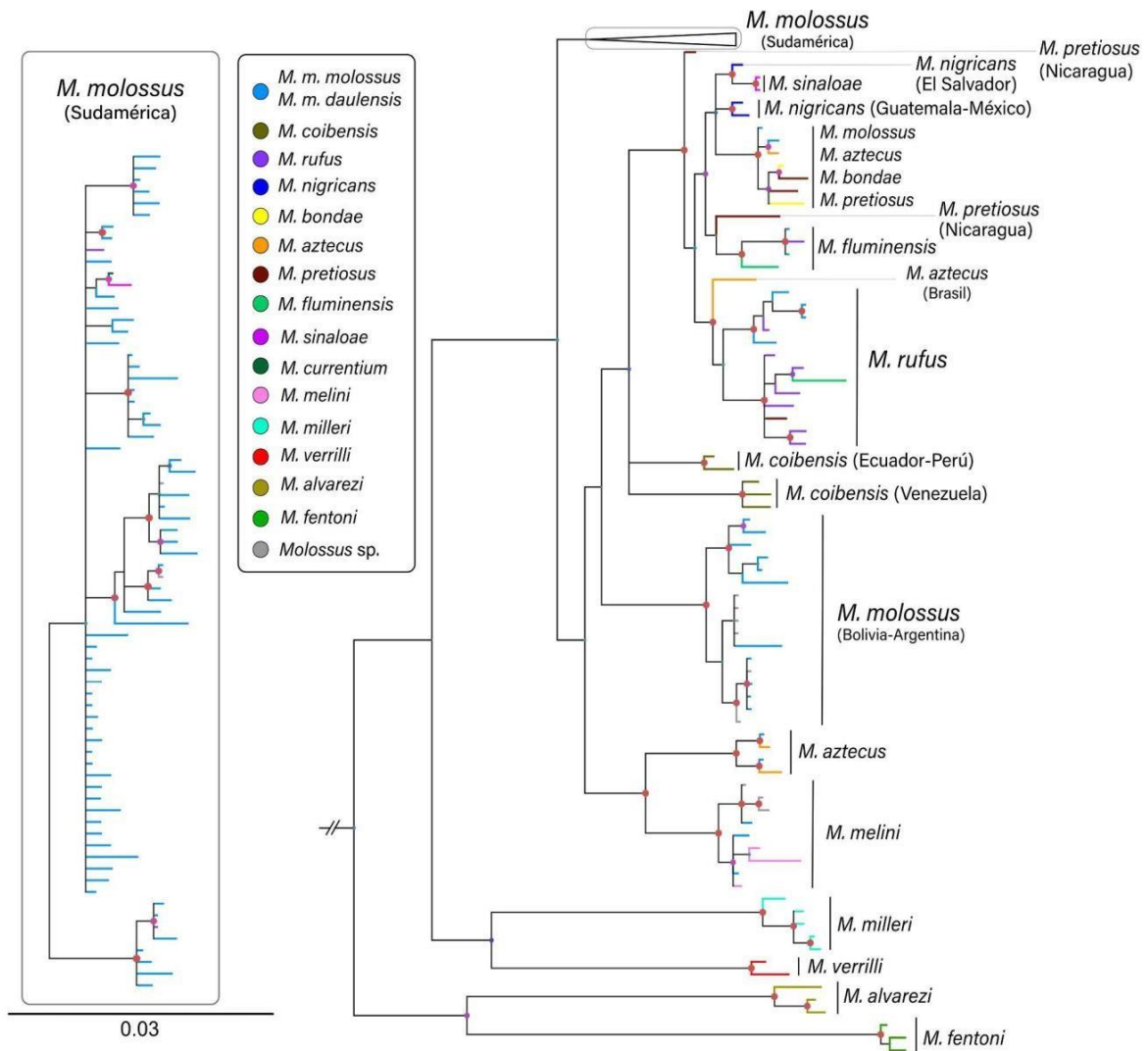


Figura 6. Árbol consenso de mayoría, obtenido a partir de secuencias parciales del gen mitocondrial citocromo b (cytb). Los colores de los terminales indican la especie a la que los individuos fueron asignación a partir de caracteres morfológicos (para el caso de las secuencias obtenidas para este trabajo) o según como estaban anotadas en GenBank. A la derecha se muestran los nombres de los grupos inferidos a partir de la filogenia. El tamaño de los nodos es proporcional a su probabilidad posterior (rojo: 1-0,95; morado-celeste: 0,94-0,75; verde-amarillo: menor a 0,75). La escala está expresada en sustituciones por sitio.

Filogenia de los genes mitocondriales

La matriz constó de 88 taxones, con una longitud de 1797 nucleótidos, con 556 sitios variables, de los cuales 512 resultaron informativos para parsimonia. Esta filogenia (Figura 7) recupera como grupos monofiléticos a las especies *M. fentoni* (pp = 1), *M. alvarezii* (pp = 1), *M. verrilli* (pp = 1), *M. milleri* (pp = 1), *M. melini* (pp = 1), *M. rufus* (pp = 0,96) y *M. sinaloae* (pp = 0,85).

Las especies *M. pretiosus*, *M. bondae* y una secuencia de *M. aztecus* (C1) agrupan juntas (pp = 0,95) y son polifiléticas. Otra secuencia de *Molossus aztecus* (B1) se encuentra agrupado

con *M. rufus* y *M. fluminensis* (pp = 0,97). Un tercer linaje de *M. aztecus* (A, pp = 1) es hermano de *M. melini* (pp = 1).

El clado mayoritario de *M. fluminensis* (pp = 1) incluye a un *M. currentium* de Paraguay. La otra secuencia de *M. currentium* se agrupa con *M. nigricans* y *M. sinaloae* (pp = 0,90). La especie *M. coibensis* quedó dividida en dos clados con alta probabilidad posterior. Algo similar ocurre con *M. molossus*. Los individuos nombrados como *M. molossus* quedaron divididos en dos clados. Por un lado, está el grupo de Sudamérica (pp = 1), donde están incluidas las secuencias de la subespecie *M. molossus daulensis* y por otro lado hay un clado conformado únicamente por individuos colectados en Argentina, a excepción de una de las secuencias, que corresponde a Bolivia (pp = 1). Estos dos clados forman parte de una politomía en la cual se encuentra la mayor parte de las especies del género.

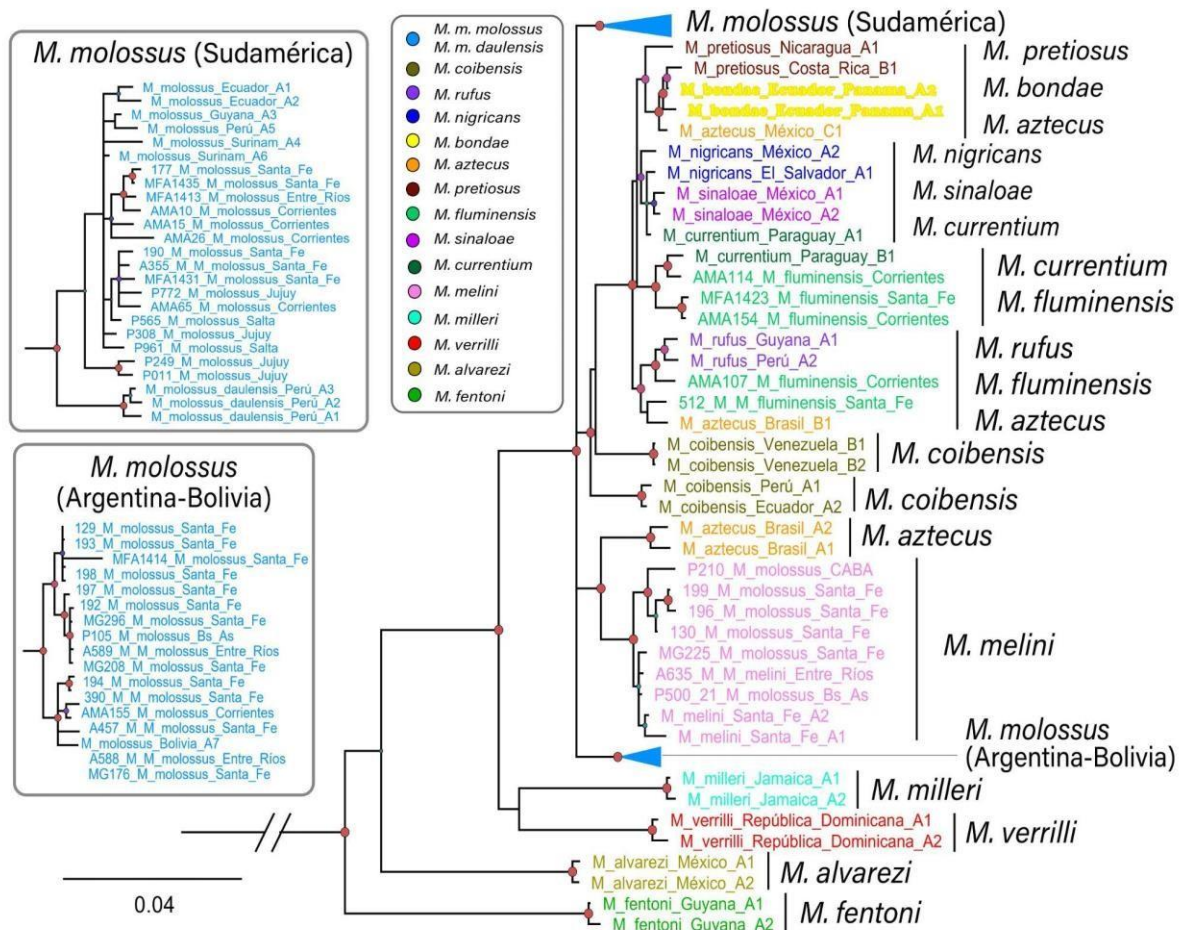


Figura 7. Árbol consenso de mayoría, obtenido a partir de los genes mitocondriales citocromo oxidasa I y citocromo b. A la derecha se muestran los nombres de los grupos inferidos a partir de la filogenia. Las letras al costado de los nombres y país, indican el linaje basado en la observación de los marcadores individuales y los números hacen referencia a la cantidad de individuos (quiméricos o no) representativos de cada linaje. El tamaño de los nodos es proporcional a su probabilidad posterior (rojo: 1-0,95; morado-celeste: 0,94-0,75; verde-amarillo: menor a 0,75). La escala está expresada en sustituciones por sitio.

Filogenia de Marcadores Concatenados

La filogenia recuperada en base a los tres loci concatenados (Figura 8) cuenta con 88 secuencias y totaliza una longitud de 2567 nucleótidos, de los cuales 684 son sitios variables y 612 sitios son informativos para parsimonia. Esta filogenia brindó, en general, una mejor resolución, en relación a lo observado para la filogenia mitocondrial (47 nodos con probabilidad posterior mayor o igual a 0,95 contra 39) y los marcadores individuales.

Las especies *M. fentoni* (pp = 1), *M. alvarezzi* (pp = 1), *M. verrilli* (pp = 1), *M. milleri* (pp = 1), *M. rufus* (pp = 1), *M. sinaloae* (pp = 0,85), *M. bondae* (pp = 0,73), *M. fluminensis* (pp = 0,84) y *M. coibensis* (pp = 0,56) resultaron monofiléticas. Y, si bien, el clado de esta última

especie, a diferencia de las anteriores, tiene una baja probabilidad posterior, sus nodos internos están bien resueltos (pp = 1 en cada caso).

El clado que reúne a los *M. fluminensis* presenta una probabilidad posterior moderada, pero se subdivide en dos clados con altos valores de probabilidad posterior. Dentro de este grupo se ubican dos individuos nombrados originalmente como *M. rufus* en base a su morfología externa (secuencias 512-M y MFA-ZV-M: 1423), ambos colectados en Santa Fe, lugar de distribución de *M. fluminensis*. También se encuentra un individuo catalogado en GenBank como *M. currentium*, que pertenece a Paraguay, país en el que se solapan las distribuciones geográficas de *M. currentium* y *M. fluminensis*. El otro individuo anotado como *M. currentium* también es de Paraguay y se encuentra agrupado junto a *M. nigricans* de El Salvador y los *M. sinaloae* de México con una baja probabilidad posterior (pp = 0,73). Este clado es hermano de aquel que reúne a los *M. rufus* con la otra secuencia de *M. nigricans* presente en el análisis (pp = 0,77).

El grupo (pp = 1) que comprende a *M. pretiosus* de Nicaragua y Costa Rica, *M. bondae* de Ecuador-Panamá y *M. aztecus* de México (C1) es hermano del clado mayoritario de *M. aztecus* (pp = 1). Además, las secuencias correspondientes al linaje de *M. aztecus* que llamamos A presentan un largo de rama mayor, lo que indica una mayor divergencia respecto al otro linaje de la especie correspondiente a Brasil (B1).

En el clado de *M. melini* (pp = 0,98) se ubican individuos previamente identificados, en base a su morfología externa, como *M. molossus*. Los individuos que dieron origen a estas secuencias fueron colectados exclusivamente en Argentina, y corresponden a las provincias de Santa Fe y Buenos Aires. El grupo hermano de *M. melini* es un clado (pp = 1) integrado por individuos nombrados como *M. molossus*, e incluye a la subespecie *M. molossus daulensis*. Hay, sin embargo, otro clado con soporte moderado (pp = 0,81) que agrupa a individuos también identificados como *M. molossus*, y se divide en dos grupos, uno con individuos de Ecuador, Perú, Guyana, Surinam y Bolivia (pp = 0,81), y otro con individuos únicamente de Argentina (pp = 0,97). Todo este último grupo fue tratado bajo el nombre de *Molossus* sp., (en fucsia en la Figura 8) ya que no forma parte del clado de *M. molossus*.

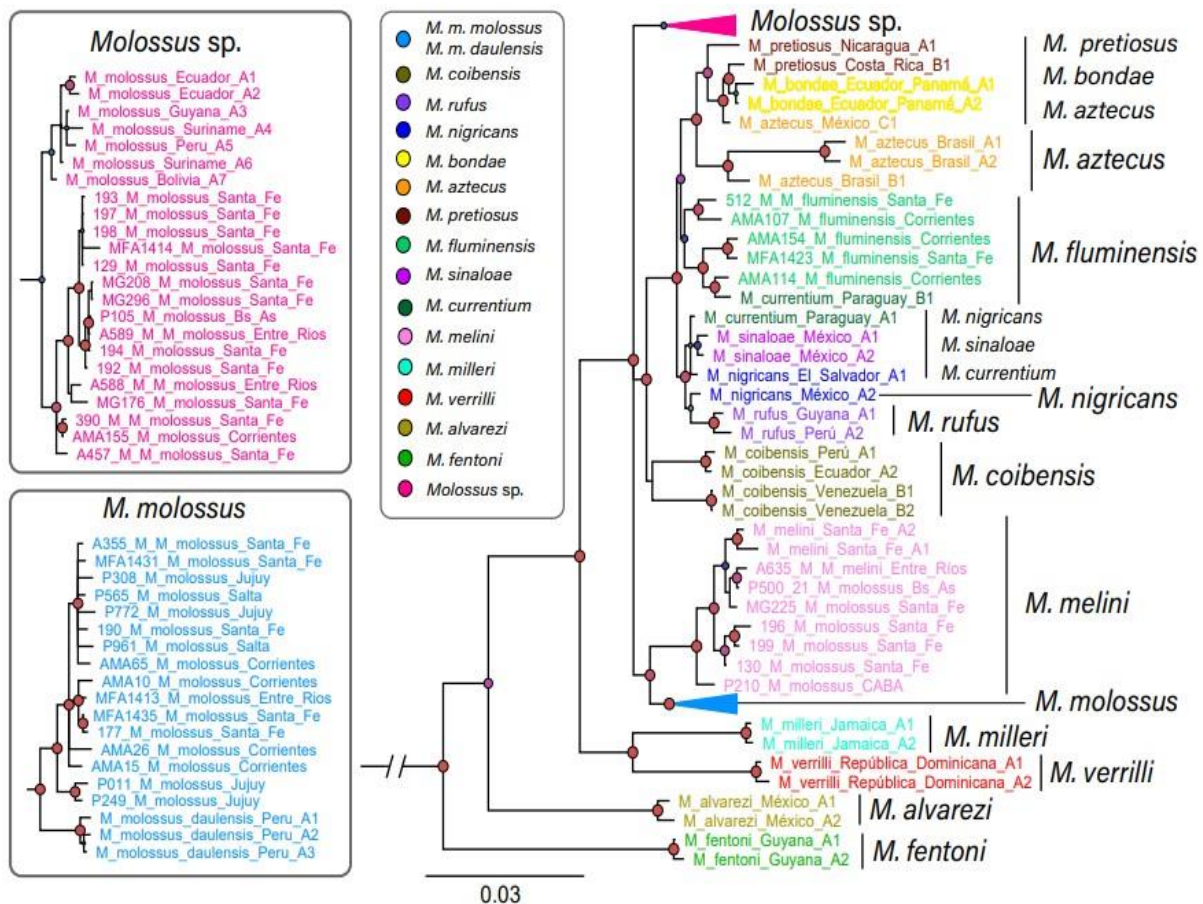


Figura 8. Árbol consenso de mayoría, obtenido a partir de los marcadores citocromo b, citocromo oxidasa I y β -fibrinógeno. A la derecha se muestran los nombres de los grupos inferidos a partir de la filogenia, según indica el código de colores. Las letras al costado de los nombres y país, indican el linaje basado en la observación de los marcadores individuales y los números hacen referencia a la cantidad de individuos (quiméricos o no) representativos de cada linaje. El tamaño y color de los nodos es proporcional a su probabilidad posterior (rojo: 10,95; morado-celeste: 0,94-0,75; verde-amarillo: menor a 0,75). La escala está expresada en sustituciones por sitio.

Distancias Genéticas

El análisis de las distancias genéticas ilustra el panorama general de *Molossus* (Figura 9). Las distancias intraespecíficas alcanzan valores bajos, que van de 0 a 1,7% (media 0,85%), los valores más altos pertenecen a *M. molossus*, *M. pretiosus*, *M. coibensis* y *M. fluminensis*. La única excepción es *M. aztecus*, que presenta una variación intraespecífica de 2,5%, un valor notablemente alto. Como era de esperar para este género, existe una amplia variación de distancias interespecíficas, con una media de 4.0%, pero incluyendo valores extremadamente bajos como los encontrados entre *M. pretiosus*, *M. nigricans*, *M. bondae*, *M. rufus*, *M. sinaloae* y *M. currentium*, para los cuales estos son <1,0%. La distancia entre *M. molossus* y *Molossus* sp. es 2,5%, lo cual es indicativo de variación interespecífica.

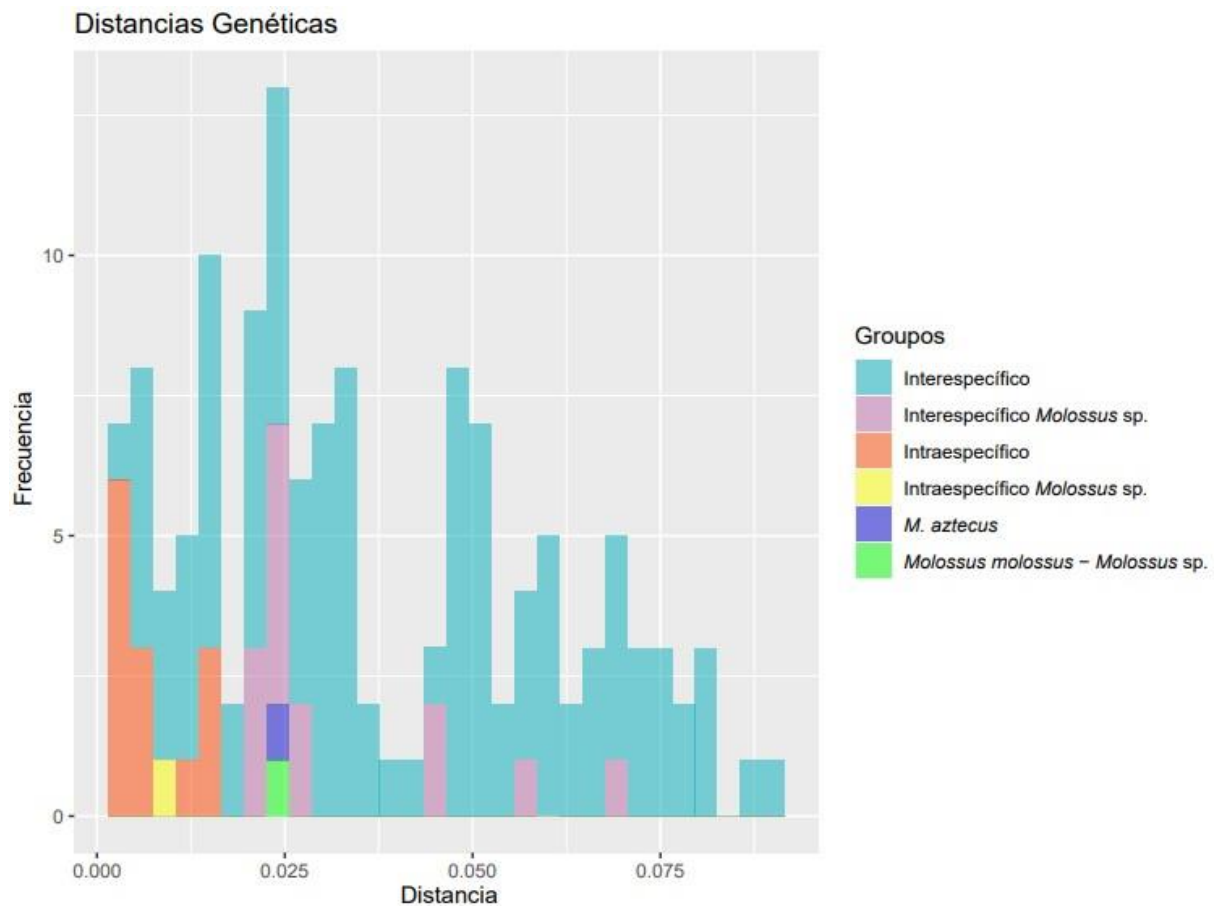


Figura 9. Histograma de las distancias intraespecíficas e interespecíficas basadas en el conjunto de marcadores concatenados (β -fib, COI y cyt b). Los diferentes colores indican: distancias intraespecíficas (naranja), distancias interespecíficas (celeste), distancia entre *Molossus* sp. y otras especies (lila), distancias dentro de *Molossus* sp. (amarillo), distancia intraespecífica de *M. aztecus* (azul) y distancia entre *M. molossus* y *Molossus* sp. (verde).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La delimitación de especies dentro del género *Molossus* nunca fue un trabajo sencillo. La identificación a nivel de especie se ha basado tradicionalmente en la morfología externa y medidas biométricas (Schmieder et al., 2015). Pero esta metodología no está exenta de errores debido a la discrepancia entre la divergencia morfológica y genética, lo que a menudo conduce a la subestimación en el número de especies (Loureiro et al., 2019) y a la asignación incorrecta de individuos, sobre todo a *M. molossus*, cuyo rango de distribución es el más amplio y está superpuesto con el de otras especies. El uso de técnicas moleculares permitió dar cuenta de la presencia de especies crípticas y de especies muy diferenciadas morfológicamente, pero con baja diferenciación genética. Asimismo, la inestabilidad taxonómica en este grupo se tradujo en errores en el registro de las especies, muchas de las cuales quedaron desactualizadas en GenBank. En este trabajo frecuentemente nos enfrentamos a errores de anotación debido a estos

motivos, sobre todo porque muchas de las secuencias empleadas para los análisis filogenéticos no corresponden a las utilizadas en el trabajo de Loureiro y colaboradores (2020), por lo cual es muy difícil aseverar que el nombre de especie que porta la secuencia en GenBank sea el correcto. Este inconveniente se resolvió basándonos tanto en la filogenia de *SNPs* (Figura 1), como en las distribuciones geográficas actualizadas de cada especie (Figura 3), así como en las coincidencias y diferencias entre las filogenias de los marcadores individuales (Figuras 4, 5 y 6).

Dentro del género *Molossus* se encuentran varios grupos de especies crípticas. *Molossus rufus*, *M. fluminensis* y *M. nigricans* conforman uno de estos, anteriormente englobados en *M. rufus* (Dolan, 1989; Loureiro et al., 2018a). Lo mismo se da entre *M. molossus*, *M. fentoni*, *M. verrilli* y *M. milleri*, que antes estaban bajo el nombre de *M. molossus* (Loureiro et al., 2019). Otro caso de especies crípticas es el de *M. bondae* y *M. currentium*, anteriormente sinonimizadas bajo el nombre de *M. currentium* (López-González et al., 2005). Más recientemente, se describió *M. melini* diferenciándose de *M. molossus* (Montani et al., 2021). En este trabajo se pudo distinguir un nuevo linaje críptico: *Molossus* sp., cuya distinción del clado *M. molossus* se debe a que el primero no agrupa con la subespecie *M. molossus daulensis*, como lo hace *M. molossus* en la filogenia obtenida por *RAD-Sequencing*. Todos los especímenes dentro del clado denominado *Molossus* sp. están anotados como *M. molossus* en GenBank, y en el caso de las secuencias obtenidas para este trabajo, la asignación a esa especie fue hecha en base a su morfología externa. El gran parecido morfológico, y la escasa similitud genética da la pauta para asumir a *M. molossus* y *Molossus* sp. como especies crípticas. Se pensó también que *Molossus* sp. pudiera tratarse de *M. currentium*, del cual apenas contamos con dos representantes para el gen citocromo oxidasa I, pero ninguna de las secuencias de *Molossus* sp. se agrupó con las secuencias asignadas a *M. currentium*, por lo que se descartó esa posibilidad. Todo esto indica que se trata de una especie críptica, distinta de *M. molossus*, y que posee una amplia distribución geográfica, solapante con la de todas las especies de Argentina.

La filogenia obtenida por el método de marcadores concatenados recupera la mayoría de las especies como monofiléticas, al igual que el enfoque *RAD-Sequencing*. Pero los árboles obtenidos con ambos abordajes muestran diferencias en las relaciones interespecíficas. Si bien para el análisis de los genes concatenados se utilizaron dos marcadores mitocondriales y uno nuclear, es de esperar que los genes mitocondriales (citocromo b y citocromo oxidasa I) tengan mayor influencia sobre el árbol de loci concatenados (Dool et al., 2016). Los genes mitocondriales tienen en promedio más sitios informativos que los loci nucleares y tasas de

sustitución más altas, por lo que la evolución del genoma mitocondrial es más rápida (Hebert et al. 2004). Dentro de las posibles causas que explican las diferencias entre las relaciones interespecíficas están la falta de representación de algunos taxones, ya que aún con las quimeras no se logró contar con secuencias para los tres marcadores en todos los casos; otras posibles causas de discrepancia son el limitado número de marcadores, el reparto incompleto de linajes y la introgresión.

El reparto incompleto de linajes (*incomplete lineage sorting*) puede explicar, al menos parcialmente, las diferencias en las relaciones interespecíficas (Dool et al., 2016) respecto a la filogenia obtenida por *RAD-sequencing* (Figura 1) y las diferencias entre la de los genes mitocondriales concatenados y la nuclear, ya que este proceso puede producir filogenias conflictivas entre marcadores de segregación independiente (Kubatko & Degnan, 2007; Warnow, 2015). También conocido como coalescencia profunda, este es un fenómeno ubicuo, ya que no depende de eventos moleculares específicos sino de las propiedades intrínsecas de cada población, a saber, de la tasa de deriva génica. A la inversa, cuando el reparto de linajes se da de forma completa, se espera que las relaciones entre los árboles de genes y los árboles de especies coincidan. La especie *M. fentoni* constituye un claro ejemplo de reparto de linajes completo, dado que su ubicación en la filogenia coincide en los árboles obtenidos por los marcadores individuales, el obtenido por la concatenación de los marcadores y el generado por *RAD-Sequencing*. Lo mismo ocurre con *M. verrilli* y *M. milleri*, que no solo se recuperan como recíprocamente monofiléticos en todos los casos, sino que también mantienen su relación como grupos hermanos.

La hibridación seguida de introgresión también representa una fuente biológica de conflicto en la identificación de especies, que puede afectar tanto a nivel molecular como morfológico. La introgresión puede afectar la monofilia a nivel de especie mediante la introducción de alelos más allá de los límites de las especies (Harrison & Larson, 2014). Las tasas de introgresión mitocondrial y nuclear difieren con frecuencia, y algunos taxones muestran sesgos para los genes mitocondriales y otros para los genes nucleares. El sesgo hacia la introgresión mitocondrial es más frecuente en los sistemas de determinación del sexo XY, como es el caso de los murciélagos (Patten et al., 2015). En el caso de la especie *M. aztecus*, hay secuencias que se ubican en linajes muy distantes entre sí, y que no corresponderían a un error de anotación sino al resultado de un proceso biológico. Por medio del árbol obtenido a partir de citocromo b (Figura 6) se pudieron detectar tres linajes de *M. aztecus*. En la Figura 8 diferenciamos como linaje A, a los especímenes de Brasil que son grupo hermano de *M. melini*, B para un individuo también de Brasil pero que diverge de un grupo compuesto

mayoritariamente por *M. rufus*, y C para un espécimen de México que se agrupa con *M. bondae* y *M. pretiosus* (Figura 6). En el árbol de marcadores concatenados los linajes A y B agrupan juntos, pero las secuencias del linaje A parecen acumular muchas diferencias, lo que se ve reflejado en el largo de ramas. Esto podría interpretarse como el resultado de hibridación e introgresión genética de un linaje emparentado con *M. melini* a *M. aztecus*, ya que los mismos fueron identificados como esta última especie. Como fue mencionado, es más probable que ocurra una introgresión mitocondrial que una nuclear, además, en el árbol de β -fibrinógeno los especímenes pertenecientes a los linajes A y B agrupan juntos, aunque con baja probabilidad posterior. Esto sugiere que al menos parte del genoma nuclear (y la morfología externa), de estos individuos son *M. aztecus*, y que lo introgresado es el genoma mitocondrial en el linaje A. Otro caso de introgresión podría explicar el hecho de que las secuencias A1, A2, A3, A4, A5 y A6, que en la filogenia mitocondrial (Figura 7) forman parte del grupo *M. molossus* de Sudamérica, en el árbol de los tres marcadores concatenados (Figura 8) aparezcan como parte del clado *Molossus* sp.

Como se sabe, hasta el momento hay cuatro especies de *Molossus* presentes en Argentina: *M. molossus*, *M. fluminensis*, *M. currentium* y *M. melini*. Esta última especie fue recientemente descrita, con una distribución restringida a su localidad tipo en la provincia de Santa Fe. Sin embargo, hace poco su distribución espacial fue extendida hasta Paraná, provincia de Entre Ríos, lo que significó también una extensión a una segunda ecorregión (Pavé et al., 2023). En este trabajo, se identificó como *M. melini* a individuos provenientes de la provincia de Buenos Aires, catalogados anteriormente como *M. molossus* por medio de su morfología externa. Esto extendería la distribución geográfica de la especie, a una tercera provincia, lo que significa un aporte crucial para el estudio y la conservación de una especie poco conocida y geográficamente muy restringida. Algo similar ocurre con *M. fluminensis*, cuyo rango geográfico debería extenderse al norte de Santa Fe de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla suplementaria 2, Figura Suplementaria 4).

En esta tesis brindamos información sobre la diversidad de las especies de *Molossus* presentes en Argentina, incluida la identificación de un linaje críptico, así como aportamos información para ampliar la distribución geográfica de dos de estas especies. Además, generamos un *dataset* de secuencias de referencia de todo el género que, junto con información geográfica y morfológica, permite identificar a qué especie corresponde un individuo perteneciente al género. Este aporte es fundamental, ya que permite a investigadores, personal que trabaja en colecciones y también a laboratorios de vigilancia epidemiológica, la correcta identificación de especies, que es muy difícil en el caso de especies crípticas. Se espera que

estos resultados contribuyan a tener mejor información para la conservación de estos murciélagos, para poder caracterizar hospedadores frente a un eventual brote, así como para el estudio de la biología de este grupo de murciélagos.

REFERENCIAS

- Adobe Inc. (2019). *adobe ilustrador* Obtenido de <https://adobe.com/products/illustrator>
- Agnarsson, I., Kuntner, M., & May-Collado, L. J. (2010). Dogs, cats, and kin: A molecular species-level phylogeny of Carnivora. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(3), 726-745. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.033>
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716-723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Allen J. A. (1904). New bats from tropical America, with note on species of Otopterus. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 20: 227-237. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/166469>
- Allen, J. A. (1906). Mammals from the states of Sinaloa and Jalisco, Mexico, collected by *JH Batty during 1904 and 1905* (Vol. 22). Knickerbocker Press.
- Allen, J. A. (1908). Mammalogical notes. 1-6. *Bulletin of the AMNH*; v. 24, article 29.
- Allen J. A. (1916). New mammals collected on the Roosevelt Brazilian Expedition. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 35: 523-30. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/167523>
- Barquez, R., Rodriguez, B., Miller, B. & Diaz, M. (2015). *Molossus molossus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T13648A22106602. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20154.RLTS.T13648A22106602.en>.
- Barquez, R. & Diaz, M. (2016). *Molossus currentium*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T88087340A22107231. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20163.RLTS.T88087340A22107231>.
- Caraballo, D. A., Montani, M. E., Martínez, L. M., Antoniazzi, L. R., Sambrana, T. C., Fernández, C., Cisterna, D. M., Beltrán, F. J., & Colombo, V. C. (2020). Heterogeneous taxonomic resolution of cytochrome b gene identification of bats from Argentina: Implications for field studies. *PLOS ONE*, 15(12), e0244750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244750>
- Caraballo, D. A., Sabio, M. S., Colombo, V. C., Piccirilli, M. G., Vico, L., Hirmas Riade, S. M., Campos, J., Martínez, G., Beltrán, F., Baumeister, E., & Cisterna, D. M. (2022). The Role of Molossidae and Vespertilionidae in Shaping the Diversity of Alphacoronaviruses in the Americas. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e03143-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03143-22>
- Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R. P., Mace, G. M., & Wayne, R. K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(7), 290-295. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01876-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01876-0)
- Decker, S. K., Krejsa, D. M., Lindsey, L. L., Amoateng, R. P., & Ammerman, L. K. (2020). Updated distributions of three species of yellow bat (*Dasypterus*) in Texas based on specimen records. *Western Wildlife*, 7, 2-8.
- Díaz, M. M., & Bárquez, R. M. (2019). *Molossus rufus*. Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. (0 ed.). Lista Roja de los mamíferos de Argentina. <https://doi.org/10.31687/SaremLR.19.109>
- Dolan, P. G. (1989). Systematics of Middle American mastiff bats of the genus *Molossus*. Special Publications, the Museum, Texas Tech University, 29, 1–71. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.142636>
- Dool, S. E., Puechmaile, S. J., Foley, N. M., Allegrini, B., Bastian, A., Mutumi, G. L., Maluleke, T. G., Odendaal, L. J., Teeling, E. C., & Jacobs, D. S. (2016). Nuclear introns outperform mitochondrial DNA in inter-specific phylogenetic reconstruction: Lessons from horseshoe bats (Rhinolophidae: Chiroptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 97, 196-212. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.01.003>
- Eger JL. 2008. Family Molossidae. Pp: 399-439, en: *Mammals of South America. Volume 1. Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats* (AL Gardner, ed.). The University of Chicago Press, Chicago, USA, 669 pp.
- Felsenstein J. (2004). *Inferring phylogenies*. Sunderland: Sinauer.
- Gager, Y., Tarland, E., Lieckfeldt, D., Ménage, M., Botero-Castro, F., Rossiter, S. J., ... Dechmann, D. K. N. (2016). The Value of Molecular vs. Morphometric and Acoustic Information for Species Identification Using Sympatric Molossid Bats. *PLOS ONE*, 11(3), e0150780. doi: 10.1371/journal.pone.0150780
- Geoffroy Saint-Hilaire, É. (1805). Mémoire sur un nouveau genre de mammifères nommé Hydromys. *Annales de Musée National d'Histoire Naturelle*, Paris, 6, 81-90.
- González-Ruiz, N., Ramírez-Pulido, J., & Arroyo-Cabrales, J. (2011). A new species of mastiff bat (Chiroptera: Molossidae: *Molossus*) from Mexico. *Mammalian Biology*, 76(4), 461-469. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.06.004>
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).

- Halpin, K., Young, P. L., Field, H. E., & Mackenzie, J. S. (2000). Isolation of Hendra virus from pteropid bats: A natural reservoir of Hendra virus. *Journal of General Virology*, 81(8), 1927-1932. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1927>
- Harrison, R. G., & Larson, E. L. (2014). *Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries*. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795–809. doi:10.1093/jhered/esu033
- Hasegawa M, Kishino H, and Yano T, (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22:160–174
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hurst, G. D. D., & Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525–1534. doi:10.1098/rspb.2005.3056.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. N. (2007). *Universal primer cocktails for fish DNA barcoding*. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544–548. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x
- Johnson, D. H. (1952). A new name for the Jamaican bat *Molossus fuliginosus* Gray. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 65, 197-198.
- Jukes T. H., Cantor C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, ed.H. H. Munro, Vol. III, pp. 21–132. New York: Academic Press.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.
- Kubatko, L. S., & Degnan, J. H. (2007). Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Systematic biology*, 56(1), 17-24.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lataste F. (1891). Description d'une espèce nouvelle ou mal connue de chauve-souris. *Annali del Museo civico di storia naturale di Genova* 2: 658-664.
- Leroy, E. M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J. T., Gonzalez, J.-P., & Swanepoel, R. (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, 438(7068), 575-576. <https://doi.org/10.1038/438575a>
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S., & Wang, L.-F. (2005). Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science*, 310(5748), 676-679. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Lindsey, L. L., & Ammerman, L. K. (2016). Patterns of genetic diversification in a widely distributed species of bat, *Molossus molossus*.
- López-González, C., Presley, S.J., (2005). Taxonomic status of *Molossus bondae* J. A. Allen, 1904 (Chiroptera: Molossidae), with description of a new subspecies. *J. Mammal.* 82, 760. Doi:10.1644/15451542(2001)082 < 0760:tsombj > 2.0.co;2.
- Loureiro, L. O., R. Gregorin, and F. A. Perini. 2018a. Diversity, morphological phylogeny, and distribution of bats of the genus *Molossus* (Chiroptera, Molossidae) in Brazil. *Zoosystema* 40:425–452.
- Loureiro, L. O., B. K. Lim, and M. D. Engstrom. 2018b. A new species of mastiff bat (Chiroptera, Molossidae, *Molossus*) from Guyana and Ecuador. *Mammalian Biology* 90:10–21.
- Loureiro, L. O., Engstrom, M., Lim, B., González, C. L., & Juste, J. (2019). Not All *Molossus* are Created Equal: Genetic Variation in the Mastiff Bat Reveals Diversity Masked by *Conservative Morphology*. *Acta Chiropterologica*, 21(1), 51. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2019.21.1.004>
- Loureiro, L. O., Engstrom, M. D., & Lim, B. K. (2020). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) provide unprecedented resolution of species boundaries, phylogenetic relationships, and genetic diversity in the mastiff bats (*Molossus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 143, 106690. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106690>
- Nylander, J. A. A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., & Nieves-Aldrey, J. (2004). Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. *Systematic Biology*, 53(1), 47-67. <https://doi.org/10.1080/10635150490264699>
- Martins, F. M., Ditchfield, A. D., Meyer, D., & Morgante, J. S. (2007). Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(4), 372-378.
- May-Collado, L., & Agnarsson, I. (2006). Cytochrome b and Bayesian inference of whale phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(2), 344-354. doi: 10.1016/j.ympev.2005.09.019

- Miller G. S. Jr. (1902). Twenty new American bats. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 54: 389-412.
- Miller, G. S. (1913). Notes on the bats of the genus *Molossus*. *Proceedings of the U.S. National Museum* 46:85–92.
- Miller, B., Reid, F., Arroyo-Cabrales, J., Cuarón, A.D. & de Grammont, P.C. (2016). *Molossus sinaloae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T13650A22106433. doi: 10.2305/IUCN.UK.20162.RLTS.T13650A22106433.
- Montani, M. Eugenia; Díaz, M. Mónica; Bárquez, Rubén M. (2019). *Molossus molossus*. En: SAYDS–SAREM (eds.) *Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. Lista Roja de los mamíferos de Argentina*. Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>
- Montani, M. E., Díaz, M. M., & Bárquez, R. M. (2019a). *Molossus currentium*. *Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción*. (0 ed.). Lista Roja de los mamíferos de Argentina. <https://doi.org/10.31687/SaremLR.19.107>
- Montani, M. E., Díaz, M. M., & Bárquez, R. M. (2019b). *Molossus molossus*. *Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción*. (0 ed.). Lista Roja de los mamíferos de Argentina. <https://doi.org/10.31687/SaremLR.19.108>
- Montani, M. E., Tomasco, I. H., Barberis, I. M., Romano, M. C., Barquez, R. M., & Díaz, M. M. (2021). A new species of *Molossus* (Chiroptera: Molossidae) from Argentina. *Journal of Mammalogy*, 102(5), 14261442. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyab078>
- Pallas, P. S. (1766). Miscellanea zoologica quibus novae imprimis atque obscurae animalium species describuntur et observationibus iconibusque illustrantur. *Hague Comitum: P. van Cleef* xii+224 p.
- Patten, M. M., Carioscia, S. A., & Linnen, C. R. (2015). Biased introgression of mitochondrial and nuclear genes: a comparison of diploid and haplodiploid systems. *Molecular ecology*, 24(20), 5200-5210. Patterson, J., Chamberlain, B., & Thayer, D. (2004). Finch TV Version 1.4.0. Published by authors.
- Pavé, R., Schierloh, P., Chambi, M., Piccirilli, M. G., Ulman, S., Saavedra, S., Cisterna, D. M., & Caraballo, D. A. (2023). Morphological and molecular analyses confirm the presence of the newly described bat species *Molossus melini* in the Espinal ecoregion from Argentina. *Mammal Research*. <https://doi.org/10.1007/s13364-023-00679-1>
- Racey, P. A., Hutson, A. M., & Lina, P. H. C. (2013). Bat Rabies, Public Health and European Bat Conservation: Bat Rabies, Public Health and Conservation. *Zoonoses and Public Health*, 60(1), 58-68. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01533.x>
- Rahman, S. A., Hassan, S. S., Olival, K. J., Mohamed, M., Chang, L.-Y., Hassan, L., Saad, N. M., Shohaimi, S. A., Mamat, Z. C., Naim, M. S., Epstein, J. H., Suri, A. S., Field, H. E., Daszak, P., & the Henipavirus Ecology Research Group. (2010). Characterization of Nipah Virus from Naturally Infected Pteropus vampyrus Bats, Malaysia. *Emerging Infectious Diseases*, 16(12), 1990-1993. <https://doi.org/10.3201/eid1612.091790>
- Rambaut A. (2018). FigTree version 1.4.4. Computer program and documentation distributed by the author. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901-904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Reeder, S. A., and R. D. Bradley. (2007). Phylogenetic relationships of neotomine-peromyscine rodents using DNA sequences from beta fibrinogen and cytochrome b. Pp.883–900, in *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson* (D. A. KELT, E. P. LESSA, J. A. SALAZAR-BRAVO, and J. L. PATTON, eds.). University of California *Publications in Zoology*, 134: 981 pp.
- Reid, F. (2009). *A field guide to the mammals of Central America & Southeast Mexico (2nd ed)*. Oxford University Press.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Salmier, A., Tirera, S., De Thoisy, B., Franc, A., Darcissac, E., Donato, D., Bouchier, C., Lacoste, V., & Lavergne, A. (2017). Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLOS ONE*, 12(11), e0186943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186943>
- Sampaio, E., Lim, B. & Peters, S. (2017). *Molossus coibensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T102208365A22106904. doi: 10.2305/IUCN.UK.20172.RLTS.T102208365A22106904.
- Saussure M. H. (1860). *Revue et Magasin de Zoologie pure et appliquée*, Paris, ser. 2, 12: 285.

- Schlottau, K., Eggerbauer, E., Freuling, C. M., Beer, M., Müller, T., & Hoffmann, B. (2020). Rapid molecular species identification of indigenous bats from Germany for surveillance purposes. *Infection, Genetics and Evolution*, 78, 104140. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104140>
- Schmieder, D. A., Benítez, H. A., Borissov, I. M., & Fruciano, C. (2015). Bat Species Comparisons Based on External Morphology: A Test of Traditional versus Geometric Morphometric Approaches. *PLOS ONE*, 10(5), e0127043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127043>
- Shaw, G (1800). *General zoology or systematic natural history: Mammalia*. G. Kearsley, London, United Kingdom 1(part 1):1–248.
- Simmons N. B. (2005). Order Chiroptera, in Wilson E., Reeder D.M. (eds), *Mammals species of the World: a taxonomic and geographic reference*. Volume 3. The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 312529.
- Solari, S. (2016). *Molossus alvarezi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T88087329A88087332. doi: 10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T88087329A88087332.en.
- Solari, S. (2017). *Molossus bondae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T88087507A88087516. doi: 10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T88087507A88087516.en.
- Solari, S. (2019). *Molossus pretiosus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T13649A22106312. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20191.RLTS.T13649A22106312.en>. Accessed on 16 August 2023
- Sodré, M. M., Gama, A. R. D., & Almeida, M. F. D. (2010). Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(2), 75-81. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000200003>
- Spinks Phillip Q, Shaffer H. Bradley, Conflicting Mitochondrial and Nuclear Phylogenies for the Widely Disjunct Emys (Testudines: Emydidae) Species Complex, and What They Tell Us about Biogeography and Hybridization, *Systematic Biology*, Volume 58, Issue 1, February 2009, Pages 1–20, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp005>
- Swofford, D.L., (2003). PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tavaré S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect. Mathemat. Life Scis.* 17:57–86.
- Taylor, P. J., Stoffberg, S., Monadjem, A., Schoeman, M. C., Bayliss, J., & Cotterill, F. P. D. (2012). Four New Bat Species (*Rhinolophus hildebrandtii* Complex) Reflect Plio-Pleistocene Divergence of Dwarfs and Giants across an Afrotropical Archipelago. *PLoS ONE*, 7(9), e41744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041744>
- Taylor, P., Lim, B., Pennay, M., Kinston, T., Loureiro, L., & Moras, L. (2019). Family Molossidae. Genus *Molossus*. In D. E., Wilson, & R. A., Mittermeier (Eds.), *Handbook of Mammals of the World* (pp. 598–673). Barcelona, Spain: Lynx Edicions
- Thomas O. (1901). On a collection of bats from Paraguay. *Annals and Magazine of Natural History* 7 (8): 435443.
- Thomas O (1915) On bats of genus *Promops*. *The Annals and Magazine of Natural History: Zoology, Botany, and Geology* (8th Series) 16 (91): 61–64.
- Trontelj, P., & Fišer, C. (2009). Cryptic species diversity should not be trivialised. *Systematics and biodiversity*, 7(1), 1-3.
- Uieda, W., Harmani, N., & Silva, M. (1995). Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 29, 393-397.
- Warnow, T. (2015). Concatenation analyses in the presence of incomplete lineage sorting. *PLoS currents*, 7.
- Zharkikh, A. (1994). Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 39, 315-329.

MATERIAL SUPLEMENTARIO - APÉNDICE:

Tabla Suplementaria 1. Individuos/quimeras usadas para el análisis de marcadores concatenados. El país, voucher y accession son los establecidos por GenBank. Las letras indican el linaje y los números la cantidad de individuos representativos de cada linaje.

Especie	Voucher	País	Bfbf-Accession	Cytb-Accession	COI-Accession	Linaje	individuo/quimera
<i>M. molossus daulensis</i>	ASK7779	Perú	–	KM387366	–	A	1
	ROM:Mamm 125541	Perú	–	–	KX960001		1
	ROM58756	Perú	–	MH058075	–		2
	ROM:Mamm 125597	Perú	–	–	KX960008		2
	ROM58713	Perú	–	MH058074	–		3
	ROM:Mamm 125554	Perú	–	–	KX960006	3	
<i>M. molossus molossus</i>	ROM 104018	Ecuador	MF436730	–	JF448961	A	1
	ROM 118785	Ecuador	MF436729	–	JF448972		2
	ROM 108127	Guyana	MF436728	–	JF455051		3
	ROM 117660	Surinam	MF436718	–	EU096792		4
	ROM 122253	Perú	MF436721	–	KX960029		5
	ROM 113899	Surinam	MF436719	–	JF447683		6
	MSB 210952	Bolivia	MF436733	MH058054	–		7
<i>M. pretiosus</i>	TTU 12343	Nicaragua	MH410746	MH410735	–	A	1
	TTU29780	Nicaragua	–	–	MH185168		1
	TTU 12565	Costa Rica	MH410747	MH410737	–	B	1
<i>M. fluminensis</i>	–	–	–	–	–	–	–
<i>M. nigricans</i>	ROM 101278	El Salvador	MF436713	–	JF446515	A	1
	ROM35465	El Salvador	–	MH058081	–		1
	ROM 75535	México	MF436714	–	–		2
	ROM30001	México	–	MH058088	–		2
	ROM 96186	México	–	–	JF447269		2
<i>M. rufus</i>	ROM F39068	Guyana	MF436712	–	JF455099	A	1
	ROM39068	Guyana	–	MH058082	–		1
	ROM 174945	Perú	MF436715	–	–		2
	ROM53800	Perú	–	MH058084	–		2
	ROM:Mamm 122090	Perú	–	–	KX960031		2
<i>M. coibensis</i>	ROM 122087	Perú	MF436737	–	KX960018	A	1
	ROM53797	Perú	–	MH058049	–		1
	ROM37882	Ecuador	–	MH058048	–		2
	ROM 105688	Ecuador	–	–	JF448946	B	2
	ROM43038	Venezuela	–	MH058078	–		1
	ROM 107901	Venezuela	–	–	JF447832		1
	ACUNHC313	Venezuela	–	MH058093	–		2
ROM 107900	Venezuela	–	–	JF447833	2		
<i>M. sinaloae</i>	UNAM1413	México	–	MH058095	–	A	1
	ECO-SC-M3079	México	–	–	MH185179		1
	UNAM676	México	–	MH058094	–		2
	ECO-SC-M2044	México	–	–	MH185182		2
<i>M. aztecus</i>	CMUFLA 1797	Brasil	MH410742	MH410731	–	A	1
	CMUFLA 400	Brasil	MH410741	MH410729	–		2
	CMUFLA 1145	Brasil	MH410743	MH410730	–	B	1
<i>M. currentium</i>	CRD2494	México	–	MH058047	MH185133	C	1
	TK61016	Paraguay	–	–	MH185139	A	1
	TK61025	Paraguay	–	–	MH185138	B	1
<i>M. bondae</i>	TTU 134662	Ecuador	MH410744	MH410732	–	A	1
	20120811_151	Panamá	–	–	MG191810		1
	TTU 134664	Ecuador	MH410745	MH410733	–		2
	20120608_68	Panamá	–	–	MG191901		2
<i>M. melini</i>	MG-ZV-M:338	Santa Fe	–	MZ153322	MZ262336	A	1
	MG-ZV-M:339	Santa Fe	MZ153324	MZ153323	MZ262337		2
<i>M. milleri</i>	ROM 120796	Jamaica	MF436726	–	KT023205	A	1
	ROM53497	Jamaica	–	MH058067	–		1
	ROM 120821	Jamaica	MF436725	–	KT023211		2
	ROM53522	Jamaica	–	MH058070	–		2
<i>M. verrilli</i>	ROM 125387	República Dominicana	MF436732	–	KX355065	A	1
	ROM59247	República Dominicana	–	MH058057	–		1
	ROM 120848	República Dominicana	MF436731	–	–		2
	ROM59248	República Dominicana	–	MH058058	–		2
	ROM:MAMM 125386	República Dominicana	–	–	KX355064		2
<i>M. alvarezii</i>	ROM F49121	México	MH410739	MH410726	MH185125	A	1
	ROM F49134	México	MH410740	MH410727	MH185128		2
<i>M. fentoni</i>	ROM 109176	Guyana	MF436735	–	EF080483	A	1
	ROM40722	Guyana	–	MH058051	–		1
	ROM 122583	Guyana	MF436734	–	KX960041		2
	ROM59101	Guyana	–	MH058053	–		2
<i>Promops centralis</i>	ROM 106035	Ecuador	MF436741	–	JF444940	A	1
	ROM40289	Ecuador	–	MH058090	–		1
	ROM 106020	Ecuador	HQ671615	–	JF449067		2
	ROM52326	Ecuador	–	MH058091	–		2
<i>Eumops auripendulus</i>	ROM 108917	Guyana	MF436740	–	EF080345	A	1
	ROM43897	Guyana	–	MH058045	–		1
	ROM 108918	Guyana	MF436739	–	EF080349		2
	ROM 43898	Guyana	–	MH058046	–		2

Tabla Suplementaria 2. Muestra el cambio (o no) en la identificación de las muestras obtenidas para este trabajo.

Muestra	Identificación inicial	Identificación post-filogenia
P011	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
P105	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.
P210	<i>M. molossus</i>	<i>M. melini</i>
P249	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
P308	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
P500-21	<i>M. molossus</i>	<i>M. melini</i>
P565	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
P772	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
P961	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
390-M	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
512-M	<i>M. rufus</i>	<i>M. fluminensis</i>
A355-M	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
A457-M	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.
A588-M	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.
A589-M	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.
A635-M	<i>M. melini</i>	<i>M. melini</i>
129	<i>Molossus</i> sp.	<i>Molossus</i> sp.
130	<i>Molossus</i> sp.	<i>M. melini</i>
177	<i>Molossus</i> sp.	<i>M. molossus</i>
190	<i>Molossus</i> sp.	<i>M. molossus</i>
192	<i>Molossus</i> sp.	<i>Molossus</i> sp.
193	<i>Molossus</i> sp.	<i>Molossus</i> sp.
194	<i>Molossus</i> sp.	<i>Molossus</i> sp.
196	<i>Molossus</i> sp.	<i>M. melini</i>
197	<i>Molossus</i> sp.	<i>Molossus</i> sp.
198	<i>Molossus</i> sp.	<i>Molossus</i> sp.
199	<i>Molossus</i> sp.	<i>M. melini</i>
MFA-ZV-M: 1413	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
MFA-ZV-M: 1414	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.
MFA-ZV-M: 1423	<i>M. rufus</i>	<i>M. fluminensis</i>
MFA-ZV-M: 1431	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
MFA-ZV-M: 1435	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
MG-ZV-M: 176	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.
MG-ZV-M: 208	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.
MG-ZV-M: 225	<i>M. molossus</i>	<i>M. melini</i>
MG-ZV-M: 296	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.
AMA-10	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
AMA-15	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
AMA-26	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
AMA-65	<i>M. molossus</i>	<i>M. molossus</i>
AMA-107	<i>M. fluminensis</i>	<i>M. fluminensis</i>
AMA-114	<i>M. fluminensis</i>	<i>M. fluminensis</i>
AMA-154	<i>M. fluminensis</i>	<i>M. fluminensis</i>
AMA-155	<i>M. molossus</i>	<i>Molossus</i> sp.

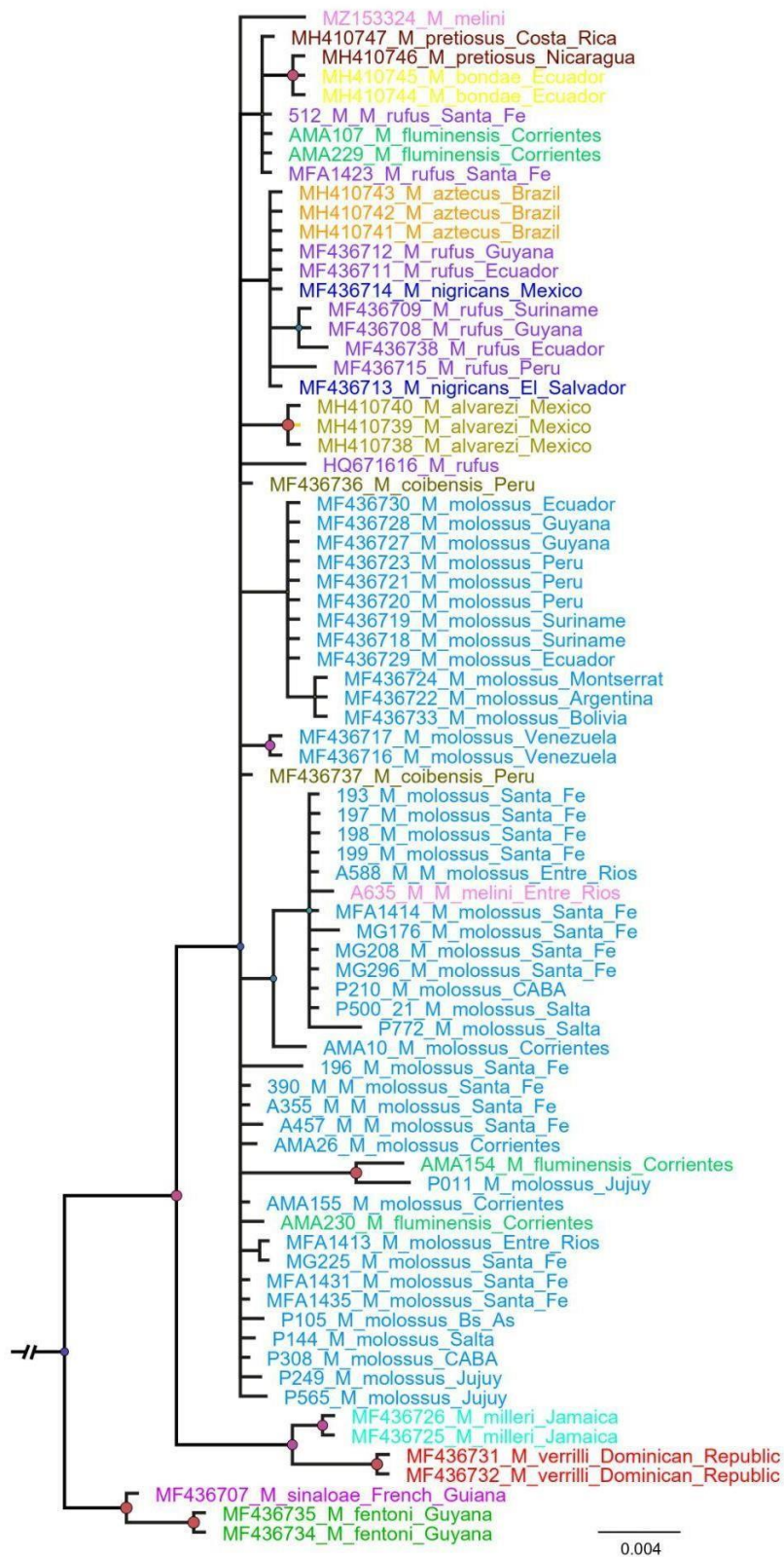
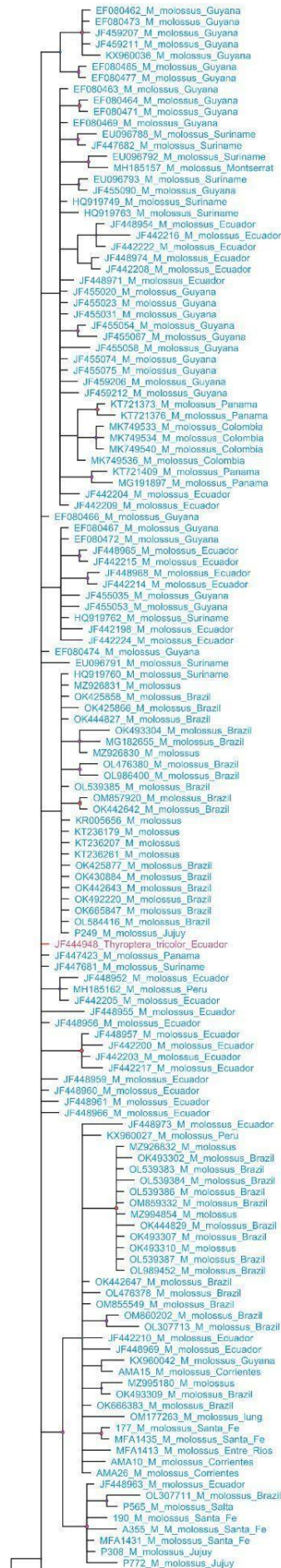
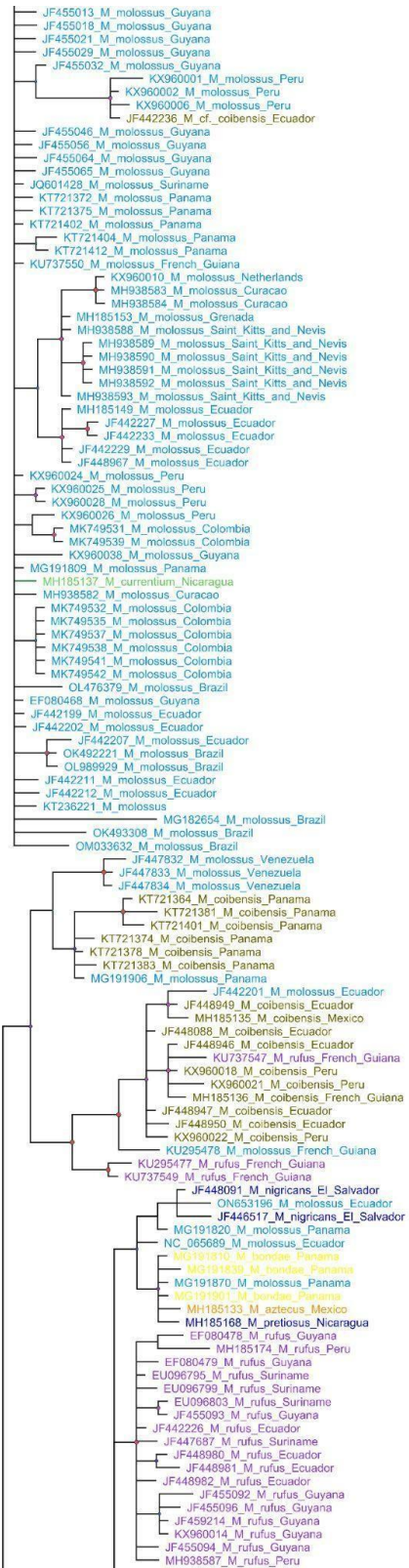
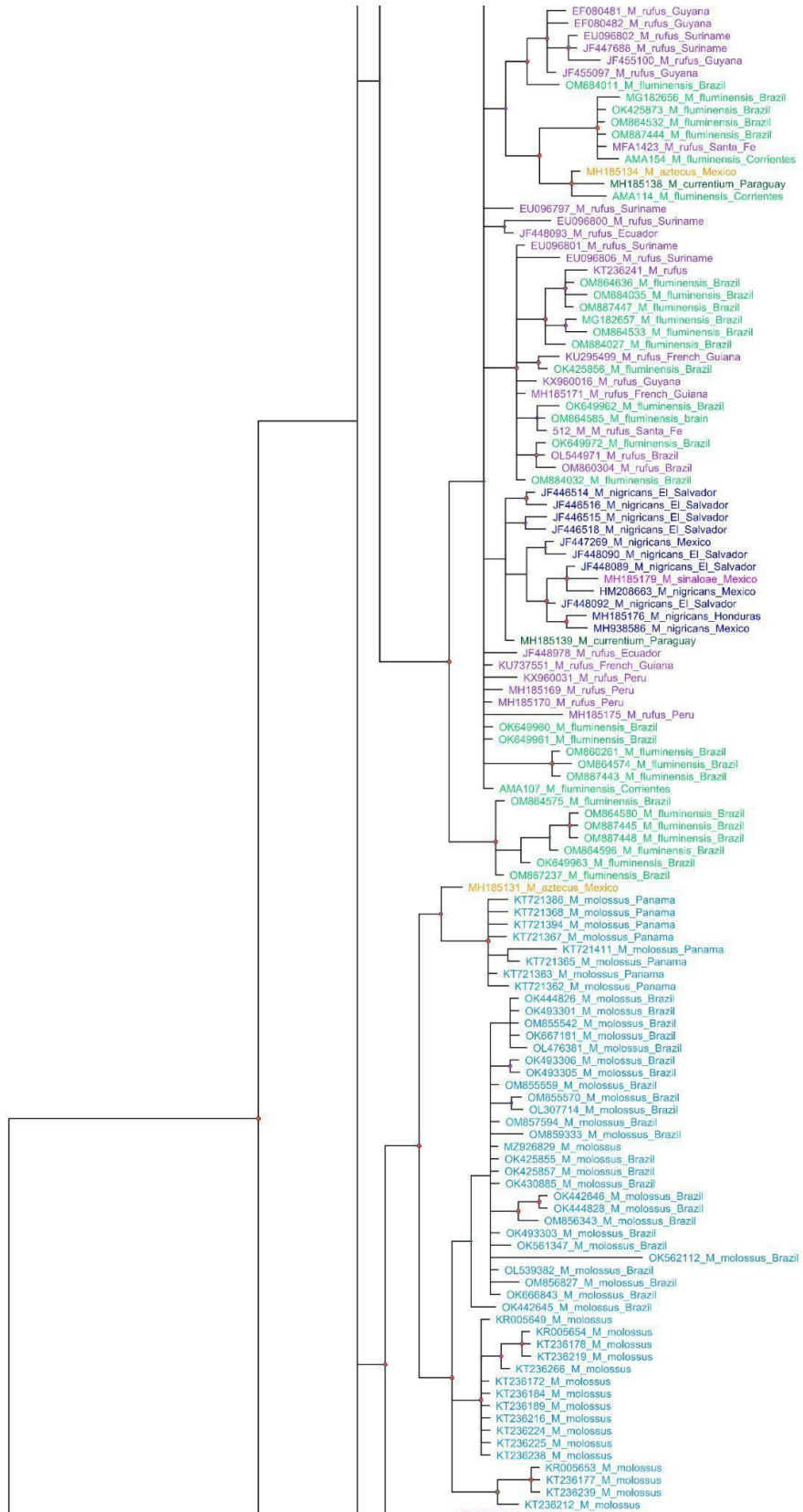


Figura Suplementaria 1. Árbol de consenso obtenido a partir del intrón 7 del gen β -fibrinógeno. Los nombres corresponden a la asignación determinada por morfología externa y a la provista por GenBank. La escala está en sustituciones por sitio.







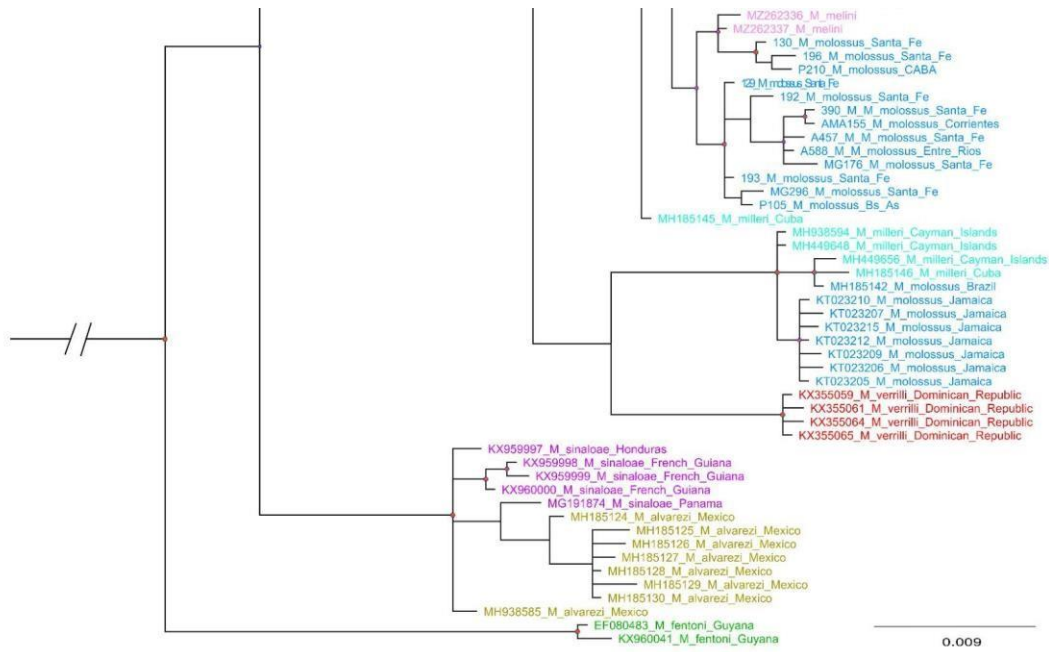
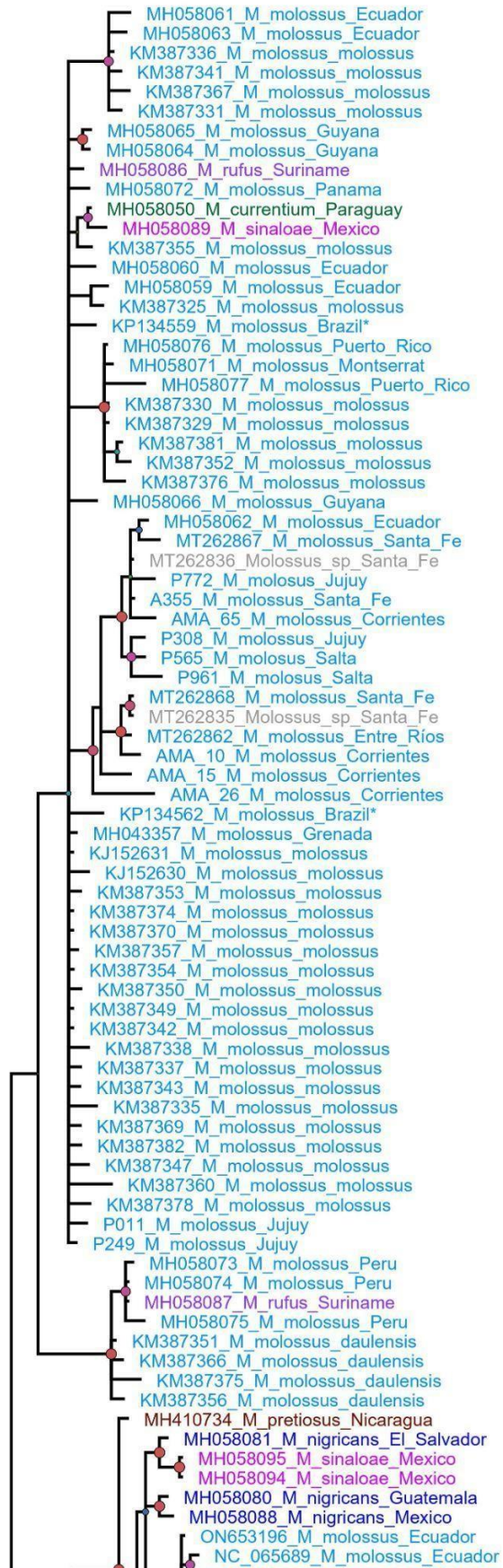


Figura Suplementaria 2. Árbol consenso de mayoría obtenido a partir del gen mitocondrial citocromo oxidasa 1. Los nombres corresponden a la asignación determinada por morfología externa y a la provista por GenBank. La escala está en sustituciones por sitio.



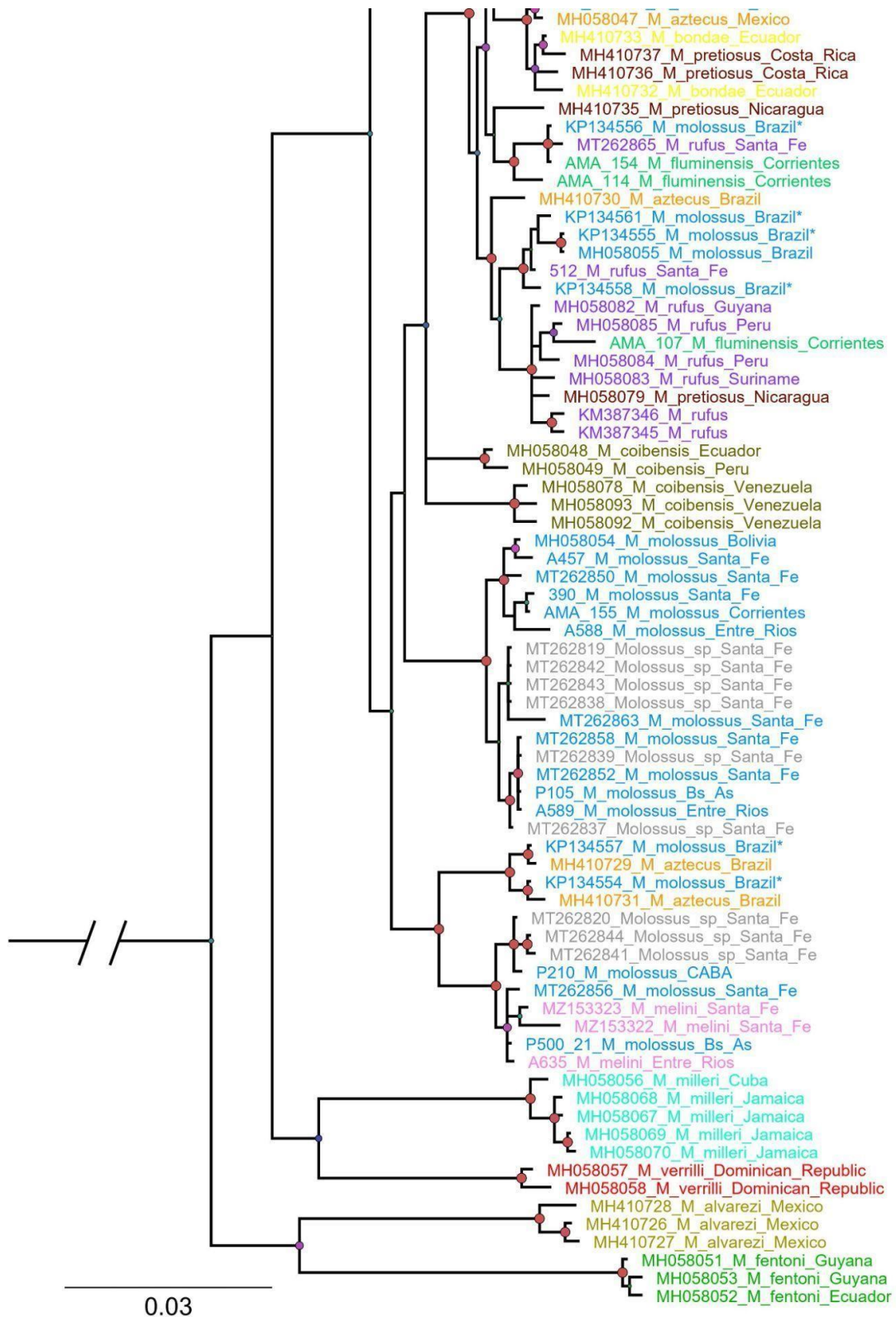


Figura Suplementaria 3. Árbol consenso de mayoría obtenido a partir del gen mitocondrial citocromo b. Los nombres corresponden a la asignación determinada por morfología externa y a la provista por GenBank. La escala está en sustituciones por sitio.

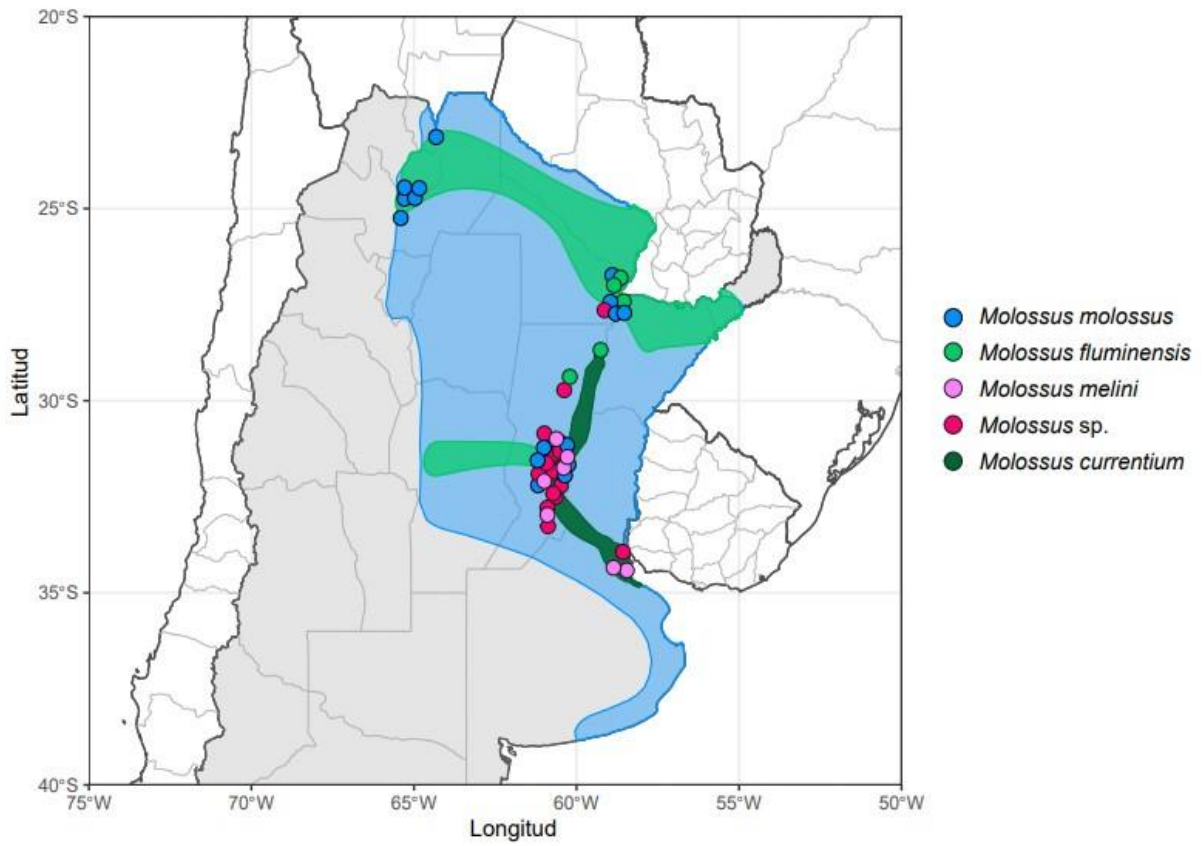


Figura Suplementaria 4. Mapa de Argentina. El sombreado muestra las distribuciones geográficas de las especies de *Molossus* presentes en el país (Díaz & Bárquez, 2019; Montani et al., 2019; Pavé et al., 2023). Los círculos indican el lugar de proveniencia de la muestra, y los colores reflejan la asignación taxonómica dada por la filogenia de los tres marcadores concatenados.