

Análisis filogenético de Chiroptera (Eutheria: Laurasiatheria) y biogeográfico del género *Pteropus* (Chiroptera: Pteropodidae)

Cediel Becerra José Duban Daniel*, Pitalua Lizarazo Shirley Andrea**,
Navarro Barón Nathaniel Alejandro***

* jose2173054@correo.uis.edu.co, dubancedielb@gmail.com

**shirley.pitalua@correo.uis.edu.co, Shirleypitalua@gmail.com

***nathaniel2170065@correo.uis.edu.co, nathanielalejandron@gmail.com

Grupo A
Equipo 4

Introducción

Laurasiatheria es un superorden de mamíferos placentarios en donde sus relaciones filogenéticas han sido ampliamente estudiadas debido a controversias en las relaciones de hermandad [1-3]. Su clasificación actual reconoce seis órdenes: Eulipotyphla, Perissodactyla, Carnivora, Cetartiodactyla, Pholidota y Chiroptera [2]. Particularmente, el orden Chiroptera presenta una alta riqueza de especies, aproximadamente 20% del total de las especies de la clase Mammalia, gran diversidad ecológica y una distribución cosmopolita [4].

Por tanto, es de gran interés establecer las relaciones filogenéticas de Chiroptera, dado que se han publicado numerosos estudios que buscan encontrar su posición. Por ejemplo, se propuso como grupo hermano de Chiroptera a: Cetartiodactyla, usando secuencias codificantes [1]; Perissodactyla y Carnívora, por medio de análisis de inserción de retroposones [5]; Perissodactyla, soportado por secuencias de intrones e inferido con evidencia citogenética [6,7]; al clado de Ferungulata (Perissodactyla, Carnívora, Cetartiodactyla, Pholidota) sustentado por datos moleculares e información morfológica de la placenta [8,9]; Eulipotyphla, basado en secuencias de cDNAs para Pepsinógenos [6] y, Cetartiodactyla, Perissodactyla y Carnívora, establecido con ADNmt [10]. A la luz de lo anterior, se evidencia que se han reportado posiciones diferentes para Chiroptera, dependiendo del conjunto de datos empleado.

Por otro lado, en el género *Pteropus* se encuentran los murciélagos de mayor tamaño, comúnmente llamados zorros voladores. Están distribuidos en la zona tropical de Asia, África, Australia y otras islas de Oceanía [11]. Este género presenta una alta diversidad de especies [12], donde la mayoría son endémicas por isla, por lo que es interesante identificar dónde se diversificaron. Para eso, hay que tener en cuenta dos eventos ocurridos en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 7 Ma.: las barreras físicas, dada la aparición de las grandes cadenas montañosas provocadas por la colisión entre las placas africanas, árabes, euroasiáticas e indias [13] y el surgimiento de islas, causado por la unión de Australia y Asia. Estos eventos pudieron llevar a la especiación alopátrica debido al aislamiento geográfico que hizo posible la inexistencia de flujo genético [11].

Por lo anterior, el presente estudio se propone identificar el grupo hermano del orden Chiroptera, dentro del superorden Laurasiatheria y determinar el área ancestral del género *Pteropus*.

Hipótesis

1. El grupo hermano del orden Chiroptera es el orden Perissodactyla.
2. El área ancestral del género *Pteropus* corresponde al área Indo-Malayo según la actualización de las regiones zoogeográficas de Wallace [14].

Metodología

-Reconstrucción filogenética

Se seleccionaron 23 terminales (21 ingroup y 2 outgroup) y se descargaron sus secuencias de ADN de dos genes mitocondriales (ND1 y CYTB) y dos nucleares (RAG1 y BRCA1) de la base de datos del GenBank [15]. Las secuencias se alinearon usando Muscle v3.8.31 [16] con costos gap opening de -12 y gap extensión de -1. Seguido, se elaboró una matriz morfológica de 10 caracteres basada en una revisión bibliográfica [17–20] y se concatenaron las matrices anteriormente mencionadas para obtener una única matriz de evidencia total (ET).

Se utilizaron tres métodos de reconstrucción filogenética: parsimonia, máxima verosimilitud (*ML*) e inferencia bayesiana; para los dos primeros se emplearon las tres particiones mencionadas y para la última solo se usó la de ET. Además, se realizó un “Bootstrap” con 1500 réplicas para parsimonia y 100000 para *ML* [21]. En primer lugar, en TNT v1.5 [22] se hizo una búsqueda heurística de 150 réplicas, perturbando con TBR y optimizando con 10 iteraciones de Ratchet. En segundo lugar, en IqTree v.1.6.12 [23] se usó *ML* para la optimización del árbol de ajuste. Para esto se inició con 150 árboles de parsimonia para determinar los modelos óptimos de evolución bajo el criterio de AICc [24]. Por último, el análisis de inferencia bayesiana se realizó en el programa MrBayes v.3.2.7 [25] y dentro de la plataforma CIPRES [26]. Se evaluaron dos esquemas de priores, fijos y Dirichlet. Donde la corrida final se hizo con Dirichlet, a partir del criterio de los factores bayesianos [27], se hicieron dos corridas usando veinte millones de generaciones a una temperatura de 0.2 y cuatro cadenas.

-Biogeografía

El análisis del área ancestral se ejecutó en RASP v.4.2 [28], donde se evaluó el modelo de Dispersión-Extinción-Cladogénesis (DEC) [29] con un máximo de 3 áreas a optimizar por nodo. Para esto se usó la filogenia datada de 37 especies del género *Pteropus*, propuesta por Almeida y colaboradores [30]; una matriz de distribución de 10 áreas, extraídas del GBIF [31], basados en la actualización de las regiones zoogeográficas de Wallace [14] y, tres matrices de probabilidades de dispersión de los estratos geológicos de las áreas a testear, cuyos periodos fueron de 2.21 Ma., sin tener en cuenta los eventos geológicos [32]. Se inició en el presente y culminó en 6.63 Ma., edad propuesta como el origen del género *Pteropus* [11]. Las probabilidades en las matrices de dispersión fueron asignadas dependiendo de la distancia geográfica de las áreas a través del tiempo [32], donde a mayor distancia, menor probabilidad de dispersión.

Resultados

Basado en la partición de evidencia total, las topologías resultantes en el análisis de parsimonia, de *ML* y en la inferencia bayesiana mostraron diferentes relaciones filogenéticas, donde solo *ML* mantiene la monofila de Chiroptera. En el análisis por parsimonia se reporta al suborden microchiroptera como grupo hermano de algunos miembros de Carnívora y Pholidota y al suborden megachiroptera como hermano de microchiroptera, Carnívora, Pholidota y Eulipotyphla con un soporte de Bootstrap < 50 para ambas topologías (Fig. 1a); en *ML* Chiroptera presenta hermandad con *Condylura cristata*, que pertenece al orden Eulipotyphla, con un bootstrap de 58 (Fig. 2a) y en la inferencia bayesiana se encontró una relación entre Chiroptera y algunos miembros de los órdenes Eulipotyphla, Pholidota y Carnívora y Chiroptera (Fig. 3a), exceptuando a *Myotis davidii* que se encontró en relación con *Manis javanica*, *Condylura cristata* y *Phoca vitulina* lo cual también se evidenció en la topología de la partición molecular en el análisis de parsimonia (Bootstrap 98) (Fig. 1b) y el resto de los integrantes de Chiroptera se relacionaron con Eulipotyphla y Carnívora. Sin embargo, usando la partición morfológica se recuperó la

monofilia de Chiroptera y la hermandad con Eulipotyphla (Bootstrap < 50%), donde ambos grupos mostraron politomias (Fig. 3b), cuya relación también se evidencia en *ML* (Fig. 2b).

En relación a Perissodactyla, no se evidenció relación de hermandad con Chiroptera, dado que este se encontró como grupo hermano del clado Pholidota, Carnívora, Eulipotyphla y Chiroptera en los tres métodos usando todas las particiones.

Por otro lado, el área ancestral más probable para *Pteropus* fue la región de Papua-Melanesia, que corresponde al área del nodo 73, la cual divergió hace 6.63 Ma.. Los escenarios de diversificación más plausibles fueron dispersión, vicarianza y extinción con 35, 12 y 1 eventos globales, respectivamente (Fig. 4). Los eventos vicariantes más recientes ocurrieron hace aproximadamente 1 Ma. en los nodos 40, 42, 56, 59, 70 y 57; este último nodo representa a su vez el único evento de extinción.

Discusión

Los análisis reportaron a Chiroptera como grupo monofilético hermano de Eulipotyphla, usando datos morfológicos, que se relaciona con lo encontrado por Chen et al. [6]. Sin embargo, usando datos moleculares sólo se recuperó una relación entre Chiroptera y *Condylura cristata*, no obstante, pese a tener un soporte superior al 50%, no se afirma una relación de hermandad entre estos debido a que se evidenció a Eulipotyphla como un grupo parafilético. Lo que sí es evidente es que existe una relación entre el clado Eulipotyphla, Pholidota, Carnívora y Chiroptera, lo cual no había sido reportado por la literatura. Es más, resulta relevante que pese a que varios estudios resaltan como grupo hermano a Cetartiodactyla [1,8,9], en el análisis realizado no se encontró dicha relación. De igual forma, ninguna de las topologías resultantes representó a Chiroptera como hermano de Perissodactyla como se reporta en la literatura [2].

Además, al comparar las topologías resultantes de la partición morfológica con la partición molecular se evidencia que con datos moleculares las relaciones tienen mejores soportes que los reportados con datos morfológicos. Lo anterior sustenta el hecho de que al usar estos caracteres pueden surgir incongruencias en las relaciones filogenéticas porque cada partición refleja una historia evolutiva diferente [33], lo anterior podría llevar a inferir que este tipo de datos tiende a reportar relaciones filogenéticas inciertas, aún así, no se aconseja realizar los análisis solo con datos moleculares porque los morfológicos son necesarios cuando se desea estimar filogenias para taxones fósiles y vivos [34] y para comparar las topologías de análisis moleculares y así corroborar que no hayan errores experimentales.

Por otro lado, el área ancestral más probable de *Pteropus* fue la región Papua-Melanesia que limita con la línea de Wallacea (Fig. 4), la cual es considerada el epicentro de diversificación [35], tanto para aves cantoras [36], como ratones murinos [37], y definida como el área ancestral de *Pteropus* según Tsang [11]. Estos conjuntos de islas oceánicas emergieron hace aproximadamente 23 Ma. [38], producto de altos niveles de subducción y arcos volcánicos que desencadenaron fallas geológicas y dieron lugar a numerosas islas, lo cual produjo flujo genético directo entre la masa continental asiática y la australiana, lo cual explica la alta diversificación del género [11].

Finalmente, *Pteropus* es considerado especialista en colonizar islas en sucesión primaria porque poseen roles ecológicos vitales como polinizadores y diseminadores de semillas [39], producto de la gran habilidad de dispersión que presentan; lo anterior, justifica por qué el evento que predominó en nuestro análisis del área ancestral fue la dispersión, lo cual está soportado por estudios biogeográficos, donde se afirma que la mayoría de taxones insulares surgen de la dispersión y no de la vicarianza [11], este último, es propuesto para explicar la presencia de algunas especies de *Pteropus* en Asia y África. Tal es el caso en nuestro análisis, puesto que *P.*

dasymallus y *P. pumilus*, divergieron por un evento vicariante (nodo 63) ocasionado posiblemente por el flujo genético restringido a través de barreras oceánicas [40].

Conclusiones

No se evidenció a Chiroptera como grupo hermano de Perissodactyla. Sin embargo, esta sí fue representada con el orden Eulipotyphla, usando caracteres morfológicos. Pero, utilizando datos molecular o ET se presentó una relación entre los órdenes Eulipotyphla, Pholidota, Carnívora y Chiroptera. Por lo tanto, debido a que no se ha aclarado de manera concluyente el grupo hermano de Chiroptera, por la presencia de resultados inconsistentes y bajos valores de Bootstrap, es necesario seguir indagando sobre la hermandad de cada uno de los grupos. Por otro lado, se rechaza la hipótesis de que el área ancestral de *Pteropus* es la región Indo-Malayo, nuestro análisis propone a la región Papua-Melanesia y la dispersión, como el evento predominante de diversificación.

Bibliografía

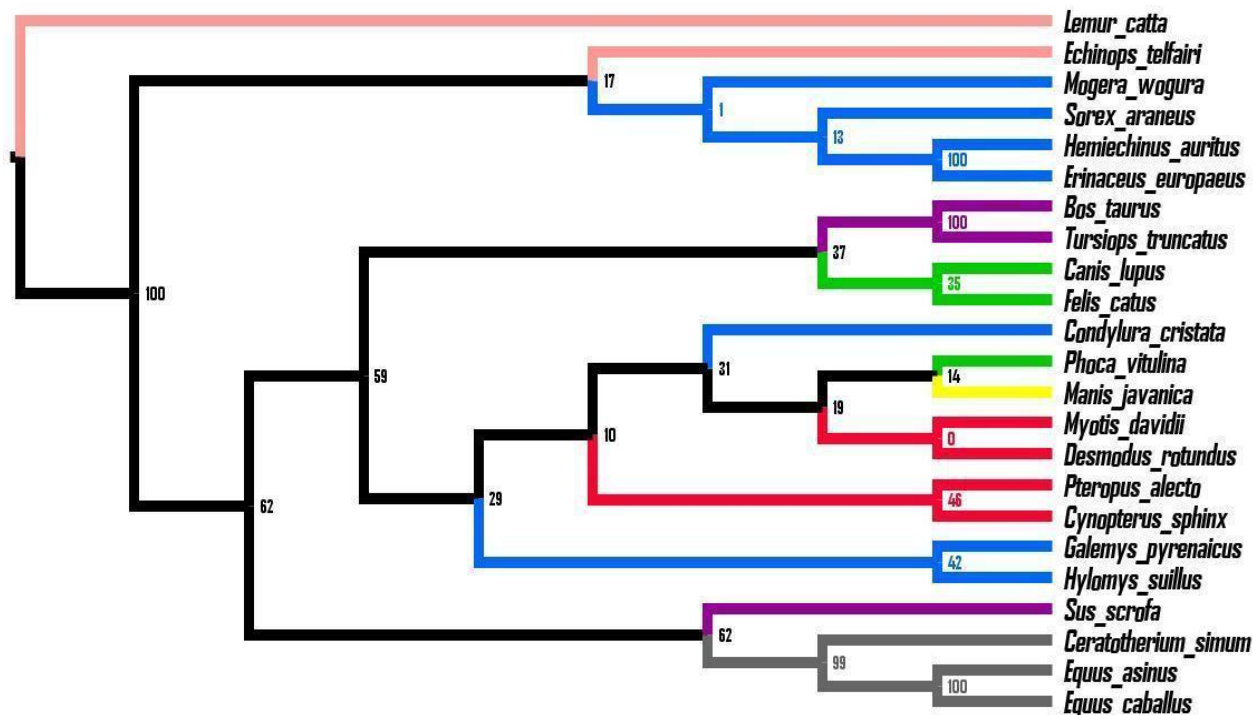
1. Nery MF, González DJ, Hoffmann FG, Opazo JC. 2012 Resolution of the laurasiatherian phylogeny: evidence from genomic data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 64, 685–689. (doi:10.1016/j.ympev.2012.04.012)
2. Hu JY, Zhang YP, Yu L. 2012 Summary of Laurasiatheria (mammalia) phylogeny. *Zool. Res.* 33, 65–74. (doi:10.3724/SP.J.1141.2012.E05-06E65)
3. Zhou X., Xu S, Xu J, Chen B, Zhou K, Yang G. 2012 Phylogenomic analysis resolves the interordinal relationships and rapid diversification of the laurasiatherian mammals. *Syst. Biol.* 61, 150–164. (doi:10.1093/sysbio/syr089)
4. Nowak R. 1991 Order Chiroptera. En Walker EP. *Mammals of the World* de Walker. Vol. 1, 190–194. Johns Hopkins University Press, Baltimore/Londres.
5. Nishihara H, Hasegawa M, Okada N. 2006 Pegasoferae, an unexpected mammalian clade revealed by tracking ancient retroposon insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 9929–9934. (doi:10.1073/pnas.0603797103)
6. Chen MY, Liang D, Zhang P. 2017 Phylogenomic resolution of the phylogeny of laurasiatherian mammals: Exploring phylogenetic signals within coding and noncoding sequences. *Genome Biol. Evol.* 9, 1998–2012. (doi:10.1093/gbe/evx147)
7. Kulemzina I, Biltueva LS, Trifonov VA, Perelman PL, Staroselec YY, Beklemisheva VR, Vorobieva N V., Serdukova NA, Graphodatsky AS. 2010 Comparative cytogenetics of main Laurasiatheria taxa. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 46, 1132–1137. (doi:10.1134/S1022795410090322)
8. Murphy WJ. 2001 Resolution of the Early Placental Mammal Radiation Using Bayesian Phylogenetics. *Science* 294, 2348–2351. (doi:10.1126/science.1067179)
9. Wildman DE, Chen C, Erez O, Grossman LI, Goodman M, Romero R. 2006 Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3203–3208. (doi:10.1073/pnas.0511344103)
10. Pumo DE, Finamore PS, Franek WR, Phillips CJ, Tarzami S, Balzarano D. 1998 Complete mitochondrial genome of a neotropical fruit bat, *Artibeus jamaicensis*, and a new hypothesis of the relationships of bats to other eutherian mammals. *J. Mol. Evol.* 47, 709–717. (doi:10.1007/PL00006430)
11. Tsang SM, Wiantoro S, Veluz MJ, Sugita N, Nguyen YL, Simmons NB, Lohman DJ. 2019 Dispersal out of Wallacea spurs diversification of *Pteropus* flying foxes, the world's largest bats (Mammalia: Chiroptera). *J. Biogeogr.* 47, 527–537. (doi:10.1111/jbi.13750)
12. Simmons NB. 2005 Order Chiroptera. En: Wilson DE, Reeder DM. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Vol. 2, 312–525. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
13. Ficetola GF, Mazel F, Thuiller W. 2018 Global determinants of zoogeographical boundaries. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1–7. (doi:10.1038/s41559-017-0089)

14. Holt BG et al. 2012 An Update of Wallace's Zoogeographic Regions of the World. *Science* 339, 74–78. (doi:10.1126/science.1228282)
15. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2017 GenBank. *Nucleic Acids Res.* 45, 37–42. (doi:10.1093/nar/gkw1070)
16. Edgar RC. 2004 MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. (doi:10.1093/nar/gkh340)
17. O'Leary MA et al. 2013 The Placental Mammal Ancestor and the Post-K-Pg Radiation of Placentals. *Science* 339, 662–667. (doi:10.1126/science.1229237)
18. Fracasso MPA, de Oliveira Salles L, Perini FA. 2011 Upper molar morphology and relationships among higher taxa in bats. *J. Mammal.* 92, 421–432. (doi:10.1644/09-mamm-a-415.1)
19. Gheerbran E, Filippo A, Schmitt A. 2016 Convergence of afrotherian and laurasiatherian ungulate-like mammals: First morphological evidence from the Paleocene of Morocco. *PLoS One* 11, 1–35. (doi:10.1371/journal.pone.0157556)
20. Kondoh D et al. 2020 Comparative histological studies on properties of polysaccharides secreted by vomeronasal glands of eight Laurasiatheria species. *Acta Histochem.* 122, 151515. (doi:10.1016/j.acthis.2020.151515)
21. Soltis PS, Soltis DE. 2003 Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction. *Statist. Sci.* 18, 256–267. doi:10.1214/ss/1063994980.
22. Goloboff PA, Catalano SA. 2016 TNT version 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics* 32, 221–238. (doi:10.1111/cla.12160)
23. Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2014 IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. (doi:10.1093/molbev/msu300)
24. Akaike H. 1981 Likelihood of a model and information criteria. *J. Econom.* 16, 3–14. (doi:10.1016/0304-4076(81)90071-3)
25. Ronquist F et al. 2012 MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. (doi:10.1093/sysbio/sys029)
26. Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2011 The CIPRES science gateway. In Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference on Extreme Digital Discovery - TG '11, ACM Press. (doi:10.1145/2016741.2016785)
27. Kass RE, Raftery AE. 1995 Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association* 90, 773–795. (doi:10.1080/01621459.1995.10476572)
28. Yu Y, Blair C, He X. 2019 RASP 4: Ancestral State Reconstruction Tool for Multiple Genes and Characters. *Mol. Biol. Evol.* 37, 604–606. (doi:10.1093/molbev/msz257)
29. Ree RH, Smith SA. 2008 Maximum Likelihood Inference of Geographic Range Evolution by Dispersal, Local Extinction, and Cladogenesis. *Syst. Biol.* 57, 4–14. (doi:10.1080/10635150701883881)
30. Almeida FC, Giannini NP, Simmons NB, Helgen KM. 2014 Each flying fox on its own branch: A phylogenetic tree for *Pteropus* and related genera (Chiroptera: Pteropodidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 77, 83–95. (doi:10.1016/j.ympev.2014.03.009)
31. GBIF.org. 2020 GBIF occurrence. <https://www.gbif.org/occurrence/search>
32. Gradstein FM, Ogg JG, Schmitz D, Ogg GM. 2012 The Geologic time scale. Vol. 1. Elsevier, Oxford, U.K.
33. Hillis DM, Wiens JJ. 2000. Molecules versus morphology systematics. En: Wiens JJ. *Phylogenetic analysis of morphological data*. Vol. 53, 1–19. Smithsonian Institution Press, Washington.
34. Wiens JJ. 2004 The Role of Morphological Data in Phylogeny Reconstruction. *Syst. Biol.* 53, 653–661. (doi:10.1080/10635150490472959)
35. Wallace AR. 1860 On the Zoological Geography of the Malay Archipelago. *J. Proc. Linn. Soc.* 4, 172–184. (doi:10.1111/j.1096-3642.1860.tb00090.x)
36. O'Connell DP, Kelly DJ, Lawless N, Karya A, Analuddin K, Marples NM. 2018 Diversification of a 'great speciator' in the Wallacea region: differing responses of closely

- related resident and migratory kingfisher species (Aves: Alcedinidae: Todiramphus). *Ibis* 161, 806-823. (doi:10.1111/ibi.12688)
37. Rowe KC, Achmadi AS, Fabre P, Schenk JJ, Steppan SJ, Esselstyn JA. 2019 Oceanic islands of Wallacea as a source for dispersal and diversification of murine rodents. *J Biogeogr* 46, 2752-2768. (doi:10.1111/jbi.13720)
38. Moyle RG, Oliveros CH, Andersen MJ, Hosner PA, Benz BW, Manthey JD, Travers SL, Brown RM, Faircloth BC. 2016 Tectonic collision and uplift of Wallacea triggered the global songbird radiation. *Nat Commun* 7, 1-7. (doi:10.1038/ncomms12709)
39. O'Brien J, Mariani C, Olson L, Russell AL, Say L, Yoder AD, Hayden TJ. 2009 Multiple colonisations of the western Indian Ocean by Pteropus fruit bats (Megachiroptera: Pteropodidae): The furthest islands were colonised first. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51, 294-303. (doi:10.1016/j.ympev.2009.02.010)
40. Michaux B. 2010 Biogeology of Wallacea: geotectonic models, areas of endemism, and natural biogeographical units. *Biol. J. Linn. Soc* 101, 193-212. (doi:10.1111/j.1095-8312.2010.01473.x)

Tablas y Figuras

A.



B.

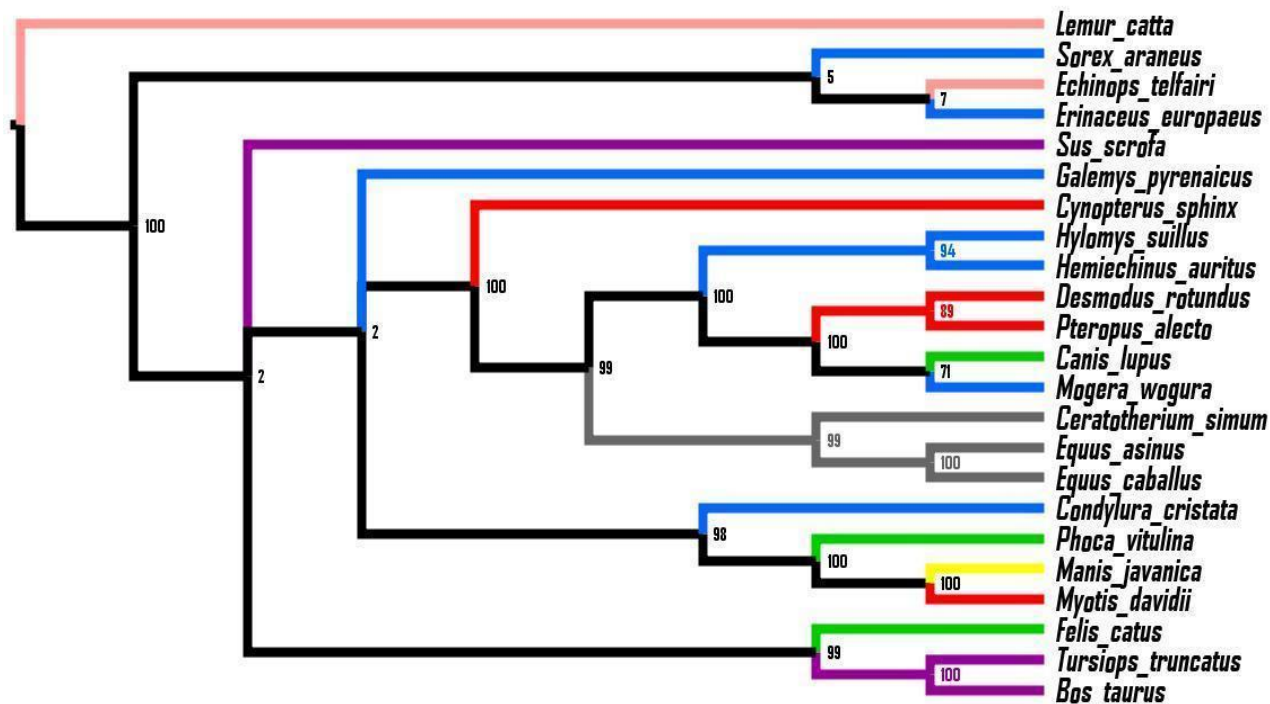


Fig. 1 Árboles filogenéticos basados en el análisis de parsimonia. **A** Árbol filogenético con la partición de ET. **B** Árbol filogenético para partición molecular. Rojo representa a Chiroptera; azul, Eulipotyphla; verde, Carnívora; gris, Perissodactyla; morado, Cetartiodactyla y, rosa, el outgroup.

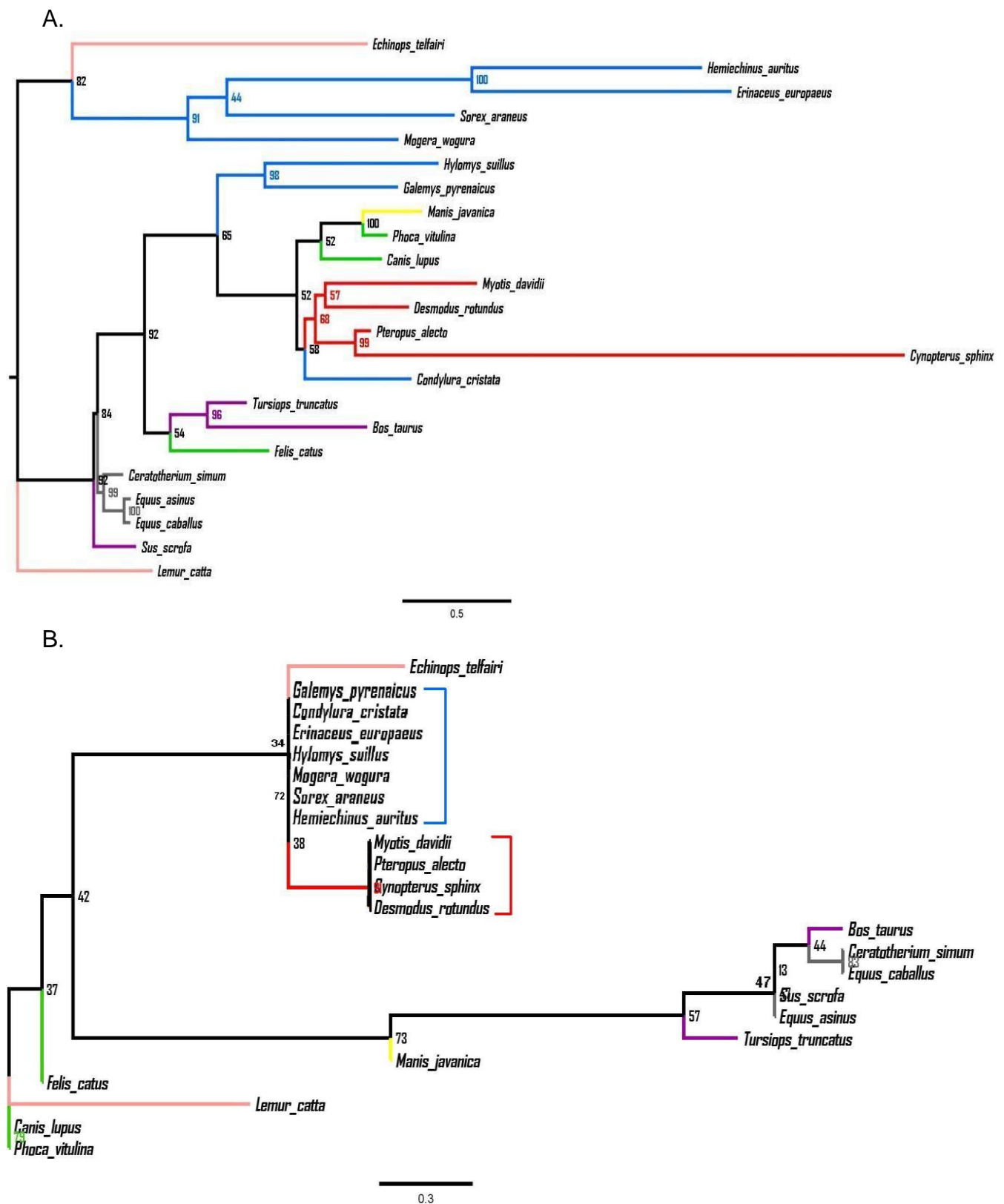


Fig 2. Árboles filogenéticos basado en el análisis *ML*. **A** Árbol con la partición de ET. **B** Árbol con partición morfológica. Rojo representa a Chiroptera; azul, Eulipotyphla; verde, Carnívora; gris, Perissodactyla; morado, Cetartiodactyla y, rosa, el outgroup.

A



B

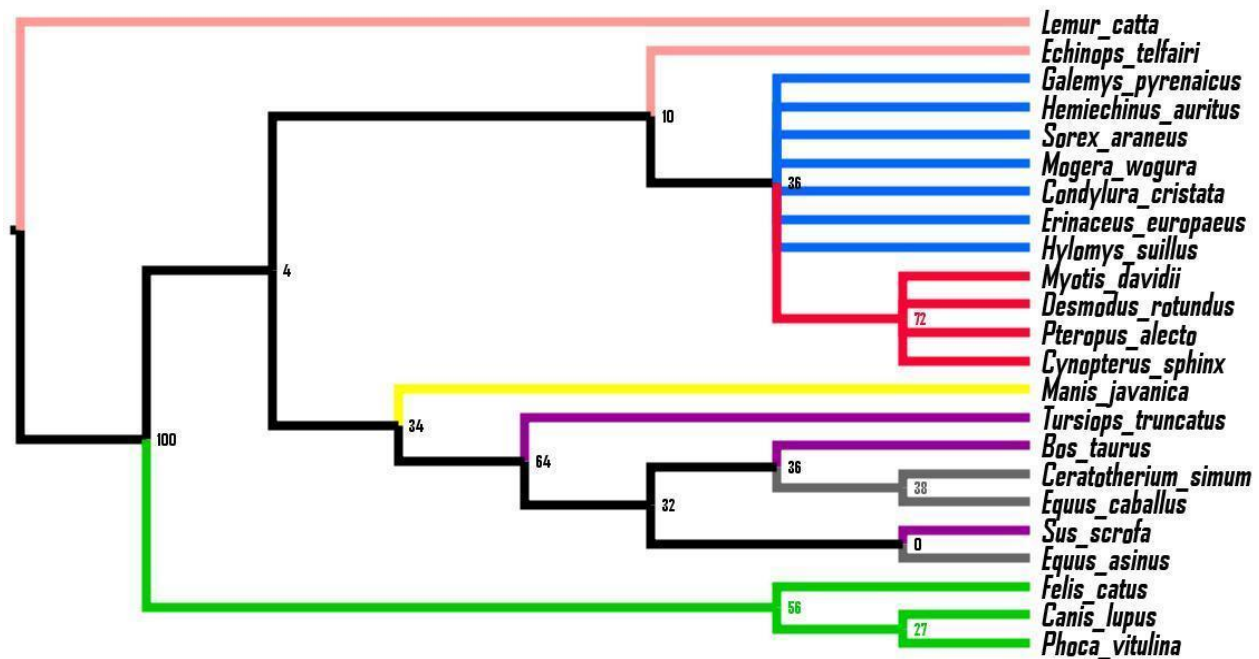


Fig. 3 A Árbol filogenético basado en el análisis de inferencia bayesiana.3b.Árbol filogenético basado en el análisis de parsimonia usando la partición morfológica. Rojo representa a Chiroptera; azul, Eulipotyphla; verde, Carnívora; gris, Perissodactyla; morado, Cetartiodactyla y, rosa, el outgroup.

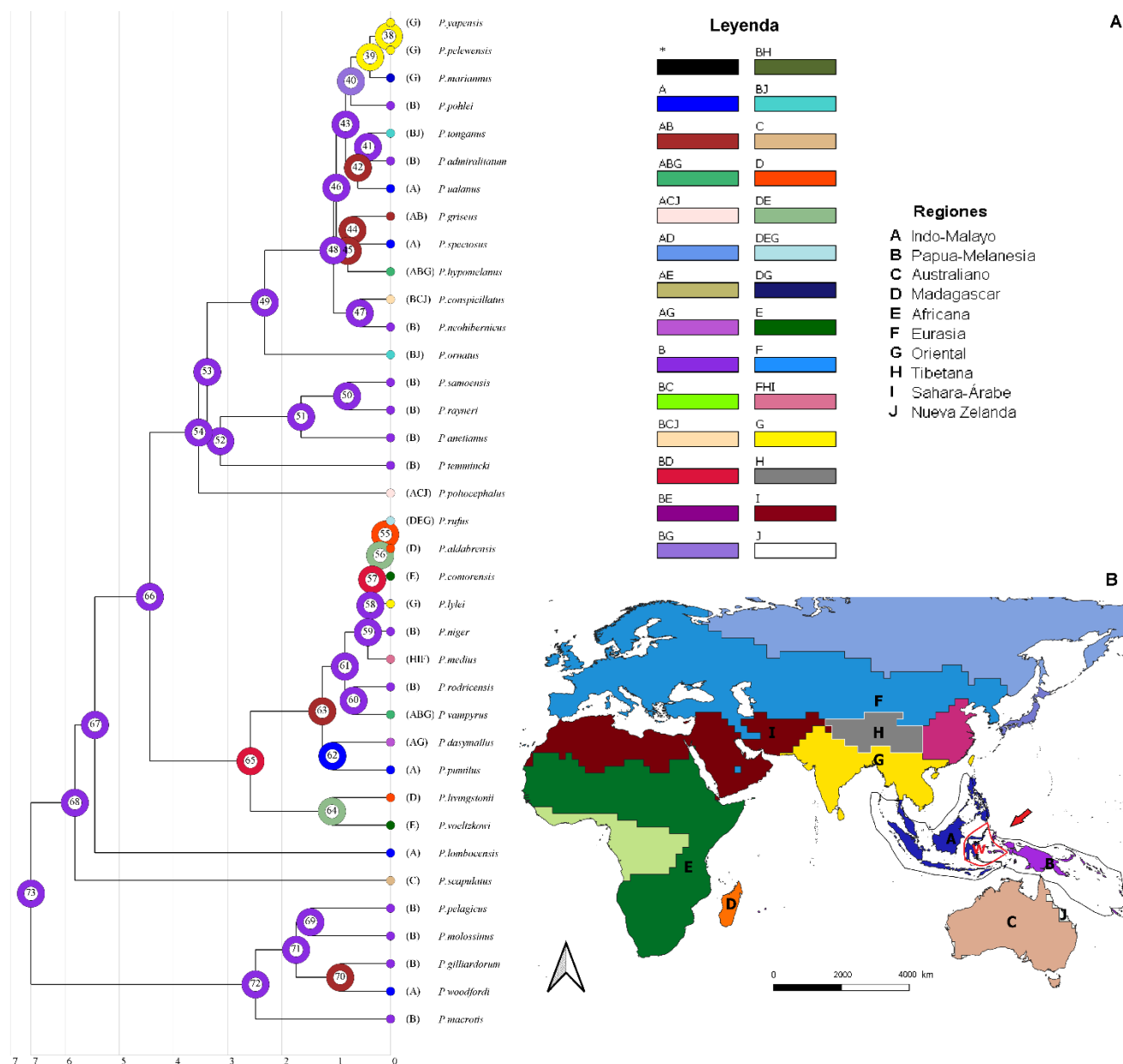


Fig. 4. **A** Análisis del área ancestral y la leyenda de las regiones. **B** Mapa con la regionalización utilizada [35]. ➡ : línea de Wallacea [11].