

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BRUNA DA SILVA FONSECA

**Taxonomia integrativa revela diversidade críptica
em *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae)**

VITÓRIA

2019

BRUNA DA SILVA FONSECA

**Taxonomia integrativa revela diversidade críptica
em *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Biologia Animal.

Orientador: Dr. Yuri Luiz Reis Leite

Co-orientador: Dr. Albert David Ditchfield

VITÓRIA

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D111t da Silva Fonseca, Bruna, 1987-
Taxonomia integrativa revela diversidade críptica em
Trachops cirrhosus (Chiroptera, Phyllostomidae) / Bruna da
Silva Fonseca. - 2019.
79 f. : il.

Orientador: Yuri Luiz Reis Leite.

Coorientador: Albert David Ditchfield.

Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Especiação críptica. 2. Filogeografia. 3. Morfometria. 4. Modelagem de nicho ecológico. I. Reis Leite, Yuri Luiz. II. Ditchfield, Albert David. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

Bruna da Silva Fonseca

**“Taxonomia integrativa revela diversidade críptica em *Trachops cirrhosus*
(Chiroptera, Phyllostomidae)”**

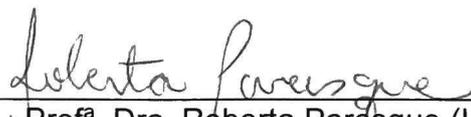
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Biologia Animal.

Aprovada em 12 de março de 2019.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Yuri Luiz Reis Leite (UFES)
Orientador e Presidente da Comissão



Prof.ª Dra. Roberta Parêque (UFES)
Examinadora interna



Prof.ª Dra. Elisandra de Almeida Chiquito (UFES)
Examinadora interna



Prof. Dr. Yuri Luiz Reis Leite (UFES)
Por Prof.ª Dra. Valeria da Cunha Tavares (UFPB)
Examinadora externa



Prof. Dr. Renato Gregorin (UFLA)
Examinador externo

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é um dos resultados de mais de 25 anos de formação, quando ainda na pré-escola eu descobri que queria ser cientista. Durante esse caminho, conheci muitas pessoas que contribuíram com mudanças significativas em mim como ser humano e como profissional. Algumas delas nem mesmo sabem que o fizeram. Algumas eu vou citar aqui.

Agradeço primeiramente a todos meus professores, da tia Nivinha, na pré-escola, aos meus professores no doutorado. Foi imprescindível a forma como cada um atuou na minha formação em diferentes fases da minha vida. E à minha mãe que, como professora, soube me mostrar o valor e a responsabilidade do conhecimento. Obrigada a todos que dedicam suas vidas ao ensino! Vocês fazem a diferença.

Ao prof. Dr. Yuri Leite por ter aceitado me orientar no doutorado com um grupo um pouco fora de sua especialidade sempre disposto a compartilhar seus conhecimentos, por todas as nossas discordâncias sadias e por ter me encorajado a crescer nas adversidades deste projeto. Ao prof. Dr. Albert Ditchfield por colaborar com este trabalho em forma de co-orientação e por ter me incentivado a descobrir o fascinante mundo dos morcegos ainda no meu primeiro semestre da graduação. Sou muito grata por todo conhecimento compartilhado, incentivo, confiança e apoio de ambos especialmente nos últimos meses! Não posso deixar de mencionar minha gratidão à professora Leonora Costa pelo encorajamento e discussões valiosas. Vocês são sensacionais!

À Dr. Nancy Simmons que me recebeu no American Museum of Natural History durante a realização do doutorado sanduíche. Seu entusiasmo com a ciência foi renovador e seus conselhos foram essenciais. Agradeço também à equipe do AMNH que me ofereceu todo o suporte durante minha estadia: Brian O'Toole, Eileen Westwig, Eleanor Hoeger e Neil Duncan.

À minha mãe, que sempre acreditou que eu era capaz quando eu achei que não, e à minha irmã Bia, que tanto me deu força nessa última etapa da tese (inclusive me alimentando quando eu lembrava, já de madrugada, que só tinha almoçado). Minha prima Pati, primeira colega de experimentos em zoologia/entomologia, obrigada por me fazer engolir o choro na hora do desespero e por sempre estar ao meu lado. Aos meus amigos de sempre, Daniela Paes, Luciane A. C. Reis, Camila Torquetti, Luane Gomes e Joyce Hellen, pelas risadas, pelas conversas, pela força quando mais precisei, pelos forrós, pelas praias (com ou sem faca), pelas biritas... enfim por serem a válvula de escape que manteve minha sanidade. Apoio incondicional foi o que vocês me deram durante todos esses anos.

Agradeço ao Angelo, principalmente pelo companheirismo e paciência para lidar com todas as minhas crises na reta final, mas também por ter me socorrido com as análises. Seu amor e apoio foram essenciais para que eu conseguisse fechar esse ciclo... Que bom que nos encontramos!

Aos amigos queridos que a Ufes e que o AMNH me apresentaram – e que não ousou citar nomes para não deixar ninguém de fora –, com quem perdi o passo na zumba, nadei como se não houvesse amanhã no mergulho, chorei as pitangas, compartilhei as séries preferidas e os almoços no Central Park no breve verão nova iorquino, pelo happy hour de toda sexta-feira, por me apresentarem alguns cantinhos maravilhosos de NYC e por serem a companhia que tornou aquela experiência ainda mais incrível. Quero sempre essa energia boa de vocês na minha vida! Obrigada por estarem presentes!

Aos colegas e amigos do LABEQ e LaMaB pelo companheirismo, pela ajuda com o trabalho de bancada, pelas discussões, pelo happy hour, pelas divertidas idas a campo. O trabalho ficou menos pesado com a companhia de vocês! Um muito obrigada especial à Roberta Bonela, Isadora Barbatto, João (Hoppe e Guedes), Gabis (Marchezi e Colombo), Roger Guimarães, Felipe Gatti, Iago Ornellas e Carol Loss: essa tese tem um pedacinho da ajuda imprescindível de cada um de vocês!

À Juliana Justino, nossa tão querida técnica do Núcleo de Genética Aplicada a Conservação da Biodiversidade, pela imensurável ajuda no trabalho de bancada, pelas caronas, pela amizade e pelo aprendizado.

A todos os colaboradores que gentilmente emprestaram tecidos e espécimes que foram de suma importância para este trabalho: Dr. Burton Lim (Royal Ontario Museum); Dr. Bruce Patterson (Field Museum of Natural History), Dr. Paulo Estefano Dineli Bobroweic (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), Dra. Valéria Tavares (Universidade Federal da Paraíba), Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos (Universidade Federal de Minas Gerais), Dr. Renato Gregorim (Universidade Federal de Lavras), Dr. Luís Reginaldo R. Rodrigues (Universidade Federal do Oeste do Pará), Dr. Darrin Lunde (UNMH), Dra. Nancy Simmons (AMNH) e Ana Pavan (Universidade de São Paulo).

Aos membros examinadores da banca, que gentilmente aceitaram avaliar este trabalho e que trouxeram contribuições valiosas para seu melhoramento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas, tanto no país quanto no exterior. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que tornou possível a realização desta pesquisa em meio a tantos cortes do governo.

“Nomina si nescis perit cognitio rerum.”

Quem não conhece o nome, não conhece o assunto. (Linnaeus 1773, *Critica Botanica*)

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
APRESENTAÇÃO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Amostragem molecular e sequenciamento.....	28
2.2 Reconstruções filogenéticas.....	30
2.3 Morfologia.....	32
2.4 Modelagem de nicho ecológico (ENM).....	33
2.5 Conceito de espécie e critérios operacionais para delimitação de espécies.....	35
2.6 Análises filogeográficas e datação molecular.....	36
3. RESULTADOS	
3.1 Reconstruções filogenéticas.....	38
3.2 Morfologia.....	40
3.3 Modelagem de nicho ecológico (ENM).....	44
3.4 Considerações filogeográficas.....	48
4. DISCUSSÃO	
4.1 Filogenia molecular e especiação críptica.....	54
4.2 Modelos de nicho ecológico e suas implicações na sistemática e filogeografia.....	60
4.3 Integrando disciplinas para gerar hipótese final de especiação críptica em <i>Trachops</i>	62
4.4 <i>Trachops</i> no tempo e no espaço.....	63

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
6. APÊNDICES.....	81

RESUMO

Trachops Gray, 1847 (Chiroptera: Phyllostomidae) é um gênero monotípico de morcegos carnívoros, com apenas *Trachops cirrhosus* (Spix, 1823) reconhecida atualmente. Existem três subespécies que ocupam grande parte da região Neotropical, ocorrendo do sul do México à Nicarágua (*T. c. coffini*), da Costa Rica ao sudeste e nordeste brasileiro (*T. c. cirrhosus*) e do sul do Brasil à Bolívia (*T. c. ehrhardti*). Embora o gênero tenha origem antiga, ca. 17 milhões de anos atrás, fósseis de *T. cirrhosus* são escassos e relativamente recentes, datando do Pleistoceno Tardio e Holoceno. No que diz respeito à taxonomia, estudos filogeográficos anteriores levantaram a hipótese de especiação críptica no gênero. O principal objetivo do presente estudo foi investigar a diversidade de *Trachops* ao longo de sua distribuição geográfica, integrando análises moleculares, morfológicas e ecológicas para compreender a taxonomia do gênero. Utilizei o conceito de espécie de Linhagem Geral e critérios operacionais baseados em: 1) monofiletismo nas filogenias moleculares com base em três marcadores mitocondriais e um nuclear; 2) divergência morfométrica com análise de *Normal Mixture Models* e caracteres morfológicos discretos; 3) divergência de nicho ecológico, por meio de modelagem e teste de identidade de nicho. Além disso, a filogeografia de *Trachops* também foi reanalisada utilizando redes de haplótipos e estimativas de tempo de divergência para se compreender os padrões de distribuição das linhagens genéticas e testar *status* subespecífico. Os resultados mostram que *Trachops* deve ser dividido em 2 espécies: *T. ehrhardti*, monotípico e *T. cirrhosus*, com 2 subespécies (*T. c. cirrhosus* e *T. c. coffini*). As análises filogenéticas apontaram para a existência de 7 linhagens geograficamente estruturadas de *Trachops* com divergências genéticas > 5%. Dentre essas, a linhagem da porção sul da Mata Atlântica (*T. ehrhardti*) apresentou-se como a mais divergente, separando-se do grupo irmão (*T. cirrhosus*) há cerca de 7 milhões de anos. A árvore coalescente de espécies reforça a ideia de que essas duas grandes linhagens sejam espécies distintas, embora o suporte estatístico para *T. cirrhosus* seja relativamente baixo na árvore de genes. As análises morfométricas indicam dois agrupamentos de *Trachops* em relação ao tamanho: um maior e outro menor. Embora essa diferença seja significativa, ela não é conspícua, possivelmente devido à grande distribuição geográfica de *T. cirrhosus* e, portanto, à existência de formas intermediárias. *Trachops ehrhardti* da Mata Atlântica e *T. c. coffini* da América Central têm dimensões similares, mas apresentam diferenças morfológicas qualitativas. *Trachops c. cirrhosus* é maior, apresentando variação clinal de tamanho, e o Panamá parece ser a zona de contato com *T. c. coffini*. Os modelos de nicho ecológico dos três táxons mostraram áreas de adequabilidade distintas

principalmente para *T. ehrhardti*. O teste de sobreposição de nicho revelou maior sobreposição entre *T. ehrhardti* e *T. c. coffini*, do que entre *T. ehrhardti* e sua vizinha *T. c. cirrhosus*, sugerindo que a semelhança entre os nichos pode estar atuando para manter as semelhanças em tamanho. Além disso, o teste de identidade de nicho corroborou a singularidade dos nichos para cada táxon. Lançando mão desses resultados, fica clara a distinção genética, ecológica e morfométrica entre *T. ehrhardti* e *T. cirrhosus*. *Trachops ehrhardti* mostra pouco compartilhamento de haplótipos e diversificação apenas durante o Pleistoceno. Já *T. cirrhosus* tem alta diversidade haplotípica e valores de F_{ST} esperados para populações panmíticas, embora contenha 6 linhagens geograficamente estruturadas. A origem do gênero parece ter sido na América do Sul, uma vez que *T. c. coffini* teve sua origem há 2,96 milhões de anos atrás, coincidindo com a data mais recente proposta para o fechamento do Istmo do Panamá. A linhagem de *T. cirrhosus* com maior distribuição geográfica ocupa vários biomas da América do Sul, incluindo a Mata Atlântica do nordeste brasileiro e Amazônia. As diferenças florísticas atuais entre as porções norte e sul da Mata Atlântica e todas as interações bióticas e abióticas envolvidas podem representar barreiras ecológicas para as duas espécies de *Trachops*.

Palavras-chave: espécies crípticas, filogeografia, morfometria, modelagem de nicho ecológico.

ABSTRACT

Trachops Gray, 1847 (Chiroptera: Phyllostomidae) is a monotypic carnivorous bat, with only *Trachops cirrhosus* (Spix, 1823) currently recognized. There are three subspecies that occupy a large part of the Neotropical region, occurring from southern Mexico to Nicaragua (*T. c. coffini*), from Costa Rica to the southeast and northeast of Brazil (*T. c. cirrhosus*) and from southern Brazil to Bolivia (*T. c. ehrhardti*). Although the genus has an ancient origin, ca. 17 million years ago, fossils of the species are scarce and relatively recent, dating to the Late Pleistocene and Holocene. Regarding its taxonomy, genetic studies have raised the hypothesis of cryptic speciation in the genus, but no work integrating different data matrices has been done to date. The main goal of the present study was to investigate the diversity of *Trachops* along its geographic distribution, integrating molecular, morphometric and ecological analyses, to understand the taxonomy of the genus. I used the General Lineage species concept and operational criteria based on: 1) monophyly in the molecular phylogenies based on one nuclear and three mitochondrial markers, morphometric divergence with analysis of Normal Mixture Models, and ecological niche divergence, through ecological niche modeling and niche identity test. In addition, *Trachops* phylogeography was also revisited using haplotype networks and divergence time estimates to understand the distribution patterns of genetic lineages. Results show that *Trachops* should be divided into 2 species: *T. ehrhardti*, monotypic, and *T. cirrhosus*, with 2 subspecies (*T. c. cirrhosus* e *T. c. coffini*). The phylogenetic analyses pointed to the existence of 7 geographically structured lineages with genetic divergences > 5%. Among these, the southern Atlantic Forest lineage (*T. ehrhardti*) was the most divergent, separating from its sister group (*T. cirrhosus*) about 7 million years ago. The coalescent species tree reinforces the idea that these two main lineages comprise distinct species, although statistical support for *T. cirrhosus* is relatively low in the gene tree. Morphometric analyses also point to the existence of 2 forms of *Trachops*: large sized and small sized. Although this difference is significant, it is not conspicuous, possibly due to the large geographic range of *T. cirrhosus* and, therefore, to the existence of intermediates. *Trachops ehrhardti* of the Atlantic Forest and *T. c. coffini* from Central America are of similar size, but show morphological differences. *Trachops c. cirrhosus* is larger, showing clinal size variation, and Panama seems to be the contact zone with *T. c. coffini*. The niche overlap test revealed greater overlap between *T. ehrhardti* and *T. c. coffini*, than between *T. ehrhardti* and its neighbor *T. c. cirrhosus*, suggesting that the similarity between niches may be acting to maintain similarities in size. In addition, the niche identity test corroborated the uniqueness of the niches for each taxon. Using these results, the genetic,

ecologic, and morphometric distinction between *T. ehrhardti* and *T. cirrhosus* is clear. *Trachops ehrhardti* shows little haplotype sharing, and diversification only during the Pleistocene. *Trachops cirrhosus* has high haplotypic diversity and F_{ST} values are expected for panmitic populations, although comprising 6 geographically structured lineages. The origin of the genus seems to have been in South America, given that *T. c. coffini* originated 2.96 million years ago, coinciding with the most recent estimate for the closure of the Isthmus of Panama. The broadest ranged lineage of *T. cirrhosus* occupies several biomes of South America, including the Atlantic Forest of northeastern Brazil. The current floristic differences between the southern and northern Atlantic Forest and all biotic and abiotic interactions involved may represent ecological barriers for the two species of *Trachops*.

Keywords: cryptic species, phylogeography, morphometrics, ecological niche modeling.

APRESENTAÇÃO

Trachops cirrhosus (Spix, 1823) é a única espécie do gênero *Trachops* Gray, 1847 (Chiroptera, Phyllostomidae, Phyllostominae) reconhecida atualmente. Sua distribuição geográfica é ampla, abrangendo a maior porção da região Neotropical, de onde a família Phyllostomidae é endêmica. Há registros de *T. cirrhosus* desde o sul do México às Guianas, Trinidad, Equador, sul da Bolívia até o sudeste e sul do Brasil (Simmons 2005). São reconhecidas três subespécies (Gardner 2007) (figura I): *Trachops cirrhosus cirrhosus* (Spix, 1823), da Costa Rica ao nordeste brasileiro, passando pelo norte do Equador, Bacia Amazônica, Brasil Central e parte do sudeste; *Trachops cirrhosus coffini* (Goldman, 1925) do México à Nicarágua; e *Trachops cirrhosus ehrhardti* Felten, 1956, com distribuição conhecida para a porção sul do Brasil e Bolívia (Jones & Carter 1976) (Figura II). *Trachops fuliginosus* Gray, 1847, cuja localidade-tipo é Pernambuco, Brasil, é um sinônimo júnior de *T. c. cirrhosus* (Williams & Genoways 2007).

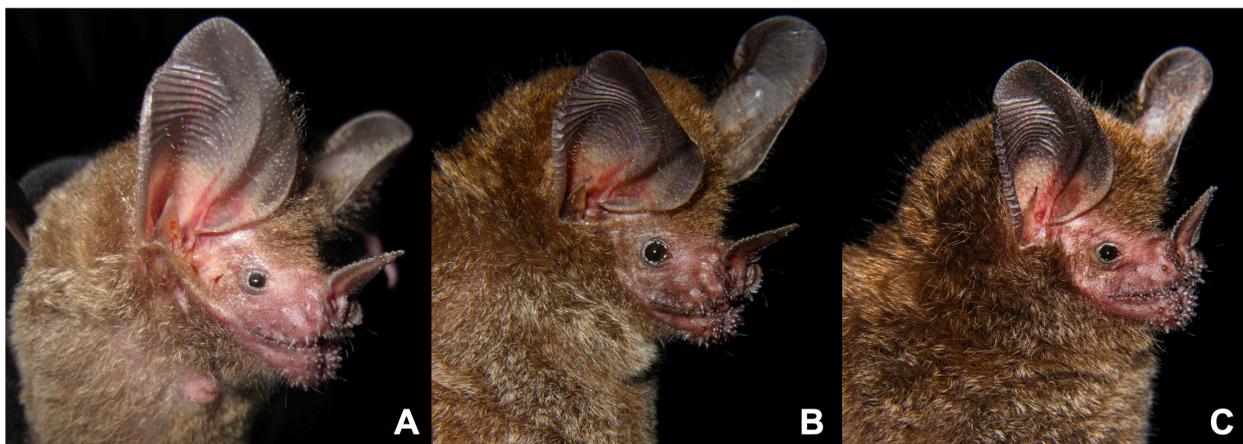


Figura I. Três subespécies de *Trachops cirrhosus* reconhecidas atualmente: (A) *T. c. coffini* (cortesia da foto por J. A. Soto-Centeno), (B) *T. c. cirrhosus* e (C) *T. c. ehrhardti* (cortesia das fotos por R. Novaes).



Figura II. Distribuição geográfica das subespécies de *Trachops cirrhosus* modificado de Cramer et al. (2001): (1) *T. fuliginosus*, (2) *T. c. coffini*, (3) *T. c. ehrhardti* e (4) *T. c. cirrhosus*. As localidades-tipo estão indicadas por círculos pretos.

Quanto à dieta, *T. cirrhosus* é classificada como carnívora, se alimentando de insetos, lagartos, anuros, pequenos mamíferos (Peracchi et al. 1982, Williams & Genoways 2007) e pássaros (Bonato et al. 2004). É comumente associada aos ambientes com baixos níveis de distúrbio ambiental, assim como os demais filostomíneos (Fenton et al. 1992). No Brasil, ocorre em quase todos os biomas, à exceção dos Campos Sulinos (Paglia et al. 2012) e pode ser encontrado em áreas de floresta primária (Ferracioli et al. 2017) e secundária (Brosset et al. 1996; Rodrigues et al. 2004), mas geralmente é capturada em elevações até 500 m. Embora estudos sugiram que *T. cirrhosus* tenha uma área de vida de cerca de 5 km² (Bernard & Fenton 2003; Jones et al. 2017), não há estudos sobre o deslocamento da espécie.

Embora Cramer et al. (2001) afirmarem não haver fósseis reconhecidos para *Trachops cirrhosus*, Eshelman & Morgan (1985) relatam um registro fóssil em Tobago cuja data é incerta entre o Pleistoceno tardio e o Holoceno. Atualmente, a espécie está extinta nessa ilha, mas ainda ocorre em sua vizinha Trinidad. Outro exemplar fóssil de *T. cirrhosus* foi encontrado no norte da Venezuela em um poço de piche de data aproximada ao Pleistoceno tardio (Czaplewski et al. 2005). Hoffmann et al. (2008) sugerem que o gênero tenha divergido de *Macrophyllum* por volta de 17 Ma, no Mioceno.

A história taxonômica de *Trachops cirrhosus* é marcada por mudanças e equívocos que são completamente compreensíveis, dado que no século XIX e primeira metade do XX, os acessos às coleções biológicas e as publicações científicas eram extremamente restritos, especialmente quando comparamos aos dias atuais. A espécie foi primeiramente descrita como parte do gênero *Vampyrus* em 1823 no conhecido trabalho de Spix, no qual ele descreveu outras 14 espécies de morcegos, além de outros mamíferos do Brasil, sem saber que o epíteto genérico já estava ocupado pelo que hoje conhecemos como *Vampyrum Rafinesque*, 1815. Spix não designou um holótipo nem mencionou a localidade precisa onde o espécime foi coletado. No entanto, Schinz (1844) assinalou a localidade para a província do Pará, no Brasil, com base na latitude que Spix (1823) descreveu em seu trabalho.

Vampyrus cirrhosus foi descrito como sendo congênere de *Vampyrus bidens* e *Vampyrus soricinus* (Spix, 1823), hoje sinônimos-júnior de *Tonatia bidens* e *Carollia brevicauda*, respectivamente (Williams & Genoways 2007). O gênero *Vampyrus* foi descrito previamente para *Vespertilio spectrum* Linnaeus, 1758, atualmente conhecido como *Vampyrum spectrum* (Linnaeus 1758) e não poderia alocar as espécies que Spix descreveu por apresentarem características muito distintas àquela (Cuvier 1827). Numa tentativa de resolver esse problema, Gray (1825) propôs manter *Vampyrus* apenas para a espécie de Linnaeus e dividir as espécies de Spix em dois novos gêneros, sendo um deles *Istiophorus*, incluindo

Vampyrus, e *Tonatia*. Entretanto, *Istiophorus* já estava ocupado por um gênero de Osteichthyes e Agassiz (1847) o nomeou *Histiophorus*, no que Williams & Genoways 2007 chamaram de “uma emenda injustificada” para a designação inválida anterior.

Finalmente, em 1847, Gray descreveu o gênero *Trachops* e a espécie *Trachops fuliginosus*, baseado em duas fêmeas coletadas no estado de Pernambuco (Brasil), cujo holótipo está depositado no National History Museum, Londres, Reino Unido (e-catalogue NHMUK 3621149). O autor cita a espécie descrita por Spix, embora com diferente grafia e com referência à prancha de primatas (“*Vampyrus cirrhosum*, Spix, Vesp. Braz., t. xxvi. fig. 3”), e faz a seguinte observação: “evidentemente pertence ao mesmo gênero, se de fato é diferente da espécie descrita acima”. A partir de então o gênero passa a ser utilizado e *Trachops fuliginosus* passa a ser eventualmente considerado sinônimo-júnior de *Trachops cirrhosus* (e.g. Dobson 1878).

Phyllostoma angusticeps Gervais 1856 foi descrito com base no holótipo coletado na Bahia (Brasil), o qual foi depositado na coleção de zoologia da Universidade de Montpellier, França (CHI-073-001). Embora tenha sido tratada como sinônimo-júnior de *Phyllostomus discolor* até recentemente, Arroyo-Cabrales et al. (2016) reanalisaram o holótipo e concluíram que *Phyllostoma angusticeps* é o mesmo táxon que *Trachops cirrhosus* e, portanto, o primeiro nome um sinônimo júnior.

Outro sinônimo de *T. cirrhosus*, *Tylostoma mexicana* Saussure 1860, foi descrito para as “regiões quentes do México”. Em duas publicações independentes, erros na grafia levaram à sinonímia de *Trachyops* (Peters 1865; Trouessart 1878) com *Trachops*.

Algumas décadas depois, Goldman (1925) descreveu *Trachops coffini* (holótipo no National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, Estados Unidos, USNM 244266) para a região de “Guyo”, Peten (Guatemala). Aqui nos deparamos com um equívoco no que diz respeito à localidade-tipo. De la Torre (1956) não encontrou tal localidade

em Peten durante sua visita e acreditou haver algum possível erro de grafia. Ao receber uma carta de um colaborador, Dr. Stuart, o qual conhecia o coletor Harry Malleis, foi informado de que talvez o desconhecimento da língua espanhola pudesse ter conduzido a um erro ortográfico. Com auxílio de colaboradores e lançando mão do mapeamento da região de amostragem de Malleis, De la Torre (1956) redefiniu a localidade-tipo de *T. coffini* para El Gallo, 8 milhas oeste de Yaxha, Peten, Guatemala. Felten (1956a), além de descrever *Trachops cirrhosus ehrhardti*, de Santa Catarina (Brasil) – holótipo no Senckenberg Museum Frankfurt (SMF), na Alemanha, catalogado sob o número SMF11716 – também altera o nível taxonômico de *T. coffini* e a considera uma subespécie de *T. cirrhosus* (Felten, 1956b).

Cramer et al. (2001) consideram a localidade-tipo de *T. c. cirrhosus* como Pernambuco, Brasil, adotando essa informação com base em *Trachops fuliginosus*. No entanto, Husson (1962) já havia chamado atenção para esse problema, uma vez que a indicação de Schinz (1844) tem prioridade, e reforçou que a localidade-tipo de *T. cirrhosus* e, conseqüentemente de *T. c. cirrhosus*, é no Pará, Brasil.

No que diz respeito à diagnose, *T. cirrhosus* é comumente descrito como um morcego de tamanho médio (antebraço 58–65 mm e comprimento do crânio 27–31 mm), presença de múltiplas verrugas ao redor dos lábios, folha nasal serrilhada nas bordas, cauda de comprimento até a metade do uropatágio e calcâneo de tamanho aproximado ao do pé (Williams & Genoways 2007). Segundo Cramer et al. (2001), a espécie é facilmente diferenciada de outros Phyllostominae por possuir dois pares de incisivos inferiores, enquanto *Tonatia*, *Mimon* e *Chrotopterus* têm um; e três pares de pré-molares inferiores ao invés de dois como em *Phyllostomus*. Além disso, *Trachops* possui o segundo premolar inferior (p2) bastante reduzido, quando comparado ao p3, e os autores ressaltam que o posicionamento do p2 na face lingual é um caráter que diferencia o gênero entre os crânios de *Lonchorhina* e *Phylloderma*. *Trachops cirrhosus* possui 2n=30 (NF=56) e o cromossomo X é subtelocêntrico em indivíduos

de Chiapas, México (Baker 1967), mas acrocêntrico em indivíduos de Pernambuco (Barros et al. 2009) e do Amazonas (Silva 2016), Brasil, podendo indicar variação entre as subespécies *T. c. coffini* e *T. c. cirrhosus*, respectivamente.

Estudos prévios de filogeografia em morcegos Neotropicais (Ditchfield 1996; Clare et al. 2007, 2011; Clare 2011), utilizando matrizes de dados moleculares, levantaram a possibilidade de *Trachops cirrhosus* compreender mais de uma espécie. A principal motivação desse trabalho é, portanto, testar a hipótese de que *Trachops cirrhosus* trata-se de um complexo de espécies crípticas lançando mão do uso de dados morfológicos e de marcadores moleculares com taxas de evolução e padrões de herança discrepantes. Espécimes de populações de diferentes biomas da América do Sul devem ser comparados aos das Américas Central e do México a fim de se entender se a ocupação de ambientes tão distintos durante um intervalo de tempo relativamente grande teria ocasionado mudanças evolutivas significativas a ponto de serem caracterizadas espécies diferentes de *Trachops*. Neste sentido, pergunta-se: as subespécies atualmente reconhecidas ou outros conjuntos de populações geograficamente delimitadas representam linhagens evolutivas que podem ser consideradas espécies? Quais os padrões de distribuição intra e/ou interespecíficos encontrados no gênero?

Dessa forma, este trabalho será apresentado em formato de artigo científico e tem dois principais objetivos: (1) caracterizar a diversidade de *Trachops cirrhosus* com base em matrizes de dados genéticos e morfológicos, com amostragem de ampla distribuição geográfica e abarcando as três subespécies reconhecidas atualmente para testar a hipótese de que há mais de uma espécie no gênero e (2) investigar os padrões filogeográficos e históricos que se apresentam em *Trachops*.

REFERÊNCIAS

- AGASSIZ, L. 1847. Nomenclatoris zoologici index universalis. Jent and Gassmann, Soloduri, Switzerland.
- ARROYO-CABRALES, J., A. L. GARDNER, B. SIGÉ, F. CATZEFLIS, AND T. J. MCCARTHY. 2016. Taxonomic reassessment of bats from Castelnau's expedition to South America (1843-1847): *Phyllostoma angusticeps* Gervais, 1856 (Chiroptera, Phyllostomidae). *Mammalia* 81:1–5.
- BAKER, R. J. 1967. Karyotypes of Bats of the Family Phyllostomidae and Their Taxonomic Implications. *The Southwestern Naturalist* 12:407–428.
- BARROS, H. M. D. D. R., C. G. DE SOTERO-CAIO, N. SANTOS, AND M. J. DE SOUZA. 2009. Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Genetics and Molecular Biology* 32:748–752.
- BERNARD, E., AND M. B. FENTON. 2003. Bat Mobility and Roosts in a Fragmented Landscape in Central Amazonia, Brazil Bat Mobility and Roosts in a Fragmented Landscape in Central. *Biotropica* 35:262–277.
- BONATO, V., K. G. FACURE, AND W. UIEDA. 2004. Food habits of bats of subfamily Vampyrinae in Brazil. *Journal of Mammalogy* 85:708–713.
- BROSSET, A., P. CHARLES-DOMINIQUE, A. COCKLE, J. F. COSSON, D. MASSON. 1996. Bat communities and deforestation in French Guiana. *Canadian Journal of Zoology*, vol74, Ottawa, p.1974-1982.
- CLARE, E. L. 2011. Cryptic species? patterns of maternal and paternal gene flow in eight Neotropical bats. *PLoS ONE* 6.
- CLARE, E. L., B. K. LIM, M. D. ENGSTROM, J. L. EGER, AND P. D. N. HEBERT. 2007. DNA

- barcoding of Neotropical bats: Species identification and discovery within Guyana: Barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7:184–190.
- CLARE, E. L., B. K. LIM, M. B. FENTON, AND P. D. N. HEBERT. 2011. Neotropical bats: Estimating species diversity with DNA barcodes. *PLoS ONE* 6.
- CRAMER, M. J., M. R. WILLIG, AND C. JONES. 2001. *Trachops cirrhosus*. *Mammalian Species* 656:1–6.
- CUVIER, G., E. GRIFFITH, C. H. SMITH, J. E. GRAY, G. R. GRAY. 1827. *The Animal Kingdom: Synopsis Of The Species Of The Class Mammalia, As Arranged With Reference To Their Organization*. London: Geo. B. Wiltaker, Vol. 5, 610 p.
- CZAPLEWSKI, N., A. D. RINCÓN, AND G. S. MORGAN. 2005. Fossil Bat (Mammalia: Chiroptera) Remains from Inciarte Tar Pit, Sierra de Perijá, Venezuela. *Caribbean Journal of Science* 41:768–781.
- DE LA TORRE, L. 1956. The correct type locality of the bat *Trachops coffini*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 69:189–190.
- DITCHFIELD, A.D. Phylogeography of Neotropical bats using mitochondrial DNA sequences. 1996. Tese (Doutorado em Integrative Biology) – Graduate Division, University of California, Berkeley.
- Dobson, G. E. 1878. *Catalogue of the Chiroptera in the collection of the British Museum*. London: British Museum (Natural History), 567 pp., 29 pls.
- ESHELMAN, R., AND G. S. MORGAN. 1985. Tobagan recent mammals, fossil vertebrates, and their zoogeographical implications. *National Geographic Society* 21:137–143.
- FELTEN, V. H. 1956a. Eine neue Unterart von *Trachops cirrhosus* (Mammalia, Chiroptera) aus Brasilien. *Senckenbergiana Biologica* 37:369–370.

- FELTEN, H. 1956b. Fledermäuse (Mammalia, Chiroptera) aus El Salvador. *Senckenbergiana Biologica* 37:179–212.
- FENTON, M. B ET AL. 1992. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica* 24: 440-446.
- FERRACIOLI, P., V. TAVARES, N. R. Reis, Peracchi. 2017. Subfamília Phyllostominae Gray, 1925. In: Reis et al., eds. *História Natural dos morcegos brasileiros: Chave de identificação de espécies*. Technical Books. 1 ed. Rio de Janeiro, 416 p.
- GRAY, J. E. 1825. An attempt at a division of the family Vespertilionidae into groups. *Zoological Journal* 2:242–243.
- GRAY, J. E. 1847. Characters of six genera of bats not hitherto distinguished. *Proceedings of the Scientific Meetings of the Zoological Society of London* 15:14–16.
- GOLDMAN, E. A. 1925. A new bat of the genus *Trachops* from Guatemala. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 38:23–34.
- HOFFMANN, F. G., S. R. HOOVER, AND R. J. BAKER. 2008. Molecular dating of the diversification of Phyllostominae bats based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:653–658.
- HUSSON, A. M. 1962. The bats of Suriname. *Zoologische Verhandelingen* 58:1–282.
- JONES, J. K., JR., and D. C. CARTER. 1976. Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. Pp. 7–38 in *Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part I* (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, The Museum, Texas Tech University 10:1–218.
- JONES, P. L., F. HÄMSCH, R. A. PAGE, E. K. V. KALKO, AND M. T. O'MARA. 2017. Foraging and Roosting Behaviour of the Fringe-Lipped Bat, *Trachops cirrhosus* , on Barro Colorado

- Island, Panamá. *Acta Chiropterologica* 19:337–346.
- MARINHO-FILHO, J. S., AND I. SAZIMA. 1998. Brazilian bats and conservation biology: a first survey. *In*: KUNZ, T. H. AND P. A. RACEY. (Eds). *Bat biology and Conservation*. Washington: Smithsonian Institution Press, p.282-279.
- PERACCHI, A. L., S. T. ALBUQUERQUE, AND S. D. L. RAIMUNDO. 1982. Contribuição ao conhecimento dos hábitos alimentares de *Trachops cirrhosus* (Spix, 1823) (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* 5:1–5.
- PETERS, W. 1865. Über die zu Vampyri gchörigen Flederthiere und über die natürliche Stellung der Gattung Antryous. *Monatsberichte der Königlichen Preusschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 1866:503–524.
- RODRIGUES, F. H. G., M. L. REIS, V. S. BRAZ. 2004. Food habits of the frog-eating bat, *Trachops cirrhosus*, in Atlantic Forest of Northeastern Brazil. *Chiroptera Neotropical*. Vol.10, No1-2. Brasília. p. 180-182.
- SCHINZ, H. R. 1844. *Systematisches Verzeichniss aller bis jetzt bekannten Säugethiere oder Synopsis Mammalium nach dem Cuvier'schen System*. Solothurn: Jent und Gassmann, 1:xvi + 1–587.
- SILVA, N. K. N. DA. 2016. *Evolução Cromossômica e Mapeamento Genômico Comparativo em Morcegos da Subfamília Phyllostominae (Mammalia, Chiroptera)*. Universidade Federal do Pará.
- SIMMONS, N.B. Order Chiroptera. *In*: *Mammals Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. (WILSON, D.E. & REEDER, D.M eds.). Johns Hopkins University Press, Baltimore: n. 1. p. 312-529. 2005.

SPIX, J.B.VON. 1823. Simiarum et vespertilionum Brasiliensium species novae. F. S. Hübschmann, Munich, Germany (<http://www.sil.si.edu/DigitalCollections/NHRareBooks/Spix/spix.htm>)

TROUessant, E. L. 1878. Catalogue de mammiferes vivants et fossiles. Ordo III. Chiroptera. *Rev. Mag. Zool.* 3, 6:201–54.

WILLIAMS, S. L., AND H. H. GENOWAYS. 2007. Subfamily Phyllostominae Gray, 1825: Mammals of South America. *In*: Mammals of South America, Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats, University of Chicago Press, Editors: A. L. Gardner, pp.255-300

Taxonomia integrativa revela diversidade críptica em *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae)

Artigo a ser submetido à revista Journal of Mammalogy

1. INTRODUÇÃO

Espécie é a unidade fundamental da biodiversidade, fazendo a conexão entre áreas da biologia micro e macro evolutiva (Ridely 2006). Darwin (1859) afirmou que, apesar de nenhuma definição de espécie ter satisfeito a todos os naturalistas, cada qual saberia, ao menos vagamente o que reconhece como uma espécie. Hoje, quase 160 anos depois, ainda não há consenso sobre um conceito unificador para espécie nos diversos campos da biologia. Conceitos de espécie são frequentemente confundidos com critérios operacionais para se identificar essas unidades (e.g. Cracraft 1983; Mallet 1995; Baker & Bradley 2006), ao invés de qualificá-las filosoficamente. Incontáveis são os debates sobre como definir uma espécie tanto conceitualmente quanto operacionalmente (e.g. Hey 2006; Rapini 2004; Zander 2007; Mallet 2010). Um desses debates envolve a ideia de que cada definição moderna de espécie é uma variação de um conceito de linhagem geral (de Queiroz 1998), no qual diz que espécie é o segmento de uma população com linhagem evolutiva independente. Segundo de Queiroz (1998), conceitos de espécie trazem esta ideia explícita ou implicitamente e, portanto, adotar o conceito de linhagem geral seria uma forma prática e simples de resolver o problema relacionado à definição de espécies.

Os critérios para delimitação de espécies estão vinculados às ferramentas utilizadas para entender a variação dentro do objeto de estudo. Uma abordagem integrativa, utilizando diferentes fontes de dados e metodologias, tem se mostrado necessária para a compreensão dos limites entre essas entidades, dada a complexidade da biologia de uma espécie, além de elevar

o nível de confiabilidade no reconhecimento de um novo táxon (Dayrat 2005; Pante et al. 2015).

Em se tratando de espécies crípticas, i.e. espécies que foram classificadas sob um único nome mas que são pelo menos superficialmente indistinguíveis por morfologia (Brickford et al. 2007), identificar os limites interespecíficos é ainda mais desafiador. Para contornar esse problema, ferramentas ecológicas (e.g. modelagem de nicho ecológico em Glor & Warren 2011) e moleculares têm sido utilizadas como complementação à morfologia tradicional e têm auxiliado na compreensão dos níveis de variações em populações naturais que não podem ser diferenciadas aplicando-se o tradicional critério de morfoespécie aristotélico e lineano (Cronquist 1978). Estudos filogeográficos têm levado ao questionamento de especiação críptica em espécies de ampla distribuição geográfica, quando mudanças genéticas não são acompanhadas por mudanças fenotípicas (Paupério et al. 2012). Aliada às matrizes moleculares multi-loci, a utilização de novas abordagens para acessar a diversidade morfológica e ambiental pode ser o caminho para reconciliar as diferenças na delimitação das espécies (Raxworthy et al. 2007; Hickerson et al. 2010; Glor & Warren 2011; Florio et al. 2012; Barley et al. 2013)

Nesse contexto, *Trachops* Gray, 1847 é um gênero monotípico de morcego filostomídeo (Chiroptera, Phyllostomidae) com apenas *T. cirrhosus* (Spix, 1823) válida atualmente, apesar de terem sido descritas outras espécies e subespécies ao longo do tempo. De ampla distribuição na região Neotropical, *T. cirrhosus* ocupa regiões de altitudes inferiores a 500 m desde o sul do México ao sul do Brasil (Cramer et al. 2001), ocorrendo em diferentes biomas e habitats, mas geralmente associado às florestas (Fenton et al. 1992). Duas das três subespécies reconhecidas atualmente, ocorrem em áreas restritas da distribuição: ao norte, *Trachops cirrhosus coffini* (Goldman, 1925), e ao sul, *Trachops cirrhosus ehrhardti* Felten, 1956, da distribuição, com *Trachops cirrhosus cirrhosus* (Spix, 1823) intercalado entre ambas.

Análises filogenéticas de *T. cirrhosus* baseadas no gene mitocondrial citocromo b (cit-b), indicaram cinco clados, cujas divergências moleculares variaram entre 5,5–11%, representando amostras desde Honduras na América Central ao sudeste do Brasil na América do Sul (Ditchfield 1996). Esses níveis de divergência genética podem indicar complexos de espécie e são 10 vezes maiores que aqueles encontrados em outros morcegos da mesma família e de distribuição geográfica similar, como *Artibeus lituratus* e *Carollia perspicillata* (Ditchfield 2000). Num estudo recente, Clare 2011 encontrou nove linhagens mitocondriais distintas de *T. cirrhosus* distribuídas entre a Guiana e o México. Nesse mesmo estudo, o marcador nuclear ligado ao cromossomo Y (Dby) apresentou baixas taxas de substituição e não foi informativo para essa espécie (Clare 2011), embora tenha resgatado relações dentro de outras espécies de morcegos neotropicais.

A estruturação filogeográfica de *T. cirrhosus* é clara ao nível mitocondrial, ainda que com grandes lacunas na amostragem, mas as variações morfológicas e ecológicas nunca foram antes investigadas. Três principais hipóteses foram testadas neste estudo: (1) *Trachops* compreende apenas uma espécie, como é reconhecida atualmente, com alta diversidade intraespecífica; (2) as subespécies atualmente reconhecidas representam linhagens evolutivas que podem ser consideradas espécies; (3) cada linhagem mitocondrial poderia representar uma espécie distinta distinguíveis também por outras matrizes de dados. Desse modo, utilizei uma abordagem que integra investigação multi-loci, morfometria clássica e modelagem de nicho ecológico (ENM) para testar a diversidade dessa espécie ao longo da distribuição.

Os resultados do presente estudo mostram que *Trachops* deve ser dividido em duas linhagens reconhecidas ao nível de espécie: *Trachops ehrhardti*, monotípico e *T. cirrhosus*, com duas subespécies (*T. c. cirrhosus* e *T. c. coffini*). Essa nova nomenclatura será utilizada e discutida ao longo do texto, sob a luz dos resultados apresentados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem molecular e sequenciamento

Foram utilizadas amostras de tecidos de 160 indivíduos obtidos por meio de empréstimos de 10 coleções, correspondendo à amostragem das três subespécies reconhecidas, compreendendo amostras do México ao sudeste do Brasil de 82 localidades. Sequências depositadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) foram utilizadas, contribuindo para o aumento de 132 indivíduos na amostragem para o citocromo c oxidase I (COI), 1 para o citocromo b (cit-b) e 2 para o Gene Ativador da Recombinação 2 (RAG2) (Dados amostrais disponíveis em: <https://github.com/bsf07/Defesa.git>). Para os demais marcadores, não foi possível acessar a localidade das poucas sequências depositadas na plataforma online (somente 1 sequência de dois marcadores) e não foram, portanto, consideradas nas análises.

As extrações de DNA foram realizadas a partir de amostras de tecidos hepáticos ou musculares utilizando o protocolo de extração de DNA total seguindo a técnica SDS/NaCl/Proteinase K (Bruford et al. 1992). As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram preparadas para clonar fragmentos de oito marcadores moleculares, sendo 3 mitocondriais e 5 nucleares. Foram amplificados os seguintes fragmentos: COI, cit-b, região controladora do DNA mitocondrial (D-loop), íntron 7 do β -Fibrinogênio (β -fib), íntron 9 da Proteína cinase C Iota type (PRKCI), Tirotropina (THY), Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 5A (STAT5A) e RAG2. As reações para cada marcador tiveram volume final de 15 μ L, contendo cerca de 40 ng de DNA molde, 0,3 μ M de cada iniciador (tabela 1), 1,5 a 2,5 mM de $MgCl_2$, 160 a 200 μ M de dNTP, 0,5 unidade de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1x tampão de reação.

Foi utilizado o método de purificação dos produtos de PCR com polietilenoglicol 8000 a 20% e NaCl 5 M, adaptado ao protocolo de Sambrook (2001). O equipamento ABI 3500® (Applied

Biosystems) foi utilizado para sequenciar os segmentos de DNA selecionados e as reações de sequenciamento foram realizadas com o kit para sequenciamento BigDYE[®] (Thermo Fisher Scientific), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. As reações de sequenciamento foram unidirecionais para o COI. Após análise inicial de 287 indivíduos deste marcador (155 sequências obtidas neste trabalho e 132 do GenBank), foram selecionadas amostras dos principais clados encontrados na filogenia para dar continuidade ao sequenciamento dos demais marcadores. Outros seis marcadores moleculares também foram sequenciados na direção *forward*, e apenas o STAT5A foi sequenciado em ambas as direções. Toda a metodologia foi realizada no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

As sequências foram visualizadas e alinhadas no Geneious[®] 9.0.5 (Biomatters) utilizando o algoritmo MUSCLE (Edgar 2004). O teste de grau de saturação de bases nucleotídicas foi conduzido no R 3.3.2 (R Core Team 2016), utilizando o pacote ape (Paradis et al. 2004) e as distâncias genéticas p não corrigidas, dentro de e entre cada clado, foram calculadas para cada marcador no programa Mega 7 (Kumar et al. 2016).

Quatro marcadores nucleares apresentaram polimorfismo muito reduzido e as filogenias recuperadas não mostraram quaisquer relações entre os indivíduos amostrados (dados não apresentados) e baixa proporção de sítios variáveis. Portanto, os marcadores PRKCI, β -fib, THY e RAG2 não foram sequenciados para incorporar a matriz concatenada. Sendo assim, a matriz alinhada de marcadores combinados foi composta por 2341 pb do cit-b, do COI, do D-loop e do STAT5A (tabela 1).

2.2 Reconstruções filogenéticas

O modelo evolutivo HKY+G foi selecionado pelo jModeltest 2.1 (Guindon & Gascuel 2003; Darriba et al. 2012) para cada marcador independentemente. Para a análise combinada de todos os marcadores, foi usado o PartitionFinder 1.1 (Lanfear et al. 2012) que selecionou o modelo HKY+G e a partição única dos dados através do critério de informação Bayesiano (BIC).

Tabela 1. Localização dos oito marcadores moleculares utilizados em *Trachops* neste estudo, tamanho da sequência alinhada, proporção de sítios variáveis e pares de iniciadores utilizados e suas respectivas referências.

Marcador	Alinhamento (pb)	Sítios variáveis (%)	Pares de iniciadores	Referência
<i>Mitochondrial</i>				
Cit-b	793	25,72	MVZ05 e MVZ16	Smith & Patton, 1993
COI	657	23,74	LCO1490 e HCO2198	Folmer et al., 1994
D-loop	430	22,56	E1 e L0	Douzery & Randi, 1997; Huchon, 1999
<i>Nuclear</i>				
β -fib	680	5,44	BI17-rod2 e BI7U-2	Porter et al. 2007
PRKCI	315	0,97	BatPKa e BatPKb	Eick et al. 2005
RAG2	583	0,34	RAG2F1 e RAG2F2	Baker et al., 2000
STAT5A	461	26,6	BatSTATa e BatSTATb	Eick et al. 2005
THY	483	3,52	BatTHYa e BatTHYb	Eick et al. 2005

Todos os alinhamentos usados para essas análises continham os grupos externos *Tonatia saurophila* Koopman & Williams, 1951 e *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758), cujas sequências foram obtidas no GenBank (Dados amostrais disponíveis em: <https://github.com/bsf07/Defesa.git>). Para cada marcador molecular e para a análise de todos os marcadores combinados, as filogenias foram reconstruídas pela inferência bayesiana (IB) e por máxima verossimilhança (MV).

As filogenias bayesianas foram estimadas por meio do programa MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) na plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2>), utilizando 10 milhões de gerações para 2 corridas de 4 cadeias independentes de Markov Monte Carlo (MCMC). As cadeias foram amostradas a cada 1.000 gerações e o *burnin* de 25% foi aplicado. As filogenias de MV foram inferidas no programa Garli 0.94x (Zwickl 2006), por meio de 5 milhões de gerações, 100 pseudo-réplicas de *bootstrap* e a árvore consenso da maioria (*majority-rule*) foi obtida no PAUP 4.0a (Swofford 2002). As filogenias resgatadas foram visualizadas e editadas no FigTree 1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

A análise para estimar a árvore coalescente foi implementada como um método adicional para se compreender a ancestralidade entre as linhagens candidatas às diferentes espécies utilizando o software BEAST 2.5 e o pacote *BEAST2 (Ogilvie et al. 2017). Essa análise foi estimada utilizando o conjunto de dados de três marcadores, com a exclusão do D-loop devido às características do marcador, o qual é mais comumente utilizado em análises intraespecíficas. A matriz concatenada conteve os marcadores *cit-b*, *COI* e *STAT5A*, onde os loci mitocondriais tiveram o modelo de sítio ligados, uma vez que o DNA mitocondrial é herdado como uma unidade. O método MCMC com 50 milhões de gerações e amostragem a cada 5000 foi implementado e o resultado foi analisado no Tracer 1.5, no qual foi verificado o estabelecimento da fase estacionária das cadeias quando os valores de tamanho efetivo da amostra (ESS) para todos os parâmetros eram superiores a 200. As 10 mil árvores resultantes foram visualizadas no DensiTree 2.2.6 (Bouckaert & Heled 2014).

2.3 Morfologia

Foram medidos 1.093 crânios de espécimes adultos das 3 subespécies reconhecidas atualmente. Os holótipos de *T. ehrhardti* e *T. c. coffini* foram analisados, entretanto, não há holótipo designado para *T. c. cirrhosus*. Os espécimes analisados (Dados amostrais disponíveis em: <https://github.com/bsf07/Defesa.git>) estão depositados em 25 coleções científicas. Dez medidas foram aferidas: maior comprimento do crânio (GLS), comprimento cêndilo-incisivo (CIL), largura entre caninos (CB) largura do arco zigomático (ZB), largura do mastoide (MB), largura interorbital (POC), largura da caixa craniana (BBC), comprimento da série de dentes maxilares (CM3), largura entre molares superiores (M3M3), altura do crânio (SH).

Algumas estruturas cranianas danificadas não puderam ser medidas para alguns crânios e dados perdidos não são permitidos em algumas análises (e.g. Análise de Componentes Principais). Para preencher os valores perdidos, foi escolhido o pacote MICE utilizando o método *predictive-mean matching* (pmm) (Buuren & Groothuis-Oudshoorn 2011), no qual amostras aleatórias são atribuídas a partir de uma série de valores observados. Os conjuntos de dados foram agrupados por localidades para restringir os valores a serem estimados, evitando assim, possível viés dos dados uma vez que a ampla distribuição geográfica poderia demonstrar grande variação de tamanhos. Indivíduos que tinham menos de 70% das medidas aferidas foram descartados da análise, e a matriz final compreende 10 medidas de 818 espécimes: *T. ehrhardti* (n=35), *T. c. coffini* (n=185) e *T. c. cirrhosus* (n=598).

Para visualizar a variação dos caracteres morfométricos, foi conduzida a Análise de Componentes Principais (PCA), para resumir as tendências gerais de variação de tamanho dentro do conjunto de dados global tratado como uma amostra única. O dimorfismo sexual foi testado

para cada táxon separadamente realizando-se análise de variância (ANOVA) para comparar machos e fêmeas utilizando os valores da PC1.

Como explicado por Chang (1983) e reforçado por Cadena et al. (2017), os componentes principais que apresentam os maiores autovalores, não necessariamente explicam a maior variabilidade dos dados. Desse modo, a análise de *normal mixture model* (NMM) também foi realizada para se testar possíveis agrupamentos morfométricos (Cadena et al. 2017). O pacote *mclust* (Scrucca et al. 2016) utiliza algoritmos de *expectation-maximization* para testar a possibilidade de formação grupos em dados com distribuição gaussiana. Foi testada a formação de 1 a 9 grupos com base nas seguintes hipóteses: (1) há apenas uma espécie de *Trachops*, como é reconhecida atualmente; (2) cada subespécie pode corresponder a uma espécie diferente de *Trachops*; e (3) pode haver até nove espécies de *Trachops*, correspondentes às nove linhagens genéticas de Clare (2011). Previamente a esta análise, o teste de Shapiro-Wilk foi realizado para testar a normalidade dos dados. Todas as análises foram conduzidas na plataforma R.

Adicionalmente à morfometria, crânios de 358 espécimes adultos de ambos os sexos foram analisados a olho nu ou sob microscópio estereoscópico em busca de caracteres qualitativos que pudessem diferenciar as subespécies *T. c. cirrhosus* e *T. c. coffinii*.

2.4 Modelagem de nicho ecológico (ENM)

Para estimar áreas de adequabilidade ambiental, a modelagem de nicho ecológico para *Trachops* foi baseada em 19 variáveis climáticas (Apêndice 1) atuais do WorldClim e uma de altitude, todas com resolução de 30" (aproximadamente 1 km²). Os pontos de ocorrência com informações de coordenadas decimais foram obtidos em três diferentes fontes: na plataforma

VertNet (<http://vertnet.org/>), na literatura e por meio de dados não publicados gentilmente cedidos por pesquisadores (Dados amostrais disponíveis em: <https://github.com/bsf07/Defesa.git>). Como critério de ocorrência, foram considerados apenas pontos com material testemunho registrado em coleções zoológicas. Do total de 1.760 pontos iniciais de ocorrência, o pacote *dismo* (Hijmans et al. 2011) removeu as duplicatas e elegeu 556 pontos de ocorrência únicos, dos quais 511 foram selecionadas utilizando o pacote *spThin* (Aiello-Lammens et al. 2015), na plataforma R, para eliminar os pontos equidistantes em até 1 km, restringindo-se, assim, a um ponto de ocorrência por quadrante da variável com o propósito de evitar viés na análise devido à falsa atribuição de peso dos pontos de ocorrência.

Três partições foram selecionadas para testar os modelos de distribuição com base nos resultados das análises moleculares e morfológicas: (1) *T. ehrhardti*, (2) *T. c. coffini* com inclusão dos indivíduos da Costa Rica e (3) *T. c. cirrhosus*. A seleção do *background* foi realizada para cada partição utilizando-se a ferramenta de *buffer* no QGIS 2.18 (QGIS Development Team 2016) e informações disponíveis sobre a ecologia da espécie ou de espécies próximas. Embora a área de vida de *T. cirrhosus* seja estimada para aproximadamente 5 km² (Bernard & Fenton 2003; Jones et al. 2017), essa medida é pouco provável de refletir a capacidade de mobilidade dos indivíduos da espécie. Assim, foi utilizado *buffer* de 150 km² em cada ponto de ocorrência a fim de extrapolar a estimativa da capacidade de mobilidade atribuída a *Artibeus lituratus* (Esbérard et al. 2017), pertencente à mesma família, e evitar subestimativa de nicho para *Trachops*.

As predições foram calculadas utilizando modelo de *presence-background* no MaxEnt 3.4.1 (Phillips et al. 2006) com 100 replicações de *bootstrap* e o desempenho preditivo dos modelos foram acessadas usando a área sob a curva (AUC), na qual valores acima de 0,8 são característicos de modelos de desempenho elevado (Swets 1988). Os modelos resultantes da análise foram

transformados em *rasters* de presença e ausência no QGIS 2.18 e o limiar de *minimum training presence* foi aplicado para cada modelo por ser o mais conservativo.

Foram realizados testes de sobreposição de nicho ecológico e de identidade de nicho para avaliar a semelhança entre os três modelos no ENMTools 1.3 (Warren et al. 2010). O primeiro compara as áreas adequadas entre os modelos gerados pelo MaxEnt entre as partições e o segundo testa a hipótese de que os modelos gerados de duas ou mais partições são mais diferentes do que o esperado se eles fossem desenhados ao acaso. Em ambas as análises, o grau de similaridade é calculado usando dois índices: estatística *D* de Schoener e estatística *I* de Hellinger (Warren, Glor & Turelli 2008), variando de 0 (ausência de sobreposição/similaridade de nichos) a 1 (total sobreposição/similaridade de nichos).

Adicionalmente, foi testado se poderia haver barreira ou área de baixa adequabilidade climática entre a população da Mata Atlântica sul e os demais indivíduos por meio do teste de ruptura de área (*range-breaking test*) utilizando a ferramenta “blob” no ENMTools. Este teste é indicado quando há duas populações ou duas espécies alopátricas cuja barreira entre elas parece não ser linear. A análise agrupa pares aleatórios de pontos de ocorrência das duas populações testadas, selecionando um ponto inicial ao acaso e expandindo até que se tenha o mesmo número de pontos de ocorrência da menor população inicial para cada pseudoreplicata (total = 100), desenhando o menor polígono possível ao redor desses pontos.

2.5 Conceito de espécie e critérios operacionais para delimitação de espécies

Neste estudo foi utilizado o conceito unificador de Linhagem Geral (de Queiroz 1998), o qual postula que a única propriedade conceitual necessária de uma espécie é que existam linhagens

evoluindo separadamente. Os critérios operacionais para delimitação de espécies foram baseados em cada tipo de dados: (a) monofiletismo nas análises filogenéticas (Mishler & Theriot 2000); (b) distinção fenotípica morfológica e/ou morfométrica (Sokal & Crovello 1970); (c) divergência de nicho na modelagem de nicho ecológico (Van Valen 1976; Funk et al. 2006). No presente estudo, utilizei também o conceito de subspecie, definida como sendo uma unidade que apresenta grande concordância entre conjuntos de caracteres geograficamente estruturados (Patton & Conroy 2017).

2.6 Análises filogeográficas e datação molecular

Os haplótipos para os marcadores mitocondriais foram identificados no DnaSP 6.12 (Librado & Rozas 2009) e as relações hierárquicas não enraizadas foram visualizadas na rede de haplótipos gerada no NETWORK 5 (Rohl 2000), pelo algoritmo *median-joining* (Bandelt et al. 1999). O índice de fixação (F_{ST}) foi calculado no Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier et al. 2010) pela análise de variância molecular (AMOVA).

A estimativa de tempo de divergência foi feita no BEAST 2.5 (Bouckaert et al. 2014), utilizando a matriz de dados combinados, composta pelos marcadores moleculares *cit-b*, *COI* e *STAT5A*, totalizando 1915 pares de base (pb) de 60 indivíduos. O modelo calibrado de Yule foi selecionado como prior para o relógio relaxado com distribuição log normal não-correlacionado. O monofiletismo foi forçado tanto para os pontos de calibração quanto para o nó dos dois clados mais inclusivos de *Trachops*, a fim de se manter a topologia da árvore gerada pela análise bayesiana para todos os quatro marcadores.

Foram utilizados 5 pontos de calibração, com distribuição normal (Ho & Phillips 2009), cujas médias das datas foram selecionadas de estudo prévio, baseadas em registro fóssil, para

datação de morcegos da família Phyllostomidae (Datzmann et al. 2010). Os pontos de calibração correspondem ao ancestral comum mais recente (ACMR) entre Desmodontinae, Carollinae, Stenodermatinae, Glossophaginae e Phyllostominae (32 Ma); ACMR entre Carollinae, Stenodermatinae, Glossophaginae e Phyllostominae (29 Ma); ACMR entre Stenodermatinae, Glossophaginae e Carollinae (27 Ma); ACMR entre Stenodermatinae e Carollinae (22 Ma); ACMR entre *Tonatia* e *Trachops* (25 Ma). O desvio padrão para cada nó foi calculado respeitando o intervalo de confiança (IC) de 95%. Corridas de MCMC com 100 milhões de gerações e com amostragem a cada 10 mil foram implementadas. O resultado foi analisado no Tracer 1.5, no qual foi verificado o estabelecimento da fase estacionária das cadeias quando os valores de ESS para todos os parâmetros eram superiores a 200. O programa Logcombiner 2.5.0 (Bouckaert et al. 2014) foi utilizado para combinar as árvores das três análises independentes, que foram realizadas a fim de se evitar subamostragem, e o burnin de 25% foi aplicado. A árvore sumarizada foi obtida no Treeanotator (Bouckaert et al. 2014), a qual foi visualizada no FigTree e no R foi inserida a escala cronológica utilizando o pacote phyloch 1.5 (Heibl 2008).

3. RESULTADOS

3.1 Reconstruções filogenéticas

De um modo geral, as topologias das árvores resultantes das análises de IB e MV foram concordantes tanto para as análises individuais dos marcadores quanto para a combinada, que recuperando as relações mais profundas com probabilidade posterior igual ou superior a 95% e *bootstrap* acima de 70% para as 7 linhagens com divergências genéticas $\geq 5\%$. Tratam-se inicialmente de 2 grandes grupos mais inclusivos: um formado por *T. ehrhardti* na Mata Atlântica centro-sul e outro formado por *T. cirrhosus* contemplando indivíduos da Mata Atlântica do nordeste brasileiro ao México. Esse último clado não apresentou suportes estatísticos altos (*bootstrap*=54% e probabilidade posterior=91%), mas aqui será considerado como um grupo com as devidas explicações nas seções seguintes. Este grupo compreende 6 filogrupos conforme mostrado na figura 1: *T. c. coffini*, incluindo as amostras do México à Costa Rica, e cinco clados de *T. c. cirrhosus* — Istmo do Panamá (PI), no Panamá e Guarico, Venezuela (único grupo cuja distância genética foi menor que 5%, a ser discutido adiante), noroeste da Amazônia (NWAm) (Equador, Venezuela e Amazônia brasileira), sudoeste da Amazônia (SWAm) (Peru e Amazônia brasileira); Escudo das Guianas (GS) e leste da Amazônia (EAm) (Figura 1). Deve-se notar que o clado *T. c. coffini* faz parte de um clado mais inclusivo, que abrange várias linhagens distintas de *T. c. cirrhosus*, fazendo com que essa última subespécie seja parafilética, mas que apresentam uma concordância entre conjuntos de caracteres estruturados ao longo de sua distribuição. Esses resultados, aliados à divergência genética e variação morfológica (conforme resultados apresentados a seguir), reforçam a ideia de que essas duas formas (*T. c. coffini* e *T. c. cirrhosus*) são subespécies e não espécies distintas (vide discussão abaixo).

Embora haja proximidade geográfica entre alguns pontos amostrais de diferentes linhagens, a simpatria não foi detectada com base nesse conjunto de dados. Na Guiana, por exemplo, a menor distância entre indivíduos dos clados GS e EAm é de apenas 8 km em linha reta e na bacia Amazônica, indivíduos dos clados SWAm e GS estão distantes cerca de 50 km, mas sem confirmação de simpatria ou sintopia em ambos os casos.

Os filogrupos recuperados por cada marcador molecular individualmente (Apêndice 2) apresentaram algumas diferenças em relação à árvore de dados concatenados. Para o COI, foram recuperados 7 clados com alto suporte estatístico, sendo os mesmos recuperados na análise da matriz concatenada. A filogenia do *cit-b* recuperou 6 desses sete clados (apenas o clado PI não foi recuperado por esse marcador). Embora esses 2 marcadores tenham apresentado maior estruturação para os grupos terminais nas filogenias do que os outros marcadores não-codificantes, as relações mais profundas entre esses grupos não foram resolvidas. Para o marcador nuclear STAT5A, um clado composto por todos os indivíduos amostrados na Mata Atlântica (incluindo tanto *T. c. cirrhosus* do nordeste quanto *T. ehrhardti* do centro-sul) foi recuperado em ambos os critérios de otimização com alto suporte estatístico. Além disso, o clado *T. c. coffini* foi recuperado com 79% de valor de *bootstrap* e com probabilidade posterior de 93%. Já a filogenia do D-loop recuperou clados estruturados localmente: indivíduos de localidades próximas do Pará (Brasil), do Amapá (Brasil), de Madre de Dios (Peru) e de Rondônia (Brasil), de Napo e de Orellana (Equador), de Orange Walk (Belize) e de Peten (Guatemala), de Caiena (Guiana Francesa), o clado *T. ehrhardti* na Mata Atlântica centro-sul, e SWAm (elucidado adiante).

As distâncias genéticas entre esses grupos para cada marcador apontaram divergências de 4,2% (entre *T. c. coffini* e *T. c. cirrhosus* PI) a 9,7% (entre *T. ehrhardti* e *T. c. cirrhosus* NWAm) para o COI. Para o *cit-b*, esses valores foram semelhantes – 4,6% (entre *T. c. coffini* e *T. c.*

cirrhosus PI) a 10% (entre *T. ehrhardti* e *T. c. cirrhosus* SWAm) – enquanto para o D-loop esses números variaram de 1,8% (entre *T. c. cirrhosus* NWAm e GS) a 5,6% (entre *T. ehrhardti* e *T. c. cirrhosus* SWAm). Utilizando o STAT5A, as distâncias evidenciaram *T. ehrhardti* como o grupo mais divergente de todos os demais (0,28% a 0,32% – *T. c. cirrhosus* GS), em contraposição às distâncias entre dos demais grupos (0,0% a 0,12%). As distâncias, principalmente entre espécimes dos dois grandes clados – *T. ehrhardti* e *T. cirrhosus* – são equivalentes àquelas observadas ao nível interespecífico, sendo um indicativo de essas duas formas serem duas espécies distintas.

A árvore de espécies também reforça a hipótese de que *T. ehrhardti* e *T. cirrhosus* são espécies distintas e as topologias das 10 mil árvores geradas nessa análise não apresentaram conflitos no que diz respeito da separação desses grupos (Figura 1B), diferentemente de quando testada para as três subespécies. As distâncias genéticas entre essas espécies mostraram divergências de 8%, 9%, 5,1% e 0,3% para os marcadores COI, cit-b, D-loop e STAT-5A, respectivamente.

3.2 Morfologia

Trachops cirrhosus apresentou diferenças de tamanho entre machos e fêmeas ($p < 0,002$), embora inconspícuas, enquanto *T. ehrhardti* não apresentou dimorfismo ($p=0,5614$) (Apêndice 3). Análises de componentes principais demonstraram grande variação no conjunto de dados, sendo que três variáveis de comprimento (CIL, GLS, CM3) e três de largura (ZB, MB, M3M3) apresentaram valores muito similares e foram as mais representativas para o primeiro componente (PC1 = 73,1%). Já as variáveis de largura POC e BBC foram as que mais contribuíram para o PC2 (7,0%). Nota-se também que os caracteres contribuíram para a variação no mesmo sentido, sugerindo que a PC1 é relacionada ao tamanho e a PC2 à forma (Figura 2).

Há grande sobreposição no espaço morfométrico de uma maneira geral, mas fica claro que *T. c. coffini* e *T. ehrhardti* possuem crânios de menor tamanho, quando comparados à *T. c. cirrhosus*, que apresenta o maior grau de variação no espaço morfométrico, estando de acordo com sua ampla extensão geográfica, incluindo indivíduos desde o Panamá até e nordeste brasileiro na América do Sul. Também é claro que os indivíduos de *T. c. cirrhosus* do Escudo das Guianas (GS) possuem crânios notadamente maiores.

Em termos morfológicos, notam-se certos caracteres conspícuos no crânio e nos dentes (Figura 3). Quando comparados com *T. c. cirrhosus* do norte e do oeste da América do Sul, nota-se que, em vista lateral, o ângulo é acentuado entre o rosto e a caixa craniana em *T. c. coffini* e menos acentuado em *T. c. cirrhosus*. No que diz respeito à morfologia dentária, o p1 em *T. c. coffini* possui uma forma característica, que parece ser particular desta subespécie apenas quando associado à característica anterior. Além disso, o m1 apresenta o paraconídeo mais desenvolvido em *T. c. coffini* do que em *T. c. cirrhosus* e pode apresentar o p3 deslocado para a face labial e não para a face lingual como em *T. c. cirrhosus*.

Essas características dentárias, quando combinadas ao ângulo da caixa craniana em relação ao rosto, são eficientes caracteres diagnósticos entre *T. c. coffini* e *T. c. cirrhosus*. Indivíduos da Costa Rica apresentam caracteres morfológicos e tamanho craniano mais similares à *T. c. coffini*, ao contrário do esperado pela distribuição conhecida e indivíduos do Panamá apresentam caracteres de *T. c. coffini* e de *T. c. cirrhosus* em frequências proporcionalmente iguais.

De acordo com observações na morfologia craniana citadas acima, parte dos indivíduos do Panamá se assemelha à *T. c. coffini* e parte à *T. c. cirrhosus*. Dados moleculares indicam que o grupo de *T. c. cirrhosus* do PI é irmão de *T. c. coffini* e o grupo de *T. c. cirrhosus* do NWAm é irmão desse clado, apresentando perceptível ligação do Panamá com a América do Sul. No gráfico

resultante da PCA (figura 2) essa gradação morfométrica entre as formas da América Central e da América do Sul é também visível. O clado de *T. cirrhosus* apresenta, portanto, uma variação clinal em tamanho, com indivíduos menores na América Central e maiores na América do Sul, com o Panamá na zona de contato contendo indivíduos das duas formas.

Os testes de agrupamento com base em NMM apontaram que a existência de dois grupos morfológicos é o cenário mais provável para *Trachops*, rejeitando as hipóteses de que podem existir até nove grupos morfológicos ou apenas um (Figura 4).

Nota-se também que o modelo com três agrupamentos selecionado pelo algoritmo é o segundo cenário mais provável, entretanto, quando partição com as três subespécies é testada, esta é considerada ainda menos provável que a partição gerada pelo modelo. Em geral, *Trachops* mostra-se em formas menores nos extremos da distribuição (*T. ehrhardti* e *T. c. coffini*) e no centro em formas maiores (*T. c. cirrhosus*) (Figura 5). Além disso, alguns indivíduos de *T. c. cirrhosus* são menores, sendo, portanto, classificados no grupo de indivíduos menores ($p < 0,05$).

Espécimes de *T. ehrhardti* ficaram divididos entre os grupos morfométricos pequeno e grande. Diferentemente das amostras do Panamá ($n=112$, 13,7% da amostragem total), que também apresentaram frequência mista, este grupo possui apenas 35 indivíduos (4,3% do total).

Por fim, os métodos utilizados para explorar os dados morfométricos apontam indícios de existência de dois grupos, mas não claramente definidos ou concordando inteiramente com os resultados filogenéticos. Ainda que as diferenças sejam significativas ($p < 0,05$) em todos os cenários, identificações apenas por meio de morfometria, especialmente em áreas de possível simpatria entre as duas espécies, necessitam de atenção devido à grande sobreposição observada.

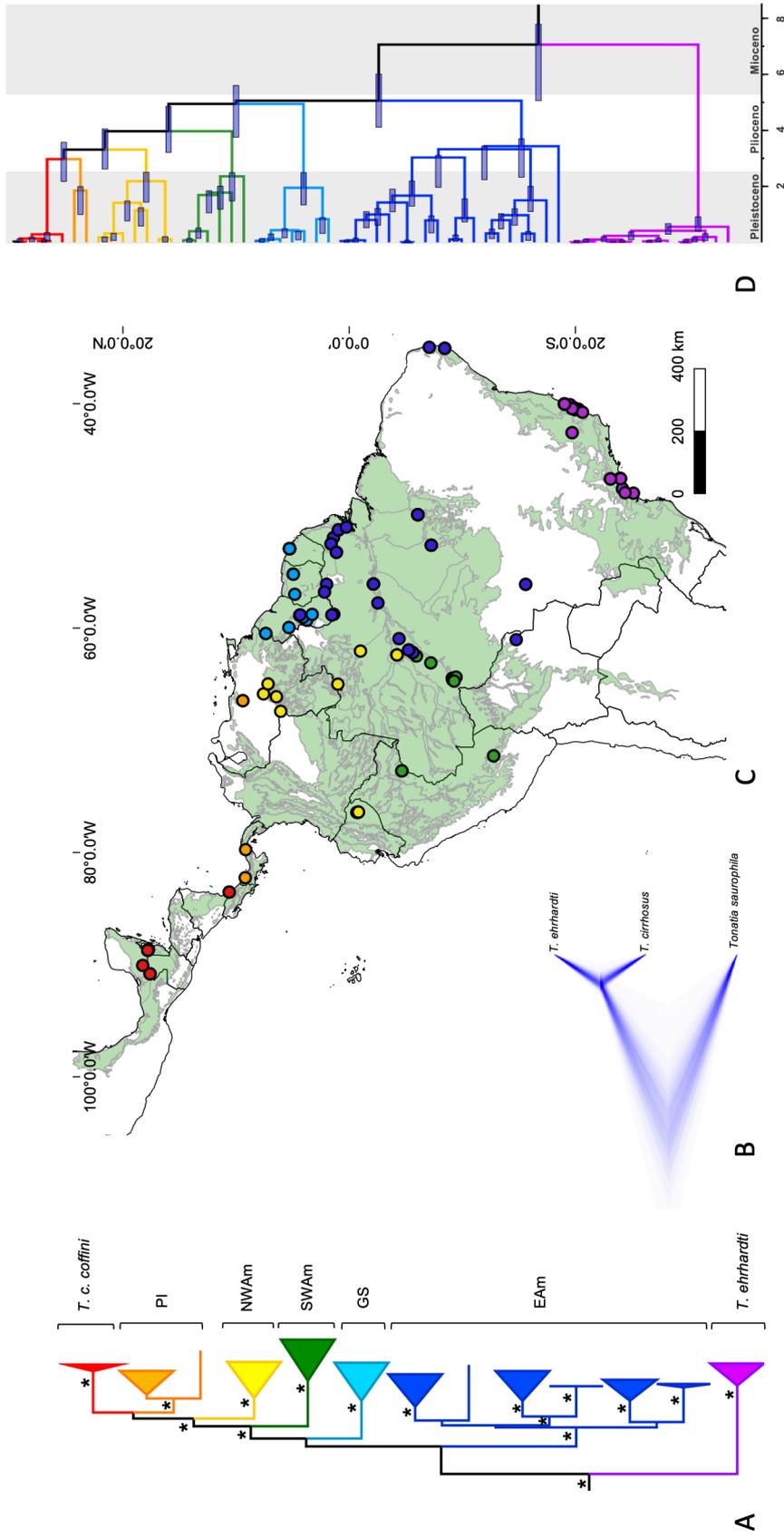


Figura 1. Relações filogenéticas entre 129 espécimes de *Trachops* com base em seqüências dos quatro marcadores (A) reconstruídas por máxima verossimilhança e (B) árvore de espécies gerada pelo método de coalescência na qual a intensidade das linhas corresponde à frequência dos arranjos de cada uma das 10 mil árvores geradas. As cores na filogenia indicam a distribuição dos filogrupos no mapa (C), onde biomas de florestas úmidas tropicais estão destacados em verde. Os asteriscos indicam probabilidade posterior $\geq 95\%$ e *bootstrap* $\geq 70\%$. Em D, a estimativa de tempo de divergência para *Trachops* utilizando a matriz concatenada com *cit-b*, *COI* e *STAT5A*.

3.3 Modelagem de nicho ecológico (ENM)

Os modelos de distribuição (Figura 6) foram significativos para cada um dos três táxons: *T. ehrhardti* (AUC=0,979), *T. c. coffini* (AUC=0,955) e *T. c. cirrhosus* (AUC=0,845). Para *T. c. coffini* (Figura 6C), foram encontradas áreas de maior adequabilidade nas terras baixas da América Central, parte do Escudo das Guianas e na porção central da floresta amazônica, caracterizando áreas propícias disjuntas evitando as terras altas dos Andes e seu entorno. Áreas de maior adequabilidade para *T. c. cirrhosus* (Figura 6B) incluem o norte da Mata Atlântica (a partir do extremo nordeste do estado da Bahia) às terras baixas e úmidas da América Central, com áreas menos propícias também na área de terras altas dos Andes, no Brasil Central e na área propícia à *T. ehrhardti*. Já para *Trachops ehrhardti* (Figura 6A), o modelo indica áreas isoladas em ilhas de adequabilidade ao longo da distribuição conhecida para *T. cirrhosus*. No que diz respeito à Mata Atlântica, a área de maior adequabilidade encontra-se ao sul da distribuição e outra do nordeste do estado da Bahia ao sul do Alagoas sendo a região entre o extremo sul e o extremo nordeste da Bahia uma grande área de baixa adequabilidade climática. Para cada um dos três táxons a altitude se apresentou como uma variável de grande contribuição para o modelo de distribuição, cuja maior adequabilidade é observada em áreas de elevação mais baixa.

O teste de sobreposição de nicho identificou maior sobreposição entre *T. c. coffini* e *T. c. cirrhosus* ($D=0,5786$; $I=0,8593$) do que entre *T. c. cirrhosus* e *T. ehrhardti* ($D=0,3302$; $I=0,6255$), com *T. c. coffini* e *T. ehrhardti* tendo sobreposição intermediária ($D=0,4469$; $I=0,7468$). Os valores das estatísticas I e D para o teste de identidade de nicho foram maiores do que os valores empíricos (Figura 7), indicando que os nichos não são mais idênticos do que o esperado para um conjunto aleatório. Os índices para cada comparação desse teste apresentaram valores significativos ($p < 0,001$).

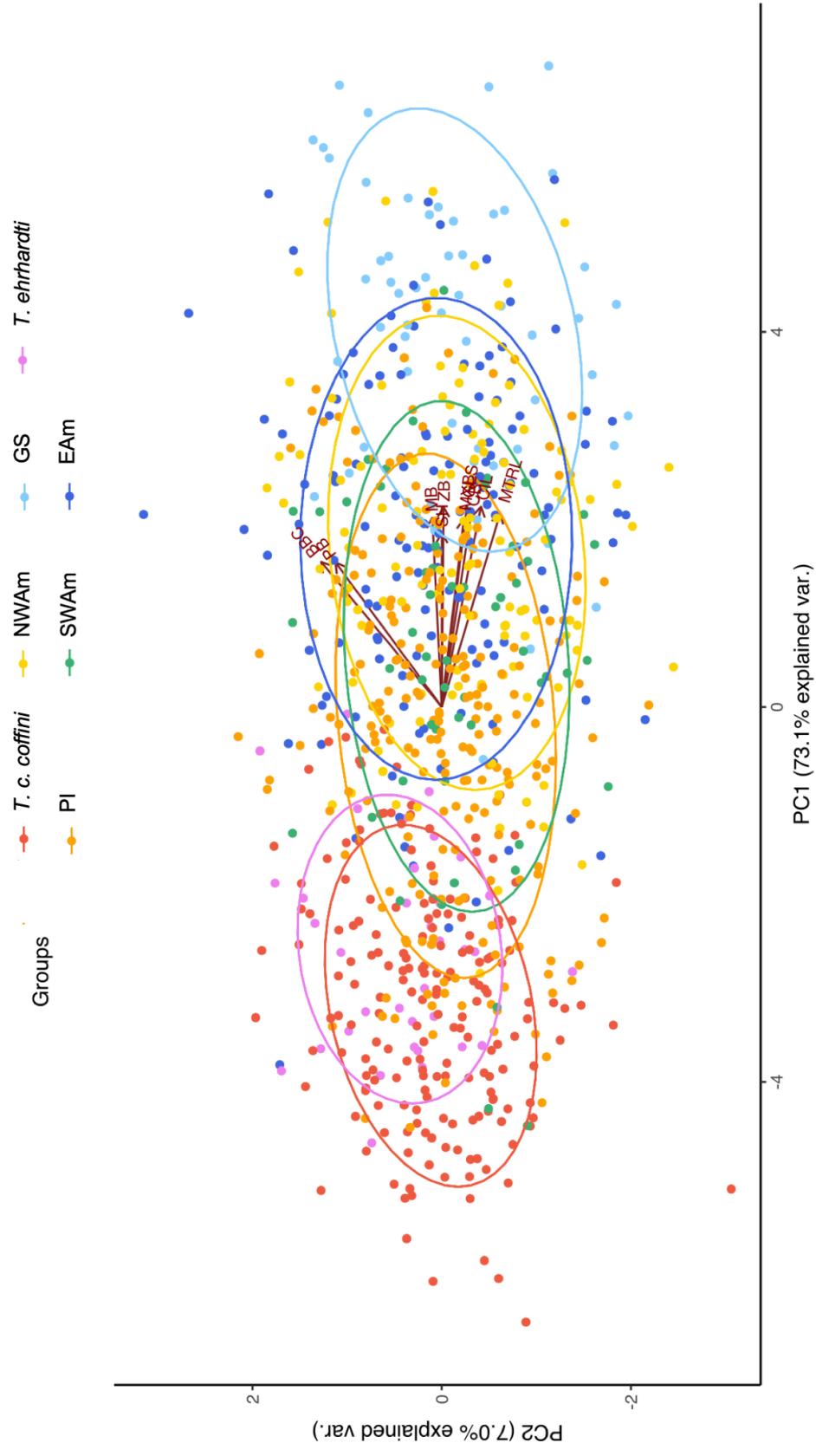


Figura 2. Diagrama representando os dois primeiros componentes principais com base em 10 caracteres cranianos para cada espécime de *Trachops*. Elipses indicam os sete filogrupos encontrados nas análises filogenéticas.

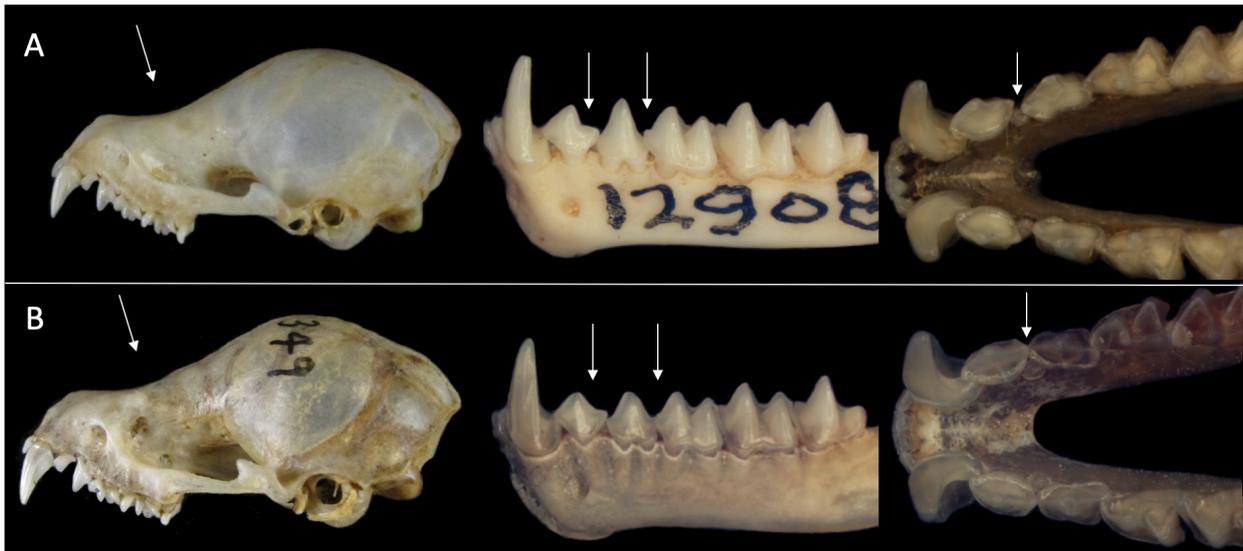


Figura 3. Variação dos caracteres morfológicos em (A) *T. c. coffini* (AMNH 129086) e (B) *T. c. cirrhosus* (AMNH 209349). Da esquerda para direita, pode-se observar diferenças no ângulo entre o rostró e a caixa craniana, no formato do p1 e no desenvolvimento do paraconídeo do m1 e no deslocamento lingual ou labial do p3.

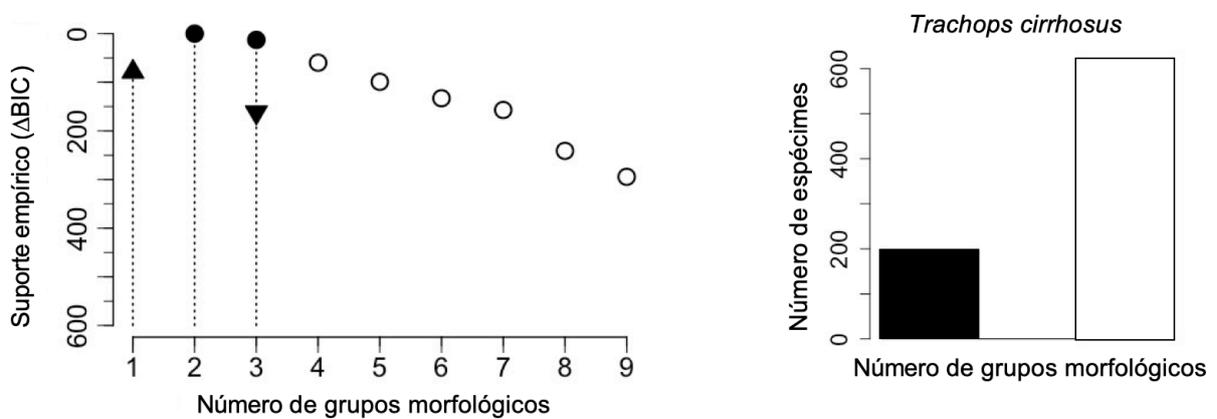


Figura 4. Análise de agrupamento pela metodologia de *normal mixture models*. À esquerda, o teste de hipóteses de formação de um a nove grupos morfométricos. Os círculos representam as estimativas do modelo. O triângulo se refere ao teste de hipótese utilizando a taxonomia atual, uma espécie, e o triângulo invertido se refere ao teste utilizando as três subespécies, reconhecidas atualmente, como partições. À direita, a separação em dois grupos morfométricos, indicados pelas barras, utilizando a taxonomia atual de *Trachops cirrhosus*.

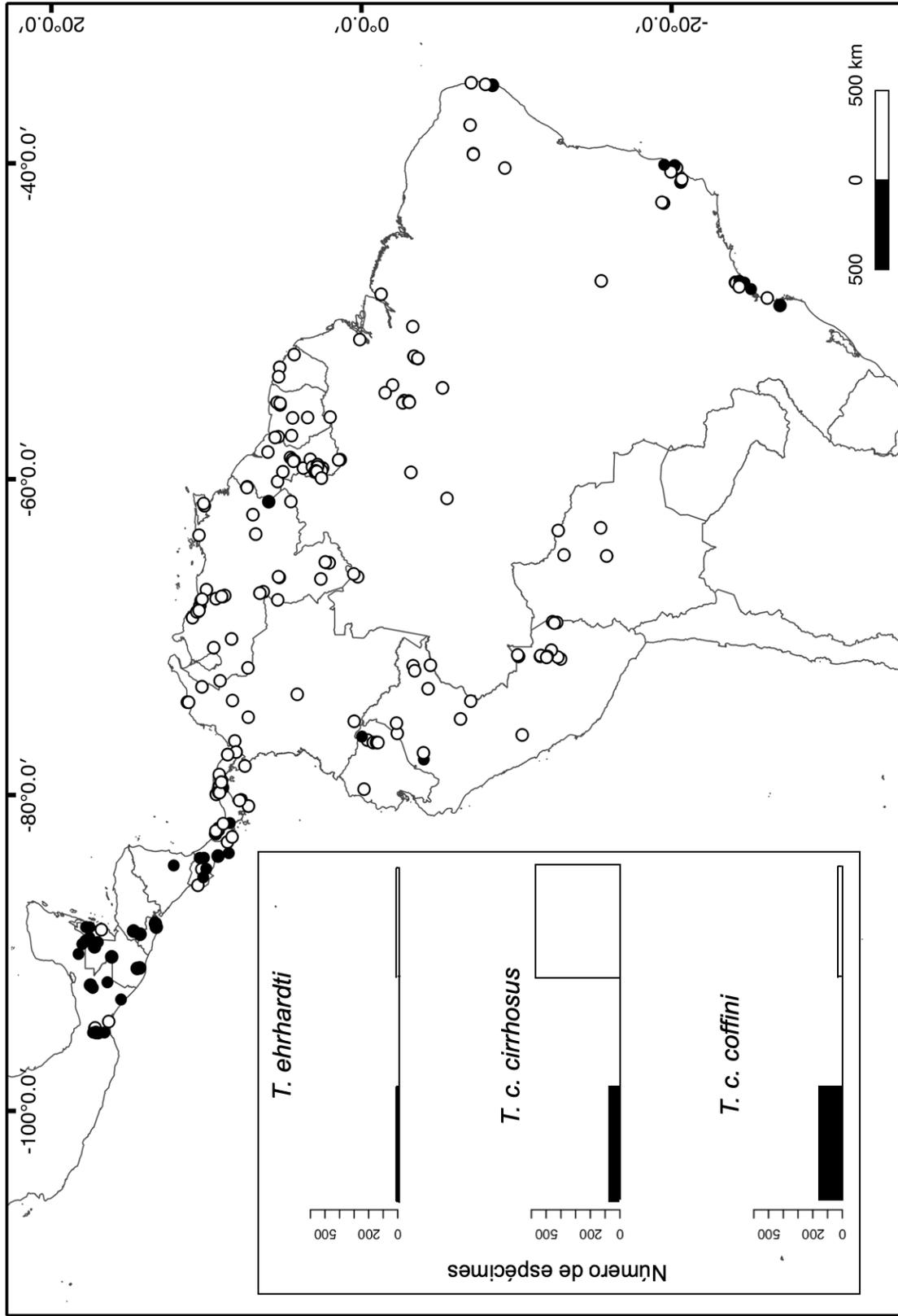


Figura 5. Distribuição dos dois grupos morfológicos encontrados em *Trachops* pela análise de *normal mixture models* representando-os em cada grupo taxonômico. Em preto, as formas menores e em branco as formas maiores.

Os valores de *I* e *D* para o teste de quebra de barreira geográfica para *T. cirrhosus* e *T. ehrhardti* foram significativos ($p < 0,0001$ em ambos os casos), sugerindo que há uma transição de ambientes tanto entre as porções sul e norte da Mata Atlântica quanto também a oeste deste bioma, criando regiões de quebra geográfica entre as espécies.

Tabela 2. Médias e desvio padrão de cada variável craniana, em milímetros, para cada táxon de *Trachops*.

	<i>T. c. cirrhosus</i>		<i>T. c. coffini</i>		<i>T. ehrhardti</i>	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
CIL	25,94 ± 0,68	26,12 ± 0,72	24,82 ± 0,34	25,11 ± 0,39	24,86 ± 0,39	24,94 ± 0,34
GLS	29,14 ± 0,77	29,38 ± 0,79	27,94 ± 0,44	28,27 ± 0,42	28,23 ± 0,48	28,06 ± 0,40
ZB	14,48 ± 0,45	14,61 ± 0,50	13,59 ± 0,24	13,7 ± 0,26	13,85 ± 0,25	13,77 ± 0,27
MB	13,69 ± 0,35	13,8 ± 0,40	13,04 ± 0,21	13,13 ± 0,22	13,3 ± 0,25	13,27 ± 0,19
POC	5,28 ± 0,18	5,3 ± 0,18	5,06 ± 0,12	5,06 ± 0,13	5,13 ± 0,20	5,06 ± 0,15
BBC	11,53 ± 0,28	11,6 ± 0,30	11,27 ± 0,22	11,44 ± 0,28	11,48 ± 0,20	11,48 ± 0,24
CM3	10,67 ± 0,30	10,75 ± 0,30	10,09 ± 0,22	10,2 ± 0,20	10,14 ± 0,16	10,19 ± 0,17
M3M3	10,18 ± 0,32	10,23 ± 0,33	9,61 ± 0,21	9,68 ± 0,17	9,83 ± 0,23	9,83 ± 0,24
CB	6,23 ± 0,24	6,31 ± 0,26	5,75 ± 0,15	5,87 ± 0,15	5,82 ± 0,17	5,87 ± 0,15
SH	17,78 ± 0,60	17,9 ± 0,63	16,86 ± 0,43	16,94 ± 0,38	16,87 ± 0,34	16,75 ± 0,37

3.4 Considerações filogeográficas

Foi encontrada alta diversidade haplotípica ($Hd=0,9875$) no DNA mitocondrial e as relações entre os táxons de *Trachops* pode ser visualizada na rede de haplótipos (Figura 8). Embora *T. cirrhosus* e *T. ehrhardti* tenham apresentado valores de F_{ST} esperados para populações panmíticas (0.08479 e 0.14053, respectivamente), e observou-se estruturação geográfica em *Trachops*, com 97% de compartilhamento de haplótipos entre localidades próximas (i.e até 50 km

em ambas as espécies) e apenas 3% dos haplótipos apresentando compartilhamento entre localidades distantes em *T. cirrhosus*. Neste último caso, os haplótipos 2 (entre amostras do Pernambuco e da Paraíba no Brasil) e 43 (entre amostras de Upper Takutu-Upper Essequibo, na Guiana, e Sipaliwini e Coeroeni no Suriname) apresentam compartilhamento entre cerca de 140 e 300 km, respectivamente.

Quando observamos a distribuição dos filogrupos por florestas tropicais úmidas (Figura 1), notamos que o filogrupo EAm compreende a Amazônia, a Mata Atlântica, além de duas regiões de ecótonos: uma no Pantanal/Cerrado brasileiro e uma no Parque Nacional Noel Kempff Mercado, o qual é composto na maior parte por floresta amazônica, mas também compreende uma complexidade de ambientes desde savanas inundadas a “campo cerrado” (Killeen & Schulenberg 1998). Pode-se observar também que populações da região do Escudo das Guianas estão distribuídas em diferentes clados na filogenia.

A estimativa de tempo de divergência (Figura 1D) indica uma média de divergência entre *Trachops* e *Tonatia* de 25,55 Ma, durante o Oligoceno. As duas espécies de *Trachops* divergiram por volta de 7,03 Ma (5,04–7,75), entre o Mioceno Tardio e o Plioceno. Embora as mostras de *T. ehrhardti* terem um ACMR no Pleistoceno tardio, *Trachops cirrhosus* tem um ACMR bem mais antigo, no Plioceno. O clado da América Central parece ter divergido daqueles da América do Sul por volta de 2,96 Ma (IC = 2,1–3,6) na transição Plioceno-Pleistoceno.

Notamos que alguns subgrupos estruturados geograficamente divergiram durante o Pleistoceno, como os da Amazônia do leste se separando da do oeste, norte do Suriname e Guiana Francesa da Guiana; enquanto outros não são exatamente bem estruturados, como o oeste da Amazônia brasileira e peruana, o leste da Amazônia brasileira e a Mata Atlântica do nordeste, a porção sul da Guiana e do Suriname do norte do Brasil. Em contrapartida, o filogrupo *T. c. coffini*

parece se diversificar muito pouco, assim como *Trachops ehrhardti*, mas diferentemente deste último, *T. c. coffini* é muito mais recente.

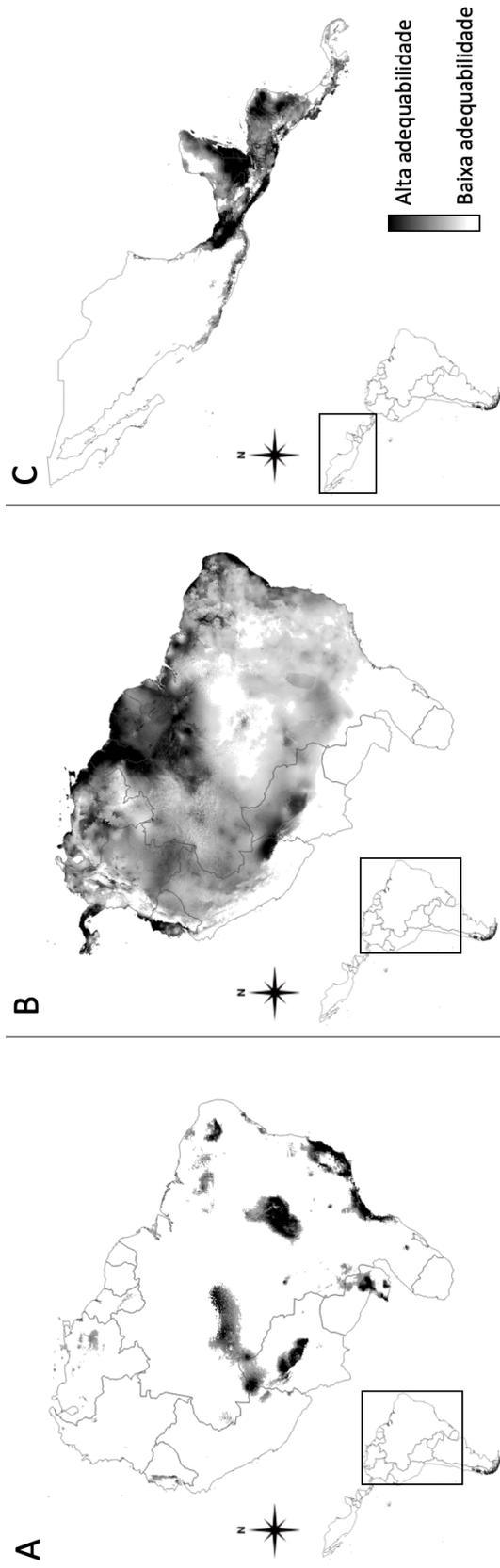


Figura 6. Modelos de nicho ecológico gerados para as três partições: (A) *ehrharti*, (B) *cirrhosus* e (C) *coffini*. Os níveis de sombreamento representam probabilidade logística contínua de ocorrência baseada na adequação climática e altitudinal. A escala de cinza representa a adequação decrescente de altamente adequado (preto) a inadequado (branco).

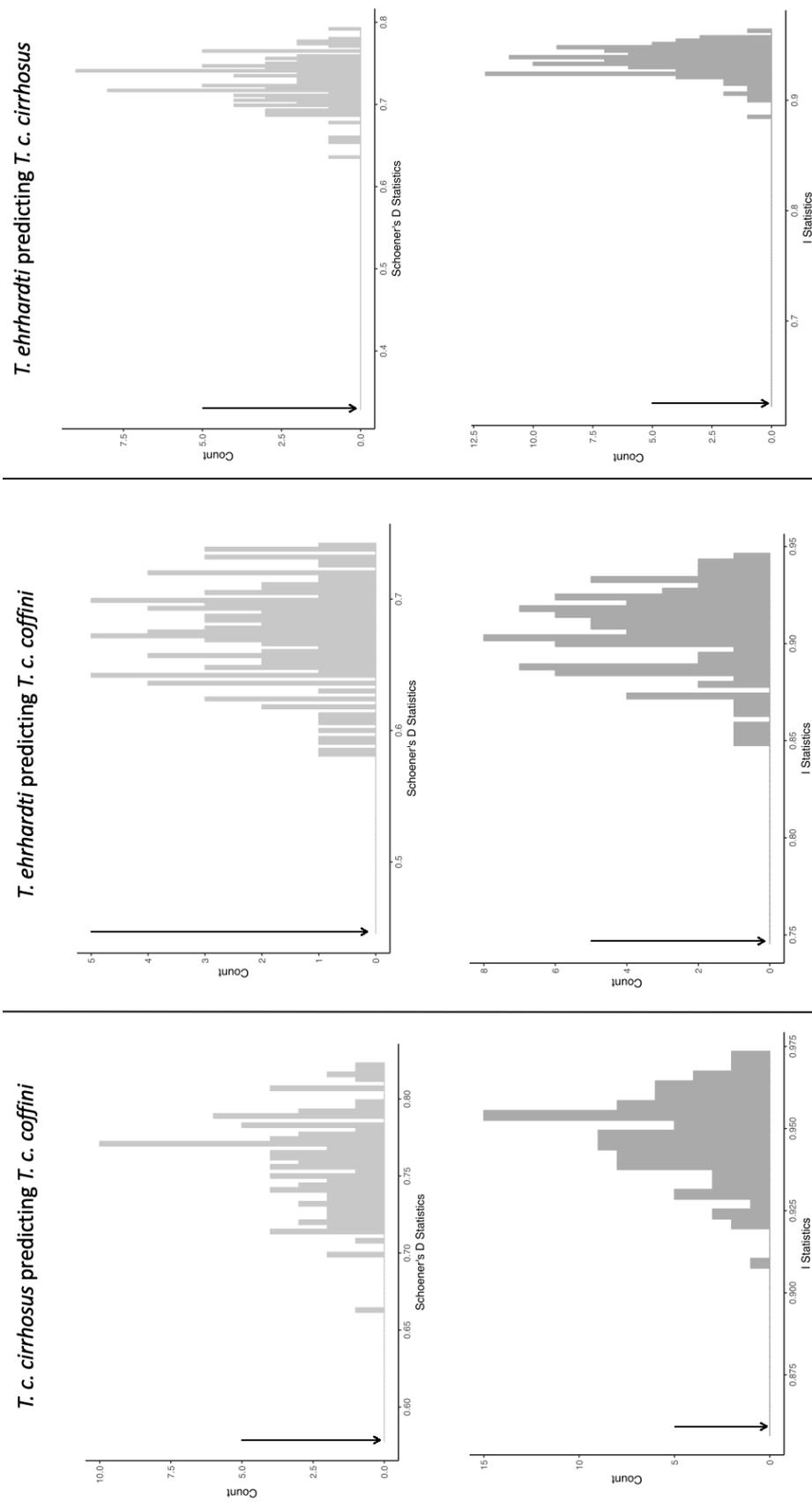


Figura 7. Teste de identidade de nicho por pares de táxons. As barras indicam a distribuição dos valores de sobreposição de nicho para 100 pseudoreplicatas e as setas indicam os valores empíricos de sobreposição de nicho. Para todos os casos $p < 0,001$.

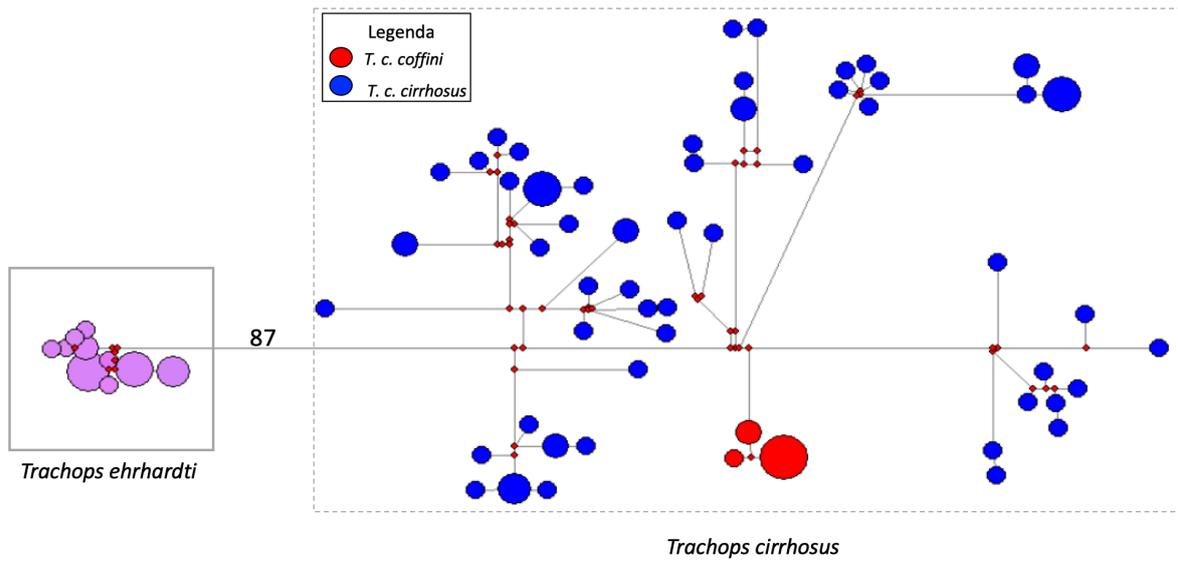


Figura 8. Rede de haplótipos mostrando as relações entre os táxons de *Trachops*.

4. DISCUSSÃO

4.1 Filogenia molecular e especiação críptica

A taxonomia de *Trachops* permaneceu estável desde 1956, quando Felten (1956b) considerou *T. coffini* como subespécie de *T. cirrhosus*. Desde então, aceitou-se a identidade monotípica do gênero e poucos trabalhos levantaram perguntas a respeito dessa questão. Os dois únicos estudos abordando potencial diversidade críptica em *Trachops* foram realizados por Ditchfield (1996), utilizando sequências parciais do gene mitocondrial *cit-b* e por Clare et al. (2007, 2011) e Clare (2011), utilizando primariamente COI e, mais recentemente, um marcador de linhagem paterna, o *Dby*. No entanto, este é o primeiro estudo que integra evidências de diferentes matrizes de dados, apontando os indícios de que *Trachops* compreenda mais de uma espécie.

Adotando o conceito de linhagem geral de Queiroz (1998), as evidências deste estudo apontam para a necessidade do reconhecimento de duas espécies de *Trachops*. Aqui, proponho que *T. c. ehrhardti* seja elevada à categoria específica, *Trachops ehrhardti*, que corresponde à linhagem da Mata Atlântica do sul e sudeste do Brasil, e que *Trachops cirrhosus* continue compreendendo as subespécies *T. c. cirrhosus* e *T. c. coffini*. Patton & Conroy (2017) criticam a inconsistência entre as metodologias para designação de subespécies e o conceito Hennigiano (Hennig 1966). Na era das abordagens moleculares, o conceito não deve confundir relações filogenéticas dentro de uma espécie com o sistema de classificação lineano (Hennig 1966). Subespécies, segundo Hennig (1966), seriam comunidades reprodutivas vicariantes que não são necessariamente distinguíveis puramente por morfologia. Aqui, *T. c. cirrhosus* e *T. c. coffini* são claramente diferenciadas por caracteres morfológicos conspícuos, apesar de não serem reciprocamente monofiléticas, e as considerações geográficas serão discutidas adiante.

Devido à ampla distribuição geográfica de *Trachops* e em ambientes tão distintos num intervalo de tempo relativamente longo (~17 Ma segundo Hoffmann et al. 2008), era de se esperar que houvesse mais de uma linhagem evolutiva dentro do gênero, suficientemente diferentes para serem reconhecidas como espécies. De um modo geral, a filogenia recuperada neste trabalho foi concordante com a dos estudos anteriores realizados para o gênero (Ditchfield 1996; Clare et al. 2007, 2011; Clare 2011). A filogenia da matriz concatenada com todos os marcadores, recuperou 7 linhagens com alta divergência de sequências entre elas e baixa dentro de cada uma: 2 a mais que em Ditchfield (1996) e 2 a menos que em Clare (2011). Para o primeiro trabalho citado, podemos concluir que a expansão da amostragem para o oeste da América do Sul recuperou os clados NWAm e SWAm que não foram analisados no estudo anterior. Além disso, pode-se compreender melhor a relação entre populações dos diferentes biomas do Brasil que serão discutidos na próxima seção. O COI também recuperou duas linhagens distintas na Mata Atlântica, uma ao norte e outra ao sul, assim como o cit-b (Ditchfield 1996), resultado conflitante com o marcador nuclear – que mostrou um clado para toda a Mata Atlântica. Podemos entender esse conflito como o fato de marcadores nucleares e mitocondriais possuírem taxas de evolução diferentes e segregação independente, portanto, serem esperadas árvores de genes conflitantes (Maddison 1997). Além disso, a árvore de espécies, que utiliza a teoria coalescente em sua metodologia, resgata as relações entre as duas espécies de *Trachops* sem mostrar o conflito entre os marcadores nucleares e mitocondriais, corroborando a topologia concatenada.

Ainda que o presente estudo tenha preenchido lacunas de amostragem do trabalho de Clare et al. (2011) e Clare (2011), especialmente na porção sul-americana da distribuição do gênero, foram recuperados sete e não nove clados, como sugerido pela autora. Isto porque Clare (2011) considerou o trabalho de Bradley & Baker (2001), no qual linhagens com divergência genética \geq

2% são candidatas a espécies diferentes e merecem investigação minuciosa. No presente estudo, considerei filogrupos (como definido por Avise & Walker 1999) com divergências de sequências $\geq 5\%$, para o cit-b (como sugerido por Baker & Bradley 2006). Vale ressaltar que esse não é um valor absoluto, e os autores mostram que entre algumas espécies de mamíferos esse valor pode ser menor, como por exemplo entre espécies do gênero *Carollia* (Hoffmann & Baker 2003) e entre espécies do gênero *Oxymycterus* (Hoffmann et al. 2002). Portanto, dentro de *Trachops cirrhosus* foram considerados dois filogrupos, PI e *T. c. coffini*, entre os quais a divergência de sequências do cit-b foi 4,6%, por serem clados irmãos cujo nó não apresentou suporte estatístico suficientemente alto. Por outro lado, os valores de divergência de sequências do cit-b entre os dois grandes clados de *Trachops* são comparáveis e em alguns casos maiores que para espécies-irmãs de *Myotis* (Larsen et al. 2012) e *Carollia* (Martins et al. 2007).

Como para o marcador de herança paternal utilizado em Clare (2011), quatro dos cinco marcadores autossômicos utilizados aqui não se mostraram informativos, todavia o marcador STAT5A recuperou dois clados – Mata Atlântica e *T. c. coffini* – evidenciando filogrupos que poderiam representar espécies distintas. Entretanto, quando analisamos a filogenia concatenada observamos que a Mata Atlântica contempla dois clados e que *T. c. coffini* é um dos clados de origem mais recente na árvore. Dessa forma, não poderíamos considerar os grupos resgatados pelo marcador nuclear como duas espécies distintas sem cometer o erro de considerar espécies parafiléticas com base no critério monofilia de Mishler & Theriot (2000). Com base no conjunto de dados genéticos, *Trachops* poderia contemplar pelo menos quatro espécies segundo aquele conceito.

Analisando os resultados da morfologia, notamos que há claramente dois grupos discrepantes em tamanho, no qual o grupo de indivíduos menores compreendem os extremos sul

e norte da distribuição do gênero (*T. ehrhardti* e *T. c. coffini*, respectivamente) e o grupo de indivíduos maiores (*T. c. cirrhosus*) está distribuído na região central. *Trachops cirrhosus coffini* e *T. ehrhardti* estão muito isolados geográfica e geneticamente um do outro e podemos então entender esses grupos morfológicos como sendo três e não dois, quando levamos em conta o fator geográfico. Sendo assim, *T. ehrhardti* corresponde um clado divergente tanto em termos moleculares quanto morfológicos e geograficamente coeso, reforçando sua singularidade. Mesmo que não se tenha incluído indivíduos da localidade-tipo de *T. ehrhardti* nas análises genéticas, o holótipo e os parátipos foram incluídos na análise morfométrica e se encontram dentro do espectro de variação morfométrica observada em *T. ehrhardti*.

Quando descreveu *T. c. ehrhardti*, Felten (1956a) relatou a semelhança de tamanho com *T. c. coffini* em disparidade com os exemplares de *T. c. cirrhosus* do norte da América do Sul que ele analisou. Na diagnose, o autor relata que ela se diferencia da forma nominal pelo tamanho menor. Acrescento que, embora *T. ehrhardti* seja semelhante em tamanho à *T. c. coffini*, vários caracteres morfológicos cranianos e dentários são diferentes. O autor aferiu 8 das 10 medidas cranianas utilizadas no presente estudo e afirmou não poder alocar os indivíduos do Pará, Ceará e Minas Gerais por falta de dados morfométricos dessas localidades. Aqui podemos entender, que dentre aquelas localidades, apenas a porção de Mata Atlântica no leste de Minas Gerais compreende distribuição de *T. ehrhardti* e que, diferentemente do que Jones e Carter (1976) propuseram, a distribuição não chega à Bolívia, onde os indivíduos são *T. c. cirrhosus*.

Além dos desafios conceituais e filosóficos enfrentados ao se identificar espécies, é sabido que a operacionalidade é um problema ainda maior quando há linhagens genéticas altamente diferenciáveis e morfologicamente muito similares, como é o caso de espécies crípticas de ampla distribuição geográfica (e.g., Clare 2011; Funk et al. 2012; Barley et al. 2013). Os clados que

apresentam alta divergência genética e estrutura geográfica bem definidas mostram uma variação morfométrica clinal, na qual os indivíduos da América Central são relativamente menores do que os da América do Sul. Curiosamente, *T. ehrhardti* é similar em tamanho aos *T. c. coffini* da América Central, sendo resultado de convergência morfológica, dado que este último grupo parece ter divergido a partir do norte da América do Sul onde os indivíduos são maiores. Todavia, os caracteres morfológicos encontrados na América Central, como a inclinação entre o rosto e a caixa craniana e os caracteres dentários descritos na seção anterior, não são encontrados no grupo do sul da Mata Atlântica sendo a semelhança entre eles restrita ao tamanho.

A existência de dois grupos morfométricos é corroborada pela análise de NMM, evidenciando as diferenças em tamanho e separando dois grupos em *T. cirrhosus* utilizando a taxonomia atual. Quando analisamos separadamente as duas espécies, a análise mostra dois grupos nos três táxons, mas apenas em *Trachops ehrhardti* a proporção de indivíduos é igual, porém com uma amostra muito baixa. Isso pode ter sido afetado pela falta de sensibilidade da análise para amostras com baixo número de indivíduos em relação às demais. A atribuição de praticamente 50% dos indivíduos para cada grupo e o fato de que para 60% dos caracteres as diferenças entre os grupos 1 e 2 de *T. ehrhardti* não foram diferentes daquelas esperados ao acaso ($p > 0,05$) são indicadores para esse argumento. O contínuo geográfico de intermediários observado em *T. cirrhosus* talvez dificulte o entendimento ou a delimitação prática entre as duas espécies do gênero, uma vez que há grande sobreposição de caracteres quantitativos. O Panamá parece ser uma zona de interesse para estudos de simpatria entre os dois grupos morfométricos, mostrando-se uma área complexa para delimitar a variação geográfica e também morfométrica entre as duas subespécies de *T. cirrhosus*. Outras formas de acessar informações fenotípicas, como por exemplo a morfometria geométrica, talvez tragam luz ao reconhecimento de morfoespécies. Esse é um caso

em que a especiação não é acompanhada por mudanças morfológicas conspícuas, no qual *T. ehrhardti* e *T. cirrhosus* sobrepõem-se em tamanho e caracteres morfológicos, apesar de altas divergências genética e ecológica (discutida adiante).

O posicionamento de *T. c. coffini* na rede de haplótipos é mais um indicativo de que o táxon se trata de uma subespécie e não uma possível espécie-irmã de *T. cirrhosus*. Apesar de apresentar diferenças morfológicas, a diferenciação genética deste grupo é muito pequena, especialmente quando observamos as distâncias genéticas para o marcador nuclear (diferenciável somente de *T. ehrhardti*) e o fato de estar cercada por populações de *T. c. cirrhosus* na rede de haplótipos distintas por poucos passos mutacionais.

Goldman (1925) descreveu *T. coffini*, que mais tarde veio a ser subespécie de *T. cirrhosus*, como sendo similar às demais formas da espécie irmã, mas distintamente menor de uma forma geral. Dentre os caracteres qualitativos descritos pelo autor, os citados neste trabalho não foram assinalados, compreendendo novas observações para a morfologia da subespécie. Embora tenha analisado apenas indivíduos da localidade-tipo, na Guatemala, a distribuição da subespécie foi atribuída do sul do México à Nicarágua. Todavia, o presente estudo indica que a distribuição deve ser expandida para a Costa Rica, onde atualmente considera-se a ocorrência de *T. c. cirrhosus* (e.g., Cramer et al. 2001), dadas às semelhanças morfológicas (caracteres do crânio e da dentição) aos demais indivíduos dessa região. Isso implica que *T. c. cirrhosus* também deva ter sua distribuição geográfica modificada: no Panamá, as duas subespécies de *T. cirrhosus* ocorrem e é difícil delimitar com precisão o limite geográfico entre essas subespécies com base na distribuição dos dados morfológicos. Todavia, é nítido que *T. c. coffini* ocorre por toda a região amostrada da Costa Rica e, por consequência, *T. c. cirrhosus* teria a distribuição do Panamá à Bolívia e Mata Atlântica do Nordeste brasileiro.

4.2 Modelos de nicho ecológico e suas implicações na sistemática e filogeografia

Aliados às outras matrizes de dados, como os genéticos e os morfológicos, os modelos de nicho ecológico podem auxiliar o entendimento de táxons crípticos quando evidenciam a divergência de nicho a qual pode promover adaptações entre populações e minimizar a conectividade entre elas (Sobel et al. 2010; Florio et al. 2012). Desenvolvendo modelos de nicho para as duas espécies de *Trachops*, e considerando duas subespécies de *T. cirrhosus*, observamos adaptações ambientais únicas para *T. ehrhardti* ao sul da Mata Atlântica, que se apresenta menos adequada para *T. cirrhosus*.

Áreas de menor adequabilidade para *T. c. cirrhosus* (figura 6B) na América do Sul apresentam-se nas áreas de terras altas dos Andes, no Brasil Central e na área propícia à *T. ehrhardti*, refletindo, respectivamente (1) a inadequação à região de elevadas altitudes e podendo indicar (2) viés amostral devido ao baixo número de pontos de ocorrência nessa região e (3) áreas de não simpatria com *T. ehrhardti*.

O fato de que *T. ehrhardti* e *T. c. coffini* compartilhem de semelhanças em tamanho e a primeira apresente maior sobreposição de nicho com a segunda do que sua vizinha, a subespécie *T. c. cirrhosus*, pode ser um indicativo de que as pressões ambientais estejam contribuindo para a fixação desta característica convergente em ambas espécies. As condições ambientais que cada táxon utiliza são mais distintas do que as esperadas ao acaso, isto é, os nichos ocupados por cada táxon são mais divergentes que semelhantes entre si. Conservadorismo de nicho é a tendência que táxons relacionados tem para reter características ecológicas ancestrais através do tempo (Peterson et al. 1999) e diferentes grupos de animais mostraram esse padrão. Entre *T. ehrhardti* e *T. cirrhosus* podemos observar correspondência entre a divergência genética e os divergência de nicho

ecológico, sugerindo que as condições ecológicas modeladas (clima e altitude) realizam papel importante na manutenção das diferenças entre as espécies.

Em contrapartida, parecem haver barreiras de baixa adequabilidade ambiental entre a distribuição conhecida de *T. ehrhardti* e *T. cirrhosus*. A especiação ocorre como um produto indireto da divergência quando barreiras ao fluxo gênico evoluem entre populações. Essas populações podem estar geograficamente isoladas por qualquer fator que iniba o fluxo gênico entre elas, tanto por isolamento macro quanto por microgeográfico. Isto é, barreiras geográficas no processo de especiação podem ser conspícuas (e.g. rios e montanhas) ou não – como um contínuo de áreas inadequadas (Mayr 1947). A lacuna de registros de ocorrência do gênero ao sul da Bahia dificulta o entendimento de qual tipo de barreira geográfica possa ter atuado na especiação de *Trachops*.

Embora rios não pareçam isolar populações de ambas as espécies e na ausência de regiões de altitude na porção mais austral da Bahia, a hipótese mais provável para a formação de barreira seria a diferença da formação vegetal. As diferenças florísticas atuais entre a Mata Atlântica do sul e do norte (Santos et al. 2007) e todas as interações bióticas e abióticas envolvidas podem apresentar barreiras ecológicas para as espécies de *Trachops*. Entretanto, assim como outros táxons de vertebrados (e.g. Gazziotin et al. 2006, Costa 2003, Patterson & Costa 2012), a quebra filogeográfica entre as duas espécies de *Trachops* na Mata Atlântica é possivelmente do Mioceno tardio, não coincidindo com as variações climáticas e florestais do final do Plioceno ao Pleistoceno (Patterson e Costa 2012). Apesar dos esforços para entender a diversidade entre táxons da Mata Atlântica do norte e do sul, nosso conhecimento limita-se a entender que a região de quebra filogeográfica varia entre as latitudes 14° e 21° S para a maioria dos vertebrados e que um evento vicariante comum pode ter causado maior divergência próxima à região do Rio Doce (Patterson e

Costa 2012). Entretanto, para as espécies de *Trachops* essa quebra foi mais ao norte e, como bem colocado por Patterson e Costa (2012), nós ainda não sabemos onde nem quais eventos poderiam ter sido responsáveis por esse isolamento na Mata Atlântica.

No que diz respeito a barreira de baixa adequabilidade à oeste desse bioma, ainda que existam indícios de que a Mata Atlântica estava conectada historicamente com outras florestas úmidas (Costa 2003), atualmente o cenário mais provável é que haja um contínuo de áreas inadequadas possivelmente relacionado à formação vegetal. *Trachops ehrhardti* parece ser endêmico da porção sul da Mata Atlântica, sendo ambientes mais secos (e.g. Cerrado, o qual ocorre ao oeste de sua distribuição) pouco adequados para a espécie.

4.3 Integrando disciplinas para gerar hipótese final de especiação críptica em *Trachops*

A filogenia molecular de *Trachops* aponta para a existência de uma linhagem, da porção sul da Mata Atlântica, claramente monofilética – tanto na análise concatenada quanto nas árvores de genes, sendo o único clado recuperado pelo marcador molecular nuclear com alto suporte estatístico. Quando lançamos mão de análises morfométricas para entender a variação fenotípica, nos deparamos com um cenário em que há dois agrupamentos baseados em tamanho: um menor, cuja distribuição é alopátrica e está nos extremos norte (*T. c. coffini*) e sul (*T. ehrhardti*) da distribuição geográfica do gênero, e um maior (*T. c. cirrhosus*), presente no centro e com zona de contato entre populações de *T. c. coffini* e das maiores da América do Sul (*T. c. cirrhosus*) no Panamá.

Diante deste cenário, fica clara a distinção de *T. ehrhardti* das demais linhagens: geneticamente, ecologicamente e morfometricamente. Ainda que as diferenças desta última

abordagem se sobreponham às de *T. cirrhosus*, é importante ressaltar que a ampla distribuição geográfica desta está acompanhada por grande variação morfométrica. Portanto, é compreensível a existência de formas intermediárias cujos tamanhos se sobreponham nas duas espécies. Ainda, as diferenças nas taxas evolutivas entre os caracteres genéticos e morfológicos é um fator a ser considerado quando falamos em espécies crípticas (de Queiroz 2007).

O monofiletismo de *T. cirrhosus* é questionável utilizando-se a filogenia com os quatro marcadores moleculares do presente estudo, na qual o clado representando essa espécie apresentou baixos valores de *bootstrap* e probabilidade posterior. Desse modo, *T. cirrhosus* poderia compreender pelo menos três linhagens genéticas correspondentes a espécies distintas, mas reconhecê-las com base em apenas um critério não teria validade numa abordagem integrativa. Tanto a morfologia quanto a ENM apresentaram resultados que não permitem subdividir esse grupo. Portanto, optei por uma abordagem mais conservativa e considerar duas espécies no gênero.

Indivíduos da localidade-tipo de *T. cirrhosus* estão no clado EAm, o mesmo ao qual pertence indivíduos da localidade-tipo de *T. fuliginosus*, um sinônimo-júnior, sendo esta mais uma evidência de que a taxonomia atual está correta neste caso.

4.4 *Trachops* no tempo e no espaço

As duas espécies de *Trachops* parecem ter divergido por volta de 7 Ma, no Mioceno, com origem do gênero na América do Sul e posterior colonização da América Central, dado que o *T. c. coffini* é um dos mais recentes em *T. cirrhosus* e tem divergência estimada na transição Plio-Pleistoceno. Essa estimativa é concomitante à do fechamento do Istmo do Panamá segundo O’Dea et al. (2016). A datação da formação do Istmo do Panamá tem sido alvo de debates, intensificados

nos últimos anos (Keigwin et al. 1976; Jackson and Dea 2013; Bacon et al. 2015; O’Dea et al. 2016). Embora a data proposta por O’Dea et al. (2016) tenha sido contestada por Jaramillo et al. (2017) e Molnar (2017), os quais levantam questões a respeito das evidências utilizadas naquele estudo, a formação de uma conexão por terra por si só não garante a dispersão de um táxon. Ainda que a data da formação do istmo esteja em debate, somente em condições ambientais e climáticas propícias a dispersão de *T. cirrhosus* poderia ter ocorrido. Essa foi uma questão abordada por Smith et al. (2012) para aves, demonstrando que eventos de especiação no Istmo do Panamá ocorreram em diferentes épocas para aves que habitam ambientes secos e para os úmidos. Ainda, o aumento súbito no registro fóssil por volta dos 2,5 Ma de linhagens de mamíferos migrando da América do Norte para a América do Sul e vice-versa (e.g., Cione et al. 2015; Leigh et al. 2014; Marshall 1985; Marshall et al. 1982; Webb 1991, 2006; Woodburne 2010), no que é conhecido como o Grande Intercâmbio Americano, é exemplificado por Bacon et al. (2016) como sendo o produto da formação de ambientes tipo savana no corredor da América Central, fruto da primeira glaciação do Quaternário. Segundo os autores, mamíferos adaptados a tal ambiente foram capazes de dispersar. *Trachops cirrhosus* é conhecido por habitar ambientes de florestas, ou associado a elas, tanto úmidas quanto secas. Portanto, ainda que a formação do Istmo do Panamá seja mais antiga, como sugerem alguns autores (Montes et al. 2012, 2015; Bacon et al. 2015), o cenário mais provável para a possibilidade de dispersão da espécie deve estar relacionado às condições ambientais mais do que à conectividade de terra por si só.

Alternativamente ao fechamento completo do Istmo do Panamá, uma hipótese de colonização por *island hopping* – como sugerido para mormopídeos do gênero *Pteronotus* no Caribe (Pavan & Marroig 2017) – pela formação incompleta do istmo e devido à ausência de fósseis de *Trachops* para ilhas caribenhas, excluindo-se assim essa rota de colonização, é também

plausível para *T. cirrhosus*. Ainda que a data estimada para divergência entre *T. c. coffini* e *T. c. cirrhosus* há aproximadamente 2,96 Ma, a colonização da América Central pode ter ocorrido mais cedo na história da espécie e as diferenças genéticas tenham aumentado entre tais linhagens ao passo que as morfológicas permaneceram relativamente estáveis.

Os quatro filogrupos sul americanos de *T. cirrhosus* têm data de diversificação durante o Plioceno Tardio, época que tem levado à elaboração de muitas teorias sobre a diversificação de táxons na Amazônia, desde Wallace (1852) com a primeira hipótese biogeográfica de rios como barreiras até atuais testes para esta (Gascon et al. 2000), para a formação do Lago Pebas (Hoorn et al. 2010), formação dos paleoarcos (Patton et al. 1997, 2000), ou a existência de refúgios durante períodos glaciais (Haffer 1969, 2008), dentre outras. Assim como para anuros e para a maioria de espécies de mamíferos (Gascon et al. 2000), rios não são barreiras para *Trachops*. Populações do filogrupo do leste da Amazônia (EAm) ocupam ambas as margens do Rio Amazonas, dentre outros rios menores, e na Mata Atlântica os rios Paraíba do Sul (onde *Desmodus rotundus* apresenta quebra filogeográfica, Martins et al. 2007) e Doce (onde há quebra filogeográfica para *Phyllomys* spp. e *Bradypus variegatus*, Costa & Leite 2012) não isolam populações de *T. ehrhardti*, assim como para maioria de táxons de vertebrados (e.g. Ditchfield 2000; Tonini et al. 2013; Menezes et al. 2016; Dalapicolla & Leite 2018). A influência do Lago Pebas ou dos paleoarcos na diversificação dos grupos amazônicos também é pouco provável, dado que a diversificação desses filogrupos é relativamente recente.

Oliveira et al. (2017) encontraram pouco suporte para a hipótese de centros de endemismos de Cracraft (1985), enfatizando que padrões de distribuição de aves na Amazônia são mais complexos que antes imaginados. Ainda que seja tentador relacionar uma das várias hipóteses para explicar a diversidade nos táxons amazônicos de *T. cirrhosus*, a verdade é que a biogeografia

histórica amazônica é muito complexa e sua diversidade pouco conhecida, sendo muito difícil relacionar um evento histórico isolado à alta diversidade intraespecífica. Dos sete clados recuperados na análise concatenada, os grupos NWAm, SWAm e GS se encontram na Bacia Amazônica em regiões de parapatria, dada a distribuição analisada. Ainda que em áreas próximas esses grupos apresentem alta divergência de sequências entre si (6,4–6,9% para o COI e 6,7–8,1% para o cit-b), a variação genética dentro de cada grupo corresponde ao esperado para variações intraespecíficas em mamíferos, como revisado em Baker & Bradley (2006) e em concordância com os valores encontrados em outras espécies de morcegos de ampla distribuição, como os morcegos frugívoros *Carollia perspicillata* (2%) e *Artibeus lituratus* (1,5%) (Pavan et al. 2011, Ditchfield 2000).

Ao contrário do encontrado para o morcego-vampiro *Desmodus rotundus* (Martins et al. 2009), a estrutura filogeográfica de *Trachops cirrhosus* não parece ter associação com ecorregiões, e *Trachops ehrhardti* parece estar restrita ao sul da Mata Atlântica. A alta diversidade haplotípica mostrou o compartilhamento de haplótipos entre indivíduos de populações próximas e aponta estrutura geográfica em menor escala geográfica em *Trachops* do que, por exemplo, em *Noctilio* (Pavan et al. 2013) além de evidenciar a divergência entre *T. ehrhardti* e *T. cirrhosus*. Quando analisamos os resultados de D-loop para as espécies de *Trachops*, encontramos uma estrutura geográfica ainda mais definida, com compartilhamento de haplótipos apenas dentro de cada localidade. Isto é particularmente interessante quando vemos outras espécies de morcegos neotropicais de ampla distribuição geográfica compartilhando haplótipos entre indivíduos separados por longas distâncias, como acontece com *Carollia perspicillata* (Pavan et al. 2011; Ditchfield 2000), *Sturnira lilium*, *Glossophaga soricina* e *Artibeus lituratus* (Ditchfield 2000). Ao contrário das espécies citadas, é possível que a associação de *Trachops* a ambientes florestados

tenha influência no fluxo gênico interpopulacional, com o desmatamento diminuindo possíveis corredores florestais. Estudos envolvendo área de vida das espécies seriam particularmente interessantes para entender a utilização da área e capacidade de movimentação de populações em áreas preservadas e entre áreas preservadas e alteradas pelo homem.

O filogruppo EAm é o que compreende maior área geográfica e ocupa os mais diversos biomas. Somente no Brasil, este grupo compreende populações da Mata Atlântica do Nordeste, da bacia Amazônica, de uma zona de transição entre os biomas Pantanal e Cerrado; além de incluir indivíduos de populações do escudo das Guianas e de uma área de complexidade de habitats na Bolívia (Killeen & Schulenberg 1998). Esse padrão é similar ao encontrado para pequenos mamíferos não voadores, especialmente para *Marmosa (Micoureus)* (Costa 2003), no qual populações do Brasil Central são mais relacionadas ou a populações amazônicas ou a populações da Mata Atlântica. Aqui, o grupo formado por indivíduos da área de transição entre Pantanal/Cerrado forma um clado com populações da Amazônia Central e do Escudo das Guianas. Este clado, por sua vez, é irmão daquele formado por populações do norte da Mata Atlântica, da Amazônia Central e do Escudo das Guianas. Essa relação Amazônia – Mata Atlântica do Nordeste foi registrada para diferentes táxons de vertebrados (e.g. Costa 2003; Batalha-Filho et al. 2013; Rocha et al. 2015; Prates et al. 2016, 2017; Dal Vechio et al. 2018) e mesmo que em muitos trabalhos tenham proposto rotas de conexão entre esses dois biomas, Auler et al. (2004) argumentam que o registro fóssil é bastante rico para suportar a hipótese de que no nordeste brasileiro a expansão das florestas foi um fenômeno regional e mais contínuo do que se pensava. Curiosamente, a relação entre amostras do Planalto da Guiana e da porção norte da Mata Atlântica também foram recuperadas neste filogruppo. Rocha et al. (2015) encontraram o mesmo padrão para

o arapaçu-do-cacau, uma ave do gênero *Xiphorhynchus*, sendo um padrão incomum encontrado apenas em Aves e serpentes (Dal Vechio et al. 2018) até o presente estudo.

O padrão encontrado para os filogrupos *T. ehrhardti* e EAm, no qual *T. ehrhardti*, na Mata Atlântica do sudeste, divergiu de *T. cirrhosus*, que inclui indivíduos da Mata Atlântica do nordeste, é particularmente interessante porque corrobora os resultados de biogeografia vicariante florística de Santos et al. (2007). Neste estudo, utilizando cerca de 500 espécies de plantas lenhosas, os autores constataram que entre os biomas analisados a porção sul da Mata Atlântica, i.e. ao sul do Rio São Francisco, foi a primeira região a divergir de outras e que a floresta Amazônica e a Mata Atlântica ao norte do Rio São Francisco são grupos irmãos nesta análise e os últimos a divergirem. A diferença na composição de espécies florestais também pode ter tido grande influência na especiação, uma vez que a espécie parece ter forte associação a ambientes de florestas (Fenton et al. 2002), indicando possível dependência da composição florestal e de outros fatores ambientais associados a ela, como o nicho ecológico que cada espécie ocupa.

5. REFERÊNCIAS

AIELLO-LAMMENS, M. E., R. A. BORJA, A. RADOSAVLJEVIC, B. VILELA, AND R. P. ANDERSON.

2015. spThin: An R package for spatial thinning of species occurrence records for use in ecological niche models. *Ecography* 38:541–545.

ARROYO-CABRALES, J., A. L. GARDNER, B. SIGÉ, F. CATZEFLIS, AND T. J. MCCARTHY. 2016.

Taxonomic reassessment of bats from Castelnau's expedition to South America (1843-1847): *Phyllostoma angusticeps* Gervais, 1856 (Chiroptera , Phyllostomidae). *Mammalia* 81:1–5.

AULER, A. S. ET AL. 2004. Quarternary ecological and geomorphic changes associated with

rainfall events in presently semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Quaternary Science* 19:693–701.

AVISE, J. C., AND D. WALKER. 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates:

perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:992–995.

BACON, C. D., P. MOLNAR, A. ANTONELLI, A. J. CRAWFORD, C. MONTES, AND M. C. VALLEJO-

PAREJA. 2016. Quaternary glaciation and the Great American Biotic Interchange. *Geology* 44:375–378.

BACON, C. D., D. SILVESTRO, C. JARAMILLO, B. T. SMITH, P. CHAKRABARTY, AND A. ANTONELLI.

2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:6110–6115.

BAKER, R. J. 1967. Karyotypes of Bats of the Family Phyllostomidae and Their Taxonomic

Implications. *The Southwestern Naturalist* 12:407–428.

- BAKER, R. J., AND R. D. BRADLEY. 2006. Speciation in Mammals and the Genetic Species Concept. *Journal of Mammalogy* 87:643–662.
- BARLEY, A. J., J. WHITE, A. C. DIESMOS, AND R. M. BROWN. 2013. The challenge of species delimitation at the extremes: Diversification without morphological change in philippine sun skinks. *Evolution* 67:3556–3572.
- BARRATT, E. M. ET AL. 1997. DNA answers the call of pipistrelle bat species. *Nature* 387.
- BARROS, H. M. D. D. R., C. G. DE SOTERO-CAIO, N. SANTOS, AND M. J. DE SOUZA. 2009. Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Genetics and Molecular Biology* 32:748–752.
- BATALHA-FILHO, H., J. FJELDSA, P. H. FABRE, AND C. Y. MIYAKI. 2013. Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *Journal of Ornithology* 154:41–50.
- BERNARD, E., AND M. B. FENTON. 2003. Bat Mobility and Roosts in a Fragmented Landscape in Central Amazonia , Brazil Bat Mobility and Roosts in a Fragmented Landscape in Central. *Biotropica* 35:262–277.
- BONATO, V., K. G. FACURE, AND W. UIEDA. 2004. Food habits of bats of subfamily Vampyrinae in Brazil. *Journal of Mammalogy* 85:708–713.
- BOUCKAERT, R. ET AL. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology* 10:1–6.
- BRADLEY, R. D., AND R. J. BAKER. 2001. A Test of the Genetic Species Concept: Cytochrome-b Sequences and Mammals. *Journal of Mammalogy* 82:960–973.
- BUUREN, S., AND K. GROOTHUIS-OUDSHOORN. 2011. Mice: multivariate imputation by chained

equations in R. *J Stat Softw* 45.

CADENA, C. D., I. JIMÉNEZ, AND F. ZAPATA. 2017. Atlantean Evolution in Darwin's Finches—
Issues in Species Delimitation using Phenotypic Data. *Systematic Biology*:1–40.

CHANG, W.-C. 1983. On using principal components before separating a mixture of two
multivariate normal distributions. *Applied Statistics* 32:267.

CLARE, E. L. 2011. Cryptic species? patterns of maternal and paternal gene flow in eight
Neotropical bats. *PLoS ONE* 6.

CLARE, E. L., B. K. LIM, M. D. ENGSTROM, J. L. EGER, AND P. D. N. HEBERT. 2007. DNA
barcoding of Neotropical bats: Species identification and discovery within Guyana:
Barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7:184–190.

CLARE, E. L., B. K. LIM, M. B. FENTON, AND P. D. N. HEBERT. 2011. Neotropical bats: Estimating
species diversity with DNA barcodes. *PLoS ONE* 6.

COSTA, L. P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the forest of Brazil: a study of
molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30:71–86.

CRACRAFT, J. 1985. Historical Biogeography and Patterns of Differentiation within the South
American Avifauna: Areas of Endemism. *Ornithological Monographs* 36:49–84.

CRAMER, M. J., M. R. WILLIG, AND C. JONES. 2001. *Trachops cirrhosus*. *Mammalian Species*
656:1–6.

CZAPLEWSKI, N., A. D. RINCÓN, AND G. S. MORGAN. 2005. Fossil Bat (Mammalia: Chiroptera)
Remains from Inciarte Tar Pit, Sierra de Perijá, Venezuela. *Caribbean Journal of Science*
41:768–781.

- DAL VECHIO, F., I. PRATES, F. G. GRAZZIOTIN, H. ZAHER, AND M. T. RODRIGUES. 2018. Phylogeography and historical demography of the arboreal pit viper *Bothrops bilineatus* (Serpentes, Crotalinae) reveal multiple connections between Amazonian and Atlantic rain forests. *Journal of Biogeography* 45:2415–2426.
- DALAPICOLLA, J., AND Y. L. R. LEITE. 2018. Historical connections among river basins and climatic changes explain the biogeographic history of a water rat. *PeerJ* 6:e5333.
- DARRIBA, D., G. L. TABOADA, R. DOALLO, AND D. POSADA. 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772.
- DATZMANN, T., O. VON HELVERSEN, AND F. MAYER. 2010. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evolutionary Biology* 10:165.
- DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85:407–415.
- DITCHFIELD, A. D. 2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: Patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology* 9:1307–1318.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792–1797.
- ESBÉRARD, C. E. L., M. S. M. GODOY, L. RENOVATO, AND W. D. CARVALHO. 2017. Novel long-distance movements by Neotropical bats (Mammalia: Chiroptera: Phyllostomidae) evidenced by recaptures in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 52:75–80.

- ESHELMAN, R., AND G. S. MORGAN. 1985. Tobagan recent mammals, fossil vertebrates, and their zoogeographical implications. *National Geographic Society* 21:137–143.
- FELTEN, V. H. 1956. Eine neue Unterart von *Trachops cirrhosus* (Mammalia, Chiroptera) aus Brasilien. *Senckenbergiana Biologica* 37:369–370.
- FLORIO, A. M., C. M. INGRAM, H. A. RAKOTONDRAVONY, E. E. LOUIS, AND C. J. RAXWORTHY. 2012. Detecting cryptic speciation in the widespread and morphologically conservative carpet chameleon (*Furcifer lateralis*) of Madagascar. *Journal of Evolutionary Biology* 25:1399–1414.
- FUNK, C. W., M. CAMINER, AND S. R. RON. 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279:1806–1814.
- GASCON, C. ET AL. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Pnas* 97:13672–13677.
- GLOR, R. E., AND D. WARREN. 2011. Testing ecological explanations for biogeographic boundaries. *Evolution* 65:673–683.
- GUINDON, S., AND O. GASCUEL. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* 52:696–704.
- HEY, J. 2001. The Mind of the species problem. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16:326–329.
- HEY, J. 2006. On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology and Evolution* 21:447–450.
- HICKERSON, M. J. ET AL. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54:291–301.

- HO, S. Y. W., AND M. J. PHILLIPS. 2009. Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology* 58:367–380.
- HOFFMANN, F. G., AND R. J. BAKER. 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (Carollia: Phyllostomidae). *Molecular Ecology* 12:3403–3414.
- HOFFMANN, F. G., S. R. HOOVER, AND R. J. BAKER. 2008. Molecular dating of the diversification of Phyllostominae bats based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:653–658.
- HOFFMANN, F. G., E. P. LESSA, AND M. F. SMITH. 2002. Systematics of *Oxymycterus* With Description of a New Species From Uruguay. *Journal of Mammalogy* 83:408–420.
- HOORN, C. ET AL. 2010. Amazonia Through Time : Andean. *Science* 330:927–931.
- HUELSENBECK, J. P., AND F. RONQUIST. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755.
- JACKSON, J. B. C., AND A. O. DEA. 2013. TIMING OF THE OCEANOGRAPHIC AND BIOLOGICAL ISOLATION OF THE CARIBBEAN SEA FROM THE TROPICAL EASTERN PACIFIC OCEAN. *Bulletin of Marine Science* 89:779–800.
- JARAMILLO, C., C. MONTES, A. CARDONA, D. SILVESTRO, A. ANTONELLI, AND C. D. BACON. 2017. Comment (1) on “Formation of the Isthmus of Panama” by O’Dea et al. *Science Advances* 3:1–8.
- JONES, P. L., F. HÄMSCH, R. A. PAGE, E. K. V. KALKO, AND M. T. O’MARA. 2017. Foraging and Roosting Behaviour of the Fringe-Lipped Bat, *Trachops cirrhosus* , on Barro Colorado Island, Panamá. *Acta Chiropterologica* 19:337–346.
- KILLEEN, T. J., AND T. S. SCHULENBERG. 1998. A Biological Assessment of Parque Nacional

- Noel Kempff Mercado, Bolivia. Assessment. RAP Workin. Conservation International, Washington, D.C.
- KUMAR, S., G. STECHER, AND K. TAMURA. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution* 33:1870–1874.
- LANFEAR, R., B. CALCOTT, S. Y. W. HO, AND S. GUINDON. 2012. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29:1695–1701.
- LARSEN, R. J. ET AL. 2012. Genetic Diversity of Neotropical Myotis (Chiroptera: Vespertilionidae) with an Emphasis on South American Species. *PLoS ONE* 7:1–9.
- LEE, M. S. Y. 2003. Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *Journal of Evolutionary Biology* 16:179–188.
- MADDISON, W. P. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology* 46:523–536.
- MALLET, J. 2010. Why was Darwin’s view of species rejected by twentieth century biologists? *Biology and Philosophy* 25:497–527.
- MARTINS, F. M., A. D. DITCHFIELD, D. MEYER, AND J. S. MORGANTE. 2007. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45:372–378.
- MARTINS, F. M., A. R. TEMPLETON, A. C. PAVAN, B. C. KOHLBACH, AND J. S. MORGANTE. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 9:1–13.

MAYR, E. 1947. Ecological factors in speciation. *The American Museum of Natural History* 24:263–288.

MENEZES, L., C. CANEDO, H. BATALHA-FILHO, A. A. GARDA, M. GEHARA, AND M. F. NAPOLI. 2016. Multilocus phylogeography of the treefrog *scinax eurydice* (Anura, Hylidae) reveals a plio-pleistocene diversification in the atlantic forest. *PLoS ONE* 11:1–20.

MOLNAR, P. 2017. Comment (2) on “Formation of the Isthmus of Panama” by O’Dea et al. *Science Advances* 3:1–4.

MONTES, C. ET AL. 2012. Evidence for middle Eocene and younger land emergence in central Panama: Implications for Isthmus closure. *Geological Society of America Bulletin* 124:780–799.

MONTES, C. ET AL. 2015. Middle Miocene closure of the Central American Seaway. *Science* 348:226–229.

O’DEA, A. ET AL. 2016. Formation of the Isthmus of Panama. *Science Advances* 2:1–11.

OGILVIE, H. A., R. R. BOUCKAERT, AND A. J. DRUMMOND. 2017. StarBEAST2 Brings Faster Species Tree Inference and Accurate Estimates of Substitution Rates. *Molecular Biology and Evolution* 34:2101–2114.

OLIVEIRA, U., M. F. VASCONCELOS, AND A. J. SANTOS. 2017. Biogeography of Amazon birds: rivers limit species composition, but not areas of endemism. *Nature* 7:1–11.

PAGLIA, A. P. ET AL. 2012. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2nd Editio. *Occasional Papers in Conservation Biology*, Arlington, VA.

PANTE, E., C. SCHOELINCK, AND N. PUILLANDRE. 2015. From integrative taxonomy to species

- description: One step beyond. *Systematic Biology* 64:152–160.
- PARADIS, E., J. CLAUDE, AND K. STRIMMER. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290.
- PATTERSON, B. D., AND L. P. COSTA. 2012. *Bones, Clones and Biomes*. The University of Chicago Press.
- PATTON, J. L., AND C. J. CONROY. 2017. The conundrum of subspecies: morphological diversity among desert populations of the California vole (*Microtus californicus*, Cricetidae). *Journal of Mammalogy* 98:1010–1026.
- PAUPÉRIO, J., J. S. HERMAN, J. MELO-FERREIRA, M. JAAROLA, P. C. ALVES, AND J. B. SEARLE. 2012. Cryptic speciation in the field vole: A multilocus approach confirms three highly divergent lineages in Eurasia. *Molecular Ecology* 21:6015–6032.
- PAVAN, A. C., AND G. MARROIG. 2017. Timing and patterns of diversification in the Neotropical bat genus *Pteronotus* (Mormoopidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 108:61–69.
- PAVAN, A. C., F. M. MARTINS, AND J. S. MORGANTE. 2013. Evolutionary history of bulldog bats (genus *Noctilio*): Recent diversification and the role of the Caribbean in Neotropical biogeography. *Biological Journal of the Linnean Society* 108:210–224.
- PAVAN, A. C., F. MARTINS, F. R. SANTOS, A. DITCHFIELD, AND R. A. F. REDONDO. 2011. Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): The effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biological Journal of the Linnean Society* 102:527–539.
- PERACCHI, A. L., S. T. ALBUQUERQUE, AND S. D. L. RAIMUNDO. 1982. Contribuição ao conhecimento dos hábitos alimentares de *Trachops cirrhosus* (Spix, 1823) (Mammalia,

- Chiroptera, Phyllostomidae). *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* 5:1–5.
- PETERSON, A. T., J. SOBERÓN, AND V. SÁNCHEZ-CORDERO. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* 285:1265–1267.
- PHILLIPS, S. J., R. P. ANDERSON, AND R. E. SCHAPIRE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190:231–259.
- PRATES, I. ET AL. 2016. Inferring responses to climate dynamics from historical demography in neotropical forest lizards. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:7978–7985.
- PRATES, I., P. R. MELO-SAMPAIO, L. DE O. DRUMMOND, M. TEIXEIRA, M. T. RODRIGUES, AND A. C. CARNAVAL. 2017. Biogeographic links between southern Atlantic Forest and western South America: Rediscovery, re-description, and phylogenetic relationships of two rare montane anole lizards from Brazil. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 113:49–58.
- RAPINI, A. 2004. Classes or Individuals? The Paradox of Systematics Revisited. *Studies in History and Philosophy of Science Part C :Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 35:675–695.
- RAXWORTHY, C. J., C. M. INGRAM, N. RABIBISOA, AND R. G. PEARSON. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: A review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology* 56:907–923.
- ROCHA, T. C. ET AL. 2015. Molecular phylogeny and diversification of a widespread Neotropical rainforest bird group: The Buff-throated Woodcreeper complex, *Xiphorhynchus guttatus/susurrans* (Aves: Dendrocolaptidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*

85:131–140.

RONQUIST, F., AND J. P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.

SANTOS, A. M. M., D. R. CAVALCANTI, J. M. C. DA SILVA, AND M. TABARELLI. 2007. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *Journal of Biogeography* 34:437–446.

SCRUCCA, L., M. FOP, T. B. MURPHY, AND A. E. RAFTERY. 2016. mclust 5: Clustering, Classification and Density Estimation Using Gaussian Finite Mixture Models. *The R Journal* 8:289–317.

SILVA, N. K. N. DA. 2016. *Evolução Cromossômica e Mapeamento Genômico Comparativo em Morcegos da Subfamília Phyllostominae (Mammalia, Chiroptera)*. Universidade Federal do Pará.

SMITH, B. T., A. AMEI, AND J. KLICKA. 2012. Evaluating the role of contracting and expanding rainforest in initiating cycles of speciation across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279:3520–3526.

SOBEL, J. M., G. F. CHEN, L. R. WATT, AND D. W. SCHEMSKE. 2010. The biology of speciation. *Evolution* 64:295–315.

TONINI, J. F. R., L. P. COSTA, AND A. C. CARNAVAL. 2013. Phylogeographic structure is strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 51:114–121.

WALLACE, A. R. 1852. On the Monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London* 20:107–110.

WARREN, D. L., R. E. GLOR, AND M. TURELLI. 2010. ENMTools: A toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography* 33:607–611.

ZANDER, R. H. 2007. Paraphyly and the species concept, a reply to Ebach & al. *Taxon* 56:642–644.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Variáveis climáticas atuais, disponibilizadas pelo WorldClim, utilizadas nas análises de modelagem de nicho ecológico.

BIO1 = Annual Mean Temperature

BIO2 = Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))

BIO3 = Isothermality (BIO2/BIO7) (*100)

BIO4 = Temperature Seasonality (standard deviation *100)

BIO5 = Max Temperature of Warmest Month

BIO6 = Min Temperature of Coldest Month

BIO7 = Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)

BIO8 = Mean Temperature of Wettest Quarter

BIO9 = Mean Temperature of Driest Quarter

BIO10 = Mean Temperature of Warmest Quarter

BIO11 = Mean Temperature of Coldest Quarter

BIO12 = Annual Precipitation

BIO13 = Precipitation of Wettest Month

BIO14 = Precipitation of Driest Month

BIO15 = Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)

BIO16 = Precipitation of Wettest Quarter

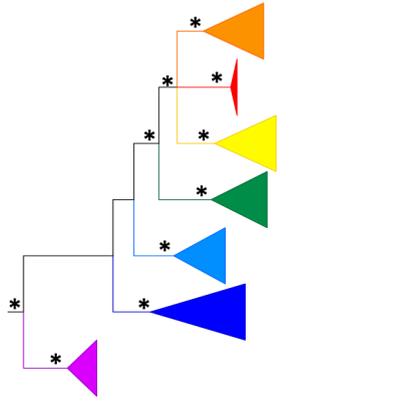
BIO17 = Precipitation of Driest Quarter

BIO18 = Precipitation of Warmest Quarter

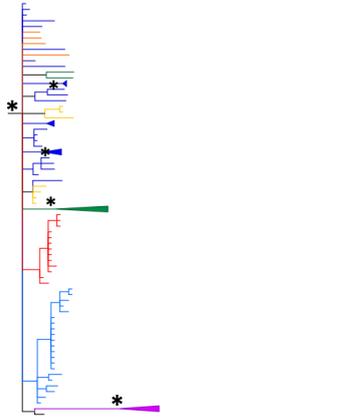
BIO19 = Precipitation of Coldest Quarter

APÊNDICE 2. Filogenias moleculares de cada marcador utilizando a mesma codificação por cores utilizada nas filogenias no texto. Os asteriscos indicam probabilidade posterior $\geq 95\%$ e *bootstrap* $\geq 70\%$.

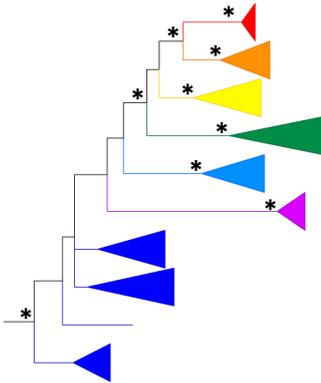
COI



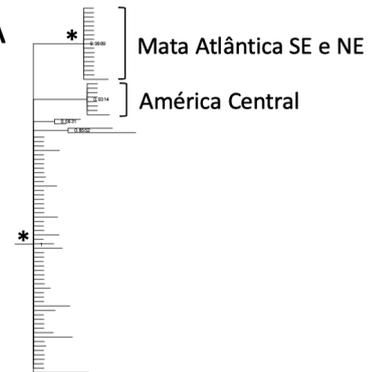
D-loop



cit-b



STAT5A



APÊNDICE 3. ANOVA da primeira componente principal das 10 medidas cranianas para testar dimorfismo sexual nos táxons de *Trachops*.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	p-value
<i>T. c.cirrhosus</i>					
Sex	1	22.72	22.7183	13.986	0.000202
Residuals	596	968.15	1.6244		
<i>T. c. coffini</i>					
Sex	1	11.251	11.2507	25.604	1.02E-06
Residuals	183	80.413	0.4394		
<i>T. ehrhardti</i>					
Sex	1	0.1266	0.12660	0.3443	0.5614
Residuals	33	12.1356	0.36774		