

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diversificação do gênero *Trachops* Gray, 1837: uma
abordagem filogenética molecular
mitocondrial e nuclear**

Bruna da Silva Fonseca

Vitória, ES

Fevereiro, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diversificação do gênero *Trachops* Gray, 1837: uma
abordagem filogenética molecular
mitocondrial e nuclear**

Bruna da Silva Fonseca

Orientador: Dr. Albert David Ditchfield

Co-Orientadora: Dra. Valéria Fagundes

Dissertação submetida 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 Mestre em Biologia Animal.

Vitória, ES

Fevereiro, 2014

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas cruzaram meu caminho durante este período e contribuíram de alguma forma para este trabalho. Agradeço a todos, mas principalmente:

Ao Dr. Albert David Ditchfield, que aceitou me orientar quando eu bati à sua porta sete anos atrás e até hoje me ensina, com paciência, um pouco de tudo que sabe sobre morcegos. Pelo entusiasmo com o ensino, fosse durante as aulas da graduação e da pós-graduação ou mesmo nas reuniões. Seus ensinamentos me serviram como exemplo tanto no cunho profissional como pessoal: sua dedicação, honestidade e caráter serão modelos que adotarei para minha vida.

À Dra. Valéria Fagundes, pela valiosa contribuição na minha formação, como professora e co-orientadora, e que primeiro despertou minha paixão pela biologia molecular no primeiro período da graduação.

À professora Maria do Carmo Pimentel Batitucci, sempre tão amável, pelos ensinamentos nas aulas de Genética, pelo exemplo de profissional dedicada e pelo pronto auxílio quando Albert estava no Canadá.

À CAPES, pela bolsa concedida e à Universidade Federal do Espírito Santo pelo espaço físico.

A todos os colaboradores, que gentilmente emprestaram tecidos 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 e Dra. Valéria Tavares (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), 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).

Aos amigos do Laboratório de Estudos em Quirópteros, Jeisdens e Júnior. Mas, especialmente ao pessoal das antigas: Luane Gomes da Silva, pelas divertidas idas a campo; Amanda Dasilio, minha companheira moléculóide e herdeira dos *Anoura* e também João Paulo Hoppe, pela ajuda com a estatística de um modo geral e por sempre compartilhar seu conhecimento aleatório. O trabalho no LABEQ ficou menos pesado com a companhia e ajuda de vocês, amigos!

Aos colegas de turma do mestrado, que ajudaram de alguma ou de muitas maneiras a chegar com sanidade ao final desta etapa. Jeronymo Dallapicolla, pela grande ajuda com as análises, Amanda Colodetti, pela ajuda com os mapas e à Fê (Fernanda Zaidan), por sempre encontrar programas revolucionários que adiantaram nossas vidas! Aprecio muito a amizade de vocês.

À Juliana Justino, técnica do Núcleo de Genética Aplicada a Conservação da Biodiversidade, pela imensurável ajuda no trabalho de bancada sempre de forma tão gentil e prestativa.

À minha família, mesmo que tenha demorado a compreender meu amor pela biologia. Agradeço especialmente minha mãe, que sempre priorizou e incentivou minha formação. Minha prima Pat, minha primeira melhor amiga. Minha sobrinha Rebeca, que conta orgulhosa na escolinha que a “tia Bruna” é bióloga e caça morcegos. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido! Agradeço também ao Vini, que chegou na fase mais crítica do mestrado e que muito me ajudou, fosse com as análises em paralelo ou com sua paciência, seu carinho e seu cuidado.

Aos meus amigos, alguns distantes geograficamente, os quais sempre apareciam com a pergunta inconveniente “e o mestrado?”. Aos amigos que posso chamar de irmãos, Dani e Claudiomar, obrigada pelo cuidado, pelas risadas e pelos momentos de descontração mesmo à distância! Obrigada por se fazerem tão presentes nos momentos mais difíceis...

Ao John (João Paulo Maires Hoppe), à Amanda (Dasilio), ao Dudu (Eduardo Loyola Muhl) e à Marina Monjardim, pela amizade e apoio durante esses anos de Ufes. Não posso deixar de mencionar Luciane Ayres Castro Reis, grande amiga, pelas nossas lendárias idas ao forró pé-de-serra. Paolla e Pedro, amigos queridos! Às meninas da república BoaZona: Sarah, Livinha, Kissia, Gla, Soy... mesmo que cada uma tenha seguido seu rumo, vocês sempre estiveram presentes de alguma forma. À minha companheira de apartamento, Thabata, pela compreensão durante essa fase final do mestrado.

- Mas... que fazes aqui?

E ele repetiu-me então, brandamente, como uma coisa muito séria:

- Por favor... desenha-me um carneiro...

Quando o mistério é muito impressionante, a gente não ousa desobedecer. Por mais absurdo que aquilo me parecesse a mil milhas de todos os lugares habitados e em perigo de morte, tirei do bolso uma folha de papel e uma caneta. Mas lembrei-me, então, que eu havia estudado de preferência geografia, história, cálculo e gramática, e disse ao garoto (com um pouco de mau humor) que eu não sabia desenhar. Respondeu-me:

- Não tem importância. Desenha-me um carneiro.

Como jamais houvesse desenhado um carneiro, refiz para ele um dos dois únicos desenhos que sabia. O da jibóia fechada. E fiquei estupefato de ouvir o garoto replicar:

- Não! Não! Eu não quero um elefante numa jibóia. A jibóia é perigosa e o elefante toma muito espaço. Tudo é pequeno onde eu moro. Preciso é dum carneiro. Desenha-me um carneiro.

Então eu desenhei.

RESUMO

Pesquisas recentes têm mostrado que a abordagem molecular é uma poderosa ferramenta no reconhecimento de clados que podem ter escapado do reconhecimento pela taxonomia tradicional devido a sua convergência morfológica. Apesar de ser amplamente distribuído geograficamente e por ambientes distintos, *Trachops* é considerado um gênero monotípico. Questionamentos sobre o número de táxons que o gênero poderia abranger foram levantados anteriormente, entretanto os estudos permaneceram inconclusivos, continuando a hipótese de especiação críptica no gênero. Diante deste cenário, este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética de *Trachops*, utilizando sequências de DNA mitocondriais e um nuclear de indivíduos da Mata Atlântica, do Cerrado, da Amazônia, da América Central e do México. Apesar do marcador nuclear não revelar polimorfismos suficientes para esclarecer a história da espécie, análises filogenéticas e populacionais, gerados pela análise do citocromo *c* oxidase I (COI) e citocromo *b* mostraram alta diversidade dentro do gênero, com forte estruturação geográfica. Os nove clados encontrados pelas análises do COI divergiram entre o Plioceno e o Pleistoceno e é possível que os clados que estão em zonas de simpatria tenham divergido em alopatria e restabelecido contato posteriormente. O Escudo das Guianas pode ter exercido influência na diversificação dos grupos amazônicos, bem como a Hipótese do Lago. Todavia, essas são especulações de prováveis fatores que possam ter contribuído para a diversidade do gênero. Aplicando-se o conceito filogenético de espécies, os clados encontrados poderiam ser diagnosticados como nove espécies válidas. A combinação com outros caracteres, como outro marcador nuclear e a morfologia, deve ser utilizada como complemento aos dados do DNA mitocondrial.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração dos reagentes e perfil das reações em cadeia da polimerase (PCR) para geração dos fragmentos dos genes COI, Citb-b e RAG2. Nos perfis das PCRs são apresentadas a temperatura (em Celsius) seguida do tempo (em minutos e/ou segundos).....22
- Tabela 2.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de COI de *Trachops*. Erro padrão é mostrado na diagonal superior. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros. Em negrito a distância entre os grupos Amazônia Central I e II, menor que 4%.....29
- Tabela 3.** Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de Cit-b de *Trachops*. Erro padrão é mostrado na diagonal superior. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.....32
- Tabela 4.** Cálculos de variância molecular dentro das populações, entre populações e entre grupos de populações de *Trachops* utilizando o citocromo c oxidase I (COI).....35
- Tabela 5.** Subespécies com respectivas localidades tipo, discutidas em Husson (1962), e os clados deste estudo que foram propostos como correspondentes às subespécies.....49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica de *Trachops cirrhosus* e suas três subespécies. 1. *T. c. cirrhosus*; 2. *T. c. coffini*; 3. *T. c. ehrhardti*. Localidades tipo para cada subespécie estão indicadas por círculos pretos. (Cramer, Willig e Jones 2001).....16
- Figura 2.** Mapa indicando os pontos amostrais de *Trachops* ao longo da distribuição. Nos quadros, as regiões da Guiana, oeste do Suriname e Bacia Amazônica estão ampliadas. Detalhes no Apêndice21
- Figura 3.** Filogenia molecular do citocromo *c* oxidase I gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB), Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Para MV e MP, branco para bootstrap $\leq 50\%$, cinza para 50 –70% e preto para $\geq 70\%$. Para Análise Bayesiana, branco indica probabilidade posterior $< 95\%$ e preto $\geq 95\%$. Na rede de haplótipos, os grupos com cores correspondentes na filogenia. No mapa, a distribuição geográfica dos grupos encontrados pelos métodos filogenéticos, com as regiões da Guiana (A) e Bacia Amazônica (B) ampliadas.....30
- Figura 4.** Filogenia molecular dos haplótipos do citocromo *c* oxidase I gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Valores acima dos ramos indicam probabilidade posterior e abaixo dos ramos os valores de *bootstrap*. Valores inferiores a 95% para Inferência Bayesiana e 70% para Máxima Verossimilhança não foram mostradas. No mapa, a distribuição geográfica dos grupos encontrados pelos métodos filogenéticos.....31
- Figura 5.** Filogenia molecular do citocromo *b* (esquerda) e do RAG2 (direita) gerada pelos métodos de Inferência Bayesiana (IB), Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP). Suportes estatísticos indicados pelos círculos pretos. Para MV e MP, indica bootstrap $\geq 70\%$ e para Inferência Bayesiana, $\geq 95\%$. Os indivíduos da Venezuela (vermelho) e da Guiana Francesa (cinza) foram apresentados diferentemente pelos três métodos filogenéticos, porém sem suporte estatístico. Na rede de haplótipos, os grupos com cores correspondentes na filogenia. No mapa, a distribuição geográfica dos grupos encontrados pelos métodos filogenéticos. Indivíduos cujas sequências não foram obtidas no COI estão representados pela cor preta e cinza.....34

Figura 6. Estimativa de tempo de divergência dos nove grupos de *Trachops* gerada pelo BEAST 2.1.0 (Bouckaert *et al.*, 2013), usando três pontos de calibração dentro de Phyllostomidae. Números próximos aos nós são datas em milhões de anos antes do presente, com 95% de intervalo de confiança. Os tempos geológicos estão de acordo com a escala de tempo geológica da Geological Society of America (www.geosociety.org/science/timescale/timescl.pdf).....37

SUMÁRIO

1	Introdução	12
1.1	Marcadores Moleculares e Suas Aplicações na Abordagem Filogenética.....	12
1.2	Objeto de estudo.....	14
2	Materiais e Métodos	19
2.1	Amostras	19
2.2.	Obtenção das sequências nucleotídicas.....	20
2.3	Análises Filogenéticas	22
2.4	Análises Populacionais	24
2.5	Análise de Estimativa de Tempo de Divergência.....	24
3	Resultados	26
3.1	Análises Filogenéticas	26
3.1.1	Citocromo coxidase I	26
3.1. 2	Citocromo b	32
3.1.3	Recombination Activation Gene 2.....	33
3.2	Análises Populacionais	35
3.3	Análises de Estimativa de Tempo de Divergência.....	36
4.	Discussão	38
4.1	Análises Filogenéticas e Estruturação Espacial.....	38
4.2	Análise de Tempo de Divergência e Considerações Biogeográficas.....	42
4.3	<i>Trachops cirrhosus</i> Trata-se de um Complexo de Espécies Crípticas?.....	45
5.	Referências bibliográficas	50
	Apêndice.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES NA ABORDAGEM FILOGENÉTICA

Na era pré-molecular, estimativas de parentesco e filogenia eram feitas utilizando-se comparações de dados fenotípicos de morfologia, fisiologia, comportamento ou outras características possíveis de observação (Avise, 2000). Classicamente estudos de taxonomia eram baseados exclusivamente na análise de caracteres morfológicos, porém se constatou que essa metodologia possui limitações, uma vez que a convergência de função de certos caracteres leva a uniformidade. Isso dificulta a distinção de indivíduos, principalmente quando se trata do reconhecimento de táxons crípticos (Hebert *et al.*, 2003).

Os campos de ecologia e evolução molecular tiveram seu início na segunda metade do século XX e desde então, gradualmente, marcadores moleculares tem sido empregados em estudos de comportamento do organismo, história natural e relações filogenéticas. Entre os vários apelos práticos do uso de marcadores moleculares, pode-se destacar o fato de nos oferecerem acesso à base fundamental da mudança evolutiva: o polimorfismo de DNA (Avise, 2000).

Por uma série de propriedades, Avise (1987) defende que marcadores moleculares mitocondriais são interessantes em inferências filogenéticas. Essas características consistem em: marcador amplamente distribuído em diversos organismos, permitindo comparações entre diferentes grupos; estrutura genética simples, ou seja, sem DNA repetitivo, elementos transponíveis e/ou íntrons; fácil de isolar e testar; herança sem recombinação; evolução rápida.

Muitos estudos com morcegos tem sido realizados utilizando DNA mitocondrial (DNAmít), principalmente em se tratando de estudos filogeográficos e de sistemática molecular (e.g. Ditchfield, 2000; Hoffmann e Baker, 2001; Martins *et al.*, 2007; Redondo *et al.*, 2008;

Pavan *et al.*, 2011; Velazco e Patterson, 2013). Dentre os marcadores moleculares mitocondriais mais utilizados estão o citocromo *b* (Cit-*b*) e o citocromo *c* oxidase I (COI). O primeiro é mais comumente utilizado em estudos de filogeografia, mas também em filogenias de espécies. O segundo tem sido bastante utilizado após a iniciativa do DNA *barcoding*, que objetiva fazer uma biblioteca de “códigos de barra” de DNA para diagnoses de espécies (Hebert *et al.*, 2003).

Pesquisas recentes têm mostrado que a abordagem molecular é uma poderosa ferramenta no reconhecimento de clados que podem ter escapado do reconhecimento pela taxonomia tradicional devido a sua convergência morfológica. Podemos citar, pelo menos, três grandes exemplos em morcegos. O primeiro em *Carollia* que é um gênero difícil de diferenciar morfológicamente as espécies (Pine, 1972; McLellan, 1984) e até há cinco anos possuía apenas quatro espécies reconhecidas. Com a implementação de ferramentas moleculares, cinco espécies adicionais foram descritas, com base em marcadores moleculares mitocondriais e dados citogenéticos, utilizando a morfologia como dado secundário em sua diferenciação (Solari e Baker, 2006). No segundo exemplo, análises moleculares revelaram que *Pipistrellus pipistrellus* consiste em duas espécies biológicas crípticas, que agora podem ser diferenciadas por chamadas de ecolocalização e caracteres externos sutis (Barratt *et al.*, 1997; Häussler *et al.*, 2000). Por último, Porter *et al.* (2007), discutiram sobre criptismo em três espécies de *Micronycteris* (*M. megalotis*, *M. minuta* e *M. hirsuta*).

Marcadores moleculares nucleares foram propostos como complemento aos estudos sistemáticos moleculares. Clare (2012) chama a atenção para o uso unicamente do DNAmít no reconhecimento de espécies e propõe o uso adicional de marcadores nucleares. Ao contrário do DNAmít, no DNA nuclear (DNAnuc) a herança é biparental e a taxa de evolução é mais lenta. Isso é particularmente interessante em se tratando de sistemática molecular, uma vez que, dadas suas características, a filogenia mostra a história da espécie e não somente da

linhagem materna. O Recombination Activation Gene 2 (RAG2) é bastante utilizado em estudos para lançar luz à sistemática filogenética de táxons de morcegos *e.g. Myotis* (Lack *et al.*, 2010), morcegos da subfamília Molossinae (Ammerman *et al.*, 2012) e *Sturnira* (Velazco e Patterson, 2013).

1.2 OBJETO DE ESTUDO

A ordem Chiroptera compõe um grupo de mamíferos muito bem sucedido, constituído por 18 famílias, 186 gêneros e aproximadamente 1100 espécies (Simmons, 2005). Esse grupo possui distribuição global com exceções das regiões polares e algumas ilhas oceânicas isoladas, e alcança maior diversidade na região Neotropical. As espécies frugívoras, nectarívoras, carnívoras e hematófagas são confinadas às regiões tropicais e subtropicais, enquanto as insetívoras são cosmopolitas. Nenhum outro grupo de mamíferos atingiu a diversidade de hábitos alimentares encontrada em Chiroptera. Trata-se, portanto, da segunda ordem de mamíferos mais especiosa e a primeira em diversidade de hábitos alimentares (Reis *et al.*, 2007).

Dobson (1875) dividiu esta ordem em duas subordens: Megachiroptera, contendo apenas a família Pteropodidae, e Microchiroptera, contendo todas as demais famílias de morcegos. Esta classificação foi bastante utilizada e Koopman (1984) dividiu Microchiroptera nas infraordens Yinchiroptera (morcegos com pré-maxila móvel) e Yanchiroptera (morcegos com pré-maxila imóvel). Hutcheon e Kirsch (2004) encontraram associação molecular de Rhinolophoidea com Megachiroptera e de Emballonuridae com Yangochiroptera. Neste estudo, os autores recomendam que essas subdivisões não sejam utilizadas e que novas terminologias sejam adotadas. Eles sugerem, então, o uso de Pteropodiformes (Pteropodidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Megadermatidae e Rhinopomatidae) e Vespertilioniformes (todas as demais famílias).

Dentro de Vespertilioniformes, encontra-se a superfamília Noctilionoidea a qual contém quatro famílias viventes: Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae e Mystacinidae (Hutcheon e Kirsch, 2004). Phyllostomidae é a família mais diversa da região Neotropical, composta por 57 gêneros e 160 espécies (Reis *et al.*, 2007). Trata-se de um clado endêmico do continente Americano, com registros desde o sudoeste dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina, na América do Sul (Hall, 1981; Barquez *et al.*, 1999).

Trachops Gray, 1837 engloba uma espécie, *T. cirrhosus* (Spix, 1823). Sua distribuição geográfica é ampla, conhecida desde o sul do México às Guianas, Trinidad, Equador, sul da Bolívia até o sudeste do Brasil (Koopman, 1993). Atualmente, são reconhecidas três subespécies: *T. c. cirrhosus*, que ocorre da Costa Rica ao Nordeste brasileiro, passando pelo norte do Equador, Bacia Amazônia, Brasil Central e parte do sudeste; *T. c. coffini* que ocorre do México à Nicaraguá e *T. c. ehrhardti* distribuído no sudeste do Brasil e na Bolívia (Jones e Carter, 1976) (Figura 1).

Trachops cirrhosus é comumente associado a ambientes de floresta e ambientes ribeirinhos (Handley, 1976; Tuttle 1970), mas também já foi encontrado em área de savana e de agricultura. Utiliza cavernas, buracos em árvores e galerias como abrigos diurnos (Goodwin e Greenhall 1961; Handley, 1976; Kalko *et al.* 1998).

Gardner (1977) encontrou evidências de que *T. cirrhosus* se alimenta de insetos e pequenos vertebrados, como lagartos e morcegos e o classificou como carnívoro. A predação de anuros foi documentada para o Panamá e os estudos de Tuttle e Ryan (1981) sugerem que a predação por *T. cirrhosus* provavelmente influenciou a evolução da vocalização de anuros nos trópicos. Bonato e Facure (2000) encontraram restos de *Furipterus horrens*, um pequeno morcego insetívoro, no estômago de um macho adulto de *T. cirrhosus* no nordeste do Brasil.



Figura 1. Distribuição geográfica de *Trachops cirrhosus* e suas três subespécies. 1. *T. c. cirrhosus*; 2. *T. c. coffini*; 3. *T. c. ehrhardti*. Localidades tipo para cada subespécie estão indicadas por círculos pretos (Cramer, Willig e Jones, 2001).

Apesar de ser amplamente distribuído geograficamente e por ambientes distintos, *Trachops* é considerado um gênero monotípico. A geomorfologia do continente americano não permaneceu imutável desde o surgimento de *Trachops* que de acordo com estudos moleculares ocorreu há aproximadamente 17 Ma (Hoffmann *et al.*, 2008). Levando em consideração que eventos vicariantes promovem o isolamento de populações e que o isolamento reprodutivo leva a especiação, podemos supor que mudanças na geomorfologia podem ter “moldado” linhagens de *Trachops* ao longo do tempo evolutivo, isto é, levado a diferenciação da espécie em diferentes ambientes.

Trachops cirrhosus parece ser muito diferente dos outros morcegos estudados por Ditchfield (1996). Usando cerca de um terço do gene do citocromo b (Cit-b), Ditchfield (1996) encontrou cinco clados com divergências que variaram de 5,5% a 11%, correspondendo a

indivíduos de Honduras, Panamá, Guianas, do nordeste e do sudeste do Brasil. Estes níveis são surpreendentes, pois são dez vezes maiores que os encontrados para variação intra-específica em *Artibeus lituratus*, abrangendo uma distribuição geográfica semelhante a de *T. cirrhosus*. Em estudo morfométrico mais recente em alguns Phyllostominae foi sugerido que *T. cirrhosus* pudesse ser um complexo de espécies com até seis formas crípticas: as cinco identificadas com dados moleculares e uma adicional correspondendo aos exemplares da Bacia Amazônica (Ditchfield, comunicação pessoal).

Clare (2012) realizou um estudo do gene mitocondrial do citocromo c oxidase I (COI) e do gene ligado ao cromossomo Y, *Dby 7th Intron (Dby)*, em oito espécies de morcegos, incluindo *T. cirrhosus*. A amostragem compreendeu indivíduos do sul do México ao norte da América do Sul, não envolvendo, assim, amostras da Mata Atlântica, Cerrado ou Amazônia brasileira. Nesse estudo, os dados de DNA mitocondrial mostraram nove linhagens distintas distribuídas na Guiana, no Suriname, na Venezuela, no Equador, no Panamá, na Guatemala e no México. Todavia, o estudo com o gene ligado ao Y não mostrou divergência entre os exemplares, permanecendo, portanto, a hipótese de especiação críptica em *T. cirrhosus*, sendo necessário o uso de outro marcador nuclear para testar a hipótese de especiação críptica em *Trachops*.

Entender se *T. cirrhosus*, de fato, se trata de um complexo de espécies e não apenas uma como é conhecido, será uma fonte valiosa de informação para estudos em quaisquer áreas de conhecimento. A resolução de complexos de espécies minimamente diferentes tem importância para biologia evolutiva, pois evita a subestimativa da diversidade biológica e permite compreender a ecologia e comportamento de espécies de uma forma em que o comportamento correto e demais dados da biologia são atribuídos a uma entidade biológica correta (Mayr, 1970). Por exemplo, há evidências de que exemplares de *T. cirrhosus* da Mata Atlântica estão parasitados com protozoários da família Trypanosomatidae (Simões *et al.*,

2011), levantando questões se essa espécie de morcego pode ser um reservatório potencial de Doença de Chagas ou de Leishmaniose Visceral (Neves, 2012). Sob esse enfoque, *T. cirrhosus* se tornaria uma espécie alvo para futuros estudos epidemiológicos destas parasitoses. Porém, qual forma de *Trachops* seria alvo de investigação para estudos de estatísticas? Há de se estudar exemplares de toda sua área de abrangência ou, talvez, somente grupos específicos? *Trachops cirrhosus* poderia representar um complexo de espécies crípticas ou estaria mantendo fluxo gênico com populações ao longo de toda sua distribuição geográfica?

Há vários exemplos que demonstram a importância de um bom estudo de taxonomia, no qual se resolve problemas sobre o número de espécies existentes em um grupo com ampla distribuição geográfica (Redondo *et al.*, 2008; Velazco, Gardner e Patterson, 2010; Clare *et al.*, 2011; Clare, 2012; Velazco e Patterson, 2013).

Diante deste cenário, este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética de *Trachops*, utilizando sequências de DNA mitocondriais (os mesmos utilizados em estudos prévios para fins de comparação) e um nuclear diferente daquele utilizado no estudo de Clare (2012). Também ampliou a amostragem do estudo de Clare (2012) incluindo indivíduos da Mata Atlântica, do Cerrado e da Amazônia brasileira e peruana a fim de discutir sobre possível especiação críptica de *Trachops cirrhosus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Sequências do gene mitocondrial COI foram obtidas de 59 indivíduos de *Trachops cirrhosus* provenientes de 10 localidades do Brasil, uma do México e uma do Peru. Adicionalmente, foram incluídas sequências de 160 indivíduos de 15 localidades entre Equador, Guatemala, Guiana, Panamá, Suriname e Venezuela, disponíveis no GenBank. Totalizou-se, assim, 219 indivíduos de 27 localidades.

Do gene mitocondrial do Cit-b foram geradas sequências de 15 indivíduos de 4 localidades do Brasil e acrescentadas duas sequências disponíveis no GenBank: uma da Guiana Francesa e uma da Venezuela, totalizando 17 indivíduos de 6 localidades. Este marcador molecular foi escolhido como comparativo aos dados de Ditchfield (2000).

Sequências do gene nuclear RAG2 foram obtidas de 24 indivíduos provenientes de sete localidades do Brasil, uma do Peru e uma do Suriname. Uma sequência de um indivíduo da Guiana Francesa foi obtida do GenBank. Assim foram analisadas sequências de 25 indivíduos de 10 localidades.

As amostras de tecidos utilizadas para extração de DNA são provenientes de coleções e bancos de tecidos do Laboratório de Estudos de Quirópteros (LABEQ), do Laboratório de Genética Animal (LGA) e da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), do Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), da Coleção de Mamíferos da Universidade Federal de Lavras (CMUFLA), do Field Museum of Natural History (FMNH) e do Royal Ontario Museum (ROM). A distribuição dos pontos amostrais de *Trachops* pode ser encontrada na Figura 2.

2.2 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

As extrações de DNA foram realizadas a partir de amostras de tecidos hepáticos ou musculares mantidos em álcool absoluto a -20°C. O protocolo de extração de DNA total (SDS/NaCl/Proteinase K) seguiu a técnica descrita por Bruford *et al.* (1992). As condições do DNA obtido foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com o corante Blue Green® (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta.

As amplificações foram feitas através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para gerar fragmentos de 614 pares de bases (pb) do gene COI utilizou-se os iniciadores LCO 1490 e HCO 2198 (Folmer *et al.*, 1994). Para gerar fragmentos de 779 pb do Cit-b, utilizou-se os iniciadores Bat05A e Bat14A (Martins *et al.*, 2007) e para fragmentos de 583 pb do RAG2 utilizou-se os iniciadores RAG2F1 e RAG2R2 (Baker *et al.*, 2000). Os perfis adotados para as reações de PCR são apresentados na Tabela 1.

Após a amplificação, o tamanho dos produtos de PCR foi estimado utilizando gel de agarose 2% e marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen, Inc.). Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com enzimas do kit Exo-Sap-IT (USB-Corporation) a fim de se eliminarem potenciais inibidores do sequenciamento. O equipamento ABI 3500® foi utilizado para sequenciar os segmentos de DNA utilizados e as reações de sequenciamento foram realizadas com o kit para sequenciamento BigDYE®, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi unidirecional, utilizando-se os iniciadores BAT05A, LCO 1490 e RAG2F1, e realizada no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) da UFES.

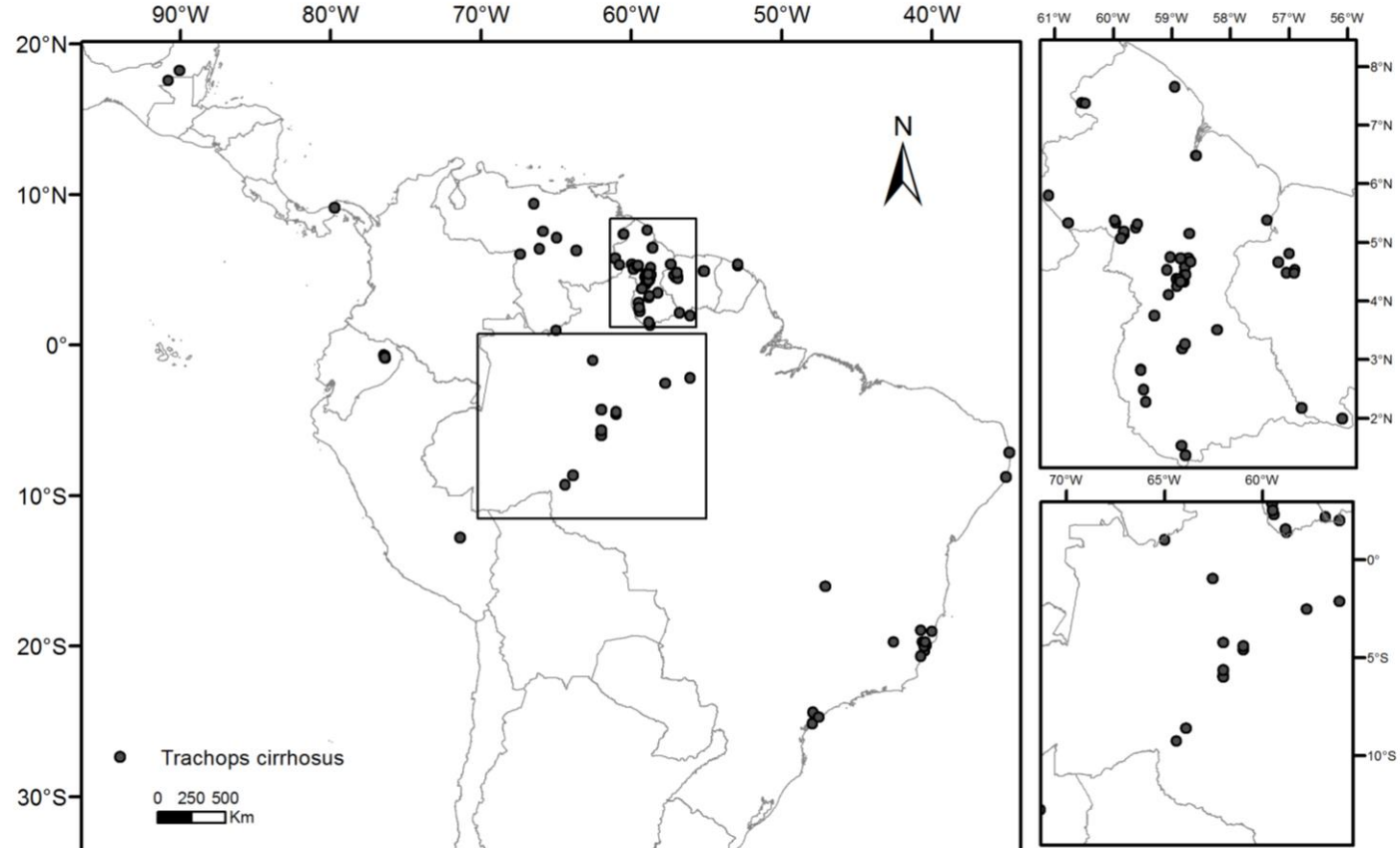


Figura 2. Mapa indicando os pontos amostrais de *Trachops* ao longo da distribuição. Nos quadros, as regiões da Guiana, oeste do Suriname e Bacia Amazônica estão ampliadas. Detalhes no Apêndice.

O programa MEGA v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011) foi utilizado para o alinhamento das sequências de DNA através do algoritmo *Clustal W* seguido de correções manuais, quando necessárias. Para cada fragmento obtido foi conduzida uma pesquisa comparativa de similaridade no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com o objetivo de verificar a ocorrência de contaminação e a fidelidade dos iniciadores em amplificar as regiões alvos.

Tabela 1. Concentração dos reagentes e perfil das reações em cadeia da polimerase (PCR) para geração dos fragmentos dos genes COI, Citb-b e RAG2. Nos perfis das PCRs são apresentadas a temperatura (em Celsius) seguida do tempo (em minutos e/ou segundos).

Marçador	COI	Cit-b	RAG2
Mix PCR			
Tampão	1x	1x	1x
MgCl ₂	1,5 mM	2,0 mM	2,0 mM
dNTPs	200 uM	200 uM	200 uM
Iniciadores	0,4 uM	0,4 uM	0,4 uM
Easy Taq	0,7 u	0,75 u	0,75 u
Volume total	15 uL	15 uL	15 uL
Perfil PCR			
Denaturaçãõ inicial	94°C - 1'	94°C - 5'	95°C - 2'
Número de ciclos	35	36	35
Denaturaçãõ	94°C - 1'	94°C - 1'30"	95°C - 30"
Anelamento	50°C - 1'30"	46°C - 1'30"	60°C - 30"
Extensãõ	72°C - 1'	72°C - 1'20"	72°C - 2'
Extensãõ final	72°C - 5'	72°C - 5'	72°C - 10'

2.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Antes de aplicar os métodos filogenéticos foi verificado o grau de saturaçãõ das bases nucleotídicas dentro das sequências de DNA pelo do programa DAMBE de (Xia e Xie, 2001).

Foram realizadas análises filogenéticas através dos métodos de Máxima Verossimilhança (MV), Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Parcimônia (MP). O melhor modelo evolutivo foi obtido pelo programa jModeltest 2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012).

A análise de MV foi gerada pela plataforma *online* PhyML (Guindon e Gascuel, 2003) e a de MP pelo programa MEGA v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011), ambas testadas por 1000 replicações de bootstrap. A análise Bayesiana foi realizada no programa Mr. Bayes 3.1 (Huelsenbeck *et al.*, 2001; Ronquist e Huelsenbeck, 2003), com um total de 3 milhões de gerações para as cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC). A definição da melhor topologia pelo método MCMC baseia-se no algoritmo Metropolis-Hastings para a busca. De acordo com este método, o programa estima a verossimilhança de uma árvore dado um valor inicial de theta. Na próxima etapa, o programa faz um rearranjo na topologia da árvore e calcula de novo o valor de verossimilhança para esta nova topologia. Tal topologia pode então ser aceita ou rejeitada com base na comparação do seu valor de verossimilhança com relação à topologia anterior, e assim sucessivamente, num processo que cria uma cadeia de Markov. Valores amostrados a partir desta cadeia geram uma curva de valores de verossimilhança, permitindo acessar o melhor valor do parâmetro estimado dada a sua matriz de sequências, bem como a variância dessa estimativa (Kuhner *et al.*, 1998). A amostragem das cadeias foi realizada a cada 100 gerações e o tempo para o estabelecimento da fase estacionária (*burn in time*), corresponderam aos 25% das amostras obtidas. As filogenias foram editadas utilizando o programa FigTree 1.3.1 (Raumbaut, 2007).

Sequências de indivíduos utilizados como grupo externo foram obtidas do GenBank. Para o COI, o grupo externo consistiu em um indivíduo de *Artibeus lituratus* (JQ601208.1) e um de *Macrophyllum macrophyllum* (JF454932.1). Para o Cit-b, *Artibeus lituratus* (DQ869393.1) e *Macrophyllum macrophyllum* (FJ155484). Já para o RAG2, *Artibeus jamaicensis* (GU328048.1) e *Macrophyllum macrophyllum* (AF316458.1).

Distâncias genéticas entre e dentro dos grupos encontrados nas filogenias foram calculadas no programa MEGA v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando-se o método Kimura 2-Parâmetros (K2P).

2.4 ANÁLISES POPULACIONAIS

O programa DnaSP v.5 (Librado e Rozas, 2009) identificou os haplótipos e gerou as matrizes de dados. As relações hierárquicas entre os haplótipos foram observadas a partir de redes de haplótipos geradas pelo programa NETWORK 4.1 (Rohl, 2000, www.fluxus-engineering.com), o qual é baseado na implementação do algoritmo *Median-Joining*, que gera uma árvore (*minimum spanning tree*) e adiciona os intermediários ausentes usando o algoritmo de máxima parcimônia de Farris (Bandelt *et al.*, 1999).

Para as análises intrapopulacionais, o número de haplótipos, a diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) foram estimados pelo programa DnaSP v.5. As populações foram localidades contendo pelo menos três indivíduos. Pelo programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA), para avaliar a quantidade de estruturação genética entre os grupos, e calculado os valores de diferenciação genética par-a-par entre as sequências (estatística- Φ) utilizando-se o modelo de Kimura 2-parâmetros sem correção de *gamma* e com 10.000 permutações. Os grupos definidos nessa análise foram grupos de populações, definidos pelos clados obtidos pela filogenia.

2.5 ANÁLISE DE ESTIMATIVA DE TEMPO DE DIVERGÊNCIA

Fósseis de *Trachops* não foram relatados na literatura (Crammer, Willig e Jones, 2001), refletindo as pobres condições tafonômicas das florestas úmidas que o gênero ocupa. Portanto, para a análise de estimativa de tempo de divergência foram utilizados três pontos de calibração, com distribuição normal a priori, sendo consideradas as divergências entre (a) *Trachops* e *Macrophyllum* (15 – 18,8 Ma) (Hoffmann *et al.*, 2008), (b) Phyllostominae e Stenodermatinae + Glossophaginae (17 – 26 Ma) (Teeling *et al.*, 2005) e (c) Stenodermatinae e Glossophaginae (15 – 23 Ma) (Teeling *et al.*, 2005).

As estimativas de tempo de divergência foram executadas no BEAST 2.0 (Bouckaert *et al.*, 2013), utilizando o alinhamento do COI, através do relógio lognormal relaxado e o modelo Yule como *tree prior*. O modelo de substituição foi o mesmo utilizado para IB, o HKY. Foi conduzido um total de 40 milhões de cadeias de Markov Monte Carlo, com amostragem a cada 4000. O tempo para o estabelecimento da fase estacionária correspondeu aos 25% das amostras e foi realizado no Tracer v 1.5 (Drummond e Rambaut, 2007).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

3.1.1 Citocromo c oxidase I

Foram obtidos 614 pb de COI, de 219 indivíduos (58 neste trabalho e 161 do GenBank), os quais definiram 56 haplótipos com 137 sítios polimórficos. O primeiro par de bases das sequências iniciou na posição 44 do gene.

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O mesmo modelo foi selecionado para as duas análises filogenéticas realizadas (IB e MV), o de sítios finitos de Hasegawa, Kishino e Yano (1985) com $\gamma = 0,1850$ e taxa de transição transversão = 6,1344 (HKY+G).

As topologias das filogenias dos métodos IB, MV e MP foram congruentes e a filogenia generalizada está representada na Figura 3. As filogenias originais podem ser encontradas no Apêndice 2. Suportes estatísticos foram considerados altos quando na Análise Bayesiana foram $\geq 95\%$ e na Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia $\geq 70\%$. Os grupos foram nomeados de acordo com os clados formados nas filogenias.

Em 2001, Baker e Bradley revisaram taxas de divergência gênica do DNAmít em gêneros de pequenos mamíferos. Neste trabalho, propuseram que divergência genética entre 2 – 11% poderiam representar variações tanto intra quanto interespecífica e que táxons neste intervalo mereciam uma análise minuciosa. Em estudo posterior, Baker e Bradley (2006) sugeriram que filogrupos mitocondriais com divergência de sequências $\geq 5\%$ possam ser candidatos a espécies ainda não reconhecidas. Este valor de divergência de sequências é, de

certa forma, arbitrário levando em consideração o que foi observado em estudos com mamíferos. É importante chamar atenção para o fato de que esse critério foi baseado em sequências do gene mitocondrial do citocromo b e não do COI. Clare *et al.* (2011) lembram que como a taxa de evolução do Cit-b é mais rápida que a do COI (Meiklejohn, Montooth e Rand; 2007), talvez fosse necessário que o valor da divergência de sequências de COI fosse menor

Desse modo, foi adotado nesse estudo o valor de $\geq 3\%$ de divergência de sequências para identificação dos clados, podendo ser observado, então, nove grupos (Figura 4). O grupo México é o que possui distribuição mais ao norte, abrangendo indivíduos do México e da Guatemala. O Caribe, formado por indivíduos do Panamá e da região mais ao norte da Venezuela. Amazônia equatoriana, por indivíduos do Equador, região centro sul da Venezuela e da Bacia Amazônica do Brasil. O grupo Mata Atlântica Norte + Cerrado (MAN/Cerrado) contém indivíduos dos estados brasileiros Paraíba e Pernambuco, bioma Mata Atlântica, e um indivíduo de Minas Gerais, bioma Cerrado. O grupo denominado Mata Atlântica Sul compreende populações de indivíduos dos estados São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo. Estes grupos não apresentaram sobreposição de distribuição geográfica com nenhum outro no conjunto de dados analisado. Todavia, os quarto grupos discutidos a seguir apresentaram sobreposição parcial de distribuição entre si. O grupo Amazônia peruana, formado por indivíduos do Peru (Madre de Dios) e dos estados brasileiros de Rondônia e Amazonas (Tapauá e Beruri), possui uma região de simpatria com indivíduos do grupo Amazônia Central I, o qual compreende populações do Amazonas (Urucará e Manicoré) e Pará, no Brasil e do sul da Amazônia guianense (Upper Takutu–Upper Essequibo). Ainda bem próximo àquele grupo, está o Amazônia Central II formado por populações brasileiras do Amazonas (Borba e Beruri), Pará e da região centro sul da Guiana (Potaro-Siparuni e Upper Takutu–Upper Essequibo) e sul do Suriname (Sipaliwini). Mas, é com o grupo Amazônia Central I que este possui regiões de simpatria mais frequentes. Na Figura 3b, pode-se notar que as os pontos no mapa se

sobrepõem nas cores desses dois grupos no Pará (Brasil) e em Upper Takutu–Upper Essequibo (sul da Guiana). A Amazônia guianense compreende indivíduos da Guiana (ampla distribuição no país, abrangendo quase do norte ao sul) e do Suriname (Brokopondo e Sipaliwini). A simpatria é observada entre este grupo e o Amazônia Central II na região central do país (Figura 3a).

Notam-se altos suportes estatísticos para oito dos nove grupos formados. A exceção se encontra no grupo da Amazônia Central I, cujas relações não foram bem suportadas estatisticamente, bem como as relações entre os grupos superiores, como no caso de México, Caribe e o grupo da Amazônia equatoriana. Os clados Amazônia Central I e II apresentaram a menor divergência de sequência entre os grupos identificados (3,1%), e suas relações filogenéticas não estão bem compreendidas.

A fim de se entender melhor as relações filogenéticas entre esses grupos, foi feita uma filogenia de haplótipos (Figura 4). Os modelos evolutivos selecionados pelo critério Bayesiano foi o HKY+G ($G = 0,1540$; $t_i/t_v = 7,4528$). A topologia apresentada pelos dois métodos recuperou os nove grupos com altos suportes estatísticos, inclusive o grupo Amazônia Central I.

A média das distâncias par a par foi de 5,3%. As distâncias genéticas entre os nove grupos variaram de 3,1% (entre Amazônia Central I e II) a 10,7% (Amazônia equatoriana e Mata Atlântica Sul) e as distâncias intraclados variaram de 0 (México) a 2% (Amazônia peruana). As distâncias par a par entre os clados estão na Tabela 2.

A rede de haplótipos revelou os mesmos nove grupos encontrados nas filogenias (Figura 3). Tais grupos estão geograficamente estruturados e não compartilham haplótipos entre si. O grupo MAN/Cerrado apresentou 34 mutações entre indivíduos da MAN e do Cerrado. Este fato levantou dúvidas sobre o agrupamento destes indivíduos, mas levando em consideração que apenas um indivíduo do Cerrado foi analisado, não se podem fazer

inferências mais acuradas a respeito. Por exemplo, este dado pode ser um viés amostral e não refletir o que de fato ocorre em populações do Cerrado. Considerando a monofilia do grupo, preferiu-se manter MAN/Cerrado como um grupo único até que mais amostras do Cerrado possam ser analisadas.

Tabela 2. Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de COI de *Trachops*. Erro padrão é mostrado na diagonal superior. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros. Em negrito a distância entre os grupos Amazônia Central I e II, menor que 4%.

	MA Norte/ Cerrado	MA Sul	AMZ peruana	AMZ central I	AMZ central II	AMZ equatoriana	AMZ guianense	Caribe	México
MA Norte/Cerrado		0,014	0,012	0,012	0,010	0,008	0,011	0,010	0,011
MA Sul	10,1		0,013	0,015	0,012	0,012	0,014	0,012	0,013
AMZ peruana	8,6	9,9		0,010	0,011	0,011	0,011	0,009	0,009
AMZ central I	5,5	5,5	7,0		0,011	0,011	0,010	0,010	0,008
AMZ central II	4,4	4,4	7,0	3,1		0,006	0,011	0,009	0,011
AMZ equatoriana	7,2	7,2	7,1	6,4	6,4		0,011	0,008	0,010
AMZ guianense	6,6	6,6	6,2	4,6	4,7	7,1		0,011	0,010
Caribe	7,7	7,7	6,0	6,3	6,1	5,8	5,9		0,009
Mexico	8,1	8,1	6,4	6,0	6,4	5,3	6,1	4,5	

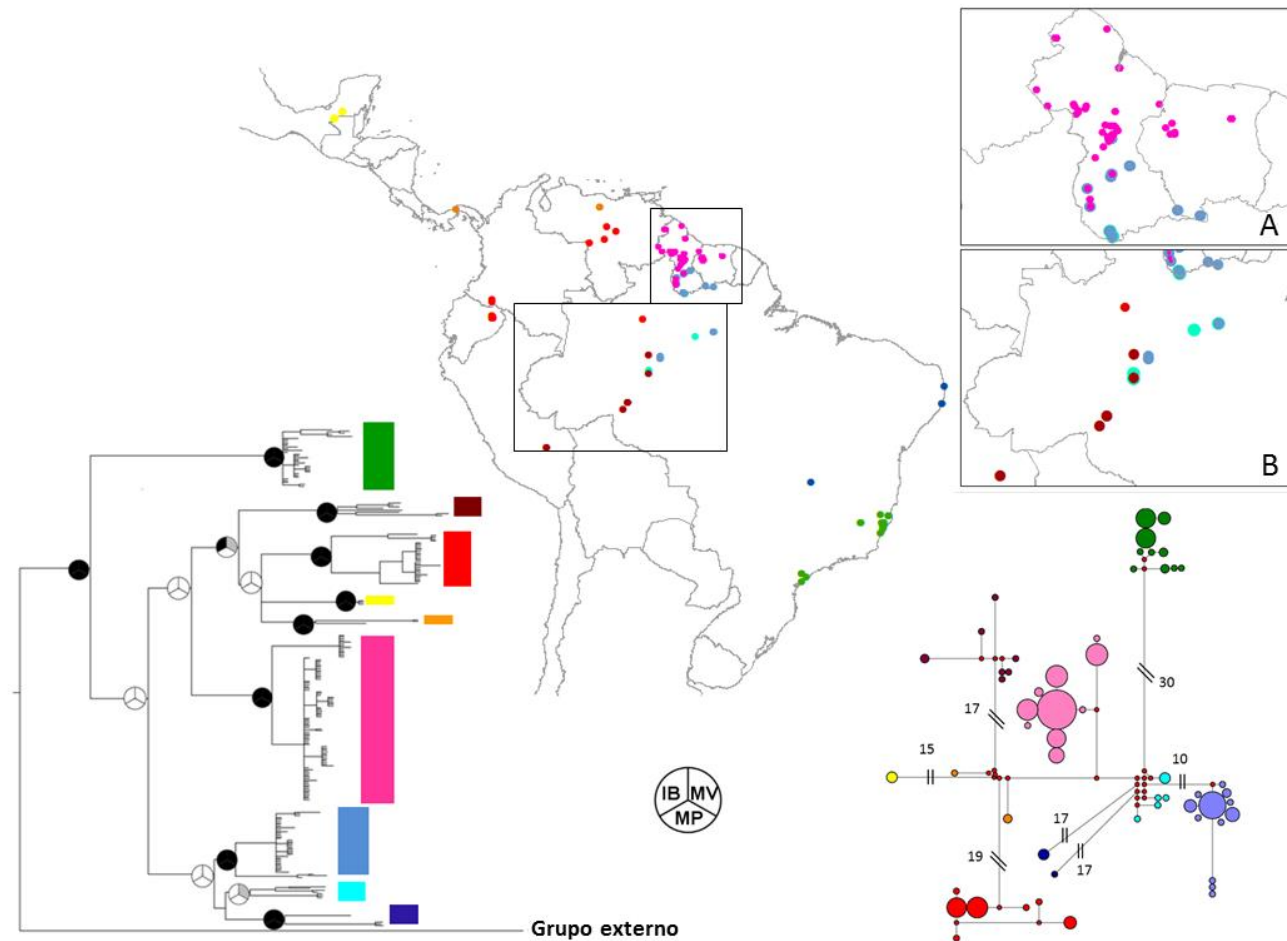


Figura 3. Filogenia molecular do citocromo *c* oxidase I gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB), Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP). Suportes estatísticos indicados pelos círculos. Para MV e MP, branco para bootstrap $\leq 50\%$, cinza para $50 - 70\%$ e preto para $\geq 70\%$. Para Análise Bayesiana, branco indica probabilidade posterior $< 95\%$ e preto $\geq 95\%$. Na rede de haplótipos, os grupos com cores correspondentes na filogenia. No mapa, a distribuição geográfica dos grupos encontrados pelos métodos filogenéticos, com as regiões da Guiana (A) e Bacia Amazônica (B) ampliadas.

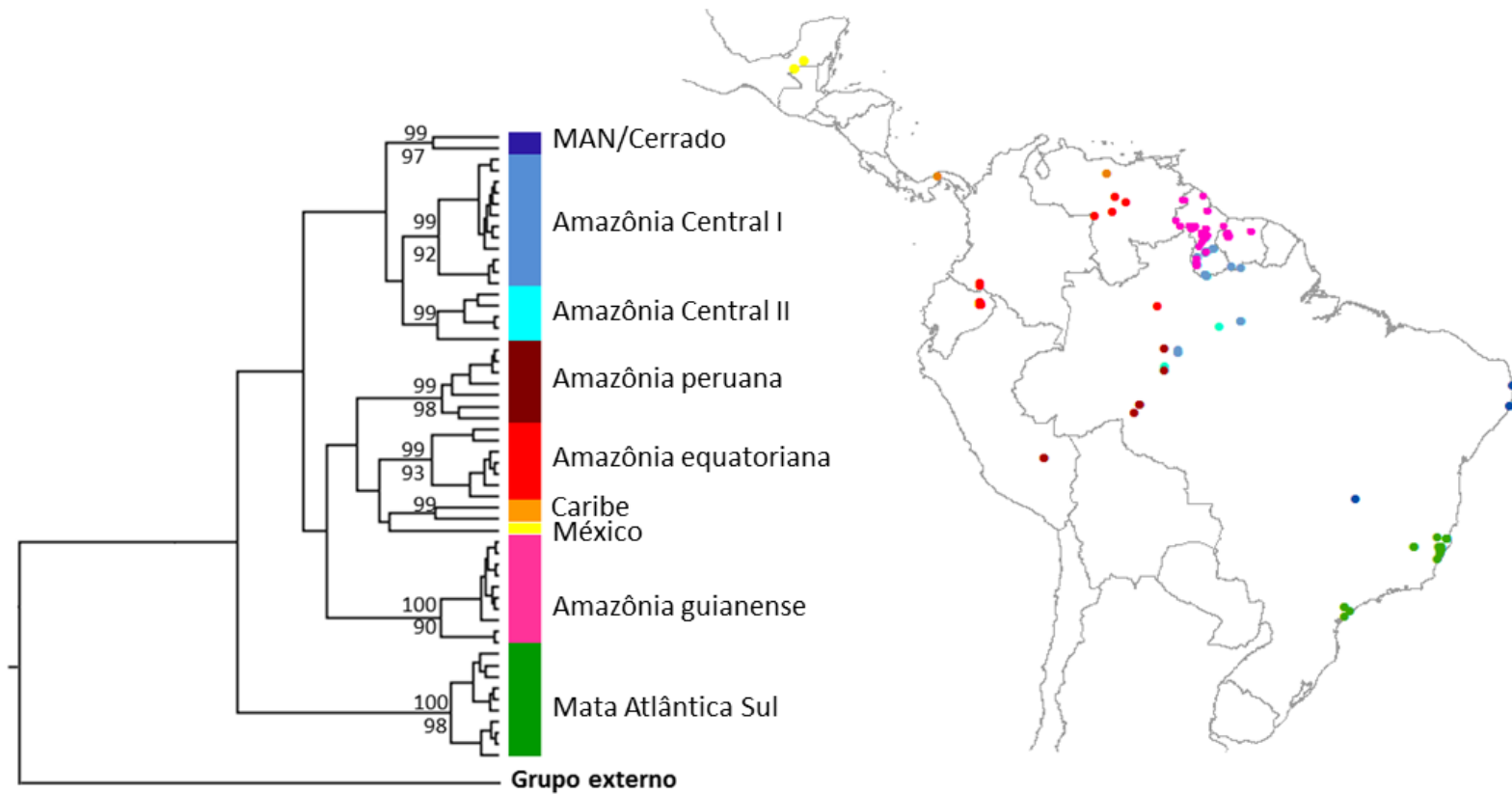


Figura 4. Filogenia molecular dos haplótipos do citocromo *c* oxidase I gerada pelo método de Inferência Bayesiana (IB). Valores acima dos ramos indicam probabilidade posterior e abaixo dos ramos os valores de *bootstrap*. Valores inferiores a 95% para Inferência Bayesiana e 70% para Máxima Verossimilhança não foram mostradas. No mapa, a distribuição geográfica dos grupos encontrados pelos métodos filogenéticos.

3.1.2 Citocromo *b*

Sequências parciais de 779 pb, iniciando na posição 86, de Cit-*b* foram obtidas de 17 indivíduos, as quais apresentaram 122 sítios polimórficos e definiram 9 haplótipos.

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O modelo evolutivo selecionado pelo critério Akaike e Bayesiano foi o “Generalised Time-Reversible” (Tavaré, 1986) com o parâmetro gamma igual a 0,2080 (GTR+G).

Os grupos Mata Atlântica Sul e MAN/Cerrado foram recuperados por este marcador. Outros dois clados foram formados, entretanto com apenas um indivíduo cada: um de Bolívar (Venezuela) e um de Paracou (Guiana Francesa). A média da distância par a par foi 7,2% e as distâncias intercalados variaram de 6,3% (MAN/Cerrado e Venezuela) a 9,6% (Mata Atlântica Sul e Venezuela). A filogenia generalizada e a rede de haplótipos estão apresentadas na Figura 5.

Inicialmente, este marcador foi testado para ser utilizado como método comparativo ao trabalho de Ditchfield (1996). Entretanto, devido às dificuldades em amplificar este marcador e este apresentar grupos semelhantes ao COI, este marcador não foi mais utilizado.

Tabela 3. Estimativa de divergência de sequências (%) par a par entre grupos de Cit-*b* de *Trachops*. Erro padrão é mostrado na diagonal superior. As análises foram conduzidas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros.

	MAN/ Cerrado	MA Sul	Venezuela	Guiana Francesa
MAN/Cerrado		0,010	0,009	0,010
MAS	7,2		0,012	0,011
Venezuela	6,3	9,6		0,011
Guiana Francesa	7,4	9,1	8,6	

3.1.3 Recombination Activation Gene 2

Foram geradas sequências parciais de 583 pb de 24 O conjunto de dados apresentou apenas dois sítios polimórficos. As sequências parciais tiveram seu início na posição 365 e final na posição 947.

Os conjuntos de dados não apresentaram saturação de substituições de base significativa pelo índice de saturação do método de Xia e Xie (2001). O programa jModeltest selecionou os modelos evolutivos mais apropriados para os conjunto de dados. O modelo evolutivo selecionado pelo critério Akaike e Bayesiano foi o proposto por Jukes e Cantor (1969) com proporção de sítios invariantes (JC+I; p-inv = 0,9610) e HKY+I (p-inv= 0,9610), respectivamente.

Devido ao pequeno número de polimorfismos, as filogenias geradas por análise Bayesiana e Máxima Verossimilhança apresentaram topologia com extensa politomia para o conjunto de dados deste marcador. A Figura 5 apresenta a filogenia generalizada para os dois métodos filogenéticos. As cores na filogenia seguem as dos grupos formados pelo COI, com exceção das cores preta e cinza, que representam os indivíduos RZ 42 (Barcelos, AM) e TK 15289 (Paracou, Guiana Francesa), respectivamente. Por não terem sido utilizados nas análises do COI e como o RAG2 não mostrou estruturação, não foi possível identificar o (s) grupo (s) a que esses indivíduos pertencem.

A média das distâncias par a par foi de 0,1% e grupos não puderam ser definidos para este marcador.

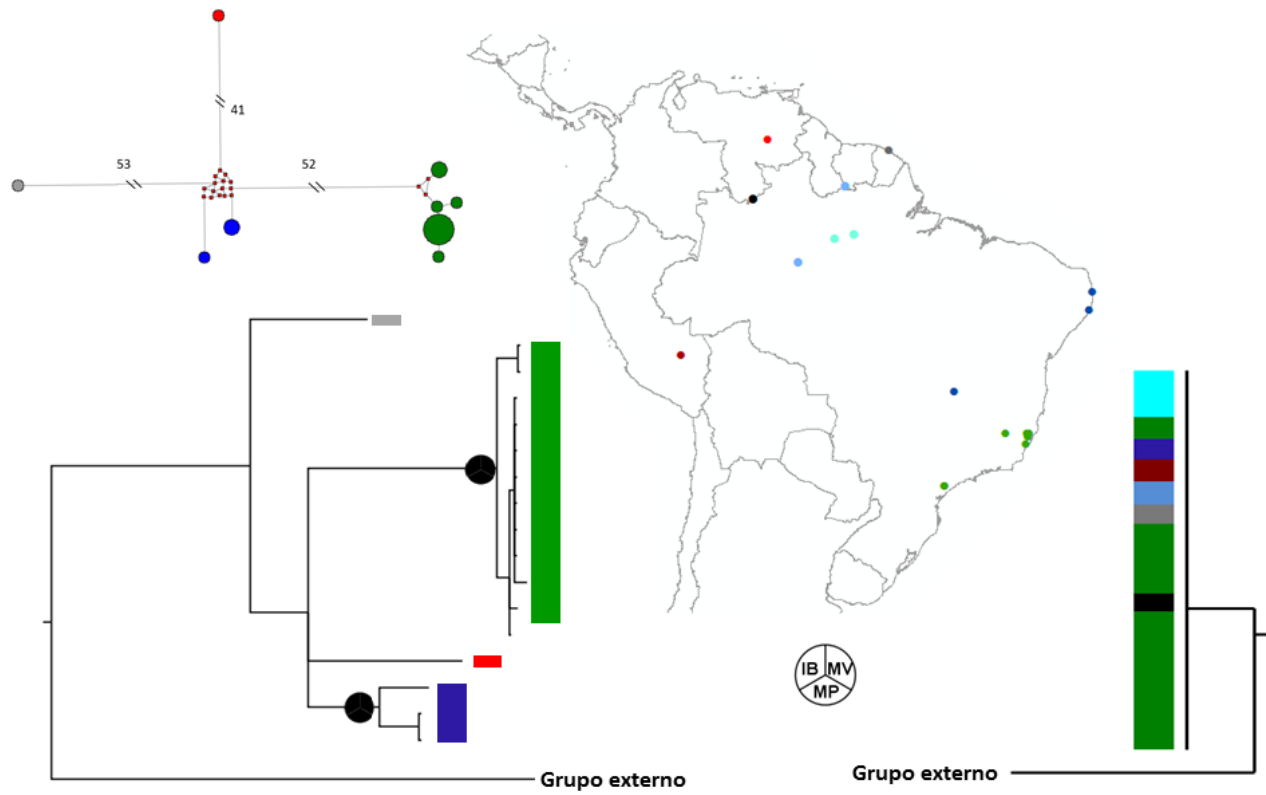


Figura 5. Filogenia molecular do citocromo b (esquerda) e do RAG2 (direita) gerada pelos métodos de Inferência Bayesiana (IB), Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP). Suportes estatísticos indicados pelos círculos pretos. Para MV e MP, indica bootstrap $\geq 70\%$ e para Inferência Bayesiana, $\geq 95\%$. Os indivíduos da Venezuela (vermelho) e da Guiana Francesa (cinza) foram apresentados diferentemente pelos três métodos filogenéticos, porém sem suporte estatístico. Na rede de haplótipos, os grupos com cores correspondentes na filogenia. No mapa, a distribuição geográfica dos grupos encontrados pelos métodos filogenéticos. Indivíduos cujas sequências não foram obtidas no COI estão representados pela cor preta e cinza.

3.2 ANÁLISES POPULACIONAIS

Para o conjunto de dados dos marcadores moleculares mitocondriais, tanto a diversidade haplotípica, $h=0,9421$ e $h= 0,831$, quanto à diversidade nucleotídica, $\pi=0,0501$ e $\pi=0,04205$, foram altas para o COI e para o Cit-b respectivamente. Para as demais análises, foi considerado apenas o conjunto de dados do COI, o qual teve maior representatividade amostral.

Os índices de fixação geral das populações foram significativamente altos para COI, indicando forte estruturação geográfica da diversidade genética. Isso foi reforçado pela AMOVA, que indicou a maior porcentagem da variação entre as populações (81,34%) Considerando o cenário em que os nove clados são grupos de populações, é possível constatar a forte estruturação entre grupos do que dentro de populações (Tabela 4).

Tabela 4. Cálculos de variância molecular dentro das populações, entre populações e entre grupos de populações de *Trachops* utilizando o citocromo c oxidase I (COI).

AMOVA			Estatística Φ		
	Porcentagem de variação				
Entre grupos	Entre populações dentro dos grupos	Dentro das populações	FSC	FST	FCT
81,34	14,30	4,36	0,766	0,956	0,813

3.3 ANÁLISE DE ESTIMATIVA DE TEMPO DE DIVERGÊNCIA

Estimativa de tempo de divergência para *Trachops* só havia sido feita anteriormente em nível de gêneros da subfamília Phyllostominae (Hoffmann *et al.*, 2008). Em trabalho anterior a esse, Teeling *et al.* (2005) fez estimativas de datação de famílias de toda ordem Chiroptera, inclusive de subfamílias de Phyllostomidae. Teeling e colaboradores (2005), analisaram 13,7 kb de 17 genes nucleares de indivíduos representantes de todas as famílias de morcegos vivos e utilizaram quatro grupos de Laurasiatheria como grupo externo. Hoffmann e colaboradores (2008), utilizaram 4,6 kb de quatro marcadores moleculares (um nuclear e três mitocondriais) e os pontos de calibração seguiram o trabalho de Teeling *et al.* (2005) e datação de fósseis de *Notonycteris* e *Lophostoma*.

As estimativas de tempo de divergência encontrados no presente estudo (Figura 6) são condizentes às dos estudos citados em se tratando das datas de separação de *Trachops* e *Macrophyllum* e *Artibeus* e *Anoura*. Os dados mostram que em *Trachops*, os nove filogrupos se separaram tardiamente, com exceção dos grupos Amazônia Central I e II, cuja separação é mais recente, podendo explicar a menor divergência genética encontrada nesses grupos em relação aos demais.

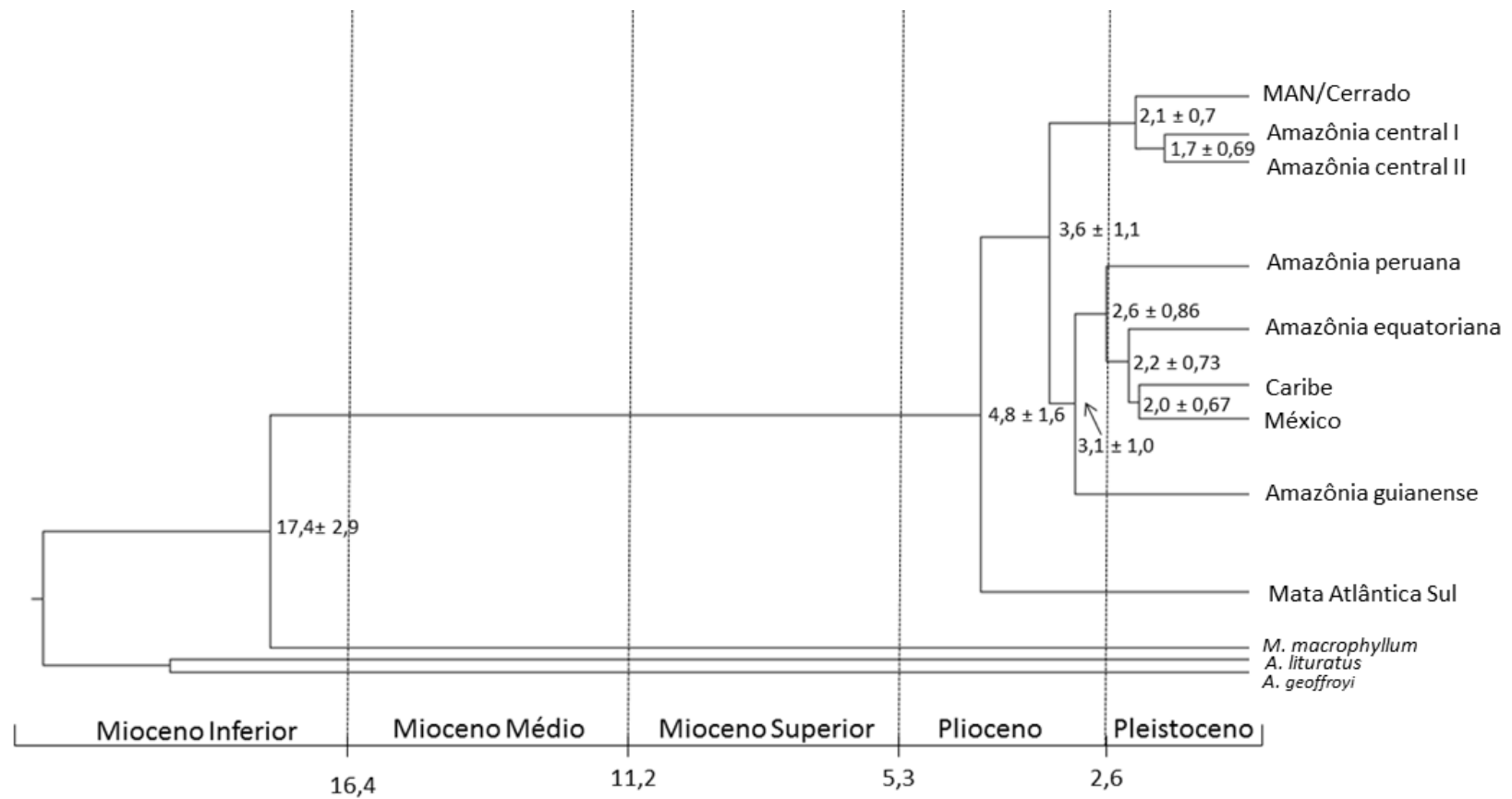


Figura 6. Estimativa de tempo de divergência dos nove grupos de *Trachops gerada* pelo BEAST 2.1.0 (Bouckaert *et al.*, 2013), usando três pontos de calibração dentro de Phyllostomidae. Números próximos aos nós são datas em milhões de anos antes do presente, com 95% de intervalo de confiança. Os tempos geológicos estão de acordo com a escala de tempo geológica da Geological Society of America (www.geosociety.org/science/timescale/timescl.pdf).

4 DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E ESTRUTURAÇÃO ESPACIAL

De modo geral, os dados deste trabalho foram concordantes com estudos anteriores. Os dados do Cit-b foram concordantes com aqueles de Ditchfield (1996) e resgatou três (“Sudeste”, “Nordeste” e “Guiana Francesa”) dos cinco clados daquele estudo. Análises do COI foram mais completas e mostraram os cinco clados propostos por Ditchfield (1996): os três citados anteriormente mais “Guatemala” e “Panamá”, com o adicional de outros quatro. O clado da Amazônia encontrado em análise morfológica por Ditchfield (comunicação pessoal) também foi encontrado. Todavia, é possível notar que a complexidade daquele clado é maior do que o observado por Ditchfield. Somente na porção brasileira da Amazônia é possível observar a presença de três grupos fortemente estruturados, que serão discutidos mais adiante. Assim como no trabalho de Clare (2012), o marcador nuclear utilizado neste estudo também apresentou uma filogenia altamente politômica. Clare (2012) utilizou uma região não codificadora do DNA nuclear, o Dby, e, portanto era esperado que apresentasse mais polimorfismos que uma região codificadora, como o RAG2. No entanto, ambos marcadores não mostraram diferenças para linhagens de *Trachops*. Para outras espécies, como *Saccopteryx bilineata*, *Glossophaga soricina* e *Chrotopterus auritus*, o Dby foi informativo; assim como, por exemplo, para *Sturnira* (Velazco e Patterson, 2013) e *Myotis* (Lack *et al.*, 2010) o RAG2 também foi. Estes não se revelaram bons marcadores para este tipo de estudo em *Trachops* e talvez fosse interessante testar outros marcadores nucleares como, por exemplo, o íntron 7 do betafibrinogênio o qual tem sido utilizado em estudos de sistemática molecular de morcegos (e.g. Ammerman *et al.*, 2012, Nesi *et al.*, 2012). A morfologia também pode lançar luz como complemento na identificação dos nove grupos distintos. Um exemplo que já foi citado é do gênero *Carollia*, que possuía quatro espécies há até poucos anos e que atualmente conta com

nove espécies. O uso de ferramentas moleculares evidenciou polimorfismos de DNA mitocondrial que foram fortalecidos por usos de ferramentas morfométricas (Baker, Solari e Hoffmann, 2002; Solari e Baker 2006). *Miniopterus manavi* é um outro caso no qual foi utilizado sequências do gene do citocromo b que identificou três grupos altamente divergentes e monofiléticos, e posteriormente um estudo morfométrico corroborou os dados moleculares (Goodmann *et al.*, 2009). Hoje, *Miniopterus manavi* compõe um complexo de espécies no arquipélago de Comoro, Madagascar que podem ser distinguíveis por caracteres externos e craniodentais. Ditchfield já utilizou essa metodologia em *Trachops* e os seis clados observados apresentaram diferenças morfológicas sutis.

As nove linhagens mitocondriais relatadas no trabalho de Clare (2012), foram recuperadas aqui. Adicionalmente, foram encontrados mais três grupos, totalizando 12. Entretanto, os nove grupos de Clare (2012) foram consideradas como seis grupos distintos no presente estudo utilizando o critério de Baker e Bradley (2006) já discutido anteriormente. As distâncias moleculares dentro dos grupos não ultrapassaram 2%, portanto, menor do que o valor do critério para grupos potencialmente crípticos adotado neste estudo ($\geq 3\%$).

A inclusão de amostras da Amazônia brasileira e peruana foi particularmente interessante no rearranjo das linhagens encontradas por Clare (2012), discutidas a seguir. A autora fala sobre três linhagens na Guiana e uma no Suriname, as quais, neste estudo, formaram três grupos: duas linhagens da Guiana e uma do Suriname foram agrupadas (formando o grupo Amazônia guianense) e a outra da Guiana agrupou com populações dos estados do Amazonas e do Pará, no Brasil, e de Sipaliwini, no Suriname (formando os grupos Amazônia Central I e II). A linhagem do Equador e da região mais central da Venezuela formaram um grupo, juntamente com um indivíduo do Amazonas (Brasil). Panamá e Venezuela (Guarico) formam um grupo monofilético com alto suporte. Apenas a linhagem formada por

indivíduos do México e da Guatemala foram inteiramente recuperadas neste estudo. Cada um dos grupos encontrados no presente estudo serão discutidos adiante.

Os três métodos filogenéticos, para os dados do COI, apresentaram nove grupos sendo oito deles com altos suportes estatísticos. Tais grupos também foram encontrados na rede de haplótipos. Apenas o grupo Amazônia Central I não apresentou suporte estatístico alto. Entretanto, na filogenia de haplótipos este clado apresenta suporte alto. A AMOVA reforçou o resultado encontrado nas filogenias, evidenciando que a maior porcentagem da variação se encontra entre os grupos e a menor parte da variação se encontra dentro de cada grupo.

De fato, a estruturação e a monofilia dos grupos deve ser um critério prioritário na identificação de táxons crípticos e o uso da divergência de sequências um critério secundário. Isto porque a diferenciação genética pode esconder as causas dessa diferenciação. Outro cuidado que se deve tomar é que ainda que o estudo de Baker e Bradley (2006) tenha sido embasado em trabalhos recentes de mamíferos, se baseou numa média e existem as exceções. Se grupos estão em fase de separação recente, é normal que a distância genética seja menor que em grupos cuja separação ocorreu há mais tempo, porque o fluxo gênico foi perdido há mais tempo. No caso dos grupos Amazônia central I e II, essa separação ocorreu há cerca de um milhão de anos e em relação com os demais grupos encontrados em *Trachops*, foi uma separação recente. Além disso, na rede de haplótipos o grupo Amazônia Central II apresenta um haplótipo mais frequente, do qual se irradiam vários haplótipos menos frequentes, que diferem do haplótipo original por poucas substituições nucleotídicas, conferindo à rede de haplótipos um aspecto de “estrela”. Este padrão é observado em grupos que sofreram expansão populacional recente, enquanto que os demais grupos parecem ter permanecido estáveis.

Os grupos nomeados México, Caribe, Amazônia equatoriana, Mata Atlântica Sul e MAN/Cerrado apresentaram forte estrutura geográfica sem sobreposição de outros grupos. Em

contrapartida, Amazônia Central I, Amazônia Central II, Amazônia guianense e Amazônia peruana apresentaram zonas potenciais de simpatria no conjunto de dados apresentado. Isto é particularmente interessante, uma vez que Clare *et al.* (2011) encontrou essas zonas de simpatria na Guiana para clados fortemente definidos de *Pteronotus parnelli*, *Platyrrhinus helleri*, *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus*.

A Guiana é uma região interessante dado que no Escudo das Guianas (que se estende da região nordeste, central e sudeste Venezuela ao Suriname, adentrando no norte do Brasil) existe grande variedade litológica, estrutural e tectônica suficientemente importante para condicionar a geomorfologia moderna (Ab'Sáber, 2004). Ora, todos esses fatores citados exercem grande influência na vegetação e conseqüentemente na fauna que ali habita. *Platyrrhinus helleri* e *G. soricina* são morcegos fitófagos e talvez as populações tenham se especializado em diferentes plantas naquela região. *Pteronotus parnelli* é insetívoro e assim como *Trachops*, que é carnívoro, depende de presas que por sua vez podem variar de acordo com as condições florísticas do meio. Em estudo recente (Clare *et al.*, 2013) constatou que *P. parnelli* trata-se de um complexo de espécies crípticas cuja distribuição condiz com a história geológica da América Central e nordeste da América do Sul. Assim como *Trachops*, *P. parnelli* divergiu há aproximadamente 6 Ma e teve uma diversificação rápida durante o Pleistoceno. É sabido que *Trachops* preda anuros no Panamá (Tuttle e Ryan; 1981), mas para nenhuma outra área isso foi formalmente relatado. Talvez por lacuna no conhecimento. Talvez porque *Trachops* tenha se especializado em diversas dietas ao longo de sua distribuição. Simon e Gasparini (2003) relataram que em um experimento de reprodução por playback da vocalização do anuro *Phyllodytes kautskyi* na região de Santa Teresa (ES), um morcego investiu por duas vezes consecutivas sobre os autofalantes do gravador. Entretanto, o morcego não foi identificado.

Dois grupos foram encontrados na Venezuela: indivíduos de Guarico, mais ao norte, agruparam com Panamá formando o grupo Caribe; enquanto que indivíduos do Amazonas e de Bolívar, região central do país, agruparam com Equador e Brasil, formando o grupo Amazônia equatoriana. O Escudo das Guianas abrange uma porção da Venezuela que a divide de forma correspondente à divisão dos dois grupos e pode ter sido um fator para tamanha diferenciação dos grupos citados.

4.2 ANÁLISE DE TEMPO DE DIVERGÊNCIA E CONSIDERAÇÕES BIOGEOGRÁFICAS

Os nove grupos recuperados pelas análises filogenéticas mostraram forte estruturação geográfica, embora com sobreposição de áreas entre alguns grupos amazônicos.

A análise do tempo de divergência mostrou que a separação dos grupos de *Trachops* ocorreu entre 4,8 e 1,7 Ma. Três grupos se separaram no Plioceno e seis no Pleistoceno. A Mata Atlântica Sul representa o grupo mais basal de *Trachops*, cuja divergência ocorreu há aproximadamente 4,8 Ma. Grupos amazônicos tiveram suas formações em intervalos de tempo próximos entre si. A formação do grupo México e Caribe ocorreu no Pleistoceno, após a formação do Istmo do Panamá no Plioceno. Estes dados sugerem, portanto, que a expansão demográfica de *Trachops* se iniciou pela Mata Atlântica Sul, seguindo pelo Nordeste brasileiro, Brasil Central e Amazônia até a América Central e América do Norte.

A maior diversificação do gênero ocorreu durante a transição Plioceno – Pleistoceno, se estendendo ao início do Pleistoceno. Muitas são as evidências de que anteriormente à expansão dos climas secos do Pleistoceno Superior pela América do Sul Oriental, a vegetação era similar à atual. Apesar das flutuações paleoclimáticas durante o Quaternário, os grandes tipos de cobertura vegetal da América do Sul teriam sido praticamente os mesmos de hoje. A Teoria dos Refúgios Pleistocênicos (Haffer, 1969, Vanzolini, 1970) tem sido a principal hipótese para explicar a diversidade na região Neotropical. Alguns autores refutam essa teoria,

afirmando que um resfriamento estimado de 5 a 6°C na média anual da Bacia Amazônica concomitante com o alto índice de umidade, não teria permitido a fragmentação das florestas (Colinvaux *et al.*, 1996, 2000). De um modo geral, essa teoria prediz que o último período glacial foi marcado pela regressão das florestas e ampliação das formações abertas inter e subtropicais. Isso ocorreu em função da expansão dos climas secos determinada pela expansão das correntes frias até latitudes bem mais baixas do que as de suas extremidades (Ab'Sáber, 1979).

As mudanças climáticas nessa época ocorreram por volta de 20 a 13 mil anos atrás (Ab'Sáber, 1979) – embora exista divergência entre diversos autores, essas datas oscilam muito pouco – e a separação dos grupos de *Trachops* datam da primeira metade do Pleistoceno (2,6 a 1 Ma). Talvez as flutuações climáticas no Plioceno, ainda que menos intensas que no Pleistoceno, tenham contribuído para a separação dessas linhagens. Os eventos de cladogênese que ocorreram no final e no início dessas duas épocas formaram grupos de *Trachops* que já estavam estabelecidos no Pleistoceno Superior, onde ocorreram as mudanças mais marcantes no clima e, conseqüentemente, na vegetação. Sendo assim, a Teoria dos Refúgios Pleistocênicos pode não ser a melhor explicação pela diversificação dos grupos de *Trachops*, assim como Costa (2003) relatou para algumas linhagens de pequenos mamíferos não voadores de diversificação antiga.

Uma hipótese alternativa para a diferenciação dos grupos amazônicos é a Hipótese do Lago a qual diz de que a maior parte da Amazônia era coberta por um imenso lago durante o Plioceno. Presume-se que oscilações na temperatura global associadas aos períodos glacial e interglacial tenham causado elevação e redução do nível dos oceanos em relação ao atual. Com a elevação, as águas marítimas poderiam tanto avançar continente adentro, quanto represar a saída de águas fluviais, causando o extravasamento de muitos rios e gerando amplas áreas alagadas ou mesmo a formação de um grande lago na Amazônia (Klammer 1984;

Marroig e Cerqueira 1997). Klammer (1984) estima que no final do Plioceno o nível dos oceanos pode ter atingido 180 m acima do nível atual, regredindo gradualmente até cerca de 100 m há aproximadamente 750 mil anos. Os proponentes desse modelo admitem que a inundação “empurrou” as florestas tropicais para regiões periféricas da Bacia Amazônica onde, os rios alargados separaram populações de animais e plantas em ilhas florestais. Populações isoladas pelo lago amazônico poderiam ter se diferenciado ao longo de milhões de anos e com a quebra da barreira, passaram a ocorrer em zonas de simpatria, como foi apresentado o caso da Amazônia Central I, Amazônia Central II e Amazônia guianense e também Amazônia peruana e Amazônia Central I e II.

Haffer (2008) afirma que é certo que a situação paleogeográfica do Terciário definiu o cenário para a evolução da biota no Escudo das Guianas e regiões vizinhas, cujos grupos de *Trachops* foram discutidos na seção anterior. Isto porque, ao contrário da região andina que é altamente dinâmica, o Escudo das Guianas permaneceu relativamente estável durante o cenozoico, mas posteriormente continuou a elevar-se gradativamente.

Os grupos da Mata Atlântica Norte e Mata Atlântica Sul são bastante divergentes, apresentando 10,1% de divergência de sequências. Essa separação da Mata Atlântica em grupos norte e Sul já foi relatada em outros estudos. Costa (2003) descreveu esse padrão para roedores e marsupiais dos gêneros *Micoureus* e *Rhipidomys*, respectivamente. Ditchfield (2000) encontrou a mesma separação para *Carollia perspicillata*, entretanto com uma região de sobreposição dos dois grupos numa sub-região do nordeste, e Martins *et al.* (2007) encontrou essa divisão para clados do morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Nestes dois últimos estudos a divergência de sequências foi baixa, apesar de apresentar dois clados estruturados ao norte e ao sul da Mata Atlântica, diferentemente de *Trachops*. Além disso, estes grupos de *Trachops* se separaram no Plioceno o que explica tamanha divergência de sequências entre eles.

4.3 *TRACHOPS CIRRHOSUS* TRATA-SE DE UM COMPLEXO DE ESPÉCIES CRÍPTICAS?

Reconhecer espécies é uma tarefa difícil, embora de extrema importância para muitas áreas do conhecimento biológico. Saber qual a unidade taxonômica a qual está sendo examinada é a base de quaisquer estudos de biodiversidade, ecologia e conservação. As unidades que utilizamos para descrever a diversidade da vida, como populações, subespécies ou espécies não são facilmente identificáveis (Mallet, 2007).

Desde que Linnaeus introduziu o sistema binomial para nomear espécies, estas tem sido descritas, nomeadas e classificadas de modo a evitar a redundância de nomenclatura. O reconhecimento de espécies pela morfologia tem sido feito por séculos. Um componente crucial desta prática taxonômica é o conceito do espécime tipo (holótipo), que servirá de referência para comparações. Quando uma nova espécie é descrita é necessário que o holótipo seja descrito morfologicamente e fique disponível em museu para estudo. A grande limitação da taxonomia tradicional, entretanto, se encontra na escassez de especialistas na área (Tautz *et al.*, 2003). Outro problema encontrado é a identificação de espécies politípicas ou crípticas, por exemplo, que dificilmente são reconhecidas ao se utilizar o conceito tipológico de Aristóteles. Espécie que apresenta grande plasticidade fenotípica corre o risco de ser classificada como várias espécies distintas e em espécies crípticas o contrário ocorre. Devido a esta última apresentar, em geral, diferenças morfológicas sutis, podem ser agrupadas em uma única espécie. Este parece ser o caso de *Trachops cirrhosus*, cuja morfologia só foi investigada por Ditchfield após estudos baseados em DNA mostrarem grande divergência de sequências entre cinco clados bem estruturados geograficamente. O que fazer então, diante das restrições do conceito morfológico de espécies?

O maior obstáculo encontrado na sistemática é não somente reconhecer qual o conceito de espécie adotar em um estudo, dada a grande diversidade de conceitos, mas também qual o critério operacional a ser utilizado, isto é, como reconhecer espécies na prática. Tautz *et al.*

(2003) sugere que polimorfismos DNA sejam empregados como auxílio ao que ele chama de “crise taxonômica”, a respeito da escassez de especialistas. De fato, desde que a sistemática filogenética foi instituída por Hennig, os métodos cladísticos revolucionaram a sistemática ao propor o conceito de monofilia e este, por sua vez, também foi aplicado em filogenias moleculares.

Um conceito que vem sendo discutido desde Wallace e Poulton (Mallet, 2007) é o conceito de intercruzamento, popularizado posteriormente por Mayr (1970) como o conceito biológico de espécie. Este conceito define espécie como “grupos de populações naturais que intercruzam e são reprodutivamente isoladas de outros grupos”. Sendo assim, o isolamento reprodutivo é um dos requisitos para que ocorra especiação. É mais fácil se pensar nessa quebra de fluxo gênico entre populações que estão geograficamente separadas, uma vez que populações próximas têm chances maiores de manter o fluxo gênico. Se fossemos aplicar esse conceito para *Trachops*, os grupos que apresentaram zonas potenciais de simpatria na Amazônia não necessariamente passaram por processo de especiação simpátrica. Algum evento vicariante poderia ter separado as populações em questão, como por exemplo, a Hipótese do Lago, e posteriormente essas populações podem ter restabelecido o contato, entretanto, com diferenciação suficiente que impediu o intercruzamento. Todavia, este é um conceito mais filosófico do que prático, uma vez que não é possível avaliar se grupos de populações estão isolados reprodutivamente e se, portanto, mantêm ou não fluxo gênico entre si.

Por esse motivo, foi adotado neste estudo o conceito filogenético de espécie de Cracraft (1983), o qual define espécie como sendo um “grupo irreduzível de organismos, distintos de outros grupos e dentro do qual existe um padrão parental de ancestralidade e descendência”. Se aplicarmos este conceito a *Trachops cirrhosus*, podemos identificar os nove grupos como candidatos a espécies.

Martins *et al.* (2009) encontraram incongruências entre análises de DNAmít e DNAnuc para o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, assim como Clare (2012). Os marcadores mitocondriais em ambos os trabalhos (Cit-b e COI, respectivamente) mostraram forte estruturação geográfica dos clados de *D. rotundus*, entretanto os nucleares ou mostraram haplótipos compartilhados ao longo da distribuição ou intensa politomia nas análises filogenéticas. Por esse motivo, para *D. rotundus* permaneceu a hipótese de especiação críptica. Ainda que a filogenia do gene nuclear de *Trachops* não tenha recuperado os nove grupos, de modo a corroborar ou refutar os dados do DNAmít, há forte estruturação geográfica entre os clados que foram concordantes em todas as análises realizadas. Além disso, há indícios morfológicos, ainda não publicados, de que os seis grupos encontrados por Ditchfield – também identificados neste trabalho – são diferenciáveis. Esses dados combinados nos dão forte indício de que *Trachops* se trate de um complexo de espécies crípticas.

A seguir, serão consideradas as distribuições das subespécies apresentadas anteriormente (Crammer, Willig e Jones, 2001) e o histórico taxonômico de *Trachops cirrhosus* e distribuição discutidos por Husson (1962).

Dos nove clados encontrados no presente estudo apenas o México tem correspondência com a subespécie proposta para a mesma região, *T. c. coffini* Felten (1956). Desse modo, essa subespécie poderia ser elevada a nível específico (*T. coffini*), já que a localidade tipo da subespécie é Peten, Guatemala, e nesse clado há espécimes dessa localidade.

O grupo Mata Atlântica Sul está distribuído entre as áreas de *T. c. ehrhardti* Felten (1956) e *T. c. cirrhosus* Spix (1823). Este clado poderia ser denominado *T. ehrhardti*, já que a subespécie foi descrita para o estado de Santa Catarina, Brasil, e há indivíduos representantes do grupo na abrangência da distribuição dessa subespécie.

Uma subespécie, *T. c. fuliginosus* Gray (1847), havia sido descrita para Pernambuco, todavia foi considerada sinônimo júnior de *T. c. cirrhosus* (Koopman, 1993), descrito para o estado do Pará, Brasil. O clado MAN/Cerrado, poderia resgatar o nome *fuliginosus*, sendo então chamado *T. fuliginosus*.

Trachops cirrhosus foi descrito originalmente como *Vampyrus cirrhosus* Spix, 1823 e não consta localidade tipo em sua descrição. Foi então que Schinz em 1844 nomeou o Pará, Brasil, como localidade tipo. Todavia, Gray descreveu *Trachops fuliginosus* do Pernambuco, em 1847, como espécie tipo do gênero e declarou que evidentemente trata-se do mesmo gênero de Spix. A partir dessas informações se causou grande confusão em relação às localidades tipo das subespécies *T. c. cirrhosus* e *T. c. fuliginosus*. Existe controvérsia entre os trabalhos de Jones e Carter (1976) e Husson (1962). O primeiro considera que a localidade tipo de *cirrhosus* é Pernambuco, assim como para *fuliginosus* já que este foi considerado sinônimo júnior. Já o segundo, defende que a descrição de localidade tipo de Schinz deve ter prioridade. Aqui foi considerado, então, a localidade tipo como sendo no Pará, Brasil, de acordo com o trabalho de Husson (1962).

Trachops cirrhosus cirrhosus, a subespécie mais amplamente distribuída, possui seis grupos em sua área de abrangência, excluindo-se os grupos MAN/Cerrado e Mata Atlântica Sul já discutidos. Dado que a localidade tipo de *T. c. cirrhosus* é Pará, Brasil, existiriam dois grupos candidatos a manter o nome da espécie (*T. cirrhosus*): Amazônia Central I e Amazônia Central II, visto que ambos possuem ocorrência no estado do Pará (Tabela 4). Aos demais grupos caberiam novos nomes.

Tabela 5. Subespécies com respectivas localidades tipo, discutidas em Husson (1962), e os clados deste estudo que foram propostos como correspondentes às subespécies.

Subespécie	Localidade tipo	Clado Correspondente
<i>T. c. cirrhosus</i> Spix, 1823	Pará, Brasil (Schinz, 1844)	Amazônia Central I Amazônia Central II
<i>T. c. fuliginosus</i> Gray (1847)	Pernambuco, Brasil	MAN/Cerrado
<i>T. c. cofinnii</i> Felten (1956)	Peten, Guatemala (Goldman, 1925)	México
<i>T. c. ehrhardti</i> Felten (1956)	Santa Catarina, Brasil	Mata Atlântica Sul

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SÁBER, A.N. Os mecanismos da desintegração das paisagens tropicais no Pleistoceno. Efeitos paleoclimáticos do período Würm-Wisconsin no Brasil. **Paleoclimas**, 8: 1-11. 1979.

AB'SÁBER, A.N. A Amazônia: do discurso à práxis. 2 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2004.

AMMERMAN, L.K.; LEE, D.N.; TIPPS, T.M. First molecular phylogenetic insights into the evolution of free-tailed bats in the subfamily Molossinae (Molossidae, Chiroptera). **Journal of Mammalogy**, 93(1):12-28. 2012.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A., Saunders, N.C. Intraespecific phylogeography: the bridge between population genetics and systematics. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, 18: 489-522. 1987.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press. 2000.

BAKER, R.J.; PORTER, C.A.; PATTON, J.C.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. Systematics of bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. **Occasional Papers**, 202:1-6. 2000.

BAKER, R.J., SOLARI, S., HOFFMANN, F.G. A new Central American species from the *Carollia brevicauda* complex. **Occasional Papers** The Museum of Texas Tech University 217: 1–10. 2002

BAKER, R.J.; BRADLEY, R.T.D. Speciation in mammals and the genetic species concept. **Journal of Mammalogy**, 87(4):643-662. 2006.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16:37-48. 1999.

BARQUEZ, R.M.; MARES, M.A.; BRAUN, J.K. The bats of Argentina. **Special Publications Museum of Texas Tech University**, 42:1-275. 1999.

BARRATT, E. M.; DEAVILLE, R.; BURLAND, T. M.; BRUFORD, M. W.; JONES, G.; RACEY, P. A.; WAYNE, R. K. DNA answers the call of pipistrelle bat species. **Nature**, 387:138-139. 1997.

BONATO, V. & FACURE, K.G. Bat predation by the fringed bat *Trachops cirrhosus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Mammalia**, 64:241-243. 2000.

BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KUEHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C.H.; XIE, D.; SUCHARD, D.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. **In preparation**. 2013.

BRADLEY, R. D.; BAKER, R. J. A test of the genetic species concept: cytochrome b sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**, 82 (4): 960-973. 2001.

BRUFORD, M.W.; HANOTTE, O.; BROOKFIELD, J.F.Y.; BURKE, T. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. **Molecular genetic analyses of populations: A practical Approach**. Gráfica: Oxford. 1992.

CLARE, E. L.; LIM, B. K.; FENTON, M. B.; HEBERT, P. D. N. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. **Plos One**, 6 (7): 22648. 2011.

CLARE, E.L. Cryptic Species? Patterns of Maternal and Paternal Gene Flow in Eight Neotropical Bats. **Plos One**, 6(7):1-13. 2012.

CLARE, E.L.; ADAMS, A.M.; MAYA-SIMÕES, A.Z.; EGER, J.L.; HEBERT, P.D.N.; FENTON, B.M. Diversification and reproductive isolation: cryptic species in the only New World high-duty cycle bat, *Pteronotus parnellii*. **BMC Evolutionary Biology**, 13:26. 2013.

COLINVAUX, P.A.; DE OLIVEIRA, P.E.; MORENO, J.E.; MILLER, M.C.; BUSH, M. A long pollen record from lowland Amazônia: forest and cooling in glacial times. **Science**, 274:85-88. 1996.

COLINVAUX, P.A.; DE OLIVEIRA, P.E.; BUSH, M. Amazonian and Neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. **Quaternary Science Reviews**, 19:141-169.

COSTA, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, 30(1):71-86.

CRACRAFT, J. Species Concepts and Speciation Analysis. **Current Ornithology**, 1: 159-187. 1983.

CRAMER, M.J.; WILLIG, M.R.; JONES. *Trachops cirrhosus*. **Mammalian Species**, 656, 1-6. 2001.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9(8):772. 2012.

DITCHFIELD, A.D. **Phylogeography of Neotropical bats using mitochondrial DNA sequences**. 1996. Tese (Doutorado em Integrative Biology) – Graduate Division, University of California, Berkeley.

DITCHFIELD, A.D. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to non-volant small mammals. **Molecular Ecology**, 9:1307-1318. 2000.

DOBSON, G. E. Conspectus of the suborders, families and genera of Chiroptera arranged according to their natural affinities. **Annals and Magazine of Natural History**, 16: 345–357. 1875.

DRUMMOND, A.J. e RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, 7: 214. 2007.

EXCOFFIER, L. e LISCHER, H.E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, n. 10, p. 564-567. 2010.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 3:294-297. 1994.

GARDNER, A. L. Feeding habits. In: BAKER, R. J.; JONES, J. K.; JR.; CARTER, D. C. (Eds.) **Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae**. 293-350. Part I1. Special Publication Museum Texas Tech University, 13: I-364. 1977.

GOODMAN, S.M.; MAMINIRINA, C.P.; WEYENETH, N.; BRADMAN, H.M.; CHRISTIDIS, L.; RUEDI, M., APPLETON, B. The use of molecular and morphological characters to resolve the taxonomic identity of cryptic species: the case of *Miniopterus manavi* (Chiroptera, Miniopteridae). **Zoologica Scripta**, 38:339-363. 2009.

GOODWIN, G.G. e GREENHALL, A.M. A review of the bats of Trinidad and Tobago. Descriptions, rabies infection and ecology. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 122:187–302. 1961.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, 52:696-704. 2003.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, 165:131-137. 1969.

HAFFER, J. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, 68(4):917-947. 2008.

HALL, E. R. **The mammals of North America**. 2 ed. Wiley, New York. 1981.

HANDLEY, C. O. Jr. 1976. Mammals of the Smithsonian Venezuelan Project. Provo, Utah: Brigham Young University Science bulletin. **Biological series**, v. 20, no. 5.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, 22(2):160–174. 1985.

HÄUSSLER, U.; NAGEL, A.; BRUAN, M.; ARNOLD, A. External characters discriminating sibling species of European pipistrelles, *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) and *P. pygmaeus* (Leach, 1825). **Myotis**, 37:27-40. 2000.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identification through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, 270:313-321. 2003.

HOFFMANN, F.G. e BAKER, R.J. Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based on the cytochrome b gene. **Journal of Mammalogy**, 82:3403-3414. 2001.

HOFFMANN, F.G.; HOOFFER, S.R.; BAKER, R.J. Molecular dating of the diversification of Phyllostominae bats based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49(2): 653-658. 2008.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, 294:2310-2314. 2001.

HUSSON, A.M. The bats of Suriname. **Zoologische Verhandelingen**, 58(1):1-278. 1962.

HUTCHEON, J. M. e KIRSCH, J. A. W. Camping in a different tree: results of molecular systematic studies of bats using DNA-DNA-hybridization. **Journal of Mammalian Evolution**, 11: 17–47. 2004.

JONES Jr., J. K. e CARTER, D.C. Annotated check-list, with keys to subfamilies and genera. In: **Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae**. Part I. Baker, R.J.; Jones Jr., J.K.; Carter, D.C. (eds.) Special Publications of the Museum 10. Lubbock: Texas Tech University Press. 1976.

JUKES, T.H. e CANTOR, C.R. **Evolution of Protein Molecules**. New York: Academic Press. pp.21–132. 1969.

KALKO, E.K.V e CONDON, M.A. 1998. Echolocation, olfaction and fruit display: how bats find fruit of flagelliferous cucurbits. **Functional Ecology**, 12:364-372.

KLAMMER, G. The relief of the extra-Andean Amazon Basin. In: SIOLI, H. (Ed.). **The Amazon: Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin**. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht. 1984.

KOOPMAN, K. F. A synopsis of the families of bats, part VII. **Bat Research News**, 25: 25–29. 1984.

KOOPMAN, K. F. Order Chiroptera. In: **Mammal species of the world**, 2 ed. Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (eds). Washington, DC: The Smithsonian Institution Press. 1993.

KUHNER, M.K., YAMATO, J., FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. **Genetics**, 149:429-434. 1998.

LACK, J.B.; ROEHRS, Z. P.; STANLEY, JR. C. E.; RUEDI, M.; BUSSCHE, R.A.V.D. Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). **Journal of Mammalogy**, 91(4):976-992. 2010.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25:1451-1452. 2009.

MALLET, J. Species, concepts of. In: **Encyclopedia of Biodiversity**, v.2. Levin, S.A (ed). Academic Press: Minnesota. 16p. 2007.

MARROIG, G. e R. CERQUEIRA. Plio-Pleistocene South American history and the Amazon Lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. *J.Comp. Biol.* 2, p. 103-19, 1997.

MARTINS, F. M.; DITCHFIELD, A. D.; MEYER, D.; MORGANTE, J. S. 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. 2007.

MARTINS, F.M.; TEMPLETON, A.R.; PAVAN, A.C.O.; KOHLBACK, B.C.; MORGANTE, J.S. 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: 294. 2009.

MAYR, E. **Populations, Species and Evolution**. Boston, MA: Harvard University Press. 1970.

MCLELLAN, L. J. A morphometric analysis of *Carollia* (Chiroptera, Phyllostomidae). **American Museum Novitates**, n. 2791, p.1-35. 1984.

MEIKLEJOHN, C.D., MONTOOTH, K.L., RAND, D.M. Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends Genet* 23: 259–263. 2007.

NESI, N.; KADJO, B.; POURRUT, X.; LEROY, E.; SHONGO, C.P.; CRUAUD, C.; HASSANIN, A. Molecular systematics and phylogeography of the tribe Myonycterini (Mammalia, Pteropodidae) inferred from mitochondrial and nuclear markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 66:126-137. 2012.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 12 ed. Rio de Janeiro: Atheneu Rio, 2012.

PAVAN, A.C.; MARTINS, F.; SANTOS, F.R.; DITCHFIELD, A.; REDONDO, R.A.F. 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. 2011.

PINE, R. H. **The bats of the genus *Carollia***. Technical Monograph 8, September. The Texas Agricultural Experiment Station, 125p. 1972.

PORTER, C.A.; HOOFER, S.R.; CLINE, C.A., HOFFMANN, F.G.; BAKER, R.J. Molecular phylogenetics of the phyllostomid bat genus *Micronicterys* with descriptions of two new subgenera. **Journal of Mammalogy**, 88(5):1205-1215. 2007.

RAUMBAUT, A. 2007. FigTree 1.3.1. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>

REDONDO, R.A.F.; BRINA, L.P.S.; SILVA, R.F.; DITCHFIELD, A.D.; SANTOS, F.R. Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49:44-58. 2008.

REIS, N. R.; SHIBATTA, O. A.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Sobre os morcegos brasileiros. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO W. A.; LIMA, I. P. (Eds.). **Morcegos do Brasil**. 2^o ed. Londrina, 253p. 2007.

ROHL A. Network: Phylogenetic Network Analysis, v.3.1.1.1. **Fluxus Technology**, Ltd: Germany. 2000.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19:1572-1574. 2003.

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.

SIMÕES, M.B.; DITCHFIELD, A.D.; FUX, B.; MOREIRA, N.I.B. **Diversidade de endoparasitos em quirópteros no estado do Espírito Santo**. In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2011, São Paulo.

SIMON, J.E. e GASPARINI, J.L. Descrição da vocalização de *Phyllodytes kautskyi* Peixoto e Cruz, 1988 (Amphibia, Anura, Hylidae). **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, 16:47-54. 2003.

SOLARI, S. e BAKER, R. J. Mitochondrial DNA sequence, karyotypic, and morphologic variation in the *Carollia castanea* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae) with description of a new species. **Occasional Papers, The Museum, Texas Tech University**. 254: 1–16. 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. 28(10):2731-2739. 2011.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R.H.; VOGLER, A.P. A plea for DNA taxonomy. **Trends Ecol. Evol.** 18 (6), 70–74. 2003.

TAVARÉ, S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. **Lectures on Mathematics in the Life Sciences** (American Mathematical Society), 17: 57–86. 1986.

TEELING, E.C.; SPRINGER, M.S.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN, S.J.; MURPHY, W.J. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. **Science**, 307 (5709): 580. 2005.

TUTTLE, M. D. Distribution and zoogeography of Peruvian bats, with comments on natural history. **University of Kansas Scientific Bulletin**, 49:45–86. 1970.

TUTTLE, M. D. e RYAN, M. J. Bat predation and the evolution of frog vocalizations in the Neotropics. **Science**, 214: 677. 1981.

VANZOLINI, P. E. **Zoologia sistemática, geografia e origem das espécies**. Inst. Geo. de São Paulo. Série teses e monografias. 3:233-242. 1970.

VELAZCO, P.M.; GARDNER, A.L.; PATTERSON, B.D. Systematics of the *Platyrrhinus helleri* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae), with descriptions of two new species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, n. 159, p. 785-812. 2010.

VELAZCO, P.M.; PATTERSON, B.D. Diversification of the Yellow-shouldered bats, Genus *Sturnira* (Chiroptera, Phyllostomidae), in the New World tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 68(3): 683-698. 2013.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, 92:371-373. 2001.

APÊNDICE

Espécimes utilizados para as análises dos genes citocromo c oxidase I, citocromo b e recombination activation gene 2. As coordenadas geográficas estão em graus decimais.

Amostras	Longitude	Latitude	Localidade	País
AD 131	-35,100	-8,750	Tamandaré, Pernambuco	Brasil
AD 133	-35,100	-8,750	Tamandaré, Pernambuco	Brasil
AD 44	-34,867	-7,117	João Pessoa, Paraíba.	Brasil
AD 609	-47,926	-24,388	Sete Barras, São Paulo	Brasil
AD 635	-47,550	-24,717	Iguape, São Paulo	Brasil
BD 12	-63,904	-8,619	Porto Velho, Rondônia	Brasil
BD 18	-63,904	-8,619	Porto Velho, Rondônia	Brasil
CMUFLA 436	-42,576	-19,706	Marliéria, Minas Gerais	Brasil
CMUFLA 442	-42,576	-19,706	Marliéria, Minas Gerais	Brasil
CMUFLA 986	-42,576	-19,706	Marliéria, Minas Gerais	Brasil
CT 19	-40,536	-19,970	Santa Teresa, Espírito Santo	Brasil
CTA343	-40,733	-18,956	Águia Branca, Espírito Santo	Brasil
F32376	-90,07	18,25	Campeche	México
FMHN 141595	-47,967	-25,133	Ilha do cardoso, São Paulo	Brasil
FMNH 174888	-71,386	-12,772	Madre de Dios	Peru
FMNH 174893	-71,386	-12,772	Madre de Dios	Peru
IB 02	-64,402	-9,261	Porto Velho, Rondônia	Brasil
JRDB 01	-63,904	-8,619	Porto Velho, Rondônia	Brasil
LN 61	-40,496	-20,266	Cariacica, Espírito Santo	Brasil
LR 2325	-57,758	-2,537	Urucará, Amazonas	Brasil
LR 669	-56,074	-2,152	Juriti, Pará	Brasil
LR 696	-56,074	-2,152	Juriti, Pará	Brasil
LR 723	-56,074	-2,152	Juriti, Pará	Brasil
LR 733	-56,074	-2,152	Juriti, Pará	Brasil
MO 632	-47,091	-16,030	Cabeceira Grande, Minas Gerais	Brasil
PDA 177	-40,536	-19,970	Santa Teresa, Espírito Santo	Brasil
PDA 61	-40,648	-19,734	São Roque do Canaã, Espírito Santo	Brasil
PEB 1337	-62,000	-4,260	Beruri, Amazonas	Brasil
PEB 833	-62,551	-1,000	Beruri, Amazonas	Brasil
PM 30	-40,379	-19,890	Ibiraçu, Espírito Santo	Brasil
PM 31	-40,380	-19,891	Ibiraçu, Espírito Santo	Brasil
PM 33	-40,381	-19,892	Ibiraçu, Espírito Santo	Brasil
RM 0306b	-61,000	-4,591	Beruri, AM	Brasil
RM 179	-61,000	-4,594	Beruri, AM	Brasil
RM 414	-61,000	-4,409	Borba, AM	Brasil

RM 565	-62,000	-5,951	Tapauá, Amazonas	Brasil
RM 579	-62,000	-6,000	Manicoré, Amazonas	Brasil
RM 580	-62,000	-5,638	Manicoré, Amazonas	Brasil
ROM 100260	-57,37	5,38	Berbice-Corentyne	Guiana
ROM 100833	-60,48	7,37	Barima-Waini	Guiana
ROM 100859	-60,48	7,37	Barima-Waini	Guiana
ROM 100894	-60,48	7,37	Barima-Waini	Guiana
ROM 100919	-60,48	7,37	Barima-Waini	Guiana
ROM 100983	-60,48	7,37	Barima-Waini	Guiana
ROM 101002	-60,53	7,38	Barima-Waini	Guiana
ROM 101029	-60,48	7,37	Barima-Waini	Guiana
ROM 103212	-59,05	4,1	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 103359	-58,7	5,15	Upper Demerara-Berbice	Guiana
ROM 103423	-58,7	5,15	Upper Demerara-Berbice	Guiana
ROM 103474	-58,7	5,15	Upper Demerara-Berbice	Guiana
ROM 103495	-58,7	5,15	Upper Demerara-Berbice	Guiana
ROM 104008	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 104082	-76,35	-0,82	Napo	Equador
ROM 104214	-79,75	9,15	Canal Zone	Panamá
ROM 104399	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 104400	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 104401	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 104402	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 104418	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 104427	-76,43	-0,68	Napo	Equador
ROM 104679	-58,78	4,47	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 104720	-58,78	4,47	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 104721	-58,78	4,47	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 104735	-58,78	4,47	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 104799	-58,78	4,58	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 104823	-58,78	4,58	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 105187	-76,43	-0,67	Napo	Equador
ROM 105273	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 105274	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 105298	-76,43	-0,78	Napo	Equador
ROM 105338	-76,4	-0,67	Napo	Equador
ROM 105639	-76,43	-0,68	Napo	Equador
ROM 105697	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 105915	-76,45	-0,65	Napo	Equador
ROM 105955	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM 106037	-76,4	-0,67	Napo	Equador
ROM 106050	-76,4	-0,67	Napo	Equador
ROM 106110	-76,4	-0,8	Napo	Equador

ROM 106321	-76,43	-0,68	Napo	Equador
ROM 106595	-58,83	1,53	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 106596	-58,77	1,37	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 106597	-58,77	1,37	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 106654	-58,77	1,37	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 106674	-58,83	1,53	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 106675	-58,83	1,53	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 106694	-58,83	1,53	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 106695	-58,83	1,53	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 106700	-58,83	1,53	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 107057	-59,02	4,75	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 107282	-58,85	4,73	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 107283	-58,85	4,73	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 107843	-67,42	6,05	Amazonas	Venezuela
ROM 107908	-66,12	6,43	Bolivar	Venezuela
ROM 107926	-65,87	7,57	Bolivar	Venezuela
ROM 107935	-64,98	7,17	Bolivar	Venezuela
ROM 107945	-66,47	9,4	Guarico	Venezuela
ROM 107957	-66,47	9,4	Guarico	Venezuela
ROM 108133	-61,1	5,8	Cuyuni-Mazaruni	Guiana
ROM 108448	-58,85	4,37	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 108492	-58,82	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 108510	-58,82	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 108538	-58,82	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 108676	-58,82	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 108894	-58,8	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 108928	-58,72	4,73	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 108929	-58,72	4,73	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 109168	-59,08	4,53	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 109299	-59,02	4,75	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 111734	-58,92	4,38	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 111800	-58,92	4,38	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 111837	-58,92	4,38	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 111850	-58,77	4,45	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 111864	-58,77	4,45	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 111944	-58,77	4,45	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 112016	-58,68	4,67	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 113457	-58,78	3,27	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 113475	-58,78	3,27	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 113488	-58,78	3,27	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 113489	-58,78	3,27	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 113497	-58,78	3,27	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 113498	-58,78	3,27	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana

ROM 113499	-58,78	3,27	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 113514	-58,82	3,18	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 113533	-58,82	3,18	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 113562	-58,82	3,18	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 113888	-55,18	4,95	Brokopondo	Suriname
ROM 113889	-55,183	4,95	Brokopondo	Suriname
ROM 113890	-55,18	4,95	Brokopondo	Suriname
ROM 113931	-55,18	4,95	Brokopondo	Suriname
ROM 114002	-55,18	4,95	Brokopondo	Suriname
ROM 114033	-55,2	4,933	Brokopondo	Suriname
ROM 114052	-55,18	4,95	Brokopondo	Suriname
ROM 114690	-59,95	5,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 114691	-59,95	5,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 114752	-59,95	5,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 114753	-59,95	5,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 114790	-59,97	5,38	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 114791	-59,97	5,38	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 115065	-60,77	5,33	Cuyuni-Mazaruni	Guiana
ROM 115071	-60,77	5,33	Cuyuni-Mazaruni	Guiana
ROM 115072	-60,77	5,33	Cuyuni-Mazaruni	Guiana
ROM 115073	-60,77	5,33	Cuyuni-Mazaruni	Guiana
ROM 115494	-58,58	6,48	Essequibo Islands-West Demerara	Guiana
ROM 115495	-58,59	6,48	Essequibo Islands-West Demerara	Guiana
ROM 115535	-58,58	6,48	Essequibo Islands-West Demerara	Guiana
ROM 115638	-58,58	6,48	Essequibo Islands-West Demerara	Guiana
ROM 115639	-58,58	6,48	Essequibo Islands-West Demerara	Guiana
ROM 115766	-59,82	5,13	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 115767	-59,82	5,19	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 115914	-59,87	5,07	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 116599	-59,61	5,25	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 116710	-59,58	5,31	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 116726	-59,58	5,31	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 116864	-57,04	4,48	Sipaliwini	Suriname
ROM 116900	-57,04	4,48	Sipaliwini	Suriname
ROM 117056	-56,9	4,53	Sipaliwini	Suriname
ROM 117201	-57,18	4,66	Sipaliwini	Suriname
ROM 117523	-56,91	4,47	Sipaliwini	Suriname
ROM 117649	-56,99	4,81	Sipaliwini	Suriname
ROM 118765	-76,4	-0,82	Orellana	Equador
ROM 118973	-58,23	3,51	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 118974	-58,23	3,51	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 118975	-58,23	3,51	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 118991	-58,23	3,51	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana

ROM 119002	-58,23	3,51	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119003	-58,23	3,51	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119004	-58,23	3,51	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119030	-59,53	2,82	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119032	-59,53	2,82	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119087	-59,53	2,83	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119088	-59,53	2,82	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119173	-59,44	2,28	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119235	-59,44	2,28	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119253	-59,44	2,28	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119254	-59,44	2,28	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119255	-59,44	2,28	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119283	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119308	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119309	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119310	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119311	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119312	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119336	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119370	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119371	-59,48	2,49	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 119777	-58,909	4,25	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 120598	-56,788	2,1753	Kutari River	Suriname
ROM 97927	-59,3	3,75	Upper Takutu-Upper Essequibo	Guiana
ROM 97988	-58,85	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 98008	-58,85	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 98020	-58,87	4,38	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 98062	-58,85	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 98063	-58,85	4,33	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM 98701	-58,95	7,65	Barima-Waini	Guiana
ROM 99493	-90,82	17,6	Peten	Guatemala
ROM 99527	-90,82	17,6	Peten	Guatemala
ROM F37097	-76,4	-0,8	Napo	Equador
ROM F37663	-76,4	0,67	Napo	Equador
ROM F39297	-58,85	4,73	Potaro-Siparuni	Guiana
ROM MAM 120340	-56,092	1,994	Sipaliwini	Suriname
RZ 42	-65,000	1,000	Barcelos, Amazonas.	Brasil
SM 17	-47,926	-24,388	Sete Barras, São Paulo	Brasil
TK 15189	-52,9213	5,270	Paracou	Guiana Francesa
TK18829	-52,900	5,383	Paracou	Francesa
TK19132	-63,688	6,317	Bolivar	Venezuela

TV 10	-40,756	-20,634	Alfredo Chaves, Espírito Santo	Brasil
TV 121	-40,536	-19,970	Santa Teresa, Espírito Santo	Brasil
VP 126	-40,021	-19,031	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
VP 192	-40,443	-19,719	João Neiva, Espírito Santo	Brasil
VP 193	-40,444	-19,720	João Neiva, Espírito Santo	Brasil
VP 207	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
VP 222	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
VP 274	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
VP 275	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
VP 371	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
VP 448	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
VP 449	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
VP 68	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
YL 670	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
YL 671	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
YL 672	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
YL 673	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
YL 748	-40,020	-19,030	Sooretama, Espírito Santo	Brasil
