Felipe de Mello Martins

Filogeografia intraespecífica do morcego
hematófago *Desmodus rotundus* (Chiroptera,
Phyllostomidade).

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador: João Stenghel Morgante

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Martins, Felipe de Mello
Filogeografia intraespecífica do
morcego hematófago *Desmodus*
rotundus(Chiroptera, Phyllostomidade)
Número de páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Morcego-hematófago 2.
Filogeografia I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Biologia - Genética.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Agradecimentos

Como fui muito econômico nos agradecimentos no meu mestrado, resolvi dar nome a todo mundo.

Agradeço a FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

Agradeço a minha família, minha mãe, meu irmão, meu pai e a minha madrastra que, apesar de não entenderem nada do que eu faço, sempre me incentivaram.

Agradeço ao João, por todos esses anos de orientação e de realizações mas, acima de tudo, por ter sido um paizão pra mim. Agradeço a todos do laboratório pela ajuda: Nádia, Ana (por toda a ajuda na bancada), Caroline, Larissa, Gisele, Bia, Ramalho, Latino, Márcia e a Ju por ser uma amigona e uma santa de ter revisado o texto pra mim. Agradeço a Dra. Daniela Milstein pela revisão final do texto. Agradeço ao Gustavo pelas discussões e pela ajuda, e ao Diogo por ter me dado a oportunidade de aprender pacas com ele. Ao Professor Fernando Marques por fazer o impossível parecer baba na reta final. A Ana Martins, Burton Lim, Rodrigo Redondo e a todos nos pesquisadores que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho através de amostras de tecido.

Agradeço a Luciana Lobo pelas ilustrações, ao Juarez Silva pela foto da capa e a Paulo Noffs por toda a parte de figuras do trabalho, incluindo a capa.

A todas as instituições zoológicas no Brasil que abriram as portas para mim: ao Prof. Mario de Vivo e Juliana Gualda do MZUSP; a Eliane Vicente na UNIDERP; Susi Pacheco na PUCRS e a Eliana Versute na UNESPSJRP. Agradeço aos meus amigos Mercedes e Mark por toda a ajuda com a parte de crânios e medidas e, claro, por sua amizade ao longo de todo esse tempo. Agradeço ao Alex pela cola de prata, por me fazer rir e porque me fez prometer por o nome dele aqui.

Agradeço aos meus amigos de 500 anos que me deram aquela força quando eu precisei: Celinho, Fifi, Wolvie, Caverna, Feião e Tuk, meus amigos de verdade.

I would like to thank Alan Templeton for giving me the opportunity to work in his lab and spend time with one of the most brilliant man I've ever met. I would like to thank the WashU people: Donna Harmon for taking care of all the paperwork and for playing mom; Jen Neulwald for receiving me, Steve Woolley for all the help and talks, Rene Wang, and Taylor Maxwell for the analyses. Genevieve Croft and her sister Jen for helping me out in DC and, off course, Shih-Chung for the friendship and fun.

I would like to thank the institutions and the collection staff that allowed me to work with their material. I would like to thank Eileen Lacey, Rob Voss, Nancy Simmons and Nancy Lynn at the AMNH; Linda Gordon and Don Wilson at the Smithsonian; and Jim Dines at the LACMNH.

Aproveito e agradeço a todos os brazucas (ou quase) que me ajudaram nos EUA. Em STL ao Beto por ter me recebido, Armando, Elo, Guilherme, Marcola e em especial ao Paulo, por ter segurado minha barra e ter sido um amigo de verdade, agora pra vida toda. Em NY, o Eugene e ao Wilson Silva Júnior por me receberem, e ao Sal pela amizade; à Monik e ao Daniel em DC por me abrirem as portas de casa, e ao Carlos pela companhia e diversão, e à Ana, Renata e Jordan em LA por terem me ajudado.

I would like to give a very special thanks for the Kovčić family for all the love, support and for being my family away from home: Deanna, Marijo, Bill and most of all Dada. For being there for me.

São Paulo, Junho de 2008.

Sumário

Resumo	03
Abstract	05
1. Introdução	07
1.1 Objeto de estudo	08
1.2 Definindo espécie	14
1.3 Filogeografia e marcadores moleculares	18
1.4 Especiação nos trópicos e biogeografia	22
1.5 O coalescente	24
1.6 O complexo DRB	25
1.7 Objetivos	26
2. Material e Métodos	27
2.1 Coleta, extração de DNA e sequenciamento	28
2.2 Determinação do genótipo de seqüências nucleares	30
2.3 Detecção de eventos de recombinação	31
2.4 Amplificação dos loci de microssatélites	31
2.5 Análises filogenéticas	33
2.6 Análise de clados agrupados (NCA)	34
2.7 Análises de genética de populações e coalescentes	35
2.8 Simulações coalescentes	36
2.9 Análises morfológicas	39
2.9.1 Teste de hipóteses biogeográficas alternativas	44
2.10 Análise conjunta de morfologia e dados moleculares	45
2.11 Estudo de morfologia de pêlos	46
3. Resultados e Discussão	48
3.1 Marcador mitocondrial	49
3.2 Gene RAG2	64
3.3 Gene DRB-1	66
3.4 Marcadores microssatélites	69
3.5 Outros marcadores testados	69
3.6 Simulações coalescentes	71
3.7 Análises morfológicas	73

3.8 Análise integrada da morfologia e marcador molecular	82
3.9 Estudo da morfologia de pêlos	84
4. Conclusões	87
Bibliografia	90
Anexos	104
1. Número de campo, localidade e coordenadas geográficas de todos os indivíduos amostrados para sequenciamento neste trabalho	105
2. Número, localidade e coordenadas de todos os espécimes medidos para este trabalho	110

RESUMO

O morcego *Desmodus rotundus* é uma das três espécies de morcegos hematófagos existentes. Possui ampla distribuição, ocorrendo do sul do México até Argentina e Chile. Além de seu hábito alimentar incomum, esta espécie possui particular interesse por ser transmissor da raiva bovina. Apesar dos métodos de controle da população, estudos estimaram em até 33 milhões de dólares ao ano os prejuízos causados por esta espécie à pecuária no Brasil. Ao mesmo tempo, segundo dados oficiais, cerca de 200.000 indivíduos da espécie podem ter sido mortos no Estado de São Paulo no ano de 2000 através dos métodos de controle populacional. Além deste controle não surtir o efeito desejado (o número de casos de raiva não diminuiu no período), não se conhece qual o efeito desta matança nas populações naturais do morcego. Apesar de sua ampla distribuição e reconhecida variação morfológica, nenhum estudo foi realizado para procurar entender como a variabilidade genética desta espécie está distribuída geograficamente.

Este estudo se propôs a estudar a filogeografia do morcego vampiro comum analisando um marcador mitocondrial, dois marcadores nucleares e morfometria de crânio. O marcador mitocondrial identificou cinco clados monofiléticos sem haplotipos compartilhados nem zonas de contato, cada um representando uma região geográfica diferente. São eles: Mata Atlântica sul (MAS), Mata Atlântica norte (MAN), Amazônia e Cerrado (AMC), América Central (AC) e Pantanal (PAN), sendo que os clados da Mata Atlântica formam um clado monofilético a Leste, se contrapondo aos demais clados a Oeste. Os índices de divergência entre estes clados são comparáveis a distâncias descritas para espécies congêneras. Os tempos de divergência estimados entre os clados através de métodos coalescentes e não-coalescentes apontam para uma divergência pleistocênica, além de testes de neutralidade apoiarem a idéia de fragmentação por refúgios. O padrão biogeográfico descrito para *D. rotundus* possui um paralelo em uma série de outros organismos.

Os marcadores nucleares por sua vez mostraram baixa variabilidade, e extenso compartilhamento de haplótipos entre as localidades pertencentes a distintos clados mitocondriais, num padrão que contrasta com os resultados descritos anteriormente. Simulações coalescentes foram realizadas com os parâmetros calculados para o gene

nuclear RAG2 e mostraram compatibilidade entre os dados observados e vicariância pleistocênica para um marcador nuclear com o N_e calculados para *D. rotundus*.

Os dados de morfometria de crânio mostraram que existe pouca diferenciação ao longo de toda a distribuição da espécie. Dados de F_{st} , funções discriminantes e variáveis canônicas mostram uma grande afinidade entre indivíduos dos clados AC e AMC, que juntos formam a distribuição de uma antiga subespécie atribuída a este táxon, *Desmodus rotundus murinus*. As análises de distância de Mahalanobis também são concordantes com os resultados obtido para o marcador mitocondrial. Por fim, uma análise realizada com o software treescan mostra existir uma correlação estatisticamente significativa entre a árvore de DNA mitocondrial e os dados multivariados de crânio. Assim, por fim propõe-se que se reconheçam duas linhagens hoje atribuídas a *D. rotundus* como espécies distintas: uma a Leste (Mata Atlântica) e uma a Oeste. Uma amostragem mais cuidadosa do interior do Brasil e do restante da América do Sul deve determinar corretamente a área de ocorrência de cada espécie.

Abstract

The bat *Desmodus rotundus* is one of the three extant vampire bat species. It has a broad distribution, occurring from southern México until Argentina and Chile. Besides its unique feeding habit, this species is of particular interest for being the main vector of cattle rabies. Even with population control methods, studies have estimated in 33 million dollars per year the damage caused by this bat to cattle farming in Brazil. At the same time 200.000 specimens might have been killed in São Paulo state in the year 2000 using the population control methods. Besides the fact that this control did not diminish the number of rabies cases, the impact of this killing in the bats' natural populations is unknown. Although this species has a broad distribution and recognized morphological variation, no effort was made thus far to understand how this species' genetic variability is distributed geographically.

This work is aimed at studying the common vampire bats' phylogeographic pattern using a mitochondrial marker, two nuclear markers and skull morphometrics. The mitochondrial marker identified five monophyletic clades without shared haplotypes or contact zones. Each clade represents a distinct geographic region: South Atlantic Forest (SAF), North Atlantic Forest (NAF), Amazon and Cerrado (AMC), Central America (CA) and Pantanal (PAN). The Atlantic Forest clades form an Eastern monophyletic clade opposing the other clade that lies westwards. The nucleotide divergence between these clades is similar to the one described to congeneric species. The divergence times estimated by coalescent and non-coalescent methods point to a Pleistocene vicariant event. The neutrality tests also point to refugia allopatric fragmentation. The biogeographic pattern described for *D. rotundus* has a parallel in many other organisms.

The nuclear markers showed low variability and sharing of haplotypes among all localities, contrasting with the previous results. Coalescent simulations were carried with populational parameters estimated for the nuclear gene RAG2 and showed compatibility between the observed data and Pleistocene vicariance effect on a neutral nuclear marker. Skull morphometrics showed low differentiation throughout the bats' distribution. Data on Fst, discriminant functions and canonic variables shows affinity between CA and AMC clades. These two clades together form the distribution of a subspecies previously described to this taxon, *Desmodus rotundus murinus*. The Mahalanobis distance analyses are also congruent with the results obtained with the nuclear marker. The analysis done

with the software treescan shows a statistic significant correlation between the mtDNA tree and the skull multivariate data. On the basis of the results presented, it is proposed that two lineages currently attributed to *D. rotundus* are to be recognized as different species: one to the east (Atlantic Forest) and one to the west. A detailed sampling of the Brazilian and South American country will determine the exact range of each species.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBJETO DE ESTUDO

A espécie *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae; Desmodontinae) é o morcego hematófago mais comum e que possui distribuição mais ampla, ocorrendo desde o norte do México até o Chile central no oeste e toda a extensão do litoral uruguaio no leste, incluindo a bacia amazônica, o Paraguai e o norte da Argentina (Koopman 1988; Emmons 1990 – Figura 1.1). Embora existam espécies fósseis deste gênero, no presente ele é monotípico, assim como os outros gêneros pertencentes a esta subfamília que agrega as espécies de morcegos hematófagos (as outras são *Dyphilla ecaudata* e *Diaemus youngi*). Como todos os membros desta subfamília, *D. rotundus* não possui cauda e apresenta redução da folha nasal e da dentição, com incisivos e caninos extremamente afiados (Greenhall 1988). Sua pelagem é marrom escura, sua envergadura é de cerca de 35 cm e seu peso varia entre 25 e 40 gramas (Greenhall *et al.* 1983). Sua morfologia varia, mas não o suficiente para delimitar subespécies (Koopman 1988). Esta espécie não tolera climas frios, não ocorrendo em locais que possuam temperatura média inferior a 10 °C no mês mais frio do ano (Greenhall *et al.* 1983).

D. rotundus é um animal notívago que se abriga em refúgios escuros e úmidos (Taddei 1983). Suas colônias geralmente possuem de 10 a 100 morcegos (Wimsatt 1978); entretanto, já foram registradas aglomerações com até 2000 indivíduos (Wilkinson 1988). As colônias parecem permanecer estáveis em sua composição por longos períodos e seus indivíduos são capazes de se reconhecer (Schmidt 1978).

Como é comum em mamíferos gregários, *D. rotundus* apresenta estrutura social caracterizada por hierarquia de dominância, baseada na formação de um harém, onde um macho dominante toma conta de um grupo de fêmeas. O macho dominante localiza-se no alto do abrigo, rodeado pelas fêmeas, e os outros machos ficam em localizações periféricas na colônia. O macho dominante não só possui maior acesso às fêmeas como também se alimenta em localidades mais próximas do abrigo (Wilkinson 1988). Os machos não se relacionam, a não ser quando um invade o território do outro ou quando há disputa por uma fêmea – nessas ocasiões, brigas barulhentas e violentas acontecem.

Figura 1.1: distribuição da espécie *D. rotundus*.

As fêmeas e filhotes, por sua vez, apresentam várias interações sociais complexas. As fêmeas formam grupos de indivíduos não aparentados que se mantêm estáveis por longos períodos de tempo. Wilkinson (1984, 1985), através de um estudo utilizando sete enzimas do sangue e de deduções feitas a partir da ancestralidade dos indivíduos, estimou que o grau de parentesco entre fêmeas adultas é muito baixo. Dentro desses grupos existem interações como o hábito de *grooming* e regurgitação. As fêmeas bem alimentadas podem regurgitar sangue para outras fêmeas e filhotes pertencentes ao mesmo grupo, aumentando as chances de sobrevivência desses indivíduos (Wilkinson 1986). Além do cuidado comum com a prole, filhotes órfãos podem ser adotados por outras fêmeas pertencentes ao grupo.

A literatura com relação à fidelidade ao abrigo destes morcegos é confusa: não se sabe ao certo como se formam novas colônias. Wilkinson (1984, 1985) afirma que grupos de fêmeas vivem e forrageiam juntas durante anos na mesma localidade. Por outro lado o mesmo autor afirma que apesar de todas as fêmeas que observou permanecerem no grupo onde nasceram após atingirem a idade adulta, há dispersão de fêmeas: em média,

uma fêmea não-aparentada une-se a um grupo distinto daquele em que nasceu a cada dois anos.

Os machos, por sua vez, possuem um padrão de dispersão muito mais evidente; todos os machos juvenis entre 12 e 18 meses de idade deixam o abrigo onde nasceram – expulsos pelos machos residentes ou não – e procuram um novo abrigo sempre a uma distância mínima de 3 km de onde nasceram (Wilkinson 1985). Da mesma forma, os machos periféricos percorrem grandes distâncias para alimentar-se, sobrepondo sua área de forrageamento com as de outras colônias e nunca compartilhando território com outros machos da mesma colônia (não há sobreposição de território entre fêmeas de diferentes abrigos). Wilkinson (1988) acredita que esse comportamento dos machos periféricos reflete uma busca por fêmeas disponíveis em outros abrigos enquanto o macho residente foi se alimentar, ou por um abrigo onde tenha maior chance de copular.

Não há uma época específica para a reprodução, uma vez que a alimentação irrestrita é possível durante o ano inteiro (Schmidt 1988). As fêmeas dão à luz a apenas um filhote, com um período de gestação de sete meses (Schmidt 1988). O filhote possui uma longa dependência de leite: alimenta-se exclusivamente deste até os dois meses de idade, e a partir dos quatro meses acompanha a mãe em suas caçadas – porém o desmame só ocorre aos 10 meses, uma dependência excepcionalmente longa quando comparado a outros morcegos (Schmidt 1988). Sua longevidade também é excepcionalmente longa – na natureza, podem viver até 18 anos; em cativeiro, até mais que isso. A maturidade sexual é atingida antes do primeiro ano de vida (Wilkinson 1985; Schmidt 1978).

Segundo Greenhall (1970), *D. rotundus* alimenta-se preferencialmente do sangue de bovinos, seguido por cavalos, mulas, jumentos, cabras, porcos, aves domésticas, ovelhas, cães e humanos, nesta ordem, e tem se tornado comum em ambientes rurais (Uieda 1995). Poucos estudos têm sido realizados acerca da alimentação de *Desmodus* em áreas não ocupadas pelo homem. Crespo (1982) acredita que deva alimentar-se predominantemente de mamíferos de médio porte – dentre estes destacando-se a capivara (Ibañez 1986 *apud* Greenhall 1988). Em cativeiro, este morcego pode alimentar-se de mamíferos, aves, répteis e anfíbios silvestres (Schmidt & Greenhall 1972).

Há também casos de alimentação aberrante. Greenhall (1972) coletou alguns espécimes que continham insetos e carne em seus estômagos; Trajano (1984) encontrou sementes de Piperaceae nas fezes de alguns exemplares.

Ao alimentar-se, este morcego prefere as extremidades como orelhas, pescoço, região anal, vulva, mamilos e outros. A presa é perfurada com os incisivos superiores, e cerca de 20 ml de sangue são lambidos, equivalentes a uma colher de chá e à metade de seu peso. Como sua saliva contém anticoagulantes, a ferida pode sangrar consideravelmente (Cartwright 1974). Os dentes de *D. rotundus* não possuem esmalte, de forma que a fricção entre eles os mantém sempre afiados – este processo é chamado tegose (Greenhall 1988). Seu estômago possui um ceco extremamente alongado, que permite ao animal estocar uma considerável quantidade de sangue. Por ter uma alimentação muito rica em compostos nitrogenados, este morcego possui rins especializados para excretar grandes quantidades de uréia mesmo na presença de pouca água (McFarland & Wimsatt 1969).

D. rotundus, por alimentar-se de presas muito maiores que si próprio, corre riscos consideráveis ao forragear, uma vez que pode ser facilmente morto com um coice ou uma mordida. Estudos feitos com esta espécie demonstraram que seu sistema visual, cerebelo e neocórtex são mais desenvolvidos do que em outros morcegos, sugerindo que tenha uma boa capacidade de integrar informações em seu sistema nervoso central (Suthers 1970), o que provavelmente contribui para que esta espécie seja tão bem-sucedida. Além disso, *D. rotundus* possui uma capacidade incomum de se locomover quadrupedalmente no solo, quando comparado a outros morcegos, além de ser capaz de alçar vôo do chão, o que lhe permite uma aproximação e uma fuga muito ágeis (Greenhall *et al.* 1983).

Este morcego possui um cariótipo com um número diplóide ($2n$) de 28 cromossomos e um número fundamental (número de braços presentes no cariótipo autossômico) de 52. Tal cariótipo é considerado derivado dentro da família e até mesmo da subfamília (o cariótipo que se aproximaria mais do considerado primitivo é o de *Diaemus youngi*; com $2n = 32$; Baker *et al.* 1988).

Sabe-se através do registro fóssil que o gênero *Desmodus* possuía outras espécies - notadamente *D. stocki* e o gigante *D. draculae* - que se tornaram extintas no final do período Pleistocênico (Ray *et al.* 1988). Como tal período é concomitante à extinção da megafauna americana, muitos acreditam que a extinção destes grandes animais tenha reduzido drasticamente as possíveis presas destes morcegos. Tal fator, aliado a flutuações climáticas, poderia ter levado à extinção de espécies deste gênero e a um gargalo populacional em *D. rotundus*. No caso deste último, é possível que tenha experimentado uma nova explosão demográfica devido à introdução da pecuária no continente, a partir do século XVII.

Poucas revisões taxonômicas foram propostas não só para esta espécie, como para a subfamília como um todo. Desde sua primeira descrição (Geoffroy 1810), esta espécie possuiu outras sete descrições, que passaram a ser tratadas como sinônimos por Cabrera (1958). Duas subespécies foram reconhecidas para este táxon por Osgood (1912): *D. r. rotundus*, ocorrendo do norte da cadeia Andina e sul da Amazônia até o limite sul da distribuição da espécie, sendo o espécime-tipo de assunção, no Paraguai; e *D. r. murinus*, cuja distribuição segundo este autor ocorre do México até a bacia Amazônica, incluindo toda a América Central. Mais recentemente, Koopman (1988) realizou uma nova revisão e apesar de reconhecer a existência de variação individual nos espécimes provenientes de localidades distintas, não reconhece nenhuma subespécie para este táxon.

Morcegos hematófagos e não-hematófagos são o segundo maior transmissor de raiva para humanos no Brasil (Uieda 1993). Conseqüentemente este animal é tema constante em discussões relacionadas à saúde pública. Além de atacar animais domésticos em zonas rurais, tem se tornado freqüente também em grandes centros urbanos como São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte (Uieda 1995), atacando não só animais como humanos. Alguns pesquisadores atribuem este fato ao controle praticado extensivamente nas zonas rurais, que consiste na aplicação de um anticoagulante tópico em espécimes capturados. Como as fêmeas possuem o hábito de *grooming* entre si, é possível que este método esteja matando mais fêmeas que machos, os quais estariam migrando em busca de grupos de fêmeas disponíveis, alcançando os centros urbanos. Assim, o controle praticado estaria diminuindo a população de morcegos, porém também contribuindo para que a raiva bovina se espalhasse mais intensamente através das migrações dos machos (Novaes Gomes 2001).

Os prejuízos causados pela raiva bovina transmitida por *D. rotundus* são notáveis. Dois diferentes estudos durante a década de 60 estimaram as perdas devido à raiva bovina em meio milhão de cabeças de gado, totalizando um prejuízo de 50 milhões de dólares (Acha & Málaga-Alba 1988). Um estudo mais recente calculou que cerca de 100.000 cabeças de gado morrem desta forma a cada ano na América Latina, com um prejuízo de 30 milhões de dólares. Porém, segundo os próprios autores, o número estaria subestimado em até 80% devido ao fato da maior parte dos países da América Latina não possuírem a infra-estrutura necessária para que os casos sejam devidamente reportados e diagnosticados (Acha & Arambulo 1985). É verdade que a vacinação do gado, a partir dos anos 50, e o controle químico, a partir dos anos 70, supostamente contribuíram para

o controle da raiva bovina, especialmente no Brasil. Mesmo assim, as perdas econômicas causadas por esta enfermidade no Brasil estimadas para os anos de 1983 e 1984 foram da ordem de 33 e 30 milhões de dólares, respectivamente (Acha & Málaga-Alba 1988). Dados da Coordenadoria Estadual de Defesa Agropecuária de São Paulo apontaram que até 2500 reses podem ter morrido devido à raiva no ano de 1998 no Vale do Paraíba (Novaes Gomes 2001).

Atualmente pratica-se de forma extensiva um controle químico das populações deste animal. Dados da Coordenadoria Estadual de Defesa Agropecuária de São Paulo apontam que no ano de 2000, 10.036 espécimes foram capturados e tratados desta forma neste estado. Segundo Linhart *et al.* (1972), para cada animal em que se aplica o produto, cerca de outros 20, em média, morrem devido aos hábitos que esta espécie tem, como o *grooming* e o fato de se limparem lambendo-se constantemente. Isso implica que talvez mais de 200.000 *D. rotundus* tenham morrido no ano de 2000. Mesmo assim, segundo fonte oficial, os números da raiva não diminuíram. Ao mesmo tempo, nenhum estudo foi realizado acerca do impacto deste controle nas populações da espécie, assim como um estudo que procurasse entender sua diversidade regional, uma vez que este animal possui uma reconhecida variação morfológica ao longo de sua distribuição (Greenhall *et al.* 1983; Koopman 1988).

Estudos prévios que buscaram analisar a variabilidade intraespecífica do morcego vampiro comum apontaram para diferentes direções. Baker *et al.* (1988) analisaram 22 loci de isozimas em morcegos da América Central e encontraram baixos níveis de divergência entre colônias e entre indivíduos pertencentes a mesma colônia. Mais tarde, Ditchfield (2000) realizou um estudo preliminar com amostragem de sete indivíduos na floresta Atlântica e encontrou haplótipos altamente divergentes (*circa* 4%) para o marcador mitocondrial citocromo *b* em localidades relativamente próximas, apontando para possível heterogeneidade na distribuição espacial de linhagens para esta espécie. Ambos estudos, porém, possuíam um caráter muito restrito devido à sua amostragem em número de localidades e de indivíduos.

1.2 DEFININDO ESPÉCIE

Provavelmente nenhuma questão no campo da biologia evolutiva e da sistemática tenha consumido mais tempo e mais esforços que a discussão acerca da definição e do conceito de espécie. Tal ocorrência é justificada pelo fato de que as espécies são vistas como a entidade essencial do processo evolutivo (Wiley 1978). Além disso, o conceito de espécie que um determinado pesquisador utiliza influencia diretamente suas idéias sobre evolução e processos como adaptação e especiação, bem como a forma como enxerga dados empíricos observados (Eldredge & Gould 1972). No caso aqui apresentado, a definição de qual o conceito de espécie a ser utilizado e os critérios utilizados para aplicá-lo são fundamentais para um trabalho que se propõe a investigar a possibilidade de um determinado táxon ser formado por mais de uma espécie. Nesta seção introdutória será feita uma breve revisão comentada de conceitos de espécie existentes na literatura bem como a determinação de um conceito de espécies adequado para este trabalho. Esta seção não tem intenção de fazer uma revisão de todos os conceitos de espécie já elaborados, mas sim citar e comentar aqueles mais adequados dentro do contexto a que se propõe este trabalho.

De acordo com Hull (1997), um conceito de espécie adequado deve ser geral, aplicável e consistente teoricamente. Todos os conceitos de espécie brevemente descritos abaixo serão analisados de acordo com esses preceitos.

O conceito mais antigo e que permanece até hoje é o conceito tipológico ou morfológico. De acordo com essa definição, as diferenças morfológicas entre as espécies são definidas claramente e não sofrem mudanças com o tempo (Wang 1999). Tal definição remonta aos primeiros esforços de nomenclatura e classificação de Linnaeus. Embora algumas disciplinas, notadamente a paleontologia, não possuam outras formas de delimitar espécies, essa definição tem severas limitações nos quesitos identificação de espécies crípticas e até mesmo no tratamento a polimorfismos morfológicos intraespecíficos. É lugar comum entre não-zoólogos dizer que “qualquer n maior que um se torna um pesadelo para morfologistas”.

O conceito mais citado e utilizado em estudos evolutivos no último século é o conceito biológico de espécie, também chamado de conceito de isolamento de espécies (de Queiroz 1998). Este conceito postula que “espécies são grupos de populações naturais potencialmente inter cruzantes que por sua vez são reprodutivamente isoladas de outros grupos de mesmas características” (Mayr 1942). Esta definição está associada à

síntese neodarwinista e se transformou na definição com maior penetração na literatura sobre evolução. Um dos grandes méritos deste conceito é o de ser testável em condições controladas (Sites & Crandall 1997). Este conceito possui muitas críticas, que vão desde suas dificuldades em lidar com hibridação – que pode ser incomum em animais, mas muito comum em plantas - até sua não aplicabilidade a organismos assexuados ou extintos. Além disso, outras críticas baseiam-se no tratamento que este conceito dá a populações alopátricas, o fato de utilizar morfologia para inferir fluxo gênico, a não permutabilidade entre resultados de laboratório e naturais (Rice & Hostert 1993) o fato deste conceito ser estático no tempo.

Outro conceito de espécie comumente invocado na literatura é o conceito filogenético de espécies. Embora de Queiroz (1998) identifique quatro definições diferentes para este conceito, todas elas giram em torno do mesmo tema: espécie é um grupo de organismos, ou um clado, ou uma linhagem com um ancestral comum, i.e. monofilético (Baum & Shaw 1995). Nas palavras de Cracraft (1983) “espécies são o menor grupo diagnosticável de indivíduos dentre os quais há um padrão de ancestralidade e descendência”. Este conceito possui dois problemas óbvios: o primeiro deriva do fato que o evento de especiação em si pode transformar uma espécie monofilética em parafilética, de acordo com os marcadores utilizados; além disso, a partir da utilização de dados moleculares, há o problema de elevar todo e qualquer clado monofilético encontrado ao nível de espécie, e as tentativas por parte dos defensores deste conceito de distinguir linhagens intraespecíficas de espécies acabou por criar uma tautologia (Wang 1999). É também sabido que genes envolvidos na especiação – por seleção derivada de acasalamento preferencial – devem desenvolver monofilia recíproca antes de autossomos comuns (Hey 2006) – como exemplificado no complexo *Drosophila persimilis/pseudoobscura* (Wang *et al.* 1997).

Uma definição que ganhou destaque recentemente foi o conceito genético de espécie (Baker & Bradley 2006). Os autores definem este conceito como um grupo de populações naturais intercruzantes que são geneticamente isolados de outros grupos. A ênfase em isolamento genético ao invés de reprodutivo é o que distingue este conceito do biológico, de acordo com estes autores. Este conceito foi originalmente formulado por Dobzhansky (1950) e pressupõe o modelo Bateson-Dobzhansky-Muller de especiação, onde populações ou linhagens em isolamento começam a divergir geneticamente até o ponto onde deixam de ser compatíveis geneticamente, sem necessariamente possuírem morfologias distintas. De acordo com Bradley & Baker (2001), a principal crítica a essa

definição seria determinar qual a quantidade de divergência necessária para distinguir duas espécies. Os autores então propõem um modelo onde quantificam as diferenças encontradas entre espécies congêneras, irmãs, subespécies e níveis observados de divergência intraespecífica para um marcador neutro padrão (no caso, DNA mitocondrial). Baseando-se nestas observações empíricas, os autores propõem classes de divergência nucleotídicas para identificação de espécies: se as linhagens possuem de 0 a 5% de divergência, são da mesma espécie, de 5 a 10% podem ou não ser espécies diferentes e acima de 10% certamente são espécies diferentes, possivelmente espécies crípticas. Tal abordagem é evidentemente fenética não sendo, portanto, consistente teoricamente e ignora a complexidade do processo de especiação.

Um dos conceitos de espécie que se propõe a preencher os critérios delineados por Hull é o conceito de coesão de espécies (Templeton 1989). Uma espécie “coesa” é definida como uma linhagem evolutiva ou um conjunto de linhagens que se mantêm coesas por permutabilidade genética (sua habilidade de trocar genes através da reprodução) e ecológica (i.e. equivalência de atributos ecológicos e demográficos – Templeton 2001). A primeira etapa para constatar se os organismos em questão representam diferentes espécies sob a ótica do conceito de coesão é saber se pertencem a uma mesma linhagem. Isto pode ser feito através de árvores construídas com dados de seqüências de DNA. Porém, ao contrário de um conceito filogenético de espécies estrito (Baum & Shaw 1995) o conceito de coesão de espécies contempla hibridização e ausência de monofilia recíproca de clados, sendo assim mais abrangente que outros conceitos.

A segunda etapa consiste em: dada mais de uma linhagem, avaliar se estas possuem permutabilidade genética e/ou ecológica. Tais dados devem ser analisados à luz dos resultados obtidos na etapa anterior. Falha em rejeitar esta hipótese nula pode ser devido ao fato de as linhagens serem de fato pertencentes a uma mesma espécie ou há uma falta de dados reprodutivos e ecológicos adequados para realizar esta etapa. Isto torna o conceito de coesão de espécies uma série de hipóteses testáveis, apesar de alguns dados dificilmente estarem disponíveis para populações naturais.

A primeira etapa para se aplicar os conceitos expostos acima consiste numa análise de clados agrupados (NCA), que converte uma árvore haplotípica em uma série hierárquica de ramos ou clados utilizando a parcimônia estatística (Templeton *et al.* 1987; Templeton & Singh 1993). Os haplótipos são então agrupados em clados hierarquicamente de acordo com o número de passos mutacionais entre eles. O método

de NCA, empregado através do programa TCS (Clement *et al.* 1993), calcula ainda dois índices: o quanto os clados estão “espalhados” geograficamente (D_c) e a distância média de um indivíduo pertencente a um clado de interesse aos clados irmãos (D_n). O programa também calcula se estes dados são estatisticamente significantes, ou seja, se há uma correlação entre clados e geografia. Isto gera dados para serem utilizadas no teste de hipóteses, uma vez que linhagens isoladas geograficamente não possuem permutabilidade genética.

Apesar de ser teoricamente consistente, o conceito de coesão de espécies é muito difícil de ser aplicado na prática. É raríssimo encontrar dados confiáveis acerca de intercambialidade ecológica em organismos em condições naturais. Existem poucos exemplos de estudos que aplicaram com sucesso o conceito de coesão de espécies. (ver Templeton 1999) já que é necessário um extenso conhecimento sobre todos os aspectos do complexo de espécies estudado. No caso do morcego vampiro comum, por exemplo, seria necessário recolher dados sobre condições dos abrigos, preferência alimentar, dinâmica e horários de forrageamento e comportamento social, entre outros, para poder aplicar esta metodologia corretamente – uma vez que, mesmo sendo uma das espécies de morcegos mais estudadas, pouco se sabe sobre este animal em condições naturais – mesmo aspectos básicos como a alimentação. Assim este trabalho não pode aplicar este conceito rigorosamente da forma como foi proposto por não ter o arcabouço de informações necessário.

Em 1998, de Queiroz propôs o que batizou de “general lineage concept” de espécies como conceito mais amplo e unificador proposto até então. O autor fez um levantamento dos conceitos de espécie comumente utilizados na literatura e demonstrou que apesar das definições serem diferentes todos possuíam em comum o fato de atribuírem o conceito de espécies a linhagens no nível de populações, ou o maior agregado de indivíduos que evolui com uma unidade (Wiley 1978). O que é fundamentalmente diferente entre cada definição de espécie são os critérios utilizados para determinar a linha que separa as espécies de outras entidades evolutivas. Em seu artigo de Queiroz mostra em uma brilhante figura como os diferentes conceitos traçam a linha que divide espécies em diferentes momentos do processo de especiação, até o ponto onde sob o escrutínio de qualquer conceito de espécies aquelas entidades estudadas podem ser consideradas espécies distintas. O autor então propõe que para diferentes situações e para diferentes organismos sendo estudados, em etapas diferentes

do processo de especiação, diferentes critérios podem ser utilizados para determinar o status das entidades em estudo.

Apesar de o conceito geral de espécie proposto por de Queiroz também se mostrar geral e consistente teoricamente, ele é falho no quesito aplicabilidade. Independente do fato de todos os conceitos de espécie carregarem a mesma idéia central, em termos práticos é estritamente necessário determinar um critério para determinar se duas linhagens, populações ou entidades são espécies diferentes ou não. E tal critério deve possuir um caráter universal e não somente aplicável à situação em questão.

Como colocado, todos os conceitos de espécie possuem seus méritos e suas falhas. Para um trabalho que se propõe a investigar o status taxonômico de um grupo, é necessário estabelecer os critérios para separar duas entidades distintas e atribuir-lhes o caráter de espécie. Tal critério deve ter aplicabilidade, ou seja, deve utilizar os dados coletados. Assim, o critério para distinguir espécies a ser utilizado neste trabalho será o de linhagens que possuem coesão genética e morfológica, “emprestando” e adaptando as premissas do conceito de coesão de espécies.

1.3 FILOGEOGRAFIA E MARCADORES MOLECULARES

A filogeografia é definida como o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avice 1994, 2000). Como o próprio nome diz, a filogeografia lida não só com as relações filogenéticas entre os taxa estudados, mas com os componentes históricos responsáveis pela distribuição espacial destas linhagens. Assim, a análise e interpretação da distribuição de linhagens requer o processamento conjunto de informações de uma série de disciplinas, incluindo filogenética, genética de populações, etologia, demografia, paleontologia, geologia e geografia histórica. Desta forma, a característica multidisciplinar da filogeografia faz com que esta disciplina crie uma ponte entre processos micro e macro evolutivos (Avice 2000).

Dados provenientes de marcadores moleculares são capazes de fornecer informações acerca da quantidade de fluxo gênico entre populações (Slatkin 1987), detectar eventos de fundador e gargalos populacionais (Avice 1994) e estimar expansão de território em relação à localização de supostos refúgios e zonas de expansão (Rogers

& Harpending 1992), sendo por isso especialmente úteis para investigar os processos de especiação (Moritz *et al.* 1987; Terborgh 1992; Avise 2000).

O DNA mitocondrial (DNAMt) é o marcador mais utilizado em estudos filogeográficos (Avise 2000). O DNAMt dos mamíferos é uma molécula dupla fita circular, contendo de 15 a 17 quilobases. Contêm em sua maioria seqüências não repetitivas: 13 genes que codificam proteínas, dois genes de RNA ribossômico, 22 de RNA transportador e uma região controle que contém sítios para replicação e início de transcrição. É estruturalmente muito estável – há pouquíssima variação de tamanho genômico e arranjo gênico entre as espécies de mamíferos (Li 1997). Devido à suas características únicas – ausência de recombinação, herança predominantemente materna e alta taxa de evolução - é um marcador molecular extremamente informativo em estudos evolutivos, pela capacidade de caracterizar a variabilidade inter e intraespecífica, identificar espécies e populações e estimar relações filogenéticas (Moritz *et al.* 1987; Avise 1994, 2000).

Como o DNAMt é herdado predominantemente uniparentalmente e é haplóide, seu número efetivo (N_e) é de um quarto do N_e do genoma nuclear. Isto significa também, para fins filogeográficos, que o DNAMt atinge a monofilia recíproca entre populações com baixo ou nenhum fluxo gênico em um quarto do tempo que o DNA nuclear (Moore 1995), ou então três vezes (Palumbi *et al.* 2001). Assim, se um pesquisador estuda um organismo cuja divergência entre linhagens ocorreu no Pleistoceno, é certo que uma filogenia baseada em DNAMt apresentará monofilia recíproca entre as populações, enquanto na sua média os loci nucleares permanecerão sem monofilia recíproca (Hare 2001). Ainda de acordo com Moore, o número médio de loci nucleares necessários para recuperar um evento que o DNAMt recupera com 95% de confiança seria de 16 – dependendo do método utilizado para realizar esta estimativa, o número pode chegar a 40. O que significa que seriam necessárias 40 árvores de genes corretamente resolvidas para recuperar a mesma história de uma única seqüência de DNAMt.

Devido aos motivos descritos anteriormente, os primeiros esforços utilizando marcadores nucleares em estudos filogeográficos utilizavam marcadores microssatélites. Microssatélites são caracterizados por pequenos motivos (por exemplo, TAT) de DNA repetidas lado a lado, diversas vezes. Microssatélites são não codificantes e apresentam uma alta taxa de mutação. Desta forma são marcadores altamente polimórficos, possibilitando uma alta resolução tanto em estudos inter quanto intrapopulacionais. As mutações que ocorrem internamente nos microssatélites são mudanças no número das unidades de repetição. O mecanismo mais provável para explicar as altas taxas de

mutação seria a ocorrência de erros de pareamento, ocasionados pelo deslizamento das fitas de DNA no momento da replicação (*DNA replication slippage*). Além do alto grau de polimorfismo, os microssatélites são marcadores que apresentam alelos co-dominantes e são, de modo geral, seletivamente neutros (Schlötterer 1998). Os microssatélites são marcadores efetivos de fluxo gênico e história populacional, mesmo em espécies com variação gênica limitada (Taylor *et al.* 1997), além de serem muito versáteis e ideais para a identificação das relações entre populações naturais de uma determinada espécie (Queller *et al.* 1993). A grande deficiência deste marcador é não possuir informação filogenética. Como o mecanismo de mutação é pouco conhecido, não é possível deduzir relações de ancestralidade entre os alelos encontrados e as comparações entre populações ficam limitadas à demografia histórica, concentradas principalmente em estatísticas F, dependentes de frequência.

Espécies que apresentam alto grau de diferenciação populacional no DNA mitocondrial por vezes se mostram formadas por uma única população quando marcadores nucleares são analisados – como foi descrito para répteis (Godinho *et al.* 2006) e morcegos (Castella *et al.* 2001). Neste último caso os autores observaram diferenciação populacional entre o que chamaram de diferentes colônias de hibernação localizadas em lados opostos dos Alpes na Europa quando analisaram a região controle do DNAmT nos morcegos da espécie *Myotis myotis*. Porém ao analisarem marcadores microssatélites para os mesmos indivíduos não foi possível encontrar diferenciação genética entre estas mesmas colônias. Os autores atribuíram os resultados encontrados a filopatria de fêmeas e fluxo gênico mediado por machos – resultado congruente com estudos de comportamento para a espécie. Resultado semelhante foi descrito para o morcego *Megaderma gigas* na Austrália: um trabalho inicial descreveu intensa diferenciação entre colônias deste morcego ameaçado utilizando a região controle do DNAmT (Worthington Wilmer *et al.* 1994) sugerindo total isolamento entre as colônias, enquanto um trabalho posterior mostrou a presença de migração entre as mesmas mediada por machos ao estudar marcadores microssatélites para os mesmos indivíduos (Worthington Wilmer *et al.* 1999). É importante notar que tais inferências foram realizadas devido ao fato de microssatélites possuírem uma alta taxa de mutação, o que garante que eventos detectados para DNAmT e microssatélites encontram-se na mesma escala temporal; tais conclusões não poderiam ser tão categóricas caso o marcador nuclear utilizado fosse um gene nuclear com uma taxa de mutação ordens de magnitude menores que a do DNAmT.

Os estudos acima exemplificados mostram que a análise de seqüências de diferentes loci nucleares se faz necessária para uma melhor compreensão da história natural de espécies, bem como do seu status taxonômico. Além disso, genealogias baseadas em um único gene podem ser problemáticas porque cada reconstrução é somente um ponto no espaço de genealogias possíveis. Dependendo da história genealógica da população, tal tipo de abordagem pode levar a sérios erros (Wakeley 2008). Árvores filogenéticas são mais informativas em um modelo de vicariância com isolamento completo. Mesmo assim, o isolamento pode produzir árvores diferentes da real história da população. No caso, a árvore do gene pode ter sido inferida corretamente, mas não corresponde à árvore da espécie (Pamilo & Nei 1988).

Um exemplo disto foi observado em um trabalho realizado em lebres européias (Alves *et al.* 2003). Ao realizar uma filogenia utilizando seqüências de DNA mitocondrial e nuclear, os autores observaram monofilia recíproca entre as espécies para o marcador nuclear e haplótipos compartilhados entre espécies distintas para o DNAm. Como as espécies são claramente distinguíveis tanto em sua morfologia quanto em sua ecologia, e a filogenia realizada com o DNA nuclear confirmou isto, os autores atribuíram este resultado contraditório entre marcadores a uma introgressão quando glaciações ocorreram na Europa, fazendo com que espécies que ocupam a Europa Central migrassem para um refúgio na Península Ibérica. Justamente nesse período de total simpatria entre as espécies ocorreram um ou mais eventos de introgressão que resultaram na persistência de linhagens mitocondriais provenientes de uma das espécies na outra. Se o trabalho fosse realizado somente com DNAm, teria sido feita uma inferência errônea acerca da relação filogenética entre estas espécies.

Ao estudar múltiplas regiões do genoma é possível obter uma história evolutiva mais completa por reduzir o risco de perder um evento ou processo devido à ausência de uma mutação apropriada no tempo e espaço em uma seqüência de DNA em particular (Templeton 2004). Para uma abordagem multilocus são necessárias análises de loci nucleares, uma vez que o DNA mitocondrial não sofre recombinação e é herdado como um único locus, com vários genes com diferentes taxas de mutação. Como o DNA citoplasmático é comumente herdado de forma uniparental, o padrão encontrado para estes marcadores pode não ser representativo da espécie caso haja dispersão e/ou seleção ligada ao sexo (Hoelzer 1997). Além disso, espera-se que loci sob seleção possuam padrões de variação que desviem das expectativas de loci afetados somente pela demografia histórica, e podem até mimetizar padrões demográficos alternativos

(Hare 2001). A seleção age localmente no genoma, enquanto espera-se que a demografia afete de forma uniforme todos os loci neutros (Fu & Li 1999).

Ao se testar marcadores nucleares para mamíferos, os genes candidatos são em grande parte genes localizados no cromossomo X. O cromossomo X é bastante conservado em mamíferos placentários em termos de arranjo e de seqüências codantes (Ross *et al.* 2005). Assim, *primers* desenvolvidos para introns do cromossomo X que se anelam em seqüências codantes de uma espécie de mamífero podem ser usados em uma espécie totalmente diferente com sucesso (Geraldes *et al.* 2006), além de permitir a escolha de genes com baixa ou alta taxa de recombinação. Além disso, o seqüenciamento de machos (hemizigotos) permite que os haplótipos sejam definidos sem ambigüidade, o que não é possível com autossomos. Ao definir-se os haplótipos através dos machos, é possível resolver as ambigüidades encontradas no seqüenciamento das fêmeas, possivelmente sem ser necessário recorrer a abordagens estatísticas como as delineadas na seção seguinte.

Entre os genes testados com sucesso para trabalhos populacionais em mamíferos encontra-se o gene RAG2 (*recombination activator gene*). Este marcador é amplamente utilizado em filogenias de mamíferos e apresentou variação intraespecífica entre 1,5 e 2% pra espécies da família Moormopidae (Lewis-Oritt *et al.* 2001), família considerada grupo-irmão da família Phyllostomidae (Baker *et al.* 2000; Wetterer *et al.* 2000). Este gene não possui introns e realiza uma função importante no sistema imune: seu produto protéico catalisa as recombinações V(D)J nos linfócitos (Baker *et al.* 2000).

1.4 ESPECIAÇÃO NOS TRÓPICOS E BIOGEOGRAFIA

A grande diversidade existente nos trópicos sempre recebeu grande atenção por parte de pesquisadores, desde os tempos dos primeiros exploradores naturalistas e tem sido fruto de considerável debate nas últimas décadas (Patton & da Silva 1998). No centro do debate encontra-se a polêmica sobre os mecanismos de diversificação na Amazônia, a maior área de floresta contínua do planeta e considerada por muitos autores como o lar da maior diversidade de flora e fauna do mundo.

Diversos modelos de especiação para esta área foram desenvolvidos para tentar explicar esta grande diversidade, sendo que a imensa maioria deles se sustenta na idéia de especiação alopátrica e no conceito biológico de espécies, ou seja, tais modelos só podem se encaixar em especiação para vertebrados. O único modelo que possui outro

pressuposto é o modelo de gradiente, no qual as espécies estariam amplamente distribuídas no contínuo da floresta e, uma vez submetidas a microambientes diferentes com diferentes pressões seletivas nos extremos da distribuição, poderia ocorrer especiação parapátrica. Tal processo resultaria em espécies-irmãs ocupando áreas adjacentes bem como uniformidade de caracteres em áreas de condições ambientais homogêneas e congruência entre distúrbios ambientais e fenotípicos (ver Marroig & Cerqueira 1997).

Os modelos de especiação alopátrica incluem os rios como barreiras ao fluxo gênico, a existência de um grande corpo de água (laguna) na Amazônia devido à flutuação no nível dos oceanos, a teoria dos refúgios e combinações dos fatores acima apresentados (Patton & da Silva 1998; Haffer 1997; Marroig & Cerqueira, 1997). Outros autores atribuem a diversificação da Amazônia como um processo complexo que poderia incluir todos os modelos citados (ver Bush 1994 e Marroig & Cerqueira 1997).

De particular interesse para este trabalho é a teoria dos refúgios. Inicialmente proposta por Jürgen Haffer em 1969, este modelo suscitou muito debate e possui um grande número de defensores. Baseado em evidências palinológicas e geomorfológicas e tendo como carro-chefe estudos taxonômicos em aves, Haffer propôs que flutuações climáticas associadas aos ciclos glaciais teriam provocado um “ressecamento” da biota amazônica fazendo com que boa parte da floresta fosse substituída por formações abertas (savanas) e que a floresta ficasse fragmentada em ilhas (“refúgios”) onde as diferentes populações de uma espécie evoluíam em alopatria. Com o fim do ciclo glacial, a cobertura florestal se tornaria contínua novamente e essas populações – agora espécies isoladas reprodutivamente – teriam um contato secundário e expandiriam sua área de ocorrência (revisão em Haffer 1997). Por ir de encontro com alguns conceitos da mentalidade dominante sobre especiação em sua época – como especiação alopátrica e o conceito biológico de espécie - a teoria dos refúgios foi amplamente aceita. Mesmo com a polêmica em torno de se os refúgios foram ou não a força motriz da diversificação da Amazônia, o fato das florestas tropicais serem dinâmicas e passarem por mudanças de composição florística devido a flutuações climáticas históricas é um fato científico comumente aceito. Estas mesmas alterações climáticas globais também causaram fragmentação florestal na Mata Atlântica, que foi entrecortada por áreas abertas, de acordo com estudos palinológicos (Behling & Lichte 1997).

1.5 O COALESCENTE

O coalescente (ou teoria da coalescência) engloba uma coleção de tratamentos matemáticos formais às relações de ancestralidade e descendência a partir de uma amostragem e é considerado o maior avanço em genética de populações dos últimos 20 anos. É particularmente conveniente para dados moleculares, como seqüências de DNA – que contém ricas informações sobre relações de ancestralidade, e com o grande acúmulo de informações de dados moleculares a partir da década de 80 tornou-se uma importante ferramenta para estudos genéticos, sobretudo em genética evolutiva humana (Fu & Li 1999). Enquanto a genética de populações clássica preocupa-se com o futuro das freqüências gênicas nas populações a partir de um determinado ponto, o coalescente parte do presente e olha para o passado, através de uma abordagem probabilística (Nordborg 2001). Porém o campo do coalescente mostrou-se bastante árido, de difícil compreensão para os não-teóricos, o que fez com que pesquisadores mais voltados para a coleta de dados mostrassem uma certa resistência à utilização dessas técnicas, apesar de alguns autores (ver Bermingham & Moritz 1998) terem reconhecido que a integração entre a filogeografia comparativa e a coalescência traria grandes benefícios para a primeira.

Um marco histórico na integração destas duas disciplinas ocorreu através do método desenvolvido por Kuhner *et al.* (1995). Este método faz uma estimativa de máxima verossimilhança para uma série de parâmetros de interesse quando se procura recuperar a história demográfica de uma população ou espécie. O objetivo é calcular o valor de Θ ($4N_e\mu$, sendo N_e o número efetivo da população e μ a taxa de mutação) que maximiza a matriz de seqüências. Tal valor de verossimilhança é o produto da probabilidade da genealogia baseada num valor pré-definido de Θ [$P(G|\Theta)$] e a probabilidade dos dados de seqüência dada a topologia [$P(D|G)$]. Apesar desta verossimilhança parecer relativamente fácil de ser calculada a princípio, tal cálculo exigiria uma somatória com um número quase infinito de topologias, dadas todas as possibilidades de comprimentos de ramos. É neste momento que o método desenvolvido por Kuhner *et al.* faz o grande salto ao utilizar um algoritmo que torna a amostragem de topologias heurística. O surgimento de métodos computacionais baseados no algoritmo de Metropolis-Hastings foi fundamental para o desenvolvimento do aparato necessário para a análise de dados empíricos tendo o coalescente como base teórica. A abordagem

através deste algoritmo concentra a busca de genealogias no espaço que mais contribui para a verossimilhança final (Beerli & Felsenstein 2001).

De acordo com este método, o programa estima a verossimilhança de uma árvore dado um valor inicial de Θ . 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 matriz de seqüências, bem como a variância dessa estimativa. De maneira análoga, outros parâmetros populacionais podem ser calculados a partir de Θ com base nesta abordagem, como por exemplo uma taxa de crescimento populacional (Kuhner *et al.* 1998).

1.6 O COMPLEXO DRB

O complexo gênico DRB pertence ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), responsável pelas respostas imunes inatas, ou seja, pelo reconhecimento de proteínas próprias (*self*) e estranhas ao organismo e a subsequente ativação das vias imunológicas. Os genes DRB são genes MHC de classe II e transcrevem proteínas transmembrânicas primariamente em células apresentadoras de antígenos do sistema imune (Bernatchez & Landry 2003).

Devido ao seu papel no sistema imune, os genes do complexo MHC são sempre candidatos para estudos dos efeitos da seleção na variabilidade genética das espécies. Estudos feitos com esse complexo de genes encontraram níveis altíssimos de polimorfismo bem como polimorfismos trans-específicos, levando a conclusão que muitos genes deste complexo estão sob um regime de seleção balanceadora, com vantagem para heterozigotos (Hughes & Nei 1988). A seleção balanceadora mantém vários alelos em freqüências intermediárias e presentes nas populações por longos períodos de tempo, de forma que alelos muitas vezes são compartilhados por espécies distintas (Klein 1987).

Em uma revisão recente, Bernatchez & Landry (2003) apontaram os marcadores do complexo MHC como a melhor oportunidade de testar adaptações diferentes em cada população, o que poderia fazer deste marcador uma ferramenta muito interessante para estudos filogeográficos em populações naturais. Mais recentemente, Berggren *et al.*

(2005) encontraram um padrão filogeográfico congruente entre marcadores mitocondriais e MHC para uma espécie de ouriço europeu. Assim, na busca de marcadores informativos e de realizar uma análise sistemática das linhagens atribuídas a *D. rotundus*, genes do complexo MHC apresentam-se como uma alternativa interessante para testar diferenciação populacional: caso tenha havido seleção diferencial entre as populações deste morcego, isto estará evidenciado na distribuição dos haplótipos de MHC; no caso de não ter havido seleção diferencial, espera-se encontrar pouca ou nenhuma diferenciação nas frequências gênicas entre as populações.

1.7 OBJETIVOS

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivos:

- Realizar um estudo filogeográfico para a espécie *D. rotundus* e discutir quais as implicações dos resultados encontrados num contexto biogeográfico dos neotrópicos;
- Comparar os resultados obtidos entre marcadores mitocondriais e nucleares e discutir possíveis incongruências e suas prováveis causas;
- Analisar a morfologia craniana de *D. rotundus* ao longo de sua distribuição e testar a hipótese de divergência morfológica associada a divergência genética; caso tal divergência seja encontrada, descrevê-la;
- Por fim, identificar quantas e quais são as espécies atribuídas a *D. rotundus*; e sugerir adequações taxonômicas

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA, EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO

Todas as amostras de tecido utilizadas neste trabalho pertencem ao banco de tecidos do Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEC) devidamente credenciado junto ao Ministério do Meio Ambiente (CGen). Os espécimes foram coletados com o auxílio de redes de neblina com espessura de 36mm, sacrificados e dissecados. O tecido utilizado para extração de DNA foi preferencialmente o fígado, conservado em etanol absoluto. Em alguns casos – como quando a hora do óbito do animal era desconhecida – o tecido extraído foi músculo do antebraço. Para a correta identificação dos animais foi utilizada a chave dicotômica elaborada por Vizotto & Taddei (1973). As amostras que não foram coletadas diretamente por membros do LABEC sob a licença de coleta número 163-2005 do IBAMA foram doadas por pesquisadores do Brasil e do exterior e suas respectivas licenças de coleta e transporte. A lista completa de espécimes utilizados encontra-se no Anexo 1.

O diferentes protocolos utilizados para extração de DNA genômico incluem o método clorofórmio-fenol (Sambrook *et al.* 1989), o protocolo NaCl/SDS/Proteinase K (Bruford *et al.* 1992) e na etapa final um kit de extração que potencializa a quantidade de DNA obtida a partir de fragmentos mínimos de tecido (Chargeswitch gDNA mini tissue kit, Invitrogen, Gaithersburg, USA). Após a extração do DNA dos tecidos, a solução obtida foi quantificada e uma diluição de 20ng/μl foi feita para a reação em cadeia de polimerase (PCR) em termocicladora MJ Research (Watertown, USA) - exceto no caso das amostras em que o kit de extração foi utilizado e que a solução final já se encontra em concentração adequada para a reação de amplificação. As concentrações dos reagentes desta reação seguiram a recomendação do fornecedor da enzima (Gibco/Life Technologies do Brasil). O protocolo do programa de PCR encontra-se na Tabela 2.1.1.

Devido aos motivos delineados na introdução, o primeiro marcador selecionado para estudar filogeografia de *D. rotundus* foi um marcador mitocondrial. O gene escolhido foi o gene do citocromo b (cyt b), amplamente utilizado em estudos filogeográficos e com reconhecida variação intraespecífica. Além disso, a utilização deste marcador facilita a comparação com outros estudos filogeográficos de morcegos e de mamíferos em geral. Foram amplificados dois fragmentos do DNAm: um correspondente ao fim do gene que transcreve o RNA transportador da glutamina e à porção inicial do gene do cit b; o

segundo corresponde à porção final do *cyt b* e ao início do gene do RNA transportador da tirosina (*primers* descritos em Martins *et al.* 2007).

Nº de ciclos	Nome	Temperatura	Tempo
1	Denaturação	94 °C	1min30s
35	denaturação	94 °C	30s
	<i>annealing</i>	*°C	45s
	extensão	72 °C	1min10s
1	Extensão	72 °C	10min

Tabela 2.1.1: protocolo de PCR utilizado para amplificação dos fragmentos de DNA. O protocolo utilizado foi o mesmo para todos os fragmentos, diferindo apenas na temperatura de annealing (*) utilizada para cada reação. Para os primers BAT17/14, 44,7°C; para BAT05/04, 47,8°C; para RAG2, 64,3°C e para DRB-1 59,3°C.

Com o intuito de aumentar a robustez dos dados de sequência obtidos (pelos motivos delineados na introdução) decidiu-se por testar marcadores nucleares que pudessem ser informativos para a escala de estudo. A seleção dos marcadores seguiu dois critérios: 1 – descrição na literatura de que o marcador era informativo no nível populacional e 2 – marcadores ligados ao cromossomo X teriam prioridade. Dentro deste contexto, uma série de marcadores foram testados: o intron 44 do gene da distrofina (*Dmd*) que apresenta alta variabilidade em humanos (Nachman & Cromwell 2000); o gene *Hprt1*, utilizado com sucesso no estudo da filogeografia de coelhos europeus (Geraldes *et al.* 2006); o gene 2C3 que encontra-se dentro de um intron de outro gene (de receptor de serotonina) e está envolvido na sinalização celular de neurônios (Bockaert *et al.* 2006). Todos estes genes são ligados ao cromossomo X. Também foram testados os genes autossômicos β -globina e κ -caseína. Os *primers* utilizados para amplificação destes loci foram desenvolvidos num projeto em colaboração envolvendo o Centro de investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO) em Porto, Portugal e o LABEC com o intuito de gerar marcadores autossômicos para preguiças (dados não publicados). Para o gene autossômico RAG2 os índices relativamente altos de variabilidade intraespecífica descritos na literatura, a característica de neutralidade do marcador e a disponibilidade de *primers* já utilizados nestes morcegos foram os fatores que levaram a inclusão deste gene como marcador para este projeto.

Devido à disponibilidade de primers na literatura e a possibilidade inédita de se estudar a ação da seleção em um gene em morcegos, optou-se por testar o gene DRB-1

nas amostras de *D. rotundus*. A oportunidade de estudar o complexo MHC em morcegos surgiu a partir do trabalho de Kupfermann *et al.* (1999) que amplificou os introns 4 e 5 de morcegos da família Phyllotomidae para utilizar estas seqüências como grupo externo para análises filogenéticas dentro da ordem Primata. Os autores desenvolveram *primers* especificamente para seqüenciamento em morcegos que foram testados em *D. rotundus*.

A reação de seqüenciamento foi feita com o BigDye Mix Terminator (Applied Biosystems, Foster City, USA), seguindo as recomendações do fabricante do seqüenciador automático (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems): 30 ng de produto de PCR, 2,5 µl de BigDye, 6 µl de tampão (Tris-HCl pH 9,0, MgCl₂ 50 mM), 1,6 pmol de *primer* em um volume final de reação de 20 µl. As amostras e/ou placas foram precipitadas utilizando-se um protocolo de isopropanol/etanol (Sambrook *et al.* 1989). As amostras foram então analisadas em sequenciador automático. A análise preliminar dos resultados do seqüenciamento foi feita no programa Sequence Navigator e o alinhamento das mesmas no programa Se-Al (Rambaut 2000).

2.2 DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE SEQUENCIAS NUCLEARES.

Como as seqüências de DNA geradas para este projeto apresentaram um grande número de heterozigotos, foi necessário utilizar um método para determinar a fase dos haplótipos sequenciados. Estes heterozigotos são detectados quando no eletroferograma dois picos de absorbância correspondendo a diferentes pares de base se sobrepõem nas duas leituras (fitas *leading* - L e *reverse* - R). Quando uma seqüência é “heterozigota” em um sítio, não há ambigüidade na atribuição dos haplótipos: um cromossomo possui um dos nucleotídeos (por exemplo, um T) e o outro possui o complementar (por exemplo, um G). Porém quando a seqüência possui mais de um sítio heterozigoto, torna-se impossível atribuir a fase e determinar os haplótipos e genótipos sem clonar ou amplificar cada alelo especificamente. Como essas alternativas consomem tempo e trabalhos imensos, optou-se por uma alternativa comumente utilizada em trabalhos envolvendo genética humana: a atribuição dos genótipos através de uma abordagem estatística. O programa disponível que melhor recupera os genótipos chama-se PHASE (Stephens *et al.* 2001). Este programa utiliza estatística bayesiana para inferir corretamente os haplótipos e genótipos dos indivíduos através de informações fornecidas *a priori* (como, por exemplo, os haplótipos dos homozigotos e suas freqüências relativas). O programa também mostra no arquivo de saída as probabilidades posteriores atribuídas a cada inferência feita.

2.3 DETECÇÃO DE EVENTOS DE RECOMBINAÇÃO

Devido à utilização de marcadores nucleares (diplóides), é necessário detectar se houve algum efeito de recombinação nos loci estudados. A reconstrução filogenética baseia-se no fato que os haplótipos observados são fruto unicamente do fenômeno mutacional: a recombinação cria novos haplótipos e pode em alguns casos criar topologias completamente diferentes da real história dos haplótipos (Posada & Crandall 2002) bem como alterar os comprimentos de ramos e descaracterizar o relógio molecular (Schierup & Hein 2000). Para detectar eventos de recombinação nos genes RAG2 e DRB-1 foi utilizado o programa RDP2 (Martin *et al.* 2005). Este software, além de aplicar o método RDP original (Martin & Rybicky 2000) aplica mais cinco métodos de detecção de recombinação – Bootscanning (Salminen *et al.* 1995), Máximo qui-quadrado (Maynard Smith 1992; Posada & Crandall 2001), Chimaera (Posada & Crandall 2001), Sister-Scanning (Gibbs *et al.* 2000) e TOPAL (McGuire & Wright 2000), além de criar uma interface para os programas GENECONV (Padidam *et al.* 1999), LARD (Holmes *et al.* 1999), e Reticulate (Jakobsen & Easteal 1996).

2.4 AMPLIFICAÇÃO DOS LOCI DE MICROSSATÉLITE

A literatura contém exemplos de estudos cuja comparação entre dados de DNAm e microssatélites foi extremamente informativa. Assim decidiu-se por testar estes marcadores em *D. rotundus*. Catorze loci de microssatélite desenvolvidos, testados e descritos por Ortega *et al.* (2002) para a espécie *Artibeus jamaicensis* foram testados para *D. rotundus*. *A. jamaicensis* pertence à mesma família (Phyllostomidae) que o morcego vampiro comum. Nesta mesma publicação, os autores testaram os primers desenvolvidos em outras espécies de morcegos e conseguiram para algumas espécies não só amplificar os loci como também constatar que estes são polimórficos (mais de um alelo - caso das espécies *Phyllostomus Hastatus*, *Uroderma Bilobatum* e *Leptonycteris nivalis*). Decidiu-se por testar estes *primers* nas amostras deste projeto. Os loci estão descritos na Tabela 2.4.1.

As reações de amplificação também seguiram inicialmente as condições descritas pelos autores Ortega *et al.* (2002). Todos os *primers* foram testados utilizando como molde um conjunto de várias amostras diferentes de DNA cuja amplificação em outras

reações foi bem sucedida. Para obter melhores condições de amplificação dos loci, diversas variáveis da reação de PCR foram testadas. A primeira delas foi a temperatura de anelamento dos *primers*. Para cada par de primers temperaturas entre 40 e 60 graus Celsius foram testadas para a obtenção de uma temperatura ótima para cada reação (14 reações ao todo). Quanto mais alta a temperatura de hibridação, mais específica a interação entre primer e template (DNA – Sambrook *et al.* 1989). Esta etapa foi realizada em uma termocicladora PTC-200 (MJ Research) dotada de um dispositivo que realiza um gradiente de temperaturas entre as colunas, permitindo o teste de várias temperaturas de anelamento no mesmo programa.

Lócus	Padrão de repetição	Tamanho dos alelos	Nº Genbank
AjB464	(CT) ₂₇ (CA) ₁₄	230-272	AY099072
AjA123	(CA) ₁ A(CA) ₁₇ CT(CA) ₂	242-272	AY099073
AjA40	(GT) ₁₃ N ₆ (CT) ₃	190-220	AY099074
AjA47	(CA) ₂ CT(CA) ₁₈	168-194	AY099075
AjA151	(CA) ₃ N ₉ (GT) ₁₇	158-192	AY099076
AjA74	(GT) ₇ (GA) ₂ TT(GT) ₂ N ₉ (GT) ₄ N ₄ (GT) ₄ N ₅ (GT) ₂ N ₆ (GT) ₄ N ₈ (GT) ₄	150-166	AY099077
AjA185	(CA) ₁₄	102-136	AY099078
AjA180	(GT) ₂₁ N ₂ (GT) ₄ AT(GT) ₈	128-152	AY099079
AjA2	(CA) ₆ N ₁₄ (CA) ₅ GT(CA) ₄ N ₁₀ (CA) ₃ N ₄ (CA) ₇	122-134	AY099080
AjA84	(CA) ₃ TA(CA) ₆ N ₃ (CA) ₅ N ₉ (CA) ₉	112-150	AY099081
AjA80	(CA) ₄ A(CA) ₁₀	12-136	AY099082
AjA199	(CA) ₄ GA(CA) ₁ N ₆ (CA) ₄ TA(CA) ₁₂	90-108	AY099083
AjA107	(CA) ₁₂	120-136	AY099084
AjA110	(CA) ₁₃ TA(CA) ₃	94-114	AY099085

Tabela 2.4.1 – Loci de microssatélites testados neste trabalho (modificado de Ortega *et al.* 2003)

A etapa seguinte consistiu em alterar o protocolo proposto por Ortega *et al.* (2002) quando a amplificação não apresentou resultados satisfatórios. Um dos recursos utilizados foi testar a quantidade de *template* (diluição de DNA de 20ng/μl) como tentativa de aumentar a concentração do produto amplificado. Outro protocolo utilizado foi o teste de várias concentrações de cloreto de magnésio (MgCl₂). O MgCl₂ é cofator da enzima

Taq polimerase e o aumento em sua concentração baixa a especificidade da interação *primer-template-taq*. Como os primers foram desenvolvidos para uma espécie diferente, tais *primers* podem não possuir uma seqüência complementar idêntica no DNA de *D. rotundus*; assim, lançar mão de tais recursos pode ser a diferença entre conseguir ou não a amplificação de determinados loci (Sambrook *et al.* 1989).

Os loci com amplificação bem-sucedida foram testados antes do sequenciamento para a constatação de que eram polimórficos. Alguns loci de microssatélites são monomórficos (somente um alelo) e portanto não são marcadores informativos. Estes marcadores foram amplificados em uma série de indivíduos previamente escolhidos representando várias localidades geográficas (todos os filogrupos detectados através do DNAm^t). Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de acrilamida 6% e corados com solução de prata para visualização das bandas. O tamanho relativo das bandas foi estimado utilizando o marcador 100pb ladder (Invitrogen technologies, Gaithersburg, USA).

2.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A primeira etapa das análises filogenéticas consistiu na determinação do modelo de substituição nucleotídica mais adequado para os dados disponíveis. Esta foi realizada utilizando-se o software Modeltest (Posada & Crandall 1998) que realiza uma série hierárquica de testes em busca do modelo que melhor explica a evolução molecular do conjunto de dados, começando pelo modelo mais simples até modelos mais complexos. No total, 56 modelos diferentes de evolução molecular são testados. O modelo selecionado por este programa foi o utilizado para as análises de máxima verossimilhança (MV) e de distância (neighbor-joining) realizados através dos softwares PAUP* (Swofford 1998), MEGA (Kumar *et al.* 1993) e Garli (Zwickl 2006). No programa PAUP foi realizada busca heurística que utilizou o algoritmo *tree-bisection-reconnection* (TBR). Medida de apoio (valores de *bootstrap* – Felsenstein 1985) foi estimado utilizando 1000 réplicas. Uma busca utilizando o critério de máxima parcimônia (MP) também foi realizada no software PAUP com os mesmos parâmetros da análise de MV.

Por último, foi realizada uma reconstrução filogenética utilizando a metodologia bayesiana através do software Mr. Bayes (Ronquist *et al.* 2005). O modelo de substituição molecular utilizado foi o mesmo da análise de verossimilhança, sendo que na maioria dos outros parâmetros do programa foi utilizada a configuração *default*. Foram necessárias

cinco milhões de gerações para que as duas cadeias de Markov que correm paralelas tivessem um desvio padrão inferior a 0,01 (que segundo os autores do programa significa que a busca pela melhor árvore pode ser interrompida). A árvore salva com suas probabilidades posteriores foi visualizada através do programa Treeview.

As árvores geradas pelas análises filogenéticas foram comparadas por meio de um teste de topologia. O teste não-paramétrico de Shimodaira & Hasegawa (1999) foi utilizado para comparar simultaneamente os escores de possíveis topologias encontradas, a partir de um conjunto selecionado *a priori* (Schneider 2003). Esse teste indica se as topologias possuem valores de verossimilhança estatisticamente significativamente distintos levando em conta as premissas assumidas pelo modelo de substituição escolhido.

2.6 ANÁLISE DE CLADOS AGRUPADOS (NCA)

Além de realizar as análises filogenéticas clássicas, optou-se por realizar uma análise de clados agrupados (NCA), que converte uma árvore haplotípica em uma série hierárquica de ramos ou clados utilizando a parcimônia estatística (Templeton *et al.* 1987; Templeton & Singh 1993). O resultado desta análise não é uma árvore com um padrão de bifurcações e sim uma rede de haplótipos não enraizada que, segundo os autores, reflete de forma mais fiel o verdadeiro processo coalescente atribuído à linhagem (ver Templeton 1998, 2001). Os haplótipos são então agrupados em clados hierarquicamente de acordo com o número de passos mutacionais entre eles, e classificados como clados de interior ou de ponta, de acordo com sua localização na rede de haplótipos. Clados de interior são considerados linhagens mais antigas (Templeton *op cit*). Este método é empregado através do software TCS (Clement *et al.* 1993). A partir da rede de haplótipos e das coordenadas geográficas atribuídas aos mesmos, o programa GEODIS (Posada *et al.* 2000) calcula dois índices: o quanto os clados estão “espalhados” geograficamente (D_c) e a distância média de um indivíduo pertencente a um clado de interesse aos clados irmãos (D_n). O programa também calcula se estes dados são estatisticamente significantes, ou seja, se há uma correlação entre clados e geografia. Isto gera dados para serem utilizados em uma chave de inferência que a partir dos resultados obtidos pode discriminar o processo que deu origem ao padrão observado entre fragmentação alopátrica, expansão da área de ocorrência (contígua ou não), isolamento por distância, fluxo gênico restrito e colonização de longas distâncias.

2.7 ANÁLISES DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES E COALESCENTES

As análises de variância molecular (AMOVA – Excoffier *et al.* 1992) bem como os cálculos de F_{ST} foram realizadas através do programa Arlequin (Schneider *et al.* 2000). Foram realizadas também os testes de neutralidade de Tajima (1989) e Fu (1997) e outras estatísticas sumárias através do software DNAsp (Rozas *et al.* 2003). Como os genes RAG2 e DRB-1 são genes do sistema imune, optou-se por fazer uma análise de dN/dS (comparando o número de substituições sinônimas e não-sinônimas) para testar a hipótese de seleção para estes genes.

O programa utilizado para estimar os parâmetros M ($2Nm$, onde m é a taxa de migração), T ($t/2N$, onde t é o tempo de divergência) e θ a partir dos dados de sequência chama-se Mdiv (Nielsen & Wakeley 2001) e utiliza um modelo de finitos sítios, mais especificamente o modelo de Hasegawa-Kishino-Yano, que permite múltiplas substituições em um mesmo sítio, diferentes frequências nucleotídicas e uma taxa estimada de transição/transversão (para detalhes, ver Nei & Kumar 2000).

É preciso assinalar alguns pressupostos do modelo necessários para a interpretação dos dados. O primeiro é de que o número efetivo das duas populações e da população ancestral são iguais; assim, calcula-se um único parâmetro θ . Outro pressuposto é que a taxa de migração é constante nas duas direções, ou seja, não há migração heterogênea de um deme para outro.

A cadeia de Markov foi simulada por $5,5 \cdot 10^6$ vezes, sendo que os primeiros $5 \cdot 10^5$ ciclos foram utilizados como *burning time*, ou seja, estes ciclos foram utilizados como “aquecimento” até que as cadeias de Markov atingissem uma distribuição estacionária. Foram designados valores máximos para T e M , baseado nas análises de Palsbøll *et al.* (2004). Estes valores foram de 50 para M e 10 para T , ambos muito acima do esperado, para obter uma boa estimativa dos parâmetros. Nove corridas independentes foram realizadas usando $m=0$ e um valor de m estimado pelo software. O modelo que melhor acomodou os dados foi escolhido utilizando-se o critério de informação de Akaike (Akaike 1985). Para fins de comparação os parâmetros t e θ também foram calculados utilizando uma abordagem não-coalescente baseada no índice *net-sequence divergence* (calculado através do software MEGA) como descrito em Edwards & Beerli (2000). Duas taxas de

mutação diferentes estimadas para pequenos mamíferos não-voadores foram utilizadas como descrito em Hoffman *et al.* (2003) para calcular a divergência em anos.

Devido a dificuldades encontradas durante a execução das análises, optou-se também por realizar uma análise utilizando o mesmo método de forma expandida, através do software IM (Hey & Nielsen 2004). Este programa tem algumas vantagens: a primeira de trabalhar com dados multilocus; a segunda de que ao contrário do software MDIV este programa calcula três valores de θ : um para cada população atual e um para a população ancestral. Além disso, o programa também é capaz de estimar taxas de migração assimétricas: m_1 e m_2 (da população A para população B e vice-versa). Esta opção foi escolhida devido ao fato de podermos inferir histórias demográficas diferentes para cada população que não podem ser ignoradas no momento de fornecer os dados necessários para a simulação.

2.8 SIMULAÇÕES COALESCENTES

Como colocado anteriormente, é necessário examinar genes nucleares e compará-los com dados mitocondriais para poder afirmar que uma determinada divisão populacional encontrada é válida. Porém também foi colocado que em média genes nucleares neutros não são informativos para eventos demográficos relativamente recentes (como refúgios pleistocênicos). Para demonstrar a compatibilidade dos dados observados para o gene RAG2 (não informativo no nível filogenético) com a evolução neutra de um gene nuclear em uma espécie dividida em populações com alto número efetivo, mesmo na ausência total de fluxo gênico entre as populações, foi realizada uma simulação coalescente dos dados. O primeiro software escolhido para realizar as simulações foi SIMCOAL2 (Laval & Excoffier 2004). Os motivos para esta escolha passam pelo fato de ser possível simular amostras de populações com histórias demográficas complexas, valores arbitrários de migração entre demes bem como gargalos ou expansões. Além disso, o programa foi utilizado com sucesso em estudos de genética humana (Fagundes *et al.* 2007). O modelo utilizado foi de duas divisões populacionais, de acordo com os dados de DNA mitocondrial para esta espécie (Martins *et al.* 2007): uma primeira divisão entre Amazônia e Mata Atlântica há aproximadamente 900.000 anos, e uma divisão entre Mata Atlântica norte e sul há aproximadamente 500.000 anos (Figura 2.8.1). Os números efetivos para cada população foram estimados a partir dos dados observados para o gene RAG2. Além aos resultados obtidos através de estimativas

coalescentes colocados anteriormente e da estimativa realizada pelo software Arlequin, optou-se por realizar uma estimativa adicional através do software WH (Wakeley & Hey 1997) utilizando verossimilhança. Foi estimada também uma taxa de mutação específica para o gene através da filogenia da família Phyllostomidae com todos os seus gêneros representados publicada por Baker *et al.* (2000) tendo como ponto de calibração a origem da família há 34 milhões de anos como utilizado por Teeling *et al.* (2005). O valor encontrado foi de $1,94.10^{-9}$ substituições por sítio por ano, próxima da taxa estimada como universal para genes nucleares em mamíferos (Kumar & Subramanlan 2002). Uma segunda simulação foi realizada com o programa mlcoalsim (Ramos-Onsins & Mitchell-Olds 2007). Como as configurações descritas anteriormente não poderiam ser utilizadas neste caso, optou-se por um modelo de ilhas para representar a história demográfica de *D. rotundus*. Os arquivos de saída deste programa foram convertidos em um arquivo de entrada para o programa TNT (Goloboff *et al.* 2000) utilizando um script na plataforma LINUX e cada réplica foi rodada pelo programa TNT, que gerou como arquivo de saída além das árvores uma matriz apontando a monofilia ou não dos clados. Esta etapa foi realizada com o auxílio do Pr. Dr. Fernando Marques (Depto. de Zoologia, IB-USP).

Figura 2.8.1: esquema representando a história demográfica utilizada para as simulações coalescentes. As setas representam a ordem dos eventos do presente para o passado. As populações 3 e 4 (MAN e MAS) se originaram de uma população ancestral (2) comum há 500.000 anos, e por sua vez esta população ancestral separou-se da população AMC (1) há 900.000 anos a partir de uma outra população ancestral (0).

2.9 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Para cada indivíduo foram realizadas 19 medidas cranianas, exceto quando o estado de conservação do crânio impedia a realização de alguma delas. As medidas escolhidas foram adaptadas de Vizzoto & Taddei (1973) a partir de medidas comumente utilizadas na identificação de quirópteros. Todos os indivíduos analisados são adultos – determinado pela sutura completa dos ossos do crânio - e quando possível o sexo foi determinado.

Abaixo encontra-se a lista de todas as medidas utilizadas, que podem ser melhor visualizadas na Figura 2.9.1:

- 1 - Comprimento do crânio
- 2 - Comprimento do crânio + incisivo
- 3 – Comprimento da borda alveolar dos incisivos superiores ate o mastóideo
- 4 - Comprimento côndilo-canino
- 5 - Comprimento do canino até o processo mastóideo oposto
- 6 – Comprimento basal – da borda alveolar posterior de um dos incisivos centrais à borda anterior do forâmen.
- 7 – Comprimento da borda alveolar posterior de um dos incisivos centrais ao ponto mais anterior da chanfradura palatina, ao nível das coanas.
- 8 - Comprimento do nasal ao forâmen
- 9 – Comprimento da mandíbula.
- 10 – Largura externa dos caninos entre os pontos externos dos caninos superiores.
- 11 – Largura interorbital – largura entre os pontos mais próximos das constrições orbitais.
- 12 – Largura preorbital – largura entre os pontos mais próximos da constrição preorbital.
- 13 – Largura zigomática – largura entre os pontos extremos do arco zigomático.
- 14 – Largura entre os pontos extremos laterais das caixas cranianas.
- 15 – Largura entre os processos mastóideos.
- 16 - Largura das bulas timpânicas em sua porção mais larga.
- 17 - Largura bula timpânica na sua porção mais próxima
- 18 - Altura da caixa craniana – do ponto mais profundo do basioccipital até o ponto mais elevado do parietal desprezada a crista sagital, ou seja, do ponto mais externo do forâmen até o alto do crânio.
- 19 – Altura do occipital – da borda anterior do forâmen magno ao ponto mais alto do crânio.

Desmodus rotundus MZUSP 16751

Figura 2.9 a: vistas lateral e ventral do crânio de *D. rotundus* com as medidas indicadas. Vista lateral da mandíbula com medida indicada.

Figura 2.9 b: vistas frontal e occipital do crânio de *D. rotundus* com as medidas indicadas.

Todas as medidas foram realizadas utilizando paquímetro digital Mitutoyo digimatic ID 150mm e transferidas automaticamente para uma planilha Microsoft Excel por meio de um cabo de interface. A planilha com as medidas foi corrigida pra remoção de *missing values* e utilizada como arquivo de entrada para as análises subseqüentes.

Os espécimes analisados neste trabalho provém das seguintes instituições: American Museum of Natural History (AMNH) em Nova Iorque; Smithsonian Museum of Natural History, em Washington DC; Los Angeles County Museum of Natural History, Los Angeles, Museu de Zoologia da USP (MZUSP), Museu de Quirópteros da Universidade estadual Paulista em São José do Rio Preto (UNESP – SJRP), Coleção Zoológica da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP) e da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Após a exclusão de indivíduos com valores inexistentes devido a problemas de conservação dos crânios obteve-se uma planilha com 1943 espécimes representando todos os países continentais onde esta espécie ocorre, bem como algumas ilhas do Caribe. A lista completa de espécimes e localidades amostradas (com coordenadas geográficas para as localidades) encontra-se no Anexo 2.

Como a imensa maioria dos espécimes medidos não possui um haplótipo correspondente, optou-se por atribuir o grupo a qual cada um destes espécimes pertence de acordo com sua localidade geográfica. Assim os espécimes foram atribuídos aos clados mitocondriais descritos nos resultados. Localidades nunca amostradas para o DNA mitocondrial – como Bolívia ou Equador não foram utilizadas para as análises estatísticas que utilizaram *grupo* (como definido acima) como critério de agrupamento. Tais localidades foram incluídas em análises exploratórias e no teste de outras hipóteses biogeográficas (ver abaixo).

Para buscar *outliers* ou medidas errôneas no banco de dados calculou-se, para cada variável de cada indivíduo, seu “z-score” (Sokal & Rohlf 1969), que consiste no valor de cada variável de cada indivíduo subtraído da média dessa variável e dividido por seu desvio padrão. Desta forma, é possível comparar os dados com a distribuição esperada de uma curva normal de média igual a 0 e desvio padrão igual a 1. Nesta situação, o limite entre -3,9 e 3,9 corresponde a 99.9% da área presente em uma distribuição normal. Portanto, valores com z-score fora deste limite representam claros *outliers* da distribuição esperada para cada variável. Todas medidas assim identificadas foram removidas do banco de dados.

Optou-se por realizar as análises nos dados brutos e também nos dados com correção de tamanho. Para tanto utilizou-se o método proposto por Darroch & Mosimann (1985). Tal método divide o valor de cada uma das variáveis pela média geométrica de todas as variáveis de cada indivíduo ou amostra. A adoção desta correção é necessária a fim de que a forma do crânio, e não seu o tamanho, seja o principal aspecto a ser considerado pela variabilidade morfológica entre os grupos.

Com esses tratamentos nos dados foram utilizadas análises de funções discriminantes com uma classificação *a priori*, ou seja, baseada na correlação entre as localidades amostradas nas análises filogenéticas e as localidades a qual pertenciam os animais cujos crânios foram medidos. Esta análise cria uma função linear que maximiza as diferenças entre os grupos definidos *a priori*. Cada valor individual é resultante da análise dos desvios das variáveis do indivíduo em relação às médias das variáveis de cada uma das amostragens normalizadas pelo desvio padrão comum (Rao 1964). Análises *a posteriori* procuram “ajustar” as amostras no grupo com o qual possui maior identidade, ou seja, relata a probabilidade de uma amostra ser atribuída a um grupo comparando a distância entre os centróides da amostra e do grupo (os centróides são os pontos que representam as médias de todas as variáveis no espaço multivariado definido pelas variáveis do modelo). Além desta análise foi realizada complementarmente uma análise de variáveis canônicas, um caso especial de funções discriminantes. Estas variáveis são funções discriminantes lineares não-correlacionadas que, por possuírem esta propriedade, são então utilizadas para construir um sistema de coordenadas ortogonais, com cada eixo representando uma função (Van Vaark & Schaafsma 1992).

Também foram realizadas análises de componentes principais. Esta têm como objetivo fundamental associar os fatores mais representativos da variabilidade de uma amostra obtida a partir de múltiplas variáveis, isto é, essas análises reorganizam as variáveis já existentes a fim de concentrar a maior proporção da variabilidade das matrizes em poucas variáveis representativas e independentes entre si. Dessa forma os padrões de variabilidade são concentrados nas novas variáveis e a variabilidade de cada novo fator é independente dos demais fatores (Johnson & Wichern 1992). Todas as análises acima descritas foram realizadas através do programa STATISTICA 6.0 (Statsoft, Inc.).

Essa reorganização da variabilidade das amostras pode ser construída a partir da variância e covariância entre as sub-amostras ou das correlações entre variáveis utilizadas. No presente trabalho, a extração de auto-vetores e autovalores foi realizada

sobre matrizes de variância/covariância, mais indicada para estudos dedicados a acessar padrões morfológicos relevantes para identificar relações biológicas entre indivíduos ou grupos.

Os Calculou-se também a distância de Mahalanobis (Mahalanobis 1936) entre os grupos. Esta distância é obtida a partir da soma das diferenças entre um mesmo conjunto de variáveis em indivíduos ou grupos, havendo uma ponderação pelo inverso da matriz de covariância média intra grupos, ou seja, é a média da distância entre dois pontos no espaço definidos por duas ou mais variáveis correlacionadas.

Além das análises já citadas, optou-se por realizar estimativas de F_{st} baseadas nas medidas de crânio (metodologia desenvolvida por Williams-Blangero & Williams 1989) implementado através do programa Rmet (J. H. Relethford, State University of New York, Oneonta, NY). A significância dos valores de F_{st} foi estimada dividindo o valor estimado pelo erro padrão – esta operação tem como resultado um z-score; se o resultado encontrado estiver fora da distribuição normal (como um *outlier*), o valor de F_{st} é considerado significativo (Relethford, comunicação pessoal). Para confirmar esta estimativa foram também realizadas permutações para estimar um valor de p para os valores observados de F_{st} . Tais permutações ao acaso e o cálculo do valor de p foram feitos através de pequenos *scripts* desenvolvidos em linguagem Java com auxílio do aluno de doutorado Steven Wooley da Washington University e aplicados nos dados observados.

2.9.1 Teste de hipóteses biogeográficas alternativas

Com a adição das medidas de crânios de espécimes de muitas localidades, optou-se por testar hipóteses de diferenciação biogeográficas que não puderam ser testadas com os dados moleculares. A primeira hipótese diz respeito a climas e foi sugerido pela Dra. Nancy Simmons, curadora do AMNH. No México florestas tropicais úmidas e desertos ocorrem separados por distâncias relativamente pequenas quando comparados com as distâncias entre as amostras coletadas no Brasil. Morcegos habitando estes dois ecossistemas podem apresentar modificações morfológicas relacionadas às diferentes condições climáticas destas regiões. Assim, a comparação da morfologia entre animais capturados nestas duas diferentes formações vegetais poderia demonstrar se existem adaptações locais nesta espécie para condições climáticas diversas. Tais mudanças poderiam ser fruto de plasticidade fenotípica ou fixadas geneticamente: esta hipótese

poderia ser testada num momento posterior, através de estimativas de fluxo gênico utilizando marcadores moleculares.

Outra hipótese biogeográfica comumente levantada é a da Cordilheira dos Andes como barreira ao fluxo gênico. Como as localidades das amostras são conhecidas, é possível realizar uma comparação entre os espécimes provenientes de lados opostos da cordilheira para testar o papel desta como barreira ao fluxo gênico.

Por último, para a espécie de morcego *Carollia brevicauda* existem clados mitocondriais distintos para duas regiões geográficas: o Planalto das Guianas e a Amazônia andina (Hoffman & Baker 2003). Como *D. rotundus* ocorre nestas mesmas áreas, optou-se por testar a diferenciação entre os indivíduos provenientes destas duas regiões geográficas no morcego vampiro.

2.10 ANÁLISE CONJUNTA DE MORFOLOGIA E DADOS MOLECULARES

Para tentar obter uma correlação entre a árvore de genes e a morfologia craniana dos espécimes medidos, foi realizada uma análise utilizando o software treescan com dados multivariados (Maxwell 2006). Este programa é uma extensão do software treescan (Templeton *et al.* 2005) que acomoda dados estatísticos multivariados. Este método define na árvore de haplótipos fornecida pelo usuário *a priori* como um conjunto de partições bi-alélicas. Assim, cada ramo da árvore define um alelo. Para cada teste bi-alélico, cada classe haplotípica ou genotípica é usada como fator em uma análise multivariada de variância (MANOVA), utilizando as medidas fenotípicas como variáveis dependentes. As matrizes resultantes dessa análise são utilizadas para calcular o λ de Wilks (Wilks 1932), que por sua vez é transformado em uma estatística F. Dez mil permutações são realizadas para se avaliar a significância estatística dos resultados dos testes. O λ de Wilks é a forma mais comum de aplicação de um MANOVA. Ao contrário da maioria dos testes, a hipótese nula é rejeitada para valores baixos deste índice. O λ é um valor entre zero e um que mede a quantidade de variabilidade dos dados que não pode ser explicada pelo efeito dos níveis da sua variável (como localidade, neste caso – Zar 1999). Para avaliar a contribuição relativa de cada uma das variáveis o programa também realiza uma análise parcial de Wilks. Detalhes sobre a metodologia podem ser encontrados em Maxwell (2006) e nas referências citadas por este autor.

2.11 ANÁLISE DE MORFOLOGIA DE PÊLOS

Além das análises morfométricas, optou-se pela tentativa de encontrar um novo marcador morfológico que pudesse ser informativo para este projeto. A análise morfológica dos padrões de escamas de pêlos de mamíferos é uma ferramenta comum em estudos de filogenias e foi utilizada com sucesso em morcegos norte-americanos (Amman *et al.* 2002). Como esta técnica estava sendo desenvolvida por outro estudante de doutorado do LABEC, optou-se por testar a possibilidade de haver diferenças conspícuas nos padrões de imbricação dos pêlos.

Para realizar esta análise retirou-se uma amostra de pêlo de animais representando os diferentes clados encontrados na análise de DNAm. Todas as amostras foram extraídas de animais depositados no MZUSP. Dois dos animais selecionados contam também da análise filogenética de DNA (AD769 e AD893 – depositados no MZUSP mas ainda não tombados). Os outros indivíduos foram escolhidos de acordo com sua localidade geográfica – compatível com a distribuição dos clados mitocondriais. A Tabela 2.6 mostra todos os indivíduos analisados:

Nº amostra	Nº campo/MZUSP	Localidade	Filogrupo
1	AD769	Ribeirão Pires - SP	MAS
2	MZUSP16667	Exu – PE	?
3	MZUSP1261	Bicego – BA	MAN
4	MZUSP4383	Caxiricatuba – PA	AMC
5	AD893	Barcelos AM	AMC

Tabela 2.11 – lista de indivíduos cujos pêlos analisados, com números de campo ou de tombo na instituição em que estão depositadas. A última coluna refere-se às siglas dos filogrupos mitocondriais aos quais as amostras foram atribuídas. Estas são, pela ordem: Mata Atlântica sul (MAS), Mata Atlântica norte (MAN) e Amazônia + Cerrado (AMC).

Devido ao fato de não possuir amostras de localidades compatíveis com as localidades amostradas na análise de DNAm, a localidade Exu (PE) foi atribuída a um grupo à parte denominado Caatinga.

Os pêlos foram retirados do dorso do animal, na região interescapular, e mantidos em etanol até o início do procedimento. As peças foram imersas em detergente caseiro “Veja Multi-Usos” diluído em água (1/3) e colocadas no aparelho de ultra-som Thornton T-14 (com temporizador) por um período de 3-20 minutos. Após este período, o material foi

lavado em água destilada corrente e colocado sobre papel filtro e seco ao ar, sendo posteriormente montado em suporte metálico (*stub*) com cola de prata. O material foi coberto com ouro no Sputter Coater Balzer SCD 050. O estudo foi realizado no microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM 940 do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O protocolo detalhado do procedimento pode ser encontrado em Pinto-da-Rocha (1997).

Cada indivíduo teve pelo menos três diferentes amostras de pêlo visualizadas no microscópio. A amostra de cada indivíduo com melhor resultado teve imagens gravadas com aumento de 500 e 1000 vezes. Sempre a porção medial do pêlo foi analisada. A análise da morfologia dos pêlos foi realizada através da inspeção visual das imagens captada pelo microscópio utilizando a nomenclatura de Benedict (1957).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

“Quem quiser nascer tem que destruir o mundo”

Hermann Hesse

3.1 MARCADOR MITOCONDRIAL

Foram seqüenciados 118 indivíduos no total, representando 54 localidades. Para cada indivíduo obteve-se uma seqüência de 832 pares de base, e 72 haplótipos foram descritos para *D. rotundus* e dois para *Diphylla ecaudata*. No total, 233 sítios variáveis foram encontrados, sendo 152 parcimoniosamente informativos, ou seja, compartilhados por dois ou mais taxa. A tabela com todos os indivíduos e suas respectivas localidades com coordenadas geográficas encontra-se no Anexo 1. A composição média das seqüências foi heterogênea - 22% de T, 34,7% de C, 30,1% de A e 13,1% de G. O modelo evolutivo sugerido pelo programa Modeltest e utilizado para as análises filogenéticas de distância e de probabilidade foi o modelo *general-time reversible* (GTM) que atribui uma probabilidade diferente para cada substituição nucleotídica, com um parâmetro *gamma* de 0,3373.

A Figura 3.1.1 mostra a árvore filogenética de neighbor-joining (NJ) para os haplótipos encontrados. A árvore obtida pelo método de máxima parcimônia (MP) é idêntica a esta, exceto pela posição de um táxon. Portanto optou-se por representar graficamente somente a primeira. É possível notar que existem cinco clados monofiléticos representando diferentes regiões geográficas e domínios ecomorfológicos. São eles: Mata Atlântica norte (MAN), Mata Atlântica sul (MAS), Pantanal (PAN), América Central (AC) e Amazônia e Cerrado (AMC). A distribuição de cada um desses clados no mapa das Américas do Sul e Central pode ser encontrada na Figura 3.1.2. Não foram identificadas zonas de contato nem haplótipos compartilhados. As duas árvores (NJ e MP) diferem na posição de um haplótipo (comum a dois indivíduos da mesma localidade, no Equador): na árvore de NJ esse táxon é basal ao clado AC, enquanto na árvore de consenso das 165 topologias igualmente parcimoniosas de MP este táxon é basal ao clado AMC.

A árvore de máxima verossimilhança e a árvore bayesiana apresentaram topologias idênticas (representados na Figura 3.1.3). Ambas identificaram os clados MAS, MAN, PAN e AC, como já mostrado para as outras análises. Todos estes clados possuem alto apoio representados pelos valores de bootstrap na árvore de NJ e pelas probabilidades posteriores no caso da análise Bayesiana – inclusive altos valores de suporte para o clado formado por PAN e AC. O resultado relevante no caso das reconstruções que utilizam o método probabilístico é a não-existência de um clado amazônico (AMC) como observado nas outras árvores (Figura 3.1.1). Observa-se que os haplótipos que deveriam formar o clado AMC estão espalhados pela filogenia na forma de

uma politomia basal dentro de *D. rotundus*. Tal fato pode ser explicado pela inadequação do grupo externo para esta análise (os esforços para amplificar e seqüenciar indivíduos da espécie *Diaemus youngi* – que provavelmente seria o grupo externo mais adequado – não renderam resultados). Os haplótipos de *D. ecaudata* possuem uma altíssima divergência nucleotídica (superior a 30%) com relação ao grupo interno. Assim, como os haplótipos do grupo AMC são muito similares (ver a Tabela 3.1.1 para valores médios de divergência entre os haplótipos deste grupo) e são praticamente eqüidistantes do grupo externo, os ramos curtos que ligam estes haplótipos foram colapsados na árvore que transformou este grupo numa série de pequenos clados em uma politomia basal na árvore. Este fenômeno é denominado *long-branch attraction* e apesar de ter sido originalmente descrito em análises de MP, pode ser observada também em análises de MV (Arbogast *et al.* 2002). O teste de Shimodaira-Hasegawa realizado nestas topologias mostrou que a diferença no valor de verossimilhança entre a árvore observada e a árvore na qual o clado AMC é monofilético é estatisticamente significativa ($p=0,006$), o que mostra que a abordagem probabilística não recupera a mesma topologia que os outros métodos.

Como existem amostras para as quais por motivo de tempo ao final do processo de coleta de dados não foi possível seqüenciar os dois fragmentos do citocromo *b* mas que poderiam trazer resultados interessantes, optou-se por fazer uma análise com apenas metade do fragmento para que estas amostras pudessem ser analisadas, mesmo que preliminarmente. Assim optou-se por fazer uma análise preliminar utilizando-se somente dos 401 pares de base representando o fragmento final do gene mitocondrial estudado e uma amostra do conjunto total. Optou-se por utilizar um modelo de evolução molecular semelhante ao selecionado para a análise com o conjunto completo de amostras (GTR+G, sendo que tanto a matriz de substituição quanto o parâmetro *gamma* foram estimados pelo software PAUP). O resultado da reconstrução filogenética destas seqüências está representado resumidamente na Figura 3.1.4, mostrando somente a posição relativa das amostras que não fizeram parte da análise com o fragmento completo para o gene *cyt b*.

Figura 3.1.1: árvore filogenética de máxima parcimônia para os dados mitocondriais. Os valores acima dos nós referem-se a valores de *bootstrap*. A análise identificou 5 clados: Mata Atlântica norte (MAN). Mata Atlântica sul (MAS), Amazônia e Cerrado (AMC), América Central (AC) e Pantanal (PAN).

Figura 3.1.2: distribuição das amostras seqüenciada no mapa das Américas do Sul e Central. As diferentes cores correspondem aos diferentes clados mitocondriais, como indicado. As principais formações vegetais da área de amostragem também estão representadas no mapa.

Figura 3.1.3: árvore de verossimilhança para os dados mitocondriais. Nesta reconstrução, o clado AMC não é monofilético.

	MAN	MAS	AMC	AC	PAN
MAN	2%				
MAS	5,5%	0,8%			
AMC	7,6%	6,8	2,1%		
AC	7,6%	7%	6,1%	2,8%	
PAN	9,1%	8,5%	9%	9,1%	0,6%

Tabela 3.1.1: valores de divergência média dentro e entre os clados identificados nas análises do gene mitocondrial.

Figura 3.1.4: detalhe da árvore rodada somente com metade do fragmento do gene mitocondrial, mostrando a posição de amostras do clado AMC e PAN que não puderam ser incluídas na análise anterior.

São dois os resultados ligados a essa árvore que devem ser avaliados. O primeiro diz respeito ao clado PAN. As amostras coletadas em Jangada (MT – FM 46, 50 e 51) fazem parte deste clado. O município de Jangada localiza-se a 80 quilômetros a sudeste de Cuiabá, em uma área de Cerrado próxima a uma elevação montanhosa coberta por floresta, fora da área do Pantanal. Assim essas amostras representam ao mesmo tempo uma ampliação da distribuição do clado PAN e a constatação de que esta linhagem não está associada somente ao Pantanal mas sim a uma região geográfica, no caso o oeste do Brasil e possivelmente estende-se aos países vizinhos como Bolívia e Paraguai.

O segundo resultado diz respeito às amostras coletadas na ilha Cavianas do Meio, no arquipélago de Marajó (as amostras cujo número de campo se inicia com ICC). Apenas para a amostra ICC1 o fragmento completo do gene mitocondrial pôde ser seqüenciado. Como é possível observar na Figura 3.1.4, todos os indivíduos da ilha de Cavianas possuem haplótipos muito semelhantes e pertencem ao clado AMC. Assim a não inclusão de todos indivíduos coletados nesta localidade não prejudica as análises filogenéticas.

A Tabela 3.1.1 mostra os valores de divergência nucleotídica média entre os clados identificados na reconstrução filogenética através do modelo selecionado pelo programa Modeltest. Os valores de divergência intraclados são semelhantes aos valores intraespecíficos descritos para outras espécies de morcegos, enquanto os valores de divergência entre os clados assemelham-se (na maior parte das vezes são maiores) às distâncias encontradas entre espécies congêneras. De acordo com Bradley & Baker (2006), tais valores observados devem ser considerados para uma revisão relacionada ao número de espécies que formam este táxon.

Nas análises de clados agrupados, o programa TCS identificou os mesmos clados que as análises filogenéticas tradicionais. Os altos índices de divergência nucleotídica impediram que os clados fossem conectados pelo algoritmo de parcimônia estatística implementado pelo software, gerando assim várias redes que não poderiam ser conectadas, tornando as análises subseqüentes impraticáveis. Como todas as outras análises filogenéticas reconhecem MAN e MAS como grupos-irmãos, optou-se por realizar uma análise semelhante a descrita em Tchaicka *et al.* (2007) que considera a união entre estes dois clados como último clado na hierarquia da rede, independente de onde essas redes poderiam estar conectadas. Desta forma torna-se possível utilizar a chave de inferência para o processo que deu origem ao resultado encontrado para estes dois clados. Como a relação entre os outros clados não é bem resolvida, este recurso só

pôde ser utilizado neste caso. As redes de haplótipos podem ser visualizadas na Figura 3.1.5.

Ao utilizar a chave de inferência do programa GEODIS, dois resultados são possíveis: se for considerado que a área entre os dois clados não foi amostrada (afinal a zona de contato não foi encontrada) o resultado da análise é inconclusivo: não é possível distinguir entre fragmentação e isolamento por distância. Por outro lado, se for considerado que a área entre os clados foi amostrada, o resultado da chave de inferência é de fragmentação alopátrica. Esta última possibilidade é a mais plausível uma vez que é possível observar que existe uma transição discreta dos haplótipos que são compartilhados entre localidades distantes por haplótipos altamente divergentes em distâncias comparativamente pequenas (ver abaixo). Como a amostragem é bastante descontínua, é provável que se a análise fosse expandida para todos os clados identificados esse resultado se repetisse. Assim esta análise não apresentou resultados substancialmente diferentes das outras análises filogenéticas.

A estruturação encontrada nas análises filogenéticas refletiu-se nas análises de genética de populações. O índice de fixação encontrado para a amostra como um todo foi alto e estatisticamente significativo ($F_{st} = 0,16$; $p < 0,05$). Os valores de F_{st} calculados para as comparações par a par entre os grupos definidos pela análise filogenética estão na Tabela 3.1.2. A maior parte das comparações apresentou um valor de F_{st} estatisticamente significativo. Surpreendentemente, clado MAN não possui F_{st} significativo com os clados AMC a AC, que por sua vez também não possuem F_{st} significativo entre si. Os resultados da análise de AMOVA também refletem a estruturação encontrada: 15,85% da variação encontrada ocorre entre os grupos, enquanto o restante (84,15%) dentro dos mesmos. Todos os testes de neutralidade aplicados aos grupos foram não-significativos exceto para o clado MAS, onde tanto o valor de D de Tajima (-2,18; $p=0,003$) e F_s de Fu (-4,72; $p=0,002$) foram significativos.

Figura 3.1.5: a análise do marcador mitocondrial com o programa TCS gerou duas redes de haplótipos (correspondentes aos clados MAN, e MAS) que não puderam ser conectados pelo algoritmo de parcimônia estatística. O clado MAS é o que está na parte superior; o clado MAN está representado em parte pela rede na parte inferior da página. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os números referem-se a passos mutacionais.

	PAN	AMC	AC	MAN	MAS
PAN	-				
AMC	0,127*	-			
AC	0,124*	0,01	-		
MAN	0,14*	0,027	0,027	-	
MAS	0,32*	0,22*	0,22*	0,22*	-

Tabela 3.1.2: valores de F_{st} nas comparações par a par entre os clados identificados pelo marcador mitocondrial. Os valores seguidos de um * são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

As estimativas coalescentes de t , m e θ apontaram para cenários distintos. Em duas das comparações entre populações (MAS X PAN e MAN X PAN) o modelo em que foi estimada uma taxa de migração foi significativamente melhor do que o modelo onde $m=0$ utilizando a equação de Akaike (1985), mesmo com os dados apontando uma divergência nucleotídica média entre os grupos superior a 10% (Tabela 3.1). Este resultado rejeita a hipótese de um evento vicariante em função de uma longa história de baixo fluxo gênico (Palsbøll *et al.* 2004). Os valores de m estimados foram tão baixos que podem ser considerados insignificantes, porém valores de m maiores que 0 tornam a distribuição de probabilidades de t *flat* e não é possível datar o evento de separação por este método. No caso do clado AC, o modelo que admite migração foi o melhor para todas as comparações exceto uma (AC X NAF), porém em todas as comparações a distribuição de valores de T possui uma distribuição unimodal, indicando um evento vicariante a partir do qual o fluxo gênico foi reduzido a valores insignificantes como nas comparações anteriores. Para todas as outras comparações entre pares de populações o melhor modelo foi o que apresentava $m=0$, ou seja, um modelo de vicariância sem fluxo gênico. Esta estimativa resultou em uma superfície unimodal de valores de verossimilhança para t em cada uma das comparações. Os resultados das estimativas coalescentes e não-coalescentes estão presentes na Tabela 3.1.3. Ambas as estimativas são similares e mostram resultados compatíveis com vicariância pleistocênica.

	Tempo estimado (coalescente)	Tempo estimado (não-coalescente)
MAS x MAN	400.000-800.000	350.000-700.000y
MAS x AMC	535.000-1My	390.000-800.000y
MAS x PAN	-	835.000-1.6My
MAN x AMC	540.000-1.1My	340.000-680.000y
MAN x PAN	-	770.000-1.5My
AMC x PAN	640.000-1.2My	545.000-1.1My
AC x MAS	582.000-1.1My	520.000-1My
AC x MAN	600.000-1.3My	520.000-1My
AC x AMC	600.000-1.3My	360.000-750.000y
AC x PAN	685-1.35My	770.000-1.6My

Tabela 3.1.3: estimativas coalescentes e não-coalescentes de tempo de divergência entre os clados mitocondriais descritos nas análises filogenéticas.

A estrutura detectada para o marcador mitocondrial poderia ser atribuída à filopatria de fêmeas, dadas as características deste marcador. As fêmeas de *D. rotundus* realmente costumam permanecer na colônia onde nasceram, ou podem se unir a uma outra colônia não distante da qual onde nasceu. Além disso, Wilkinson (1985) reconhece que grupos de fêmeas mudam de colônias com alguma frequência, ou seja, há evidências coletadas no campo sobre dispersão de fêmeas. Desta forma, caso o padrão encontrado para o marcador mitocondrial resultasse somente da filopatria de fêmeas e dispersão limitada, a expectativa é de que o padrão descrito fosse de isolamento por distância. Ao invés disso, o que se observa são transições discretas entre linhagens altamente divergentes. Na área de Mata Atlântica, por exemplo, é possível encontrar o haplótipo mais comum no clado MAS (D2) em localidades muito distantes – como o sul do Estado de Minas Gerais e o Estado do Rio Grande do Sul (cerca de 1000km em linha reta) – enquanto entre as localidades Paraisópolis (MG) e Ibitipoca (MG) a distância em linha reta é inferior a 200km, mas já é possível encontrar linhagens que divergem em mais de 7%. Assim, o padrão descrito deve ser fruto de um processo distinto de filopatria de fêmeas com dispersão limitada.

O clado MAS é o que possui um padrão compatível com refúgios pleistocênicos. De acordo com Lessa *et al.* (2003) a existência de refúgios pressupõe uma contração

populacional associada à fragmentação do habitat e uma subsequente assinatura de expansão (*bottleneck*) nos marcadores moleculares que pode ser fruto de uma expansão demográfica ou geográfica, já que ambas as expansões deixam a mesma assinatura em marcadores de sequência (Ray *et al.* 2005). Uma simples observação superficial dos dados confirma esta hipótese: os haplótipos mais comuns no extremo norte da distribuição destes clados (D2) pode ser encontrado no extremo sul da distribuição (RS), resultado congruente com uma rápida expansão geográfica e demográfica. Tal observação possui apoio dos testes estatísticos implementados – os valores de D de Tajima e F_s de Fu foram negativos e estatisticamente significativos para este clado. Este padrão de expansão populacional nas áreas sudeste e sul do Brasil foi descrito recentemente para o Passeriforme *Xyphorhynchus* (Cabanne *et al.* 2007) e para uma espécie de bromélia encontrada somente em florestas (Palma-Silva 2008) utilizando dados de microssatélites, sendo este último uma evidência da expansão recente de áreas de floresta Atlântica para o sudeste e sul do país.

O padrão encontrado para o território brasileiro – com uma Mata Atlântica monofilética separada de clados do Oeste do Brasil – é coincidente com as províncias biogeográficas descritas por Koopman (1976) para a mesma área (Figura 3.1.6). De acordo com a hipótese de Koopman, haveria duas grandes áreas de endemismo – leste e oeste – no território brasileiro separados pela diagonal seca do Cerrado. Com a inclusão da localidade Jangada (MT) na análise com meio fragmento do gene *cyt b*, ficou muito claro essa divisão longitudinal ao invés de quatro clados no Brasil sem relações claras. É consenso na literatura que as matas Atlântica e Amazônica já foram conectadas no passado, tornando-se separadas nos períodos mais áridos do terciário (Oliveira-Filho & Ratter 1995; Bigarella *et al.* 1975). O trabalho aqui presente não só encontra clados separados pela diagonal seca do Brasil Central mas também mostra que amostras coletadas nesta região possuem afinidade filogenética com a Amazônia (localidades como o Distrito Federal e sul do Tocantins) ou com o clado PAN (Jangada, MT) – ao invés de formarem um clado independente, como seria esperado se o padrão fosse fruto de deriva genética associado a um isolamento por distância. Assim, os animais que ocupam a área de cerrado são provavelmente frutos de uma colonização relativamente recente desta área a partir destes outros refúgios em áreas mais úmidas. Este resultado possui ainda um paralelo por Costa (2003) que observou que pequenos mamíferos não voadores (marsupiais e roedores) coletados nas áreas de Cerrado também possuíam afinidade

filogenética com sua população de origem, sendo esta sempre ou Amazônica ou Mata Atlântica.

Figura 3.1.6: províncias biogeográficas descritas por Koopman (1976) para o Brasil.

Neste estudo a Mata Atlântica foi descrita como uma área composta, com componentes norte e sul (MAN e MAS). Esta divisão latitudinal da Mata Atlântica já foi descrita anteriormente para anfíbios (Muller 1973; Lynch 1979), répteis (Vanzolini 1988), aves (Bates *et al.* 1998) e opiliões (Pinto-da-Rocha & Silva 2005) utilizando análise parcimoniosa de endemidade. Mais recentemente esta divisão também foi encontrada em estudos que utilizaram marcadores moleculares na espécie de morcego *Carollia oerspicillata* (Ditchfield 2000), em pequenos mamíferos não-voadores (Costa 2003), em uma espécie de canídeo (Tchaicka *et al.* 2007), aves passeriformes (Cabanne *et al.* 2007), em cobras (Grazziotin *et al.* 2006) e répteis geconídeos (Pellegrino *et al.* 2005), sendo este último atribuindo a fragmentação encontrada a uma barreira fluvial. Existem numerosas referências bibliográficas que através de estudos paleopalinológicos demonstraram que áreas que são contemporaneamente cobertas pela Mata Atlântica foram no passado áreas abertas e que isto se deveria às flutuações climáticas associadas às glaciações (Behling 1999, 2002; Behling & Lichte 1997; Lichte & Behling 1999).

Um estudo recente (Carnaval & Moritz 2008) relacionou dados de simulação climática com estudos paleopalinológicos e de filogeografia e descreveu um cenário onde durante o Pleistoceno existiu uma área de floresta sempre verde contínua na Bahia, enquanto ao sul desta área – em especial no sudeste – as simulações mostraram que o clima não seria capaz de sustentar uma área com florestas como as de hoje. Os autores concluem que nesta região a floresta deve ter ficado restrita a fragmentos muito pequenos em áreas de maior pluviosidade, hipótese que já havia sido aventada anteriormente. De acordo com Whitmore & Prance (1987) esta região teria sido sujeitada a um regime climático que limitara a floresta não a um refúgio, mas a uma grande fragmentação. Os resultados encontrados neste estudo corroboram estes trabalhos: a região MAN não possui desvios significativos da neutralidade para nenhum marcador – coerente com uma história demográfica sem gargalos – enquanto para MAS existe um padrão congruente com o cenário descrito por Carnaval & Moritz (*op. cit.*) – restrito a fragmentos muito pequenos, houve um gargalo populacional e um acentuado processo de deriva genética, seguido por uma rápida expansão demográfica e geográfica que seguiu a expansão da floresta no Holoceno.

Ainda segundo estes autores, as simulações mostraram a existência de um outro refúgio mais ao norte na costa brasileira, na região de Pernambuco e Paraíba, onde hoje situam-se os brejos de altitude. Este componente da Mata Atlântica foi reconhecido para anfíbios (Muller 1973; Lynch 1979) e recentemente para aves (Cabanne *et al.* 2007). No caso deste estudo há apenas uma amostra de Pernambuco (KS156) que na árvore filogenética encontra-se, em todos métodos, basal ao clado MAN, tendo claramente afinidade filogenética com este clado. É possível que se mais amostras desta região fossem amostradas, um clado fosse formado como grupo-irmão de MAN. De qualquer forma, o extremo norte da Mata Atlântica parece estar ligado aos outros cladogramas da Mata Atlântica e não ao leste da Amazônia como postulado e como observado para alguns taxa (Costa 2003).

Esta fragmentação florestal descrita para a Floresta Atlântica parece não ter ocorrido na Amazônia (Lessa *et al.* 2003; Colinvaux 2005 e referências; Carnaval & Moritz 2008 e referências). No caso dos dados aqui apresentados, não há estruturação geográfica dentro da floresta Amazônica, tampouco sinais de expansão compatíveis com refúgios pleistocênicos.

É difícil situar o Pantanal neste panorama de relações existentes entre as Florestas Atlântica e Amazônica no território brasileiro; tal região é muito pouco estudada

e não foi possível encontrar uma bibliografia onde um grupo pertencente a esta localidade estivesse localizado num contexto maior, através de suas relações com as outras áreas. Na reconstrução filogenética apresentada neste trabalho, o Pantanal parece fazer parte de um grupo filogenético que pode na melhor das hipóteses ser chamado de oeste. Um estudo realizado com animais coletados em regiões de Cerrado fisicamente próximas ao Pantanal sul-mato-grossense revelou que os animais desta região têm uma relação muito próxima com os amazônicos, como exemplificado pelo marsupial *Marmosa murina* e o roedor *Oryzomys megacephalus* (Costa 2003). Assim, este estudo dá suporte ao resultado aqui descrito que apresenta os morcegos do Pantanal como parte de um quadro maior onde a Amazônia também é parte integrante. Porém somente com estudos mais detalhados, com uma amostragem do oeste da Amazônia que mostre a área de contato entre esses clados, bem como a inclusão de amostras de fora do país, será possível compreender melhor as relações filogenéticas existentes entre a região do Pantanal e as demais.

Existe uma aparente contradição entre os hábitos descritos para o morcego vampiro comum contemporaneamente e o padrão de fragmentação histórica descrito para o DNAmT. Esta contradição pode ser fruto de um grande número de variáveis. A primeira diz respeito ao tipo de fragmentação que ocorreu em determinadas áreas que compõem a amostragem. De acordo com Lichte & Behling (1997) e Behling & Lichte (1999) as áreas de floresta remanescentes na região sudeste do Brasil não estavam separadas por zonas de vegetação semelhantes ao Cerrado de hoje, mas por formações ainda mais secas. Esse tipo de formação poderia dificultar a dispersão deste morcego na paisagem. Outro fato importante a ser colocado é a diferença na composição das comunidades animais do período pleistocênico em comparação aos atuais. Como delineado na introdução, as outras espécies pertencentes ao gênero *Desmodus* – muito maiores que *D. rotundus* – se extinguíram juntamente a megafauna de mamíferos ao final do Pleistoceno. De acordo com Ray *et al.* (1988) estas espécies provavelmente se alimentavam da megafauna de mamíferos que, por sua vez, habitavam em sua maior parte as áreas abertas (Cartelle 1999). O morcego vampiro comum, de acordo com relatos de fazendeiros do arquipélago de Marajó, não é capaz de se alimentar de búfalos por não conseguir perfurar seu couro. Dessa forma é muito improvável que *D. rotundus* pudesse se alimentar de grandes mamíferos hoje extintos. Com grandes mamíferos ocupando as áreas abertas, as presas do morcego vampiro comum provavelmente ficavam restritas aos fragmentos florestais remanescentes no período. Assim, por mais que contemporaneamente este morcego

ocorra em todos os biomas presentes no Brasil, uma mistura de flutuações climáticas associadas a uma mudança da fitofisionomia, somada à exclusão competitiva entre *D. rotundus* e espécies extintas de morcegos vampiros, bem como entre a megafauna de herbívoros que servia de alimentação para morcegos vampiros gigantes e a fauna de médio porte da qual *D. rotundus* se alimenta contribuem para o padrão filogeográfico descrito para o DNAmT.

Assim o marcador mitocondrial revelou uma forte estruturação geográfica onde se destaca a distinção entre clados a leste (Mata Atlântica) e a oeste (Amazônia, Pantanal e América Central). Os tempos de divergência e a demografia histórica destes clados são compatíveis com refúgios pleistocênicos e possui um paralelo numa série de outras taxa.

3.2 GENE RAG2

Para o gene RAG2 88 indivíduos foram seqüenciados para um fragmento de 774 pares de base, totalizando 166 cromossomos amostrados. Os indivíduos amostrados pertencem a todos os clados descritos para o DNAmT exceto o clado PAN, por dificuldades técnicas. O número de sítios heterozigotos encontrados foi de 15, sendo 43 sítios variáveis no total. Após as análises com o software PHASE, 32 combinações de sítios heterozigotos foram sugeridas pelo programa revelando a existência de 45 haplótipos. A diversidade haplotípica encontrada é alta: 0,896. O valor observado para a diversidade nucleotídica por sua vez foi bastante baixo: 0,00314. Esta diferença se traduziu num valor de D de Tajima negativo e estatisticamente significativo ($D = -2,07$, $p < 0.05$). A divergência nucleotídica média entre os haplótipos foi de somente 0,6% e houve extenso compartilhamento de haplótipos entre as populações, como mostra a Tabela 3.2.1. Como esperado para dados como os descritos, a árvore de haplótipos para este marcador é não informativa acerca de estruturação geográfica para este morcego. O resultado encontrado para as análises de dN/dS para este gene foi de aproximadamente dez substituições sinônimas para cada substituição não-sinônima, resultado congruente com marcadores nucleares neutros descritos na literatura (Li 1997).

Apesar do compartilhamento de haplótipos entre as populações, os valores de F_{st} encontrados entre as mesmas foram todos estatisticamente significativos, ou seja, existe diferenciação entre as populações. O teste AMOVA mostrou que aproximadamente 95% da variância alélica encontra-se dentro das populações, e pouco mais de 5% entre as mesmas. Os testes de neutralidade foram todos não significativos exceto para os

indivíduos atribuídos a população MAS identificada pelo DNAm (D=-1,52, p=0,42; Fs=-8,68, p=0,002), resultado idêntico ao obtido para o DNAm para testes de neutralidade intrapopulacionais. Os valores de Fst para as comparações entre pares de populações estão presentes na Tabela 3.2.1.

	SAF	NAF	AMC
SAF	-	0,018	0.036
NAF	6	-	0,009
AMC	5	5	-

Tabela 3.2.1: Diagonal inferior: número de alelos compartilhados entre as populações para o gene RAG2. Diagonal superior: Valores de Fst para as comparações.

Na análise de clados agrupados, a rede obtida apresentou um grande número de ambigüidades. Para que a realização da próxima etapa de inferência utilizando o software GEODIS se tornasse possível, haplótipos com múltiplas conexões foram retirados da matriz de análise com o intuito de minimizar as ambigüidades. A Figura 3.2.1 mostra a rede de haplótipos após a exclusão de vários indivíduos, ainda com diversas ambigüidades. O agrupamento hierárquico de clados nas redes haplotípicas para os dois genes nucleares foi feito manualmente. As análises realizadas com o software GEODIS não encontraram nenhum tipo de correlação estatística significativa entre clados e geografia, de forma que todas as análises em todos os níveis foram inconclusivas.

Figura 3.2.1: rede de haplótipos para o marcador RAG2. O tamanho dos círculos (ou quadrado) são proporcionais a sua frequência na amostra. Os números indicam passos mutacionais. Notar o grande número de ambigüidades na rede e a ausência de uma estruturação clara.

3.3 GENE DRB-1

Para o gene DRB-1, foram obtidas 31 seqüências de 282 pares de base cada. A distribuição das amostras com relação aos clados definidos com o marcador mitocondrial foi bastante assimétrica: 13 amostras do clado AMC, 11 do clado MAN e 5 do clado MAS. Foram identificados 14 sítios variáveis, incluindo dois sítios onde há um polimorfismo de inserção/deleção (indels).

Foram utilizadas como referência para o alinhamento e para possível utilização como grupo externo nas análises filogenéticas seqüências de *Carollia perspicillata* e *Phyllostomus discolor* disponíveis na literatura (Kupfermann *et al.* 1998). Porém o alinhamento destas seqüências revelou-se uma tarefa difícil; existe uma enorme quantidade de indels que tornam algoritmos de alinhamento ineficientes, de forma que o alinhamento teve de ser feito manualmente. Levando em conta as incertezas de um alinhamento feito desta forma, optou-se por realizar somente uma rede não-enraizada utilizando o programa TCS ao invés de uma árvore filogenética com grupo externo.

O resultado da análise de clados agrupados encontra-se na Figura 3.3.1. Como pode ser observado, o haplótipo mais comum é interno na rede, ou seja, é mais antigo e deu origem aos demais haplótipos separados por um ou mais passos mutacionais. Porém este não é o único haplótipo interno. Na verdade, a figura mostra dois clados: cada um com um haplótipo interno e haplótipos externos. Tal resultado é compatível com a teoria de vantagem divergente alélica (DAA), onde a vantagem de heterozigotos não é simétrica; o heterozigoto só possui vantagem quando seus alelos são altamente divergentes. Tal resultado já havia sido demonstrado em organismos não-modelo (Richman *et al.* 2001). Como já descrito para o outro marcador nuclear, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre haplótipos e geografia.

As análises de genética de populações demonstraram um valor de F_{st} estatisticamente significativo para amostra como um todo, bem como entre MAN e Amazônia e América Central. As comparações entre MAS e as outras populações não obtiveram resultados de F_{st} significativos. Porém a amostragem para essa população é demasiada pouco representativa (apenas cinco indivíduos) e tal resultado foi sem dúvida influenciado por essa amostragem. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 92,35% da variação encontrada para este marcador encontra-se dentro dos grupos e não entre eles, o que reforça o cenário de diferenciação entre as populações. A análise de variância para este marcador encontrou valores muito semelhantes aos descritos para o marcador RAG2 (95% dentro dos grupos).

Figura 3.3.1: rede não enraizada dos haplótipos descritos para o gene DRB em *D. rotundus*. Os círculos pequenos sem identificação representam haplótipos intermediários que não foram descritos. O tamanho relativo de cada círculo ou quadrado representa a frequência de cada haplótipo na amostragem.

A coleta de dados de seqüências do gene DRB-1 foi interrompida e não foi retomada pelo motivo de os resultados preliminares mostrarem mais uma vez, a exemplo do gene RAG2, baixa variabilidade, haplótipos extensamente compartilhados entre os clados mitocondriais e ausência total de monofilia recíproca entre os indivíduos pertencentes a clados mitocondriais distintos. Assim optou-se por concentrar os esforços nas análises de simulações dos dados nucleares.

3.4 MARCADORES MICROSSATÉLITES

Após realizar todos os testes delineados na seção Material e Métodos, apenas uma pequena parcela dos marcadores apresentou bandas do tamanho esperado, e mesmo assim muito fracas. Na maior parte dos casos nenhuma amplificação foi possível; em outras houve interação inespecífica, com os *primers* amplificando uma série de fragmentos de tamanhos variáveis, sendo que nenhum correspondia ao espectro de tamanho esperado dos alelos.

Os marcadores microssatélites que tiveram banda visível no gel de agarose (AjA 47, 185, 180, 2 e 110) foram corridos no gel de acrilamida. A acrilamida é um material sintético que permite distinguir bandas de tamanho muito semelhante, como é o caso dos alelos de microssatélites. Dois indivíduos de cada filogruppo definido pela análise de DNAm_t foram testados para estes marcadores para checar se os diferentes filogruppos possuíam alelos diferentes. Todos os loci mostraram-se monomórficos, ou seja, não existe nenhuma variação alélica para estes loci em *D. rotundus*.

3.5 OUTROS MARCADORES TESTADOS

Além dos marcadores microssatélites outros cinco marcadores nucleares foram testados: o gene *DmD*, o gene 2C3, o gene da β -globina, o gene Hprt1 e o gene da κ -caseína.

Os dois fragmentos do gene *DmD* foram testados exaustivamente e nenhuma amplificação foi possível. Tais *primers* foram desenhados para humanos e aparentemente não possuem complementaridade em *D. rotundus*. Tal fato é surpreendente pois *primers* desenvolvidos para espécies mais distantes filogeneticamente obtiveram bandas de DNA visíveis em gel de agarose. O mesmo aconteceu com o gene 2C3: nenhuma amplificação foi possível.

No caso do gene κ -caseína, foi possível obter amplificações com o *pool* de DNA em três temperaturas diferentes - entre 61 e 64°C de temperatura de anelamento. O tamanho do fragmento amplificado foi de 1700 pares de base, mesmo tamanho do gene. O problema com as amplificações foi que mesmo alterando as concentrações e condições da PCR, as bandas amplificadas sempre apareceram com pouca intensidade no gel de agarose, ou seja, pouco DNA era amplificado na reação. O mesmo padrão se repetiu quando as amostras foram amplificadas. Seguiu-se a reação de sequenciamento e constatou-se que a pouca quantidade de DNA amplificado inviabilizou esta etapa; todas as reações de sequenciamento fracassaram, exceto uma. Esta sequência possuía um pequeno fragmento de 200 pares de base cuja leitura foi razoável. O passo seguinte foi consultar o *Genbank* para constatar se essa sequência pertencia ao gene da κ -caseína. Porém descobriu-se que esse fragmento não correspondia a este gene mas a outro gene completamente diferente presente em mamíferos. Ou seja, a reação de amplificação não só produziu pouco DNA como possivelmente os *primers* não anelaram na região esperada do DNA. Assim, estes primers não possuem utilidade para este projeto.

O gene *Hprt1* pôde ser amplificado nas mesmas condições do gene *RAG2*. O fragmento amplificado foi do tamanho esperado (2000 pares de base), porém a concentração do produto amplificado foi baixa e não foi possível realizar o sequenciamento, como no caso anterior. O tamanho do fragmento torna impossível o sequenciamento em um passo só. Seria necessário desenhar *primers* internos a partir de sequências obtidas com os *primers* de amplificação desenvolvidos por Gerald *et al.* (2006). Devido à grande quantidade de esforço envolvido em toda essa operação e a este insucesso inicial, decidiu-se que seria mais produtivo procurar um novo marcador do que insistir neste gene, que poderia não gerar resultados razoáveis.

O gene da β -globina foi testado em um *pool* de DNA e teve uma amplificação com boa quantidade e concentração de produto em várias temperaturas diferentes de *annealing*, com um fragmento do tamanho esperado (1200 pares de base). Diante destes resultados, foi decidido partir para a amplificação e sequenciamento de amostras. O problema é que nenhuma das amostras amplificou nas condições estabelecidas com o *pool*. Após várias tentativas frustradas, decidiu-se por testar a reação com *pool* novamente e os resultados anteriores não se repetiram. Duas explicações podem ser propostas: ou o *primer* utilizado degradou nesse ínterim (o que é pouco provável uma vez que ele continua sendo utilizado com sucesso em preguiças) ou os resultados do primeiro teste foram um engano, fruto, por exemplo, de uma contaminação.

3.6 SIMULAÇÕES COALESCENTES

As primeiras etapas das simulações coalescentes passaram pela escolha dos parâmetros utilizados. O programa SIMCOAL precisa que o tamanho efetivo das populações seja fornecido para que a simulação ocorra. Com a taxa de mutação estimada para o gene em mãos, optou-se por utilizar o parâmetro θ ($4N_e\mu$) para calcular o número efetivo de cada população. Após nove corridas independentes do software MDIV, chegou-se a um valor de θ de 20. Como esse valor é considerado altíssimo pela literatura (resultando em uma estimativa de N_e de muitos milhões de indivíduos) e portanto inverossímil, ele foi descartado e decidiu-se utilizar uma outra estimativa. O software IM pareceu mais indicado para realizar a estimativa, uma vez que estima diferentes valores de θ para cada uma das populações e para a população ancestral. Porém este programa estimou um valor de θ ainda maior que do programa anterior (32). Parte do problema em estimar o número efetivo para a população MAS deriva do fato desta ter provavelmente passado por um gargalo seguido de expansão, como colocado nas seções anteriores. Esta flutuação demográfica introduz um desvio na estimativa de parâmetros. A estimativa realizada com o programa WH calculou um valor θ para MAS irreal (872,65), tornando o cálculo do θ ancestral pouco confiável. Devido a estes fatores, decidiu-se por utilizar as estimativas de θ_s realizadas pelo programa Arlequin. Para MAS, o valor de θ utilizado foi o calculado para antes da expansão. Os valores utilizados na simulação foram de 3,66 para AMC, 0,0422 para MAS e de 2,16 para MAN.

As simulações realizadas através do programa SIMCOAL geraram dados incompatíveis com os dados observados: cada uma das réplicas possuía um número irreal de sítios variáveis (na maioria dos casos todos os sítios eram variáveis) e cada sequência criada era um haplótipo distinto. As análises com esse software foram então abandonadas em favor das análises realizadas com o programa MLCOALSIM. Foi gerado um arquivo de saída contendo análises estatísticas das seqüências criadas, que foram comparadas com os dados observados. Apesar de não serem idênticos, o programa apresentou valores de diversidade haplotípica e de número de sítios variáveis compatível com os observados, além de valores de F_{st} estatisticamente significativos em todas as réplicas. Foram realizadas mil simulações de dados, e cada uma das simulações foi utilizada para estimar uma árvore de máxima parcimônia. Os resultados mostraram que em 31,7% das simulações houve monofilia recíproca dos clados AMC, MAN e MAS,

enquanto em 18% nenhum dos clados foi identificado como monofilético. O clado AMC foi identificado como monofilético em 55% das simulações; MAS em 54,2% e MAN em 52,3%. Os resultados não demonstram, como argumentado anteriormente, que vicariância pleistocênica não geraria monofilia recíproca em marcadores nucleares. Ao menos nas condições demográficas estimadas para *D. rotundus*, há uma possibilidade de mais de 30% que se alcance a monofilia recíproca. Porém também não demonstram que este acontecimento seja mais provável que o contrário. Assim as simulações mostram que dadas as condições estimadas de N_e , tempo de divergência e taxa de mutação para um marcador nuclear neutro – no caso o gene RAG2 – existe uma zona cinzenta onde ambos cenários são igualmente prováveis. Assim os resultados obtidos para os marcadores nucleares são compatíveis com um modelo demográfico de alopatria sem fluxo gênico que, dadas as características do marcador, pode ou não gerar a monofilia recíproca que os marcadores mitocondriais possuem.

3.7 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Análises exploratórias

Antes do início das análises é necessário avaliar se existem diferenças morfométricas entre os crânios de machos e fêmeas para uma possível análise dos mesmos sem distinção entre os sexos. Foram comparadas as médias das medidas para ambos os sexos, e foram feitas análises entre os mesmos. Como nenhuma diferença significativa foi encontrada e os resultados para machos e fêmeas mostraram-se indistinguíveis, optou-se por analisar todos os indivíduos conjuntamente.

O primeiro passo nas análises multivariadas consistiu na realização de uma análise exploratória de componentes principais. Tal análise tinha por objetivo detectar algum padrão de diferenciação observável antes da divisão *a priori* dos grupos de espécimes correspondentes aos clados mitocondriais. O resultado desta análise encontra-se na Figura 3.7.1. Como é possível observar, não há distinção entre *clusters* de indivíduos; todos os indivíduos estão dispersos em torno de um centróide de forma uniforme. Quando os grupos são representados por cores e formas diferentes nesta figura, não é possível diferenciá-los, pois estão amplamente sobrepostos.

Mesmo sem encontrar diferenciação nesta análise, optou-se por realizar análises subsequentes com os grupos descritos para o DNAm. Como a análise do marcador é robusta e as linhagens descritas são reais, os grupos utilizados para esta etapa são reais. O intuito da análise não é de constatar se os grupos existem no nível morfológico, mas qual seu padrão de segregação. Além de indivíduos representando os clados mitocondriais, houve um grande número de indivíduos medidos da região da Caatinga. Como esses indivíduos não podiam ser atribuídos a nenhum dos clados mitocondriais, optou-se por criar um grupo próprio para estes (CAA). A Tabela 3.7.1 mostra os resultados da análise discriminante para os espécimes, com os grupos estabelecidos *a priori* sem correção para tamanho, enquanto a Tabela 3.7.2 mostra a mesma análise para os dados com correção. Como é possível observar, existe um alto índice de sucesso ao se atribuir indivíduos aos clados AC e AMC. E na maioria dos casos onde a atribuição de um indivíduo do clado AC é feita erroneamente, é atribuído ao clado AMC, e vice-versa. Quando consideramos os clados AMC e AC como um só, a porcentagem de indivíduos assinalados corretamente para este grupo é de 93,86% para os dados sem

correção e 98,4% para os dados com correção. Este resultado aponta para uma grande similaridade morfológica entre os morcegos pertencentes a estes clados.

Tabela 3.7.1: valores de funções discriminantes para os diferentes grupos atribuídos *a priori*. A primeira coluna representam a porcentagem de indivíduos atribuídos corretamente; as colunas seguintes indicam número de indivíduos pertencentes aquele grupo atribuídos a cada um dos grupos.

	Porcentagem	AC	AMC	MAN	MAS	PAN	CAA
AC	85,26	700	108	0	3	0	10
AMC	68,77	130	348	1	14	4	9
MAN	16,66	14	4	7	7	1	9
MAS	62,41	21	13	3	93	9	10
PAN	57,14	3	0	0	2	8	1
CAA	43,47	52	9	2	15	0	60
Total	72,81	920	482	13	134	22	99

Tabela 3.7.2: valores de funções discriminantes para os diferentes grupos atribuídos *a priori* na análise com total de crânios com correção de tamanho.

	Porcentagem	AC	AMC	MAN	MAS	PAN	CAA
AC	83,65	686	117	1	8	0	8
AMC	60,79	167	307	3	18	3	7
MAN	16,66	13	14	7	4	1	3
MAS	48,64	25	35	1	72	9	6
PAN	35,71	4	2	0	2	5	1
CAA	18,84	56	44	0	12	0	26
Total	66,16	951	519	12	116	18	51

Para os outros grupos a porcentagem de indivíduos atribuídos corretamente é modesta. É possível notar que quando o fator tamanho é considerado, a porcentagem de indivíduos atribuídos a todos os clados exceto MAN é maior, evidenciando que tamanho é um componente importante para distinção deste clado. Por outro lado, sem o fator tamanho 73% dos indivíduos do grupo CAA são atribuídos a AC ou AMC, mostrando similaridade entre estes grupos no formato do crânio. Como esta região não foi amostrada para os estudos moleculares e não há estudos prévios com os animais desta área, torna-

se difícil discutir este resultado. É possível que os espécimes desta região não pertençam a uma única linhagem mas sim que esta região seja um mosaico, sendo recentemente colizada a partir de outras áreas como sugerido na discussão do marcador mitocondrial. No caso do outro grupo com baixo valor de atribuição (MAN) tal resultado pode ser atribuído ao baixo número de indivíduos amostrados, ou a fatores históricos. A região Sul da Mata Atlântica encontra-se sob um regime de temperaturas mais frias em determinadas épocas do ano que o Norte, e provavelmente mais severas ainda durante as glaciações. Assim o fator tamanho pode ter sido selecionado nesta região, por oferecer maior resistência às baixas temperaturas. Na ausência de pressões seletivas, é possível que o tempo de isolamento tenha sido muito reduzido para o surgimento de diferenças morfológicas entre MAN e os demais grupos. Além disso, existe a possibilidade de fluxo gênico, mesmo que reduzido, entre MAN e AMC, como sugerido por Costa (2003).

Figura 3.7.1: análise exploratória de componentes principais no total de crânios mensurados.

Devido a este resultado – e ao fato de os resultados da última análise mostrarem o clado AC como grupo irmão do clado AMC – optou-se por realizar uma análise utilizando como grupos os espécimes que poderiam ser atribuídos à antiga classificação de subespécies descrita para *D. rotundus*: *D. rotundus murinus*, com distribuição desde o México até a bacia amazônica; e *D. rotundus rotundus*, abrangendo o restante da distribuição da espécie até o seu limite sul (Greenhall *et al.* 1983). O resultado desta análise discriminante está na Tabela 3.7.3, e a representação gráfica dos escores canônicos – feitos a partir da análise de componentes principais encontra-se na Figura 3.7.2. Como é possível observar na figura, existe uma grande sobreposição dos valores para estas duas “subespécies”. No caso das funções discriminantes, o resultado é diferente: é possível atribuir com grande precisão um indivíduo à subespécie *murinus*, mas o grau de sucesso ao atribuir-se um indivíduo à subespécie *rotundus* é modesto. Tal resultado demonstra que o grupo *rotundus* possui uma variação considerável, como mostrado no gráfico, não sendo possível caracteriza-lo com confiança em termos de morfologia craniana a partir da distribuição descrita originalmente para a subespécie (Tabela 3.7.3).

	% Corretamente atribuído	<i>murinus</i>	<i>rotundus</i>
<i>murinus</i>	97,56	1482	37
<i>rotundus</i>	63,85	118	212
Total	90,73	1610	255

Tabela 3.7.3: Atribuição de funções discriminantes para as subesbpécies.

Figura 3.7.2: análise de variáveis canônicas com as subespécies de *D.rotundus*, mostrando ampla sobreposição dos valores.

Figura 3.7.3: árvore de *neighbor-joining* construída a partir das distâncias de Mahalanobis calculadas entre os grupos sem correção de tamanho.

Figura 3.7.4: árvore de *neighbor-joining* construída a partir das distâncias de Mahalanobis calculadas entre os grupos com correção de tamanho do crânio.

Quando as mesmas análises são feitas considerando apenas Amazônia e Mata Atlântica, a porcentagem de indivíduos corretamente atribuídos a este último sobe para 85%, e para 89% quando excluídos os indivíduos da Gruta da Saúva, no DF – indivíduos cujos haplótipos mitocondriais fazem parte do Clado AMC, mas cujos crânios foram todos atribuídos ao clado MAS. Esta é uma evidência de fluxo gênico e de um contato entre esses clados em algum momento. Este resultado é congruente com a hipótese formulada por Costa (2003) que propõe que mamíferos pertencentes à Amazônia e à Mata Atlântica permaneceram conectados pelas matas de galeria que cortam a diagonal seca do Brasil central. Assim, no território brasileiro, é possível encontrar duas morfologias relativamente distintas – uma para a Mata Atlântica e outro para a Amazônia, com uma provável área de contato no Brasil central.

As Figuras 3.7.3 e 3.7.4 mostram árvores feitas utilizando distâncias de Mahalanobis através do método *neighbor-joining* para os dados com e sem correção de

tamanho, respectivamente. É possível notar que na árvore dos dados com correção os ramos que separam os grupos são muito curtos e que as topologias são diferentes, evidenciando que o fator tamanho tem grande influência na diferenciação entre os grupos. A árvore construída com os dados não corrigidos possui maior correspondência com os dados de análises discriminantes e também com as análises de F_{st} (ver abaixo).

Como delineado na seção anterior, outras hipóteses biogeográficas foram testadas com o mesmo conjunto de dados. A metodologia utilizada foi a mesma das análises descritas anteriormente. Nenhuma das comparações em nenhum dos cenários descritos apresentou resultados significativos, tanto nas análises de componentes principais quanto nas análises de funções discriminantes, reforçando os resultados anteriores que mostraram baixa diferenciação geral dos crânios.

O cálculo de F_{st} realizado com os grupos delimitados para as análises exploratórias mostrou um valor geral estatisticamente significativo, demonstrando que a espécie é estruturada. Os valores de F_{st} entre os pares de populações foram todos significativos, exceto entre os dois componentes da Mata Atlântica (MAS e MAN). Este resultado é congruente com os resultados obtidos para os marcadores moleculares. A Figura 3.7.5 mostra os grupos representados através das duas primeiras coordenadas principais extraídas da matriz de distância R (Williams-Blangero & Blangero 1989). Nesta análise as duas coordenadas principais representam mais de 90% da variância original da matriz R. Tal resultado também é compatível com os resultados anteriores: como é possível observar, AMC e AC encontram-se mais próximos um do outro que os demais clados, bem como MAN e MAS – e neste o grupo PAN é mais próximo destes, como identificado nas análises de funções discriminantes onde o grupo AC é excluído da análise (resultados não mostrados). Este resultado também é congruente com as análises coalescentes descritas anteriormente, que mostraram que o cenário encontrado entre os clados mitocondriais da Mata Atlântica e o que representa o Pantanal são congruentes com uma longa história de baixo fluxo gênico ao invés de um evento vicariante. A congruência de resultados entre as estimativas coalescentes, os dados de F_{st} para crânios e as análises de estatística multivariada para os mesmos pode ser considerada um indício de maior afinidade histórica entre a Mata Atlântica e esta região sudoeste do Brasil representada aqui pelo Pantanal. No trabalho de Costa (2003) a autora descreve para o gênero *Rhipidomys* uma relação de espécies-irmãs entre táxons ocorrendo em uma área equivalente ao clado MAS no sudeste e um ocorrendo no Oeste da Amazônia, com três localidades amostradas: uma no noroeste de Mato Grosso, uma no Oeste do

estado do Amazonas e uma no Acre. Estas áreas não foram amostradas neste estudo, mas os resultados encontrados podem ser considerados indícios de um padrão semelhante. Restaria realizar um esforço de coleta para identificar as áreas de contato entre os clados PAN e AMC bem como entre PAN e MAS para compreender qual é exatamente a área ocupada por cada clado e quais os possíveis eventos históricos que poderiam originar os dados observados.

Figura 3.7.5: representação gráfica dos grupos num espaço bidimensional onde os eixos representam valores de *eigenvectors*. Os dois primeiros *eigenvectors* (EV1 e EV2) resumizam 85,3% da variância total. A estrela representa o centróide.

3.8 ANÁLISE INTEGRADA DE MORFOLOGIA E MARCADOR MOLECULAR

Para esta etapa utilizou-se uma versão simplificada da árvore de haplótipos gerada para os dados mitocondriais. Como não é possível atribuir um haplótipo para a imensa maioria dos espécimes medidos, optou-se por representar a árvore por uma forma parentética com apenas cinco ramos, cada um representando um clado mitocondrial. Devido à baixa resolução apresentada na árvore entre os clados AC, AMC e PAN, foi decidido que a melhor maneira de representar a relação entre estes clados seria uma politomia – como o programa faz testes hierarquicamente, qualquer outra representação seria equivocada, uma vez que o programa trataria, por exemplo, AMC e AC como mesmo grupo. Assim considerou-se que tratar a filogenia entre os clados fora da Mata Atlântica como uma politomia é uma aproximação válida.

A Tabela 3.8.1 mostra os resultados obtidos para esta análise de forma resumida. Resultados estatisticamente significativos foram obtidos para todos os ramos da árvore, o que aponta para o fato de existir uma morfologia diferente para cada grupo identificado. Tal diferenciação fica evidente com o valor de p : em 10000 permutações, nenhuma foi capaz de identificar um resultado diferente – de onde veio o valor para p de zero. Devido a essa falta de resolução, aplicou-se uma correção de Bonferroni ao tratamento dos dados. Nenhum resultado associado aos testes mudou após esta correção.

A parte inferior da Tabela 3.8.1 mostra os resultados da análise parcial de Wilks para cada variável incluída na amostra. Esta análise realiza uma comparação entre os resultados obtidos com e sem aquela medida no espaço multivariado quando se realiza as comparações entre os grupos pré-estabelecidos. O valor de p associado a cada uma dessas comparações está sumarizado na parte inferior da tabela. Este método minimiza falsos positivos devido a correlações entre medidas do crânio – uma análise como ANOVA é muito suscetível a esse tipo de erro.

		1vs resto	5 vs resto	4 vs resto	3 vs resto	2 vs resto	(1,2) vs resto
		clado1	clado 5	clado 4	clado 3	clado 2	clado 6
	side	1	1	1	1	1	1
	testbr	1	5	4	3	2	6
	wk	0,69453864	0,69689323	0,94592826	0,72243147	0,90015964	0,64927608
	fstat	43,98047	43,4940032	5,71626241	38,421433	11,091406	54,0176876
	wkpval	2,48E-114	3,53E-113	3,33E-12	6,10E-101	1,32E-27	2,51E-137
	logpval	113,605132	112,452691	11,478157	100,21477	26,8796786	136,600302
	pval	0	0	0	0	0	0
	pmult	0	0	0	0	0	0
1a Ct	pwilkpval	0,071	0,3084	0,0217	0,1393	0,9609	0,1017
1b Ct+inc	pwilkpval	0,0016	0,2079	0,0089	0,0009	0,0126	0
1c Cim	pwilkpval	0	0	0,0051	0,0075	0,5896	0
3a Cc	pwilkpval	0,0102	0,5517	0,1411	0,0798	0,1347	0,1553
3b Ccm	pwilkpval	0,0302	0,0015	0,7772	0	0,4723	0,1346
4 B	pwilkpval	0	0,0022	0,0369	0,792	0,9287	0
5a Cpt	pwilkpval	0	0	0,3715	0,0138	0,0453	0
5b Cnf	pwilkpval	0,9029	0,0068	0,2364	0,0099	0,4572	0,5521
6 Cm	pwilkpval	0	0	0,5126	0,2019	0,0766	0
7 Lc	pwilkpval	0	0,3187	0,1638	0	0,2164	0
8 Li	pwilkpval	0,7735	0,0002	0,0478	0	0,0001	0,0277
9 Lp	pwilkpval	0	0	0,385	0	0,7339	0,0001
11 Lcx	pwilkpval	0	0,0035	0,9471	0,2345	0,0065	0,0016
12a Lmt	pwilkpval	0,0209	0	0,0481	0	0,0107	0,0001
13 Acx	pwilkpval	0,0999	0,0062	0	0,0358	0	0
14 Ao	pwilkpval	0,5963	0	0,1505	0	0,2845	0,2411

Tabela 3.8.1: Sumário dos resultados obtidos com o software treescan. As comparações foram feitas para os clados individualmente (colunas) e para ao clado formado pela Floresta Atlântica (última coluna). As primeiras linhas mostram os valores de λ de Wilks, sua conversão em uma estatística F, o valor de p para o teste de Wilks, seu log e mais importante, o valor de p multivariado (em vermelho). As linhas subseqüentes mostram os valores de p para análise parcial de wilks para cada medida, indicando se tal medida contribuiu significativamente para a diferenciação entre os grupos. Os resultados estatisticamente significativos estão destacados em amarelo.

Os resultados apresentados mostram não haver uma só tendência na diferenciação dos crânios em cada clado. As medidas contribuem de forma distinta para diferenciação de cada grupo. A variável comprimento total, por exemplo, só contribui para a diferenciação do clado AMC com relação aos outros; outra medida, como a largura dos mastóideos mostrou-se significativa em todas as comparações. Assim, o que se demonstrou é que as diferenças morfológicas entre os clados são estatisticamente significativas, apesar de não serem conspícuas – como sugerido pelas análises anteriores. Tais resultados devem guiar os esforços para maximizar as diferenças entre estes grupos, selecionando os caracteres capazes de distinguir um grupo do outro, bem como a relação entre eles.

3.9 ESTUDO DA MORFOLOGIA DE PELOS

De acordo com Benedict (1959) os pêlos de *D. rotundus* e *Diaemus youngi* são muito semelhantes: “as escamas são curtas, de repandidas (onduladas) a sinuosas, coronais com margens irregulares”. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os padrões de escamas de pêlo nesta espécie são um pouco mais complicados, além de ser difícil uma análise qualitativa.

Os resultados obtidos (fotos) dos pêlos analisados estão na Figura 3.9.1. Optou-se por mostrar apenas a melhor representação de cada indivíduo, com o mesmo aumento. De acordo com as pranchas desenvolvidas por Benedict (1959), o único indivíduo que apresenta o padrão descrito por ele para esta espécie é o indivíduo número 2 (Exu, PE) com um padrão idêntico ao de seus desenhos e suas fotos. O problema está exatamente em sua descrição das formas. De acordo com os desenhos presentes nesta publicação, torna-se muito difícil distinguir, por exemplo entre um padrão coronal (ou seja, com as escamas do pelo em anéis) irregular e um padrão imbricado crenado. Por acreditar que há sobreposição de escamas optou-se por descrever o padrão do indivíduo número 4 (Caxiricatuba, PA) como imbricado crenado. Assim, esta descrição vai contra o que diz Benedict (1959) quando afirma que todos os Phyllostomidae possuem um padrão coronal de escamas em seus pelos. Os outros três indivíduos foram classificados como coronal hastiforme.

A verdade é que o critério utilizado para descrição dos padrões é bastante subjetivo e, portanto, sujeito a críticas. O importante é ressaltar que, mais uma vez, não houve correspondência entre o padrão descrito para esse caráter e os filogrupos

mitocondriais. O indivíduo que teve um padrão imbricado descrito ao invés de um coronal é de uma localidade no sul do Pará. Tal localidade não foi amostrada pra estudos genéticos, assim como nenhuma localidade no semi-árido nordestino – local de origem do indivíduo 2, que teve um padrão idêntico ao descrito na literatura mas diferente dos outros indivíduos amostrados. Assim apenas cinco indivíduos foram amostrados em caráter experimental.

Figura 3.9.1: fotografias dos pelos realizados com microscopia eletrônica de varredura. O número das fotos corresponde ao número dos indivíduos na Tabela 2.6. O padrão das escamas dos pelos foram denominados como coronal hastiforme (números 1, 3 e 5), coronal ondulado ou sinuoso (número 2) e imbricado crenado (número 4).

CONCLUSÕES

“You know I’m born to lose
and gambling is for fools
but that’s the way I like it, baby
I don’t want to live forever”

Lemmy Kilminster

Baseado nos dados apresentados na seção anterior, é possível concluir que para *Desmodus rotundus*:

1. Existe uma estruturação geográfica para esta espécie. Cinco clados mitocondriais foram identificados e as análises de tempo de divergência entre estes mostram que são compatíveis com vicariância pleistocênica. Mais evidente na reconstrução filogenética foi uma clara separação entre um clado formado pelos espécimes da Mata Atlântica (Leste) e os demais clados (Oeste). O padrão de fragmentação histórica encontrado para o morcego vampiro comum possui um paralelo em muitos outros organismos, de Bromeliáceas a vertebrados. Além disso, também é compatível com dados paleobiogeográficos coletados para estas localidades.

2. A análise de marcadores nucleares mostrou ausência de monofilia recíproca entre os espécimes pertencentes às distintas linhagens de DNAm, além de um grande número de haplótipos compartilhados. As comparações entre pares de populações mostraram porém valores significativos de diferenciação de frequências alélicas (F_{st}) e simulações coalescentes mostraram que este resultado é compatível a história demográfica desta espécie para marcadores nucleares.

3. As análises de morfometria de crânios mostraram uma baixa diferenciação entre os grupos mitocondriais identificados, especialmente na análise de componentes principais. Por outro lado as análises de funções discriminantes, de variáveis canônicas e de F_{st} mostraram uma grande afinidade entre a América Central e a Amazônia (clados AC e AMC), em detrimento das demais comparações. As análises de distância de Mahalanobis, como as anteriores, são congruentes com os resultados descritos para o marcador mitocondrial. A análise com o software Treescan mostrou que as diferenças entre os

clados apesar de pouco conspícuas são estatisticamente significantes, inclusive a diferenciação entre Mata Atlântica e demais clados.

4. Os dados de morfologia de pêlos não se mostraram relevantes para a diferenciação entre as linhagens.

5. Por último, fica claro uma divisão Leste/Oeste das linhagens observadas. As evidências acumuladas mostram existência de duas linhagens que coalescem: uma da Mata Atlântica e outra mais a Oeste, que inclui o Pantanal e principalmente a Amazônia e a América Central. Assim, sugere-se que estas linhagens sejam consideradas como espécies distintas e que as adequações necessárias de nomenclatura sejam realizadas. Mais estudos são necessários para que a fronteira geográfica entre estas linhagens fique bem estabelecida – incluindo o Brasil Central e os países a Oeste do Brasil.

BIBLIOGRAFIA

- Acha PN & Arambulo III PV. 1985. Rabies in the Tropics – History and current status. In Rabies in the Tropics, Kuwert, E *et al*, eds., Springer-Verlag, Heidelberg, 343.
- Acha PN & Málaga-Alba A. 1988. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: Natural History of Vampire Bats. Greenhall AM & Schmidt U (eds), Florida, CRC Press.
- Akaike H. 1985. Prediction and entropy. In Atkinson AC & Fienberg SE: A celebration of statistics. Springer-Verlag, Berlin, 1-24.
- Alves PC, Ferrand N, Suchentrunk F & Harris DJ. 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian peninsula. Mol. Phyl. Evol. 27 (1): 70-80.
- Amman BR, Owen RD & Bradley RD. 2002. Utility of hair structure for taxonomic discrimination in bats, with an example from the bats of Colorado. Occasional Papers Museum of Texas Tech University 216:1-14.
- Arbogast BS, Edwards SV, Wakeley J, Beerli P & Slowinski JB. 2002. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. Ann. Rev. Ecol Syst. 33: 707-40.
- Avise JC. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. London, Chapman & Hall.
- Avise JC. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press.
- Baker RJ & Bradley RD. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. J Mammal. 87 (4): 643-62.
- Baker RJ, Honeycutt RL & Bass RA. 1988. Genetics. In Greenhall, AM & Schmidt, U. Natural History of Vampire Bats. CRC Press, 1988.
- Baker RJ, Porter CA and Van Den Bussche RA. 2000. Systematics of the bats of the family Phyllostomidae based on RAG2 DNA sequences. Occasional Papers, Museum of Texas Tech University 202: 1-16.
- Bates JM, Hackett SJ & Cracraft J. 1998. Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypotheses based on raw distribution of passerine birds. Journal of biogeography 25: 783-93.
- Baum DA & Shaw KL. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. In Hoch PH & Stevenson AG. Experimental and molecular approaches to plant biosystematics, Vol. 53. Missouri Botanical Garden, St. Louis, pp 289-303.

- Beerli P & Felsenstein J (2001). Maximum likelihood estimation of migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using coalescent approach. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 98(8): 4563-68.
- Behling H. 1999. Late quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Rev. Paleobotany and Palynology* 99: 143-56
- Behling H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177: 19-27.
- Behling H & Lichte M. 1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research* 48, 348-58.
- Benedict FA .1957. Hair structure as a generic character in bats. *University of California publications in zoology* 59: 285-548.
- Berggren KT, Ellegren H, Hewitt GM & Seddon JM. 2005. Understanding the phylogeographic patterns of European hedgehogs *Erinaceus concolor* and *E. europaeus* using the MHC. *Heredity* 95: 84-90.
- Bermingham E & Moritz C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-9.
- Bernatchez L & Landry C. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J. Evol. Biol.* 16: 363-77.
- Bigarella JJ, Andrade-Lima D & Riehs PJ. 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 47, 411 – 64.
- Bockaert J, Clayesen S, Bécamel C, Dumuis A & Marin P. 2006. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res.* 326 (2): 553-72.
- Bradley RD, Baker RJ. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *J. Mammal* 82: 960–973.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y. e Burke, T. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. Em: *Molecular genetic analyses of populations. A practical Approach*. A.R. Hoelzel (Ed.). IRL Press, Oxford, pp. 225-269.
- Bush MB. 1994. Amazonian speciation: a necessary complex model. *Journal of Biogeography* 21, 5-17.
- Cabrera A. 1958. Catalogo de los Mamiferos del Sur. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.* “Bernardino Rivadavia”, *Cienc. Zool.*, 4, 93.

- Cabanne GS, Santos FR & Miyaki CY. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biol. J. Linn. Soc.* 91: 73-84.
- Carnaval AC & Moritz C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J. Biogeogr.* *In press*.
- Cartelle, C. 1999. Pleistocene mammals of the Cerrado and Caatinga of Brazil. Em Redford, K.H. e Eisenberg, F.E (eds.). *Mammals of the Neotropics: the Central Neotropics: volume 3: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Cartwright, T. 1974. The plasminogen activator of vampire bat saliva. *Blood* 43: 317-326.
- Castella V, Ruedi M & L Excoffier. 2001. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *J. Evol. Biol.* 14: 708-720.
- Clement M, Posada D and Crandall KA. 1993. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657-59.
- Colinvaux P. 2005. The Pleistocene vector of Neotropical diversity. In Bermingham E, Dick CW & Moritz C (eds), *Tropical rainforests: past, present and future*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Costa LP. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J. Biogeogr.* 30: 71-86.
- Cracraft J. 1983. Species concept and speciation analysis. *Current Ornith.* 1: 159-87.
- Crespo JA. 1982. Ecología de la comunidad de mamíferos del Parque Nacional Iguazu, Misiones. *Rev Mus. Argentino Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" Ecología* 3 (45).
- Darroch JN & Mosimann JE. 1985. Canonical and principal components of shape. *Biometrika* 72:241-252.
- De Queiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard DJ, Berlocher SH (eds), *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, Oxford, pp 57-75.
- Ditchfield, AD. 2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intra-specific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology* 9:1307 - 1318.

- Dobzhansky T. 1950. Mendelian populations and their evolution. *American Naturalist*. 84:401–418.
- Edwards S.V. & P. Beerli. 2000. Perspective: gene divergence, population divergence and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution* 54 (6): 1839-54.
- Eldredge N & Gould SJ. 1972. Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. In Schopf, TJM. (ed). *Models in paleobiology*. Freeman Cooper & Co, San Francisco.
- Emmons, L. 1990. *Neotropical rainforest mammals: a field guide*. University of Chicago Press.
- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 144: 2001-14.
- Fagundes NJR, Ray N, Beaumont M, Neuenschwander S, Salzano FM, Bonatto SL, Excoffier L. 2007. Statistical Evaluation of Alternative Models of Human Evolution. *PNAS* 104, 17614-19.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogeny: using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Fu Y-X. 1997. Statistical methods, tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-25.
- Fu Y-X & Li W-H. 1999. Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. *Theor. Pop. Biol.* 56: 1-10.
- Geraldes A, Ferrand N & Nachman MW. 2006. Contrasting Patterns of Introgression at X-Linked Loci Across the Hybrid Zone Between Subspecies of the European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Genetics* 173: 919-933.
- Gibbs MJ, Armstrong JS & Gibbs AJ. 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16, 573–582.
- Godinho R, Mendonça B, Crespo EG & Ferrand N. 2006. Genealogy of the nuclear β -fibrinogen locus in a highly structured lizard species: comparison with mtDNA and evidence for intragenic recombination in the hybrid zone. *Heredity* 96: 454-63.
- Goloboff P, Farris S & Nixon K. 2000. TNT (Tree analysis using New Technology) (BETA). Published by the authors, Tucumán, Argentina.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S & Bonatto S. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Ecol.* 15: 3969-82.

- Greenhall AM. 1970. The use of a precipitin test to determine host preferences of the vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diaemus youngi*. *Bijdragen tot de Dierkunde* 40, 36.
- Greenhall AM. 1972. The biting and feeding habits of vampire bat, *Desmodus rotundus*. *J. Zool.* 168, 452.
- Greenhall AM. 1988. Feeding Behavior. In: *Natural History of Vampire Bats*. Greenhall AM & Schmidt U (eds), Florida, CRC Press.
- Greenhall, AM, Joermann, G, and Schmidt, U 1983. *Desmodus rotundus*. In *Mammalian Species*, published. by the American Society of Mammalogists, New York.
- Haffer J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* 6, 451-76.
- Hare MP. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *TREE* 16 (12): 700-6.
- Hey J. 2006. Recent advances in assessing gene flow between diverging populations and species. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 16: 592-6.
- Hey J & Nielsen R. 2004. Multilocus methods for estimating populations sizes, migration rates and divergence times, with application to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167: 747-60.
- Hoelzer GA. 1997. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees revisited. *Evolution* 51: 622-6.
- Hoffman FG & Baker RJ. 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (Carollia: Phyllostomidae). *Molecular Ecology* 12: 3403-14.
- Hoffmann FG, Owen JG & Baker RJ. 2003. mtDNA perspective of chromosomal diversification and hybridization in Peters' tent-making bat (*Uroderma bilobatum*: Phyllostomidae). *Molecular Ecology* 12: 2981-93.
- Holmes EC, Worobey M & Rambaut A. 1999. Phylogenetic evidence for recombination in Dengue virus. *Mol. Biol. Evol.* 16 (3): 405-9.
- Hughes L & Nei M. 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335: 167-70.
- Hull DL. 1997. The ideal species concept – and why we can't get it. In Claridge MF, Dawah HA & Wilson MR (eds). *Species: the units of biodiversity*. Chapman & Hall, London, pp357-80.
- Jakobsen IB & Easteal S. 1996. A program for calculating and displaying compatibility matrices as an aid in determining reticulate evolution in molecular sequences. *CABIOS*, 12: 291-295.

- Johnson RA & Wichern DW. 1992. Applied multivariate statistical analyses. Practice Hall Inc., 3rd edition.
- Klein J. 1987. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Hum. Immunol.* 19: 155-62.
- Koopman KF. 1976. Zoogeography. In Baker RJ, Jones JK & Carter DC (eds.). *Biology of Bats of the New World Family Phyllostomatidae, Part 1. Special Publications of The Museum, Texas Tech University* 10: 1-218.
- Koopman KF. 1988. Systematics and distribution. In Greenhall, AM & Schmidt, U. *Natural History of Vampire Bats*. CRC Press, 1988.
- Kuhner MK, Yamato J & Felsenstein J. 1995. Estimating effective population size and mutation rate from sequence data using Metropolis-Hastings sampling. *Genetics* 140, 1421-30.
- Kuhner MK, Yamato J & Felsenstein J. 1998. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics* 149, 429-34.
- Kumar S & Subramanlan S. 2002. Mutation rates in mammalian genomes. *PNAS* 99 (2), 803-8.
- Kumar S, Tamura K & Nei M. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Molecular Analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University.
- Kupfermann H, Satta Y, Takahata N, Tichy H & Klein J. 1999. Evolution of MHC-DRB introns: implications for the origin of primates. *J. Mol. Evol.* 48 (6): 663-74.
- Laval G & Excoffier L. 2004. SIMCOAL 2.0: a program to simulate genomic diversity over large recombining regions in a subdivided population with a complex history. *Bioinformatics* 20 (15): 2485-7.
- Lessa EP, Cook JA & Patton JL. 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late quaternary. *PNAS* 100 (18): 10331-4.
- Lewis-Oritt N, Porter CA & Baker RJ. 2001. Molecular systematics of the family Moormopidae (Chiroptera) based on Cytochrome *b* and Recombination activator gene 2 sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 20 (3) 426-36.
- Li W-H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc.
- Lichte M & Behling H. 1999. Dry and cold climatic conditions in the formation of the present landscape in Southeastern Brazil: an interdisciplinary approach to a controversial topic. *Z. Geomorph.* 43:341–58

- Linhart SB, Flores-Crespo R & Mitchell GC. 1972. Control de murcielagos vampiros por medio de un anticoagulante. *Boletim Oficina Sanitaria Panamericana* 73:100-109.
- Lynch JD. 1979. The amphibians of the lowland tropical forests. In Duellman WE (ed.). *The south american Herpetofauna: Its origin, evolution and dispersal*. Museum of natural history, University of Kansas.
- Mahalanobis PC. 1936. On the generalized distance on statistics. *Prc. Natl. Inst. Sci. India* 2: 49-55.
- Marroig G & Cerqueira R. 1997. Plio-Pleistocene South American history and the Amazon Lagoon Hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. *J. Comp. Biol.* 2 (2), 103-19.
- Martin D & Rybicki E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*. 16:562-563.
- Martin DP, Williamson & Posada D. 2005. RDP2: recombinations detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21 (2), 260-2.
- Martins FM, Meyer D, Ditchfield AD & Morgante JM. 2007. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45 (4): 372-8.
- Maxwell TJ. 2006. Application of evolutionary theory to genotype/phenotype associations. Tese defendida para a obtenção do título de doutor junto à Washington University em St Louis. St Louis, 161 p. Orientador: Alan Templeton.
- Maynard Smith J. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.*, **34**: 126–129.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- McFarland WN & Wimsatt WA. 1969. The renal function and its relation to the ecology of the vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Comp. Bioche. Phy.* 28:985-1006.
- McGuire G & Wright F. 2000. TOPAL 2.0: improved detection of mosaic sequences within multiple alignments. *Bioinformatics*. **16**:130-134.
- Moore WS. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718-26.
- Moritz C. Dowling TE & Brown WM. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-92.

- Muller P. 1973. Dispersal centres of terrestrial vertebrates in the Neotropical realm. *Biogeographica* 2, Junk, The Hague, 244p.
- Nachman MW, & Cromwell SL. 2000. Contrasting Evolutionary Histories of Two Introns of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene, *Dmd*, in Humans. *Genetics* 155: 1855-64.
- Nei M & Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nielsen R & Wakeley J. 2001. Distinguishing migration from isolation: a Markov Monte Carlo approach. *Genetics* 158: 885-96.
- Nordborg M. 2001. Coalecent theory. *In* Balding D, Cannings C & Bishop M. *Handbook of Statistical Genetics*. John Wiley & Sons.
- Novaes Gomes M. 2001. Influência do sexo de indivíduos da mesma colônia no controle químico do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae). Dissertação de Mestrado – FSP/USP, São Paulo.
- Oliveira-Filho AT & Ratter JÁ. 1995. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany* 52: 141 – 94.
- Ortega J, Maldonado JE, Arita HT, Wilkinson GS & Fleischer RC. 2002. Characterization of microsatellite loci in the Jamaican fruit-eating bat *Artibeus jamaicensis* and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes* 2, 462-4.
- Osgood WH. 1912. Mammals from Western Venezuela and Eastern Colombia. *Field Mus. Nat. Hist. Zool. Ser.* 10, 63.
- Padidam M, Sawyer S & Fauquet CM. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265: 218-225.
- Palma-Silva C. 2008. Genética, filogeografia e fertilidade de populações de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). Tese apresentada para obtenção do título de doutora junto a Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientadora: Maria Helena Bodanese Zanettini .
- Palsbøll PJ, Berubé M, Aguilar A, Nortabartolo-Di-Sciara G & Nielsen R. 2004. Discerning between recurrent gene flow and recent divergence under a finite-sites model applied to North Atlantic and Mediterranean Sea fin whale (*Balaenoptera physalus*) populations. *Evolution* 58 (3), 670-75.
- Palumbi SR, Cipriano FF & Hare MP. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution* 55: 859-68.

- Pamilo P & Nei M. 1988. The relationships between gene trees and species trees. *Mol. Biol. Evol.* 5: 568-83.
- Patton JL & da Silva MNF. 1998. Rivers, refuges and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. *In* Berlocher S & Howard D. *Endless forms: Species and speciation*. Oxford University Press, 202-13.
- Pellegrino KCM.; Rodrigues MT. ; Waite AN ; Morando M; Yassuda YY & Sites JW. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85 (1): 13-26.
- Pinto-da-Rocha R. 1997. Systematic review of the Neotropical family Stygnidae (Opiliones, Laniatores, Gonyleptoidea). *Arquivos de Zoologia, São Paulo*, 33 (4): 163-342.
- Pinto-da-Rocha R & da Silva MB .2005. Faunistic similarity and historical biogeography of the harvestmen of southern and southeastern Atlantic rainforest of Brazil. *J. Arach.* 33: 290-9.
- Posada D & Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 19: 817-818.
- Posada D & Crandall KA. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 13757–13762.
- Posada D & Crandall KA. 2002. The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *J Mol Evol* 54: 396-402.
- Posada D, Crandall KA & Templeton AR. 2000. GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. *Mol. Ecol.* 9 (4):487-488.
- Queller DC, Strassman JE & Hughes CR. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8:53-61.
- Rambaut A. 2000. Se Al, software available at <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software/Se-Al/>
- Ramos-Onsins S & Mitchell-Olds T. 2007. Mlcoalsim: Multilocus Coalescent Simulations. *Evolutionary Bioinformatics* 3: 41-4.
- Rao CR. 1964. The use and interpretation of principal components analysis in applied research. *Sankhyā*, 26, 329-358.
- Ray CE, Linares OJ & Morgan GS. 1988. Paleontology. *In* Greenhall, AM & Schmidt, U. *Natural History of Vampire Bats*. CRC Press, 1988.

- Ray N, Currat M, Berthier P & Excoffier L. 2005. Recovering the geographic origin of early modern humans by realistic and spatially explicit simulations. *Gen. Res.* 15:1161–1167.
- Rice WR & Hostert EE. 1993. Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* 47 (6): 1637-53.
- Richman AD, Herrera LG & Nash D. 2001. MHC class II beta sequence diversity in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*): implication for models of balancing selection. *Mol. Ecol.* 10: 2765-73.
- Rogers A & Harpending HC. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 522-69.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP & Van der Mark P. 2005. MRBAYES 3.1: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Software disponível em: <http://mrbayes.csit.fsu.edu/download.php>.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ *et al.* 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434: 325-37.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X & Rozas R. 2003. DNAsp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-7.
- Salminen MO, Carr JK, Burke DS & McCutchan FE. 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 11: 1423-1425.
- Sambrook J, Fritsch F & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schierup MH & Hein J. 2000. Consequences of recombination in traditional phylogenetic analyses. *Genetics* 156: 879-91.
- Schlötterer C. 1998. Microsatellites. *In*: Hoelzel AR (ed.) *Molecular genetic analysis of populations*. IRL press, Oxford University Press. 337-261.
- Schmidt U 1978. *Vampir fledermause*. eue Brehm-Bucherei. Ziemsen Verlag. Wittenberg Lutherstadt
- Schmidt C. 1988. Reproduction. *In* Greenhall, AM & Schmidt, U. *Natural History of Vampire Bats*. CRC Press, 1988.
- Schmidt U & Greenhall AM. 1972. Preliminary studies of the interactions between feeding vampire bats *Desmodus rotundus* under natural and laboratory conditions. *Mammalia* 36, 241.

- Schneider, H. 2003. Métodos de Análise Filogenética: um guia prático. *Sociedade Brasileira de Genética*. Ed. Holos, Ribeirão Preto. 114p.
- Schneider S, Roessli D & Excoffier L. 2000. Arlequin ver. 2000: a software for population genetics data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Shimodaira H & Hasegawa M. 1999. Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference *Mol. Biol. Evol.* 16 (8): 1114-6.
- Sites Jr. JW & Crandall KA. 1997. Testing species boundaries in biodiversity studies. *Cons. Biol.* 11: 1289-97.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-92.
- Sokal RR & Rohlf FJ. 1969. Biometry. W.H. and Freeman, San Francisco.
- Stephens M, Smith N & Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Gen.* 68: 978-89.
- Suthers, R. A. 1970. Vision, olfaction and taste. in Wimsatt W A (ed): *Biology of Bats* Academic Press, New York, 1-406.
- Swofford DL. 1998. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*, version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taddei VA. 1983. Morcegos. Algumas considerações sistemáticas e biológicas. *Bol. Téc. Cati, Campinas, SP*, 1-107.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-95.
- Taylor AC, Horsup A, Johnson CN, Sunnucks P & Sherwin W. 1997. Unusual relatedness structure detected by microsatellite analysis, and parentage analysis in a endangered marsupial, the Northern Hairy-nosed wombat, *Lasiorninus krefftii*. *Molecular Ecology*, 6: 9-20.
- Tchacka L, Eizirik E, Oliveira TG, Candido Jr. JF & Freitas TRO. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Mol. Ecol.* 16, 819-38.
- Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien SJ & Murphy WS. 2005. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307, 580-4.

- Templeton AR. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In Otte D & Endler JA. Speciations and its consequences. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp 3-27.
- Templeton AR. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381-397.
- Templeton AR. 1999. Using gene trees to infer species from testable null hypotheses: cohesion species in the *Spalax ehrenbergi* complex. In Wasser SP (ed): Evolutionary theory and processes: modern perspectives, papers in honor of Eviatar Nevo, pp171-92.
- Templeton AR. 2001. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 10: 779-91.
- Templeton AR. 2004. Using haplotype trees for phylogeographic and species inference in fish populations. *Environmental biology of fishes* 69: 7 -20.
- Templeton AR, Boerwinkle E & Sing CF. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of Alcohol Dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117: 343-351.
- Templeton AR & Sing CF. 1993. A cladistic association analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134: 659-69.
- Templeton AR, Maxwell T, Posada D, Stengård JH, Boerwinkle E & Sing CF. 2005. Tree scanning: a method for using haplotype trees in phenotype/genotype association studies. *Genetics* 169: 441-453.
- Terborgh J. 1992. Diversity and the tropical forests. New York: Scientific American Library.
- Trajano E. 1984. Ecologia de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do Sudeste do Brasil. *Rev. Bras. de Zoologia*, São Paulo, 2, 55.
- Uieda W. 1993. O vírus da raiva nos morcegos e sua transmissão ao homem no Brasil. *Virológica* 93: 243-6.
- Uieda W. 1995. The Common Vampire Bat in Urban Environments From Southeastern Brazil. *Chiroptera Neotropical* 1 (2): 22-4.
- Van Vaark GN & Schaafsma W. 1992. Advances in quantitative analysis of skeletal morphology. In: Saunders SR & Katzenberg A (eds.) *Skeletal Biology of Past People: Research Methods*. Wiley-Liss, Inc: New York.

- Vanzolini PE. 1988. Distributional Patterns of South American lizards. In Vanzolini PE & Hayer Wr (eds.) Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Vizotto LD & Taddei VA. 1973. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. Revista da faculdade de filosofia, ciências e letras de São José do Rio Preto, Bolm. Cienc. 1: 1-72.
- Wakeley J. 2008. Coalescent Theory: An Introduction. Roberts and Publishers, Greenwood Village, Colorado.
- Wakeley J & Hey J. 1997. Estimating ancestral population parameters. Genetics 145: 847-55.
- Wang JY-C. 1999. The classification of sympatric forms of bottlenosed dolphins (genus *Tursiops*) in Chinese waters. PhD thesis, McMaster University, Hamilton, Ontario.
- Wang RL, Wakeley J & Hey J. 1997. Gene flow and natural selection in the origin of *Drosophila pseudoobscura* and close relatives. Genetics 147: 1091-106.
- Wetterer AL, Rockman MV and Simmons NB. 2000. Phylogeny of Phyllostomid bats (Mammalia, Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. Bulletin of the American Museum of Natural History 248, New York, 200 pp.
- Whitmore TC & Prance GT. 1987. Biogeography and quaternary history in tropical America. Oxford University Press, Oxford.
- Wiley EO. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. Syst. Zool. 27: 17-26.
- Wilkinson GS. 1984. Reciprocal food sharing in the vampire bat. Nature 308: 181.
- Wilkinson GS. 1985. The social organization of the common vampire bat. II. Mating system, genetic structure, and relatedness. Behav. Ecol. Sociobiol. 17, 111.
- Wilkinson GS. 1986. Social grooming in the common vampire bat, *Desmodus rotundus*. Anim. Behav. 34, 1880.
- Wilkinson GS. 1988. Social organization and behavior. In Greenhall, AM & Schmidt, U. Natural History of Vampire Bats. CRC Press, 1988.
- Wilks SS. 1932. Certain generalizations in the analysis of variance. Biometrika 24:471-94.
- Williams-Blangero S & Blangero J. 1989. Anthropometric variation and the genetic structure of the Jirels of Nepal. Human Biology 61 (1): 1-12.
- Wimsatt WA. 1978. Vampire bats. In Zoo and Wild animal medicine. Fowler ME (eds). W. B. Saunders, Philadelphia.

- Worthington Wilmer J, Hall L, Barratt E, Moritz C. 1999. Genetic structure and male-mediated gene flow in the ghost bat (*Macroderma gigas*). *Evolution* 53:1582–1591.
- Worthington Wilmer J, Moritz C, Hall L & Toop J. 1994. Extreme population structuring in the threatened ghost bat, *Macroderma gigas*: evidence from mitochondrial DNA. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 257, 193-8.
- Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 663p.
- Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

ANEXOS

Anexo 1: número de campo, localidade e coordenadas geográficas de todos os indivíduos amostrados para sequenciamento.

AMOSTRA	LOCALIDADE	LAT	LONG
AD391	Ibitipoca/MG	-21,71	-43,91
AD392	Ibitipoca/MG	-21,71	-43,91
AD394	Ibitipoca/MG	-21,71	-43,91
AD414	Cajuru/SP	-2,6	-48,3
AD455	Jundiaí/SP	-23,18	-46,86
AD456	Jundiaí/SP	-23,18	-46,86
AD188	Valença/BA	-13,39	-39,08
AD189	Valença/BA	-13,39	-39,08
AD218	Ilhabela/SP	-23,78	-45,35
AD242	Intervales/SP	-23,6	-46,61
AD243	Intervales/SP	-23,6	-46,61
AD245	Intervales/SP	-23,6	-46,61
AD361	Caratinga/MG	-19,78	-42,13
AD362	Caratinga/MG	-19,78	-42,13
AD393	Ibitipoca/MG	-21,71	-43,91
AD416	Cajuru/SP	-20,6	-48,3
AD465	Salesópolis/SP	-23,53	-45,83
AD720	Cunha/SP	-23,08	-45
AD767	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD768	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD769	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD770	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD771	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD772	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD775	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD778	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD756	Sales de Oliveira/SP	-20,76	-47,85
AD809	Sta Isabel do rio Negro/AM	-0,4	-65.033
AD832	Barcelos/AM	-1	-62,96
AD893	Barcelos/AM	-1	-62,96
FC5235	Prov. Limon/Costa Rica	9,51	-83,15
FC5484	Prov. Limon/Costa Rica	9,51	-83,15
SES268	Paracou/Guiana Francesa	5,37	-52,88
FM15	Paraisópolis/MG	-22,55	-45,78
FM16	Paraisópolis/MG	-22,55	-45,78
FM17	Paraisópolis/MG	-22,55	-45,78
FM18	Paraisópolis/MG	-22,55	-45,78
FM19	Paraisópolis/MG	-22,55	-45,78
FM20	Paraisópolis/MG	-22,55	-45,78
FM21	Paraisópolis/MG	-22,55	-45,78
FM22	Paraisópolis/MG	-22,55	-45,78

FM23	Salvaterra/PA	-0,76	-48,5
FM25	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM26	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM27	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM28	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM29	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM30	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM31	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM32	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM33	Miranda/MS	-20,23	-56,33
FM34	Miranda/MS	-20,23	-56,33
EBM199	Bananal/SP	-22,68	-44,31
EBM229	Bananal/SP	-22,68	-44,31
EBM230	Bananal/SP	-22,68	-44,31
EBM287	Bananal/SP	-22,68	-44,31
EBM342	Bananal/SP	-22,68	-44,31
LG297	Lençóis/BA	-13,81	-41,71
LG299	Lençóis/BA	-13,81	-41,71
LG328	Lençóis/BA	-13,81	-41,71
IS723	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS725	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS729	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS733	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS735	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS737	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS741	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS747	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS755	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS757	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS759	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS763	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
IS765	Bocaiúva do Sul/PR	-25,18	-49,13
AD920	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD997	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1018	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1019	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1027	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1028	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1029	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1030	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1034	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1036	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1038	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1050	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1061	Castelos/ES	-20,6	-41,2

AD1062	Castelos/ES	-20,6	-41,2
AD1063	Castelos/ES	-20,6	-41,2
MVM026	Pedro Leopoldo/MG	-19,63	-44,05
PERD10	Marliéria/MG	-19,71	-42,75
PERD20	Marliéria/MG	-19,71	-42,75
PNPBH545	Itacarambi/MG	-15,08	-44,11
FM35	Cananéia/SP	-25	-47,95
FM36	Cananéia/SP	-25	-47,95
FM37	Cananéia/SP	-25	-47,95
UFPB156	Araruna/PB	-6,53	-35,73
FM46	Jangada/MT	-15,27	-55,23
FM49	Jangada/MT	-15,27	-55,23
FM50	Jangada/MT	-15,27	-55,23
FM51	Jangada/MT	-15,27	-55,23
ICC01	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC02	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC03	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC04	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC05	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC07	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC10	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC11	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC12	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC13	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC14	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC15	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC16	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC17	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC18	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC19	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC20	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC21	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC22	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC23	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC24	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
ICC25	Ilha das Cavianas/PA	-0,15	-50
TO01	Porto Nacional/TO	-11	-48
TO01F	Dois irmãos/TO	-9,21	-48,95
TO02F	Dois irmãos/TO	-9,21	-48,95
TO03M	Dois irmãos/TO	-9,21	-48,95
TO04F	Dois irmãos/TO	-9,21	-48,95
TOC060	Estreito/MA	-5,18	-43,25
RS20	Alegrete/RS	-29,76	-55,76
RS21	Alegrete/RS	-29,76	-55,76
RS22	Alegrete/RS	-29,76	-55,76

RS23	Alegrete/RS	-29,76	-55,76
RS28	Alegrete/RS	-29,76	-55,76
RS26	Itaqui/RS	-29,13	-56,55
RS27	Itaqui/RS	-29,13	-56,55
RS29	Itaqui/RS	-29,13	-56,55
791	Governador Celso Ramos/SC	-27,6	-51,4
807	Governador Celso Ramos/SC	-27,6	-51,4
808	Governador Celso Ramos/SC	-27,6	-51,4
821	Porto Belo/SC	-27,15	-49,53
855	Rancho Queimado/SC	-27,68	-49
MAP337	Rio Anotaie Tucumaque/AP		-51
MCU12	Rio Anacuí Tucumaque/AP	0,06	-51,01
MCU13	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU38	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU43	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU45	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU49	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU63	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU64	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU66	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU69	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU71	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU72	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
MCU73	APA do Curiaú/AP	0,13	-51,06
F44047	Costa Rica	10,58	-83,5
F44065	Costa Rica	10,58	-83,5
F44066	Costa Rica	10,58	-83,5
F44021	Costa Rica	10,58	-83,5
F37706	Equador	-1	-77
F37566	Equador	-1	-77
F35649	El Salvador	13,86	-89,58
F43301	Guiana	5,8	-61,05
F50663	Guiana	6,51	-58,16
F34659	Guiana	6,25	-57,51
F50874	Guiana	5	-59
F44753	Guiana	4,5	-59,8
F46633	Guiana	4,91	-49,45
F44839	Guiana	4,5	-59
F36927	Guiana	5	-58,66
F36941	Guiana	9,6	-48
F36793	Guiana	4,16	-59,08
F38712	Guiana	3,85	-59,6
FN31114	Guiana	3,95	-59,13
FN31115	Guiana	3,95	-59,13

FN30936	México	19,08	-88,18
FN30938	México	19,08	-88,18
FN30034	México	18,08	-92,13
FN30035	México	18,08	-92,13
FN30037	México	18,08	-92,13
F54299	Suriname	3,8	-55,7
F42913	Venezuela	5,66	-67,62
CAM04	Manaus. AM	-3,11	-60,025

Anexo 2: número, localidade e coordenadas de todos os espécimes medidos para este trabalho.

Número	Localidade	latitude	longitude
127600	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
127599	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
127604	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
129753	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
127603	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
127601	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
127602	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
128226	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
127598	Honduras - La Flor Archaga	14,1	-87,6
128227	Honduras - La Cueva Archaga	14,1	-87,6
129754	Honduras - La Cueva Archaga	14,1	-87,6
128229	Honduras - La Cueva Archaga	14,1	-87,6
126212	Honduras - La Cueva Archaga	14,1	-87,6
128232	Honduras - La Cueva Archaga	14,1	-88,3
126463	Honduras - Sabana Grande - San Marcus	15,3	-88,41
126462	Honduras - Sabana Grande - San Marcus	15,3	-88,41
126461	Honduras - Sabana Grande - San Marcus	15,3	-88,41
126459	Honduras - Sabana Grande - San Marcus	15,3	-88,41
126458	Honduras - Sabana Grande - San Marcus	15,3	-88,41
126460	Honduras - Sabana Grande - San Marcus	15,3	-88,41
126456	Honduras - Sabana Grande - San Marcus	15,3	-88,41
126749	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126750	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126751	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126752	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126753	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126754	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126755	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126756	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126757	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126758	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
126810	Honduras - La Cruz Grande - La Paz	14	-87,88
129036	Honduras - Las Flores - Gracias	15,78	-84,78
129038	Honduras - Las Flores - Gracias	15,78	-84,78
129039	Honduras - Las Flores - Gracias	15,78	-84,78
129040	Honduras - Las Flores - Gracias	15,78	-84,78
129755	Honduras - Pucca	15,2	-83,43
129042	Honduras - El Capante - Gracias	15,2	-83,43
129044	Honduras - El Capante - Gracias	15,2	-83,43
129045	Honduras - El Capante - Gracias	15,2	-83,43
129047	Honduras - El Capante - Gracias	15,2	-83,43

129048	Honduras - El Capante - Gracias	15,2	-83,43
172348	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172342	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172339	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172338	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172343	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172332	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172327	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172335	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172334	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172321	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172330	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172317	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172320	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172323	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172324	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172325	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172329	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172336	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
186900	México - Chiapas - Ocozocoautla	16,76	-93,36
172292	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172294	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172297	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172299	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172303	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
254670	México - Chiapas - Mapastepec	15,43	-92,9
172316	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172315	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172313	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172312	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172311	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172308	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172307	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172305	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172304	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
177837	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177836	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177833	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
172401	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172400	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172397	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172394	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172405	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solis	17,1	-92,88
172378	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172379	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641

172383	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172386	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172387	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172388	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172389	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172390	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172392	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172393	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172377	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172376	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172375	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172374	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172373	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172372	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172370	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172369	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172368	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172367	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172366	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172363	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172362	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172361	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172360	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172359	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172358	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172357	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172355	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172353	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172352	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172351	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
172349	México - Chiapas - Pueblo Novo	15,85	-93,641
252523	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
175007	México - Chiapas - Tealpa Walla Walla	16,11	-92,05
175683	Trinidad - Moruga	10,08	-61,28
257106	Trinidad - St Patrick - La Brea	10,25	-61,61
256333	Trinidad - St Patrick - La Brea	10,25	-61,61
120944	Trinidad - Diego Martia Cave	10,71	-61,56
174170	Trinidad - Golden Crove - Arima	10,63	-61,28
68568	Guatemala - SanAntonio	14,2	-90,28
131807	Costa Rica - Swiza Turrialba	9,9	-83,68
131806	Costa Rica - Swiza Turrialba	9,9	-83,68
174305	Guatemala - Coban	14,75	-89,96
235321	Guatemala - Santa Rosa - Avellana	13,92	-90,46
131808	Costa Rica - Swiza Turrialba	9,9	-83,68
237376	México - Vera Cruz - Poterero	22	-98,41

172346	México - Vera Cruz - Rio Jaltepec	22	-98,41
177863	El Salvador - Coatepeque	13,92	-89,5
184993	Panamá - Rio Chagres	8,985	-79,58
172347	México - Vera Cruz - Rio Jaltepec	22	-98,41
172398	México - Vera Cruz - Rio Jaltepec	22	-98,41
172391	México - Vera Cruz - Rio Jaltepec	22	-98,41
172344	México - Vera Cruz - Rio Jaltepec	22	-98,41
237373	México - Vera Cruz - Rio Jaltepec	22	-98,41
234314	Paraguay - Boqueron - Pozo Colorada	-22,63	-60,5
172296	México - Vera Cruz - Rio Jaltepec	22	-98,41
28340	Nicaragua - Chiuaudega	12,61	-87,15
28344	Nicaragua - Chiuaudega	12,61	-87,15
167480	México - Oaxaca - Yautepec - Santa Catarina - Quijoquitani	16,23	-97,23
190140	México - Oaxaca - Chiltepea	17,95	-96,18
190148	México - Oaxaca - La Ventosa	16,16	-95,16
190147	México - Oaxaca - La Ventosa	16,16	-95,16
190146	México - Oaxaca - La Ventosa	16,16	-95,16
190158	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
190157	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
190156	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
190155	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
190144	México - Oaxaca - La Ventosa	16,16	-95,16
19145	México - Oaxaca - La Ventosa	16,16	-95,16
172298	México - Oaxaca	16,16	-95,16
172302	México - Oaxaca	16,16	-95,16
190149	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
190151	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
190152	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
190153	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
190154	México - Oaxaca - San Gabriel Misteppec	16,08	-97,1
147926	México - Tamaulipas - Marian Martin cave El Pachon	22,61	-99,05
147925	México - Tamaulipas - Marian Martin cave El Pachon	22,61	-99,05
147924	México - Tamaulipas - Marian Martin cave El Pachon	22,61	-99,05
147923	México - Tamaulipas - Marian Martin Rancho del Cielo	22,61	-99,05
147922	México - Tamaulipas - Marian Martin Rancho del Cielo	22,61	-99,05
147921	México - Tamaulipas - Marian Martin Rancho del Cielo	22,61	-99,05
146984	México - Tamaulipas - Marian Martin Rancho del Cielo	22,61	-99,05
146983	México - Tamaulipas - Marian Martin cave El Pachon	22,61	-99,05
237371	México - Puebla - Hueytamalco - Rancho Margaritas	19,95	-92,26
177861	México - San Luis Potosi - El Salto	22,5	-101,51
254672	México - San Luis Potosi - W, Valles	22,01	-99,06
252523	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
175007	México - Chiapas	16,11	-92,05
25114	México - Tepic - Rancho Palo Amarillo	21,5	-104,9
26233	México - Jalisco - Las Canoas	19,3	-104,5

26232	México - Jalisco - Las Canoas	19,3	-104,5
26231	México - Jalisco - Las Canoas	19,3	-104,5
26230	México - Jalisco - Las Canoas	19,3	-104,5
26229	México - Jalisco - Las Canoas	19,3	-104,5
205360	México - Colima - Cueva de la Fabrica - Quimatlan	19,3	-104,5
205359	México - Colima - Cueva de la Fabrica - Quimatlan	19,3	-104,5
205358	México - Colima - Cueva de la Fabrica - Quimatlan	19,3	-104,5
177872	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177868	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177867	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177866	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177865	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177864	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177862	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177860	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177859	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177858	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177857	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177856	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177855	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177854	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177853	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177852	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177838	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177832	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177831	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177830	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177829	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177828	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177827	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177826	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177825	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177824	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177823	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177822	México - Oaxaca - Tapanatepec	16,35	-94,2
177875	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177874	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177871	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177869	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177851	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177848	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177847	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177846	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177845	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177843	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88

177841	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177840	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203829	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203828	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203827	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203826	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203825	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203824	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203823	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203822	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203821	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203820	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203788	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203787	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203786	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203785	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203774	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203773	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203771	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
177835	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203768	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203770	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
203769	México - Chiapas - Pueblo Novo - Solistahuacan	17,1	-92,88
506532	Belize - San Anthony - Toledo	16,1	-88,93
506533	Belize - San Anthony - Toledo	16,1	-88,93
506535	Belize - San Anthony - Toledo	16,1	-88,93
245142	Guatemala - Guyo - Peten	17,06	-89,38
245143	Guatemala - Guyo - Peten	17,06	-89,38
245144	Guatemala - Guyo - Peten	17,06	-89,38
260024	Guatemala - Solola - Moca	14,53	-91,25
565042	Guatemala - Izabal Morales Finca rio frio	15,48	-88,81
568517	Costa Rica - Limon - Barra del Tortuguero	10,58	-83,53
568518	Costa Rica - Limon - Barra del Tortuguero	10,58	-83,53
568519	Costa Rica - Limon - Barra del Tortuguero	10,58	-83,53
568521	Costa Rica - Limon - Barra del Tortuguero	10,58	-83,53
568522	Costa Rica - Limon - Barra del Tortuguero	10,58	-83,53
562867	Costa Rica - Guanacaste	10	-85,41
562869	Costa Rica - Heredia - San Miguel	10	-84,06
562870	Costa Rica - Heredia - San Miguel	10	-84,06
562871	Costa Rica - Heredia - San Miguel	10	-84,06
562872	Costa Rica - Heredia - Vara Blanca	10,16	-84,15
562868	Costa Rica - Heredia - Puerto Viejo	10,46	84,01
565816	Costa Rica - Puntarenas - Monte Verde	10,3	84,81
565044	Guatemala - Zacapa - rio hondo, Montes de Moran, Sierra de las Minas	15,15	-89,48
565045	Guatemala - Zacapa - rio hondo, Finca Chahuities, Sierra de las Minas	15,01	-89,71

565046	Guatemala - Zacapa - rio hondo, Finca Chahuities, Sierra de las Minas	15,01	-89,71
565047	Guatemala - Zacapa - rio hondo, Finca Chahuities, Sierra de las Minas	15,01	-89,71
565048	Guatemala - Zacapa - rio hondo, Finca Chahuities, Sierra de las Minas	15,01	-89,71
565049	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Finca La Piedad	14,95	-89,97
565050	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Finca La Piedad	14,95	-89,97
565051	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Finca La Piedad	14,95	-89,97
565052	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565053	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565054	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565055	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565056	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565057	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565058	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565059	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565060	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565061	Guatemala - El Progreso - San Agustin Acasaguastlan - Aldea la Sidra	14,95	-89,97
565062	Guatemala - Escuinta - Brito Finca las Mercedes	14,14	-90,66
565063	Guatemala - Escuinta - Brito Finca las Mercedes	14,14	-90,66
100347	México - Campeche - Campeche	19,85	-90,53
100350	México - Campeche - Campeche	19,85	-90,53
565464	Honduras - Copan - Santa Rosa de Copan	14,76	-88,78
565466	Honduras - Lempira - Gracias Mejicapa, Santa Rosa	14,76	-88,78
565467	Honduras - Lempira - Gracias Mejicapa, Santa Rosa	14,76	-88,78
126556	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126557	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126559	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126561	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126562	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
393381	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393382	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393385	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393386	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393388	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393389	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393390	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393391	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393392	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393393	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393394	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393395	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393396	México - Chiapas - Zapaluta	16,11	-92,05
393397	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393398	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393399	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393401	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05

393402	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393403	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393405	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393406	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393407	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393408	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393410	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393414	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393415	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393416	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393417	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393419	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393420	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
393421	México - Chiapas - Zapaluta (San Lucas)	16,11	-92,05
126563	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126564	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126565	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126566	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126567	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126568	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126569	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126570	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126574	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126575	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126576	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126578	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126581	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
126582	México - Papayo - Guerrero	18	-101,81
329454	México - Guerrero	18	-101,81
329455	México - Guerrero	18	-101,81
329456	México - Guerrero	18	-101,81
559707	México - México - Tonalico	18,78	-99,68
559708	México - México - Tonalico	18,78	-99,68
559709	México - México - Tonalico	18,78	-99,68
559710	México - México - Tonalico	18,78	-99,68
559713	México - México - Valle de Bravo	19,18	-100,13
559711	México - Guerrero - Colotlipa	17,41	-99,15
559712	México - Guerrero - Rio Mezcala	17,41	-99,15
50777	México - Jalisco - Etzatlan	20,77	-104,083
559714	México - Jalisco - Chamela	20,77	-104,083
508837	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508838	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508839	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508840	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508841	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65

508842	México - Nayarit - Cucharas	22,23	-105,65
508843	México - Nayarit - Cucharas	22,23	-105,65
508844	México - Nayarit - Cucharas	22,23	-105,65
508828	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508829	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508830	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508831	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508832	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508833	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508834	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508835	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
508836	México - Nayarit - Cuautla	22,23	-105,65
36013	México - Cuernavaco	18,91	-99,25
51134	México - Morelos - Cuernavaca	18,91	-99,25
51145	México - Morelos - Cuernavaca	18,91	-99,25
51147	México - Morelos - Cuernavaca	18,91	-99,25
126446	México - Michoacan - la Salada	19,6	-100,28
126445	México - Michoacan - la Salada	19,6	-100,28
508845	México - Nayarit - Chacala	21,16	-105,23
508846	México - Nayarit - Chacala	21,16	-105,23
508847	México - Nayarit - Chacala	21,16	-105,23
508848	México - Nayarit - Chacala	21,16	-105,23
508849	México - Nayarit - Estanzuela	21,26	-104,46
508850	México - Nayarit - Estanzuela	21,26	-104,46
511489	México - Nayarit - El Casco	22,26	-104,58
511490	México - Nayarit - Mesa del Nayar	22,26	-104,58
511491	México - Nayarit - Mesa del Nayar	22,26	-104,58
511492	México - Nayarit - Rancho Sapotito	22,26	-104,58
523434	México - Nayarit - Ualcocotan	22,26	-104,58
523435	México - Nayarit - Tempiste	22,26	-104,58
523436	México - Nayarit - Las Piedras	21,2	-105,08
523437	México - Nayarit - Las Piedras	21,2	-105,08
523438	México - Nayarit - Las Piedras	21,2	-105,08
523439	México - Nayarit - Las Piedras	21,2	-105,08
556320	México - Nuevo Leon	24,61	-100,18
556321	México - Nuevo Leon	24,61	-100,18
556322	México - Nuevo Leon	24,61	-100,18
556323	México - Nuevo Leon	24,61	-100,18
556324	México - San Luis Potosi	22,5	-101,51
556325	México - San Luis Potosi	22,5	-101,51
556326	México - San Luis Potosi	22,5	-101,51
559715	México - Sinaloa - Chirimollos, Santa Lucia	24,2	-106,64
37542	México - Orizaba	18,85	-97,1
329459	México - Vera cruz - Las Minas	19,7	19,7
564574	México - Yucatan - Rancho Tochil	20,81	-89,88

329460	México - Vera cruz - Las Minas	19,7	-97,11
329462	México - Vera cruz - Las Minas	19,7	-97,11
329463	México - Vera cruz - Las Minas	19,7	-97,11
329464	México - Vera cruz - Las Minas	19,7	-97,11
329567	México - Vera cruz - Las Minas	19,7	-97,11
554228	México - Vera Cruz	19,7	-97,11
337673	Nicaragua - Bonanza - Zelaya	14,01	-84,58
173830	Panamá - Isla Taboga	8,78	-79,92
179616	Panamá - Cana	8,6	-82,5
179618	Panamá - Cana	8,6	-82,5
261410	Panamá - Pacora river district	8,1	-81,08
261411	Panamá - Pacora river district	8,1	-81,08
261413	Panamá - Pacora river district	8,1	-81,08
261414	Panamá - Pacora river district	8,1	-81,08
261415	Panamá - Pacora river district	8,1	-81,08
261416	Panamá - Pacora river district	8,1	-81,08
261417	Panamá - Pacora river district	8,1	-81,08
261418	Panamá - Pacora river district	8,1	-81,08
303243	Panamá - Canal Zone - Ft, Kobbe	8,99	-79,58
305566	Panamá - Chilibre	9,15	-79,61
305567	Panamá - Chilibre	9,15	-79,61
305568	Panamá - Chilibre	9,15	-79,61
305569	Panamá - Mandinga	7,85	-80,66
306776	Panamá - Mouth of Rio Paya	7,95	77,5
306777	Panamá - Darien	7,95	77,5
306778	Panamá - Darien	7,95	77,5
306779	Panamá - Darien	7,95	77,5
306780	Panamá - Darien	7,95	77,5
306781	Panamá - Darien	7,95	77,5
306782	Panamá - Darien	7,95	77,5
306783	Panamá - Darien	7,95	77,5
306784	Panamá - Mouth of Rio Paya	7,95	77,5
310252	Panamá - Darien - Tacarcuna	7,95	77,5
312883	Panamá - Canal Zone - Ft, Davis	8,99	-79,58
312884	Panamá - Canal Zone - Ft, Davis	8,99	-79,58
312886	Panamá - Canal Zone - Ft, Davis	8,99	-79,58
314256	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314258	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314259	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314260	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314261	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314262	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314263	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314264	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314265	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56

314266	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
541103	Panamá - Escopeta - San Felix	8,28	-81,66
314268	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314270	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314271	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314272	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314273	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314274	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314275	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314276	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314277	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314278	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314279	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314281	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314284	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314286	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314287	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314288	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314289	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314290	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314291	Panamá - Cerro Punta	8,85	-82,56
314568	Panamá - boca de Paya	8,02	-78,2
314569	Panamá - boca de Paya	8,02	-78,2
315728	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315729	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315730	Panamá - Changuinola	9,43	-82,51
315731	Panamá - Changuinola	9,43	-82,51
315732	Panamá - Changuinola	9,43	-82,51
323545	Panamá - Isla Bastiments	9,3	-82,13
323546	Panamá - Isla Bastiments	9,3	-82,13
323547	Panamá - Isla Bastiments	9,3	-82,13
323548	Panamá - Los Santos Guanico	7,3	-80,3
315718	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315719	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315720	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315721	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315722	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315723	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315724	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315725	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315726	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315727	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315709	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315712	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315713	Panamá - Almirante	9,3	-82,4

315714	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315715	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315716	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
315717	Panamá - Almirante	9,3	-82,4
323549	Panamá - Guanico	7,3	-80,3
323550	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323551	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323552	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323553	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
323554	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323555	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
323556	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323557	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323558	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323560	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323561	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323562	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323564	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323565	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323566	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323567	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323568	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323569	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323570	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323571	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
323572	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
323573	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323575	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
323576	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
323577	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323578	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
323579	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323580	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323581	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323582	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323583	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323584	Panamá - Las Palmitas	7,3	-80,3
323585	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
323586	Panamá - Guanico Arriba	7,3	-80,5
323587	Panamá - Cerro Punta - Casa Tilley	8,85	-82,56
323588	Panamá - Cerro Punta - Casa Tilley	8,85	-82,56
323589	Panamá - Cerro Punta - Casa Tilley	8,85	-82,56
323590	Panamá - Los Santos, Las Palmitas	7,3	-80,3
331882	Panamá - Cocle	8,41	-80,65
331883	Panamá - Chiriqui - Guabala	8,21	-81,7

331884	Panamá - Chiriqui - Guabala	8,21	-81,7
331885	Panamá - Cocle - Ola	8,41	-80,65
331886	Panamá - Chiriqui - Cerro Bruje, El Volcan	8,26	-81,77
331887	Panamá - Chiriqui - Cerro Bruje, El Volcan	8,26	-81,77
331888	Panamá - Chiriqui - Cerro Bruje, El Volcan	8,26	-81,77
331889	Panamá - Chiriqui - Cerro Bruje, El Volcan	8,26	-81,77
331890	Panamá	8,26	-81,77
331891	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331892	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331893	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331894	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331896	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331897	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
363068	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363069	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363070	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363071	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363072	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363073	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363074	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363075	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363076	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363077	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
457964	Panamá - Cocle - La Mesa, El Valle	8,38	-80,07
335394	Panamá - Bocas del Sibube	9,6	-82,81
335395	Panamá - San Blas Armila	8,6	-77,46
335396	Panamá - San Blas Armila	8,6	-77,46
335397	Panamá - San Blas Armila	8,6	-77,46
335398	Panamá - Armila	8,6	-77,46
363062	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363063	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363064	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363065	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363066	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
363067	Panamá - Darien - Jaque	7,5175	-78,17
331898	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331899	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331900	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331901	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331902	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331903	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331904	Panamá - Chiriqui - cuesta de piedra	8,68	-82,63
331905	Panamá - Chiriqui - San Vicente	8,6	-82,63
331906	Panamá - Chiriqui - Pedregal	8,36	-82,43
331907	Panamá - David	8,43	-82,43

331908	Panamá - Chiriqui - David	8,43	-82,43
332057	Panamá - Canal Zone - Barro Colorado	9,16	-79,83
287974	Trinidad - Granville	10,117	-61,8
307307	Trinidad - Arima	10,63	-61,28
307308	Trinidad - Granville	10,117	-61,8
307311	Trinidad - Brois Forest	10,117	-61,8
307312	Trinidad - penal Rock road	10,117	-61,8
307322	Trinidad - Cedros	14,45	90,03
536939	Trinidad - Guantapajaro	10,117	-61,8
539940	Trinidad - Plum Mitán	10,117	-61,8
464830	Panamá - Isla Colon - Bocas del Toro	9,24	-82,17
464832	Panamá - Isla Colon - Bocas del Toro	9,24	-82,17
464833	Panamá - Bocas del Toro - Cayo Nancy	9,33	-82,21
575576	Panamá - Bocas del Toro - Nuri	8,91	-81,81
575577	Panamá - Bocas del Toro - Nuri	8,91	-81,81
575579	Panamá - Bocas del Toro - Nuri	8,91	-81,81
575580	Panamá - Bocas del Toro - Nuri	8,91	-81,81
578358	Panamá - Bocas del Toro - Cayo Agua	9,15	-82,03
578359	Panamá - Bocas del Toro - Cayo Agua	9,15	-82,03
449863	Panamá - Isla San Cristoban - Bocas del Toro	8,38	-79,1
449864	Panamá - Isla San Cristoban - Bocas del Toro	8,38	-79,1
449866	Panamá - Isla San Cristoban - Bocas del Toro	8,38	-79,1
449867	Panamá - Tierra Obscura - Bocas del Toro	9,18	-82,28
464352	Panamá - Isla Bastimentos - Bocas del Toro	9,3	-82,13
464353	Panamá - Isla Bastimentos - Bocas del Toro	9,3	-82,13
464354	Panamá - Isla Bastimentos - Bocas del Toro	9,3	-82,13
464355	Panamá - Isla Bastimentos - Bocas del Toro	9,3	-82,13
464356	Panamá - Isla Bastimentos - Bocas del Toro	9,3	-82,13
464357	Panamá - Isla Bastimentos - Bocas del Toro	9,3	-82,13
464358	Panamá - Isla Bastimentos - Bocas del Toro	9,3	-82,13
578360	Panamá - Bocas del Toro - Cayo Agua	9,15	-82,03
578362	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Punta Llorona	9,16	-81,91
578363	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Punta Llorona	9,16	-81,91
578364	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Punta Llorona	9,16	-81,91
578365	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Punta Llorona	9,16	-81,91
578366	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Punta Llorona	9,16	-81,91
578367	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Punta Llorona	9,16	-81,91
578368	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Punta Alegre	9,16	-81,91
578369	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Punta Alegre	9,16	-81,91
578370	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Quebrada Hido	9,16	-81,91
578371	Panamá - Bocas del Toro - Peninsula Valiente, Quebrada Hido	9,16	-81,91
579155	Panamá - Isla Popa - Bocas del Toro - Sumwood Channel	9,18	-82,11
579156	Panamá - Isla Popa - Bocas del Toro - Sumwood Channel	9,18	-82,11
579158	Panamá - Isla Popa - Bocas del Toro - Sumwood Channel	9,18	-82,11
570159	Panamá - Isla Popa - Bocas del Toro - Sumwood Channel	9,18	-82,11

53577	Guatemala - Huehuetenago - Quezaltenago	14,83	-91,51
53578	Guatemala - Huehuetenago - Quezaltenago	14,83	-91,51
53579	Guatemala - Huehuetenago - Quezaltenago	14,83	-91,51
53580	Guatemala - Huehuetenago - Quezaltenago	14,83	-91,51
53601	Guatemala - Huehuetenago - Quezaltenago	14,83	-91,51
35004	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35005	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35006	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35007	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35008	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35009	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35010	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
20097	Panamá - Taboga	8,8	-79,5
12563	México - Sinaloa - Mazatlan	23,21	-106,41
12564	México - Sinaloa - Mazatlan	23,21	-106,41
16590	México - Sinaloa - Isla Palmito de Verde	23,21	-106,41
16597	México - Sinaloa - Isla Palmito de Verde	22,65	-105,68
34265	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34266	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34267	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34268	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34277	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34278	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34279	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34280	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34992	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
34994	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
34995	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
34269	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34270	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34271	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34272	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34281	México - Zacatecas - Escobedo	23,03	-103,83
34282	México - Zacatecas - Escobedo	23,03	-103,83
34283	México - Zacatecas - Escobedo	23,03	-103,83
34284	México - Zacatecas - Escobedo	23,03	-103,83
34996	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
34997	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
34998	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
34999	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
34273	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34274	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
4275	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34276	México - Zacatecas - Santa Rosa	22,5	-103,76
34285	México - Zacatecas - Escobedo	23,03	-103,83

34289	México - Zacatecas - Nochistlan	21,36	-102,85
34290	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
34291	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35000	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35001	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35002	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
35003	México - Zacatecas - Jalpa	24,32	-103,35
55944	México - Colima - La Cofradia	19,43	-103,55
55945	México - Colima - La Cofradia	19,43	-103,55
55946	México - Colima - Comala	19,31	103,75
73686	México - Guerrero - Zihuataneja	17,63	-101,55
73687	México - Guerrero - Zihuataneja	17,63	-101,55
12562	México - Guerrero - Zihuataneja	17,63	-101,55
13761	México - Oaxaca - Matias Romero	16,88	-95,03
9957	México - Oaxaca - Mitla	16,91	-96,4
9958	México - Oaxaca - Mitla	16,91	-96,4
9960	México - Oaxaca - Mitla	16,91	-96,4
9961	México - Oaxaca - Mitla	16,91	-96,4
12885	México - Oaxaca - Matias Romero	16,88	-95,03
12886	México - Oaxaca - Matias Romero	16,88	-95,03
12891	México - Oaxaca - Matias Romero	16,88	-95,03
12892	México - Oaxaca - Matias Romero	16,88	-95,03
25105	Costa Rica - Alajuela - Villa Quesada	10,33	-84,43
25106	Costa Rica - Alajuela - Villa Quesada	10,33	-84,43
25889	Costa Rica - Alajuela - Villa Quesada	10,33	-84,43
25906	Costa Rica - Alajuela - Villa Quesada	10,33	-84,43
24380	Costa Rica - Cartago - Moravia de Chirripo	9,85	-83,43
24551	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
24552	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
24553	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
24557	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
24558	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
24584	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
24585	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
24586	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
24591	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
26054	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
26091	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
26720	Costa Rica - Cartago - Turrialba	9,9	-83,68
23492	Costa Rica - Guanacaste - Playa del Coco	10,53	-85,68
23493	Costa Rica - Guanacaste - Playa del Coco	10,53	-85,68
23562	Costa Rica - Guanacaste - Playa del Coco	10,53	-85,68
23590	Costa Rica - Guanacaste - Playa del Coco	10,53	-85,68
23599	Costa Rica - Guanacaste - Playa del Coco	10,53	-85,68
23600	Costa Rica - Guanacaste - Playa del Coco	10,53	-85,68

23724	Costa Rica - Guanacaste - Playa del Coco	10,53	-85,68
23725	Costa Rica - Guanacaste - Playa del Coco	10,53	-85,68
24746	Costa Rica - Guanacaste - Curiol de Santa Rosa	10,6	-85,26
24747	Costa Rica - Guanacaste - Curiol de Santa Rosa	10,6	-85,26
28524	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28526	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28528	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28529	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28530	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28532	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28533	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28770	Costa Rica - Guanacaste - Finca Toboga	10,45	-85,13
24116	Costa Rica - Heredia - Finca La Selva	10,26	-84
24761	Costa Rica - Guanacaste - Curiol de Santa Rosa	10,6	-85,26
24764	Costa Rica - Guanacaste - Curiol de Santa Rosa	10,6	-85,26
24814	Costa Rica - Guanacaste - Arenal	10,61	-85,4
24815	Costa Rica - Guanacaste - Arenal	10,61	-85,4
24816	Costa Rica - Guanacaste - Arenal	10,61	-85,4
24817	Costa Rica - Guanacaste - Arenal	10,61	-85,4
24819	Costa Rica - Guanacaste - Arenal	10,61	-85,4
24820	Costa Rica - Guanacaste - Arenal	10,61	-85,4
28517	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28518	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28519	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28520	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28521	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28522	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
28523	Costa Rica - Guanacaste - Finca la Pacifica	10,45	-85,13
24206	Costa Rica - Limon - Finca la Lola	10,1	-83,36
25487	Costa Rica - Limon - Finca la Lola	10,1	-83,36
25856	Costa Rica - Limon - Los Diamantes	10,1	-83,36
25857	Costa Rica - Limon - Los Diamantes	10,1	-83,36
23798	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23799	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23800	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23801	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23857	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23858	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23859	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23860	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23861	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23862	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23863	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23864	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23865	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73

23866	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23867	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
23868	Costa Rica - Puntarenas - Boca del Barranca	9,96	-84,73
27000	Costa Rica - Puntarenas - Jaco	9,61	-84,63
15487	Costa Rica - San Jose - La Palma	9,35	-83,73
24245	Costa Rica - San Jose - Santa Ana	9,93	-84,18
24246	Costa Rica - San Jose - Santa Ana	9,93	-84,18
24247	Costa Rica - San Jose - Santa Ana	9,93	-84,18
24249	Costa Rica - San Jose - Santa Ana	9,93	-84,18
24250	Costa Rica - San Jose - Santa Ana	9,93	-84,18
24251	Costa Rica - San Jose - Santa Ana	9,93	-84,18
24717	Costa Rica - San Jose - Quepos	9,45	-84,15
24168	Costa Rica - Limon - Finca la Lola	10,1	-83,36
24169	Costa Rica - Limon - Finca la Lola	10,1	-83,36
24170	Costa Rica - Limon - Finca la Lola	10,1	-83,36
24171	Costa Rica - Limon - Finca la Lola	10,1	-83,36
24203	Costa Rica - Limon - Finca la Lola	10,1	-83,36
13963	México - Chiapas - Tonala	16,08	93,75
18661	México - Chiapas - Tonala	16,08	93,75
18662	México - Chiapas - Yerba Buena Mision	17,17	-92,9
18663	México - Chiapas - Yerba Buena Mision	17,17	-92,9
18665	México - Chiapas - Yerba Buena Mision	17,17	-92,9
55912	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55913	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55914	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55915	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55916	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55927	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55928	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55929	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55930	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55931	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
18666	México - Chiapas - Yerba Buena Mision	17,17	-92,9
18667	México - Chiapas - Yerba Buena Mision	17,17	-92,9
18668	México - Chiapas - Las Margaritas	16,31	-91,98
55918	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55919	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55920	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55921	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55934	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55935	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55936	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55937	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55938	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
11242	México - Colima - La Media Luna	19,05	-104,33

11243	México - Colima - La Media Luna	19,05	-104,33
11244	México - Colima - La Media Luna	19,05	-104,33
11245	México - Colima - Colima	19,23	-103,71
11721	México - Colima - Armeria	18,93	-103,96
27437	México - Colima - Colima	19,23	-103,71
55922	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55923	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55924	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55925	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55926	México - Colima - Comatlan	20,933	-104,55
55939	México - Colima - La Cofradia	19,43	-103,55
55940	México - Colima - La Cofradia	19,43	-103,55
55941	México - Colima - La Cofradia	19,43	-103,55
55942	México - Colima - La Cofradia	19,43	-103,55
55943	México - Colima - La Cofradia	19,43	-103,55
256983	Argentina - Jujuy - Palma Sola	-23,98	-64,3
183304	Argentina - Jujuy - Palma Sola - Sta Barbara	-23,98	-64,3
205453	Uruguay - 33 - Olimar Chico	-33,233	-54,517
205452	Uruguay - 33 - Olimar Chico	-33,233	-54,517
205451	Uruguay - Tacuarembó - Estancia El Infiernillo	-31,28	-56,15
205450	Uruguay - Tacuarembó - Estancia El Infiernillo	-31,28	-56,15
205449	Uruguay - Tacuarembó - Tacuarembó	-31,73	-55,98
205447	Uruguay - Tacuarembó - Tacuarembó	-31,73	-55,98
205420	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205421	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205426	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205427	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205433	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205411	Uruguay - Cerro Largo - Melo	-32,36	-54,18
205413	Uruguay - Cerro Largo - Melo	-32,36	-54,18
205415	Uruguay - Cerro Largo - Melo	-32,36	-54,18
205416	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205417	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205418	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205419	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205412	Uruguay - Cerro Largo - Melo	-32,36	-54,18
205446	Uruguay - Tacuarembó - Tacuarembó	-31,73	-55,98
205443	Uruguay - Tacuarembó - Tacuarembó	-31,73	-55,98
205440	Uruguay - Tacuarembó - Tacuarembó	-31,73	-55,98
205438	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205437	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205436	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
205434	Uruguay - Maldonado - Aigua	-34,2	-54,75
148661	Paraguay - Villa Rica	-25,75	-56,43
148654	Paraguay - Villa Rica	-25,75	-56,43

148660	Paraguay - Villa Rica	-25,75	-56,43
148658	Paraguay - Villa Rica	-25,75	-56,43
148657	Paraguay - Villa Rica	-25,75	-56,43
148659	Paraguay - Villa Rica	-25,75	-56,43
234315	Paraguay - Boqueron - Pozo Colorada	-22,63	-60,5
148656	Paraguay - Villa Rica	-25,75	-56,43
234313	Paraguay - Boqueron - Pozo Colorada	-22,63	-60,5
234316	Paraguay - Boqueron - Pozo Colorada	-22,63	-60,5
148655	Paraguay - Villa Rica	-25,75	-56,43
391780	Chile - Arica - Caleta Cuya	-18,48	-70,33
114995	Paraguay - Sapucay	-25,66	-56,91
114992	Paraguay - Sapucay	-25,66	-56,91
114997	Paraguay - Sapucay	-25,66	-56,91
114999	Paraguay - Sapucay	-25,66	-56,91
114977	Paraguay - Sapucay	-25,66	-56,91
115001	Paraguay - Sapucay	-25,66	-56,91
210957	Bolivia - Beni	-10,8	-65,38
209756	Bolivia - Beni - Guayaramarin	-10,8	-65,38
264904	Bolivia - Santa Cruz - Caballero	-17,833	-64,18
209755	Bolivia - Beni - Guayaramarin	-10,8	-65,38
209754	Bolivia - Beni - Guayaramarin	-10,8	-65,38
209753	Bolivia - Beni - Guayaramarin	-10,8	-65,38
210956	Bolivia - Beni - Cascajal	-12,21	-65,21
210955	Bolivia - Beni - Cascajal	-12,21	-65,21
209749	Bolivia - Beni - Baures	-13,58	-63,58
209748	Bolivia - Beni - Baures	-13,58	-63,58
248182	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248187	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248186	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248184	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248183	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248185	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248181	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248179	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248178	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248191	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248190	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
261767	Bolivia - Beni - Totaisal	-14,54	-66,19
215031	Bolivia - Beni - S, Joaquin	-14,1	-66,73
215030	Bolivia - Beni - S, Joaquin	-14,1	-66,73
910960	Bolivia - Beni - S, Antonio	-14,95	-64,66
210961	Bolivia - Beni - S, Antonio	-14,95	-64,66
209759	Bolivia - Beni - Versalles	-12,73	-63,3
209760	Bolivia - Beni - Versalles	-12,73	-63,3
209761	Bolivia - Beni - Versalles	-12,73	-63,3

209762	Bolivia - Beni - Versalles	-12,73	-63,3
209763	Bolivia - Beni - Versalles	-12,73	-63,3
209764	Bolivia - Beni - Versalles	-12,73	-63,3
261768	Bolivia - Beni - Yacuma	-15,16	-67,06
263476	Bolivia - Beni - Yacuma	-15,16	-67,06
38501	Bolivia - Cochabamba	-17,38	-66,15
248940	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248941	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248942	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248943	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248945	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248946	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248947	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
263621	Bolivia - Chuquisaca - Tarabuco	-19,166	-64,91
263622	Bolivia - Chuquisaca - Tarabuco	-19,166	-64,91
263623	Bolivia - Chuquisaca - Tarabuco	-19,166	-64,91
263624	Bolivia - Chuquisaca - Tarabuco	-19,166	-64,91
263619	Bolivia - Chuquisaca - Tarabuco	-19,166	-64,91
263620	Bolivia - Chuquisaca - Tarabuco	-19,166	-64,91
263627	Bolivia - Chuquisaca - Padilla	-19,3	-64,3
263628	Bolivia - Chuquisaca - Padilla	-19,3	-64,3
248934	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248932	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248931	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248930	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
261847	Bolivia - La Paz - Sta Ana de Medidi	-13,33	-68,3
248944	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248939	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248938	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248937	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248936	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248935	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248950	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248949	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248948	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
261772	Bolivia - La Paz - Sta Ana de Medidi	-13,33	-68,3
261773	Bolivia - La Paz - Sta Ana de Medidi	-13,33	-68,3
248189	Bolivia - Beni - Rurrenabaque	-14,46	-67,56
248967	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248966	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
248963	Bolivia - La Paz - Caracato	-16,5	-68,15
263482	Bolivia - La Paz - Tatarana	-16,68	-68
263481	Bolivia - La Paz - Tatarana	-16,68	-68
263480	Bolivia - La Paz - Tatarana	-16,68	-68
263478	Bolivia - La Paz - Tatarana	-16,68	-68

263479	Bolivia - La Paz - Tatarana	-16,68	-68
263477	Bolivia - La Paz - Tatarana	-16,68	-68
248971	Bolivia - Pando	-16,15	-67,73
262638	Bolivia - Pando	10:57	66:03:00
262640	Bolivia - Pando	11:26	67:34:00
262641	Bolivia - Pando	11:26	67:34:00
262642	Bolivia - Pando	16:09	-67,73
264690	Bolivia - La Paz - Chichijaj	16:09	-67,73
61752	Bolivia - Sta Cruz - Buena vista	-15,5	-60,48
246410	Bolivia - Sta Cruz - Sara	-17,16	-61,35
260246	Bolivia - Sta Cruz - Tita	-18,46	-62,11
260247	Bolivia - Sta Cruz - Tita	-18,46	-62,11
260248	Bolivia - Sta Cruz - Tita	-18,46	-62,11
246649	Bolivia - Tarija - Tiquipa	-20,56	-63,21
246413	Bolivia - Sta Cruz - Sara	-17,16	-61,35
261766	Bolivia - Santa Cruz - San ramon	-16,6	-62,7
246648	Bolivia - Sta Cruz - camarapa	-17,97	-64,55
263211	Bolivia - Sta Cruz - camarapa	-17,97	-64,55
263513	Peru - Ica - Chinchá - La Centinela	-13,45	-76,13
263514	Peru - Ica - Chinchá - La Centinela	-13,45	-76,13
263515	Peru - Ica - Chinchá - La Centinela	-13,45	-76,13
263516	Peru - Ica - Chinchá - La Centinela	-13,45	-76,13
263512	Peru - Ica - Chinchá - La Centinela	-13,45	-76,13
60603	Peru - Chinchá	-13,45	-76,13
60604	Peru - Vieja	-7,31	-79,55
64062	Peru - San Ignacio	-13,73	-75,91
64061	Peru - San Ignacio	-13,73	-75,91
98740	Peru - Rio Santiago	-4,417	-77,633
98744	Peru - Rio Santiago	-4,417	-77,633
230145	Peru - Pasco - Oxapampa - San Pablo	-10,56	-75,4
230144	Peru - Pasco - Oxapampa - San Pablo	-10,56	-75,4
230143	Peru - Pasco - Oxapampa - San Pablo	-10,56	-75,4
230142	Peru - Pasco - Oxapampa - San Pablo	-10,56	-75,4
230141	Peru - Pasco - Oxapampa - San Pablo	-10,56	-75,4
230139	Peru - Pasco - Oxapampa - Nevati Mision	-10,56	-75,4
213421	Peru - Pasco - Oxapampa - Nevati Mision	-10,56	-75,4
213420	Peru - Pasco - Oxapampa - Nevati Mision	-10,56	-75,4
213419	Peru - Pasco - Oxapampa - Nevati Mision	-10,56	-75,4
76084	Peru - Boca R, Urubama	-13,36	-73,9
230736	Peru - Junin - Tarma - San Ramon	-11,15	-75,99
230738	Peru - Junin - Tarma - San Ramon	-11,15	-75,99
230737	Peru - Junin - Tarma - San Ramon	-11,15	-75,99
76087	Peru - Boca R, Urubama	-13,36	-73,9
76085	Peru - Boca R, Urubama	-13,36	-73,9
62099	Equador - Puente de Chimbo	-2,15	-79,375

62100	Equador - Puente de Chimbo	-2,15	-79,375
62932	Equador - Puente de Chimbo	-2,15	-79,375
67645	Equador - Baños	-2,21	-80,7
47259	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
47258	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
47257	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
47256	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
47255	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
47254	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
47253	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
47252	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
47251	Equador - portovelo	-3,71	-79,61
144235	Colômbia - Antioquia - La Caja	6,51	-75,95
61577	Colômbia - Medellin	6,29	-75,53
32777	Colômbia - Cauca - Rio Frio	4,9	-76,12
32776	Colômbia - Cauca - Rio Frio	4,9	-76,12
32775	Colômbia - Cauca - Rio Frio	4,9	-76,12
269417	Colômbia - Valle de Cauca	5	-76
269416	Colômbia - Valle de Cauca	5	-76
269415	Colômbia - Valle de Cauca	5	-76
15098	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
15099	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
15096	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
15095	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
14724	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
14572	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
14571	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
14570	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
14569	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
14568	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
14567	Colômbia - Bonda	11,23	-74,11
142202	Colômbia - Villavicenzio	4,15	-73,635
142157	Colômbia - Villavicenzio	4,15	-73,635
121163	Bolívia - Chulumani	-16	-67
121164	Bolívia - Chulumani	-16	-67
121165	Bolívia - Chulumani	-16	-67
121166	Bolívia - Paratini	-21,86	-66,25
238698	Bolívia - Huashi	-21,86	-66,25
564333	Bolívia - Beni - Reserva Beni	-14,25	-66,55
564334	Bolívia - Beni - Reserva Beni	-14,25	-66,55
281127	Colômbia - El Orinoco	10,16	-73,4
281129	Colômbia - El Orinoco	10,16	-73,4
483944	Colômbia - Valle Vije/Cali	6,43	-74,53
499509	Colômbia - Antioquia - Zaragoza	7,49	-74,87
499510	Colômbia - Antioquia - Zaragoza	7,49	-74,87

281138	Colômbia - El Orinoco	10,16	-73,4
281140	Colômbia - Villanueva	4,95	-76,05
281142	Colômbia - Villanueva	4,95	-76,05
281147	Colômbia - Villanueva	4,95	-76,05
113368	Equador - Paramba	0,81	-78,35
522574	Equador - Guayas Huera Negra - Balao - Tenquel	-2,59	-79,38
513479	Equador - Chongon	-2,23	-80,06
522573	Equador - LosRios - Vinces	-1,33	-79,43
534317	Equador - LosRios - Vinces	-1,33	-79,43
534318	Equador - LosRios - Vinces	-1,33	-79,43
534319	Equador - LosRios - Vinces	-1,33	-79,43
534320	Equador - LosRios - Vinces	-1,33	-79,43
194456	Peru - Puquinra	-13,47	-72,11
236912	Peru - Isla Asia	-12,47	-81,16
236914	Peru - Isla Asia	-12,47	-81,16
256807	Peru - Perene	-10,96	-75,21
499222	Peru - Ucayali - Pucallpa	-8,38	-74,53
566549	Peru - Madre de Dios - Manu Pakitza	-12,25	-70,9
441515	Colômbia - Guajira - La isla	11,41	-71,55
548330	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548331	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548332	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548333	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548334	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
574562	Equador - Pastaza - Tiguino	-1,11	-76,95
528564	Equador - Pichincha Snato Domingo	-0,41	-78,38
528565	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548323	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548324	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548325	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548326	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548327	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548328	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
548329	Equador - Pastaza - Mera	-1,47	-78,13
8446	Equador - Imbabura - Consecion	0,65	-78,16
18835	Colômbia - Cauca - Popayan	2,44	-75,62
18836	Colômbia - Cauca - Popayan	2,44	-75,62
18837	Colômbia - Cauca - Popayan	2,44	-75,62
18838	Colômbia - Cauca - Popayan	2,44	-75,62
18839	Colômbia - Cauca - Popayan	2,44	-75,62
18840	Colômbia - Cauca - Popayan	2,44	-75,62
18841	Colômbia - Cauca - Popayan	2,44	-75,62
8935	Peru - Junin - Vitoc	-11,15	-75,99
8936	Peru - Junin - Vitoc	-11,15	-75,99
267211	Guiana Francesa - Paracou - Sinnamary	5,38	-52,95

267504	Guiana Francesa - Paracou - Sinnamary	5,38	-52,95
69972	Venezuela - Cuchirano	7,52	-65,84
69971	Venezuela - Cuchirano	7,52	-65,84
32138	Venezuela - Bolivar - El Hacha	10,52	-68,86
24370	Venezuela - Merida	8,59	-71,14
24369	Venezuela - Merida	8,59	-71,14
24366	Venezuela - Merida	8,59	-71,14
24368	Venezuela - Merida	8,59	-71,14
24365	Venezuela - Merida	8,59	-71,14
24364	Venezuela - Merida	8,59	-71,14
24363	Venezuela - Merida	8,59	-71,14
24362	Venezuela - Merida	8,59	-71,14
31477	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31476	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31475	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31474	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31473	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31472	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31471	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31470	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31469	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
31468	Venezuela - San Esteban	10,95	-71,1
182711	Guiana - Ilha Wakenaam - Rio Essequibo	6,58	-58,27
182710	Guiana - Ilha Wakenaam - Rio Essequibo	6,58	-58,27
336979	Guiana - Kuitaro - Dadawana Savannah	2,83	-59,51
336981	Guiana - Kuitaro - Dadawana Savannah	2,83	-59,51
122131	Suriname	5,5	-55,1
122130	Suriname	5,5	-55,1
583062	Belize - Toledo	16,85	-88,82
102941	Venezuela - Peña de Mora	8,84	-70,32
115313	Venezuela	8,59	-71,145
172938	Venezuela - Merida	8,59	-71,145
370851	Venezuela - Caracas	10,32	-66,54
370852	Venezuela - Trujillo - Agua Santa	9,32	-70,4
370853	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370854	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370855	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370857	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370856	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370858	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370859	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370860	Venezuela - Trujillo - Agua Santa	9,32	-70,4
373875	Venezuela - Apure - Puerto Paez	6,33	67,13
373874	Venezuela - Apure - Puerto Paez	6,33	67,13
373873	Venezuela - Apure - Puerto Paez	6,33	67,13

373872	Venezuela - Apure - Puerto Paez	6,33	67,13
373871	Venezuela - Apure - Puerto Paez	6,33	67,13
373869	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373868	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373867	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373866	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373865	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373864	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373863	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373862	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373861	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373860	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
373859	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372480	Venezuela - Yaracui - Urama	10,37	-68,24
372479	Venezuela - Yaracui - Urama	10,37	-68,24
372478	Venezuela - Yaracui - Urama	10,37	-68,24
372477	Venezuela - Yaracui - Urama	10,37	-68,24
372410	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372411	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372412	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372413	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372414	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372431	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372432	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372433	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372434	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372435	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372436	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372437	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372438	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372457	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372458	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372459	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372460	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372461	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372462	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372463	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372450	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372439	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372440	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372441	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372442	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372443	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372444	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372445	Venezuela - Yaracui-Falcon - Puerto Cabello	10,35	-68,15

372446	Venezuela - Yaracui - Urama	10,37	-68,24
372453	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372454	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372476	Venezuela - Trujillo - Valera	9,31	-70,35
372475	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372474	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372473	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372472	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372471	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372470	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372469	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372468	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372467	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372466	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372465	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
372464	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370869	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370868	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370864	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370863	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370862	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370861	Venezuela - Trujillo - Valera	9,32	-70,4
370865	Venezuela - Trujillo - Agua Santa	9,32	-70,4
372403	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372404	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372405	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
372406	Venezuela - Carabobo - Puerto Cabello	10,35	-68,15
416556	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416557	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416558	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416559	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416560	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416561	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416562	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,2	-66,18
416563	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416564	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416565	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416566	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416567	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416568	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416569	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416570	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416571	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,08	-66,16
416572	Venezuela - Amazonas - Cano Marucito	5,08	-66,16
416573	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,08	-66,16

416531	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416532	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416533	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416534	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416535	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416536	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416537	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416538	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416539	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416540	Venezuela - Amazonas - San Juan, Tamanaco	5,18	-66,13
416541	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416544	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416545	Venezuela - Amazonas - San Juan, Tamanaco	5,18	-66,13
416546	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416547	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416548	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416554	Venezuela - Amazonas - Corocoro, Cebro utaje	5,23	-66,06
416555	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409365	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39
409366	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39
416505	Venezuela - Monagas - Caripe	10,1	-63,3
416506	Venezuela - Monagas - Caripe	10,1	-63,3
416507	Venezuela - Monagas - Caripe	10,1	-63,3
416508	Venezuela - Monagas - Caripe	10,1	-63,3
416519	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416520	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416521	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416522	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416523	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416524	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416525	Venezuela - Amazonas - San Juan, Tamanaco	5,18	-66,13
416526	Venezuela - Amazonas - San Juan, Tamanaco	5,18	-66,13
416527	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416528	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416529	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416530	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
416576	Venezuela - Barinas - La Veja del santo Domingo, Altamira	8,5	-70,3
418368	Venezuela - Apure - Nula	7,19	71,57
441490	Venezuela - Guarico - Hato Las Palmas	9,36	-67,27
441491	Venezuela - Miranda - Caracas	10,29	-66,16
441492	Venezuela - Apure - San Fernando de Apure	7,31	-67,24
441493	Venezuela - Apure - San Fernando de Apure	7,31	-67,24
441494	Venezuela - Zulia - Kasmera	9,59	-72,43
441495	Venezuela - Zulia - Machiques	9,59	-72,43
441496	Venezuela - Zulia - Machiques	9,59	-72,43

441497	Venezuela - Tachira - Las Mesas	8,1	-72,1
441498	Venezuela - Tachira - Las Mesas	8,1	-72,1
441501	Venezuela - Zulia - Kasmera	9,59	-72,43
441502	Venezuela - Zulia - Kasmera	9,59	-72,43
441503	Venezuela - Zulia - Kasmera	9,59	-72,43
441504	Venezuela - Zulia - Kasmera	9,59	-72,43
441505	Venezuela - Zulia - Kasmera	9,59	-72,43
441506	Venezuela - Falcon - Maracaibo	10,28	-70,48
441507	Venezuela - Falcon - Socopito	10,28	-70,48
441508	Venezuela - Zulia - Maracaibo	10,51	-72,15
441509	Venezuela - Zulia - Maracaibo	10,51	-72,15
441519	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
455947	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
455948	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
455949	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
455950	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
455951	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
455952	Venezuela - Lara - El Tocuyo	9 51 N	-69,43
455953	Venezuela - Coro - Riecito	9 51 N	-69,43
455955	Venezuela - Coro - Riecito	10,54	-68,46
455956	Venezuela - Coro - Riecito	10,54	-68,46
455957	Venezuela - Coro - Riecito	10,54	-68,46
455958	Venezuela - Coro - Riecito	10,54	-68,46
545382	Venezuela - Amazonas - Tamatama	3,15	-68,83
517499	Venezuela - Aragua - Ocumare de la Costa	10,24	-67,46
517500	Venezuela - Aragua - Maracay, El Limon	10,17	-67,36
405705	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405706	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
373879	Venezuela - Apure - Puerto Paez	6,33	-67,31
373883	Venezuela - Carabobo - Urama	10,32	-68,23
373880	Venezuela - Apure - Puerto Paez	6,33	-67,31
373885	Venezuela - Carabobo - Urama	10,32	-68,23
373886	Venezuela - Carabobo - Urama	10,32	-68,23
387642	Venezuela - Miranda - Caracas	10,32	-66,5
387645	Venezuela - Bolivar - El Dorado	6,17	-61,19
387646	Venezuela - Guarico - Caracas	9,55	-66,19
387647	Venezuela - Guarico - Caracas	9,55	-66,19
387650	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,19	-65,58
387651	Venezuela - Miranda - Pedogal, Rio Chico	10,19	-65,58
387652	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,19	-65,58
387653	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,19	-65,58
387654	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,19	-65,58
387655	Venezuela - Miranda - Pedogal, Rio Chico	10,19	-65,58
387656	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387657	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54

387658	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387659	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387660	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387661	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387662	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387663	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387664	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387665	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387666	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387667	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387668	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387669	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
398670	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387671	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387687	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,23	-65,59
387688	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387689	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
387690	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,19	-65,58
387691	Venezuela - Miranda - Rio Chico	10,2	-65,54
405693	Venezuela - Sucre - Cumana, quatepe	10,26	-64,02
405694	Venezuela - Sucre - Cumana, quatepe	10,26	-64,02
405695	Venezuela - Sucre - Cumana	10,27	-63,57
405696	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405697	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405698	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405699	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405700	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405701	Venezuela - Sucre - Cumana	10,27	-63,57
405702	Venezuela - Sucre - Cumana	10,27	-63,57
405703	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405704	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405707	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405708	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405709	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405710	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405711	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405712	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405713	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405714	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405715	Venezuela - Nueva Esparta - La Asuncion	11,03	-63,51
405728	Venezuela - Nueva Esparta - Porlamar	10,59	-64,08
405732	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405734	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405735	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405736	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29

405737	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405738	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405739	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405740	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405741	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405742	Venezuela - Bolivar - Ciudad	6,49	-63,29
405743	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405744	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405745	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405746	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405747	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405748	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405749	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405750	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405751	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405752	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405753	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405754	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405755	Venezuela - Amazonas - Belen	3,39	-65,46
405757	Venezuela - Amazonas - Esmeralda	2,3	-65,13
405758	Venezuela - Amazonas - Esmeralda	2,27	-65,14
405762	Venezuela - Amazonas - Tamatama	3,1	-65,49
405763	Venezuela - Amazonas - Tamatama	3,1	-65,49
405766	Venezuela - Amazonas - Tamatama	3,1	-65,49
409253	Venezuela - Sucre - Guiria	10,38	-62,15
409255	Venezuela - Sucre - Guiria	10,4	-62,15
409257	Venezuela - Monagas - Caripe	10,12	-63,32
409258	Venezuela - Monagas - Caripe	10,12	-63,32
409259	Venezuela - Sucre - Carupano	10,37	-63,01
409260	Venezuela - Sucre - Carupano	10,37	-63,01
409261	Venezuela - Sucre - Carupano	10,37	-63,01
409262	Venezuela - Sucre - Carupano	10,37	-63,01
409263	Venezuela - Sucre - Carupano	10,37	-63,01
409264	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409265	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409266	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409267	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409268	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409269	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409270	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,21	-66,11
409271	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409272	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409273	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409274	Venezuela - Amazonas - San Juan, Rio Manapiare	5,18	-66,13
409310	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39

409311	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho, Raya	5,3	-67,37
409313	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409355	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,33	-67,36
409356	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,33	-67,36
409357	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39
409358	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39
409359	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39
409360	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39
409361	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39
409362	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,24	-67,39
409363	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,06	-67,45
409364	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,33	-67,36
416501	Venezuela - Sucre - Tuantal, Cumana	10,27	-67,57
416502	Venezuela - Sucre - Tuantal, Cumana	10,27	-67,57
416503	Venezuela - Sucre - Tuantal, Cumana	10,27	-67,57
409324	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409325	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409344	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409345	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409346	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409347	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409348	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409349	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,33	-67,36
409351	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,33	-67,36
409352	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,33	-67,36
409353	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,33	-67,36
409354	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,33	-67,36
409314	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409315	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409316	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409317	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409319	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409320	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409321	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409322	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
409323	Venezuela - Amazonas - Puerto Ayacucho	5,3	-67,37
441520	Venezuela - Carabobo - Montalban, potrerito	10,12	-68,2
441521	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441522	Venezuela - Carabobo - Montalban, potrerito	10,12	-68,2
441524	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441527	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441563	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	70,3
441539	Venezuela - Carabobo - Montalban, potrerito	10,12	-68,2
441540	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441541	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,16	-68,16

441542	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441544	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441545	Venezuela - Carabobo - Montalban, potrerito	10,12	-68,2
441546	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441547	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441548	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441549	Venezuela - Carabobo - Montalban, La Leonera	10,12	-68,2
441550	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441551	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441529	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441530	Venezuela - Carabobo - Montalban, potrerito	10,12	-68,2
441531	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441532	Venezuela - Carabobo - Montalban, potrerito	10,12	-68,2
441534	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441535	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441536	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441537	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441538	Venezuela - Carabobo - Montalban	10,12	-68,2
441591	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441592	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441593	Venezuela - Apure - Nula, Nulita	7,19	-71,57
441595	Venezuela - Apure - Nula, Nulita	7,19	-71,57
441596	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441597	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441598	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441599	Venezuela - Apure - Nula, Nulita	7,19	-71,57
441600	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441576	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441577	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441578	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441579	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441580	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441581	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441582	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441583	Venezuela - Barinas - Altamira, la veja del rio Santo Domingo	8,5	-70,3
441586	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441587	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441594	Venezuela - Apure - Nula, Nulita	7,19	-71,57
441566	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441567	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441568	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441569	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441570	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441571	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441572	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3

441574	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441575	Venezuela - Barinas - Altamira	8,5	-70,3
441626	Venezuela - Falcon - Capatarida	11,1	-70,37
441627	Venezuela - Falcon - Capatarida	11,1	-70,37
455939	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,52	-67,23
455940	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,52	-67,23
455941	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,52	-67,23
455942	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,52	-67,23
455943	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
455944	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
455945	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
455946	Venezuela - Guarico - Calabozo	8,49	-67,22
441614	Venezuela - Bolivar - Icabaru	4,25	-61,35
441616	Venezuela - Bolivar - Icabaru	4,25	-61,35
441618	Venezuela - Monagas - Maturin	9,19	-62,56
441619	Venezuela - Falcon - Capatarida	11,07	-70,46
441620	Venezuela - Falcon - Capatarida	11,07	-70,46
441621	Venezuela - Falcon - Capatarida	11,07	-70,46
441622	Venezuela - Falcon - Capatarida	11,1	-70,37
441623	Venezuela - Falcon - Capatarida	11,1	-70,37
441624	Venezuela - Falcon - Capatarida	11,1	-70,37
441601	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441602	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441603	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441606	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441607	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441608	Venezuela - Apure - Nula, La Chiricoa	7,19	-71,57
441609	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441610	Venezuela - Apure - Nula	7,19	-71,57
441611	Venezuela - Zulia - Encontrados	9,09	-72,36
441613	Venezuela - Bolivar - Icabaru	4,25	-61,35
MZUSP1252	Bicego/BA		
MZUSP1260	Bicego/BA		
MZUSP2677	Vila Nova/Ba	-17,3667	-40,3
MZUSP17567	Rio Maruanum/AP	0,0333	-51,05
MZUSP17568	Rio Maruanum/AP	0,0333	-51,05
MZUSP22586	Cachoeira do Espelho, Rio Xingu/PA	-3,8	-53
MZUSP2544	Venezuela - Mérida	8,5983	-71,145
MZUSP4583	Caxiricatuba, Rio Tapajós/PA	-2,83333	-55,1333
MZUSP962	Bolívia – LaPaz - Chulumani	-16,5	-68,15
MZUSP17590	Guareí/SP	-23,3667	-48,1667
MZUSP17591	Guareí/SP	-23,3667	-48,1667
MZUSP17597	Parque nacional da Sa. dos Órgaos/RJ - gruta São Lourenço	-22,4333	-42,9833
MZUSP21194	Marsilac São Paulo/SP	-23,5333	-46,6167
MZUSP21207	Marsilac São Paulo/SP	-23,5333	-46,6167

MZUSP24238	Marsilac São Paulo/SP	-23,5333	-46,6167
MZUSP27684	Ilha do Cardoso/SP	-25,0167	-47,95
MZUSP27690	Ilha do Cardoso/SP	-25,0167	-47,95
MZUSP27709	Ilha do Cardoso/SP	-25,0167	-47,95
MZUSP27710	Ilha do Cardoso/SP	-25,0167	-47,95
MZUSP28036	Ilha do Cardoso/SP	-25,0167	-47,95
MZUSP28134	Ilha do Cardoso/SP	-25,0167	-47,95
MZUSP28159	Ilha do Cardoso/SP	-25,0167	-47,95
MZUSP29008	Piraju/SP	-23,2	-49,3833
MZUSP15378	Vila Nova/BA	-17,3667	-40,3
MZUSP31500	Pq. Cantareira/SP	-24	-46,6
MZUSP17956	desconhecida		
2	Rio Verde/MS	-19,93	-54,86
990	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
1037	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
1038	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
3204	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
3209	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
3217	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
3223	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
3677	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
3682	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
4117	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
4153	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
4154	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
4183	Aquidauana/MS	-20,46	-55,8
10158	Gruta Ariranha/SP	-21,18	-48,78
10159	Gruta Ariranha/SP	-21,18	-48,78
10161	Gruta Ariranha/SP	-21,18	-48,78
10192	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
10203	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
10204	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
10206	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
10207	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
10208	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
10209	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
10210	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
10211	Ariranha - Fazenda Furquim/SP	-21,18	-48,78
11491	Ilha Maracá/RR	3,5	-61,5
11492	Ilha Maracá/RR	3,5	-61,5
11750	Três Lagoas/MS	-20,8	-51,71
11751	Três Lagoas/MS	-20,8	-51,71
11753	Três Lagoas/MS	-20,8	-51,71
11764	Três Lagoas/MS	-20,8	-51,71
11765	Três Lagoas/MS	-20,8	-51,71

12143	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12144	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12394	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12395	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12396	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12397	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12398	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12399	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12400	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12479	Paranaíba/MS	-19,66	-51,18
12672	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
12769	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
13151	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
14124	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
14710	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
14773	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
14798	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
14848	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
14856	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
14868	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
14771	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
15185	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
15191	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
15257	Jacupiranga/SP	-24,69	-48,03
15267	Jacupiranga/SP	-24,69	-48,03
15268	Jacupiranga/SP	-24,69	-48,03
15271	Jacupiranga/SP	-24,69	-48,03
15272	Jacupiranga/SP	-24,69	-48,03
15729	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15288	Humaitá/AM	-7,51	-76,02
15729	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15716	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15717	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15718	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15719	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15720	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15721	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15722	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15723	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15724	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15725	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15726	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15727	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15728	Botucatu/SP	-22,86	-48,43
15746	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88

15748	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15750	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15751	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15752	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15753	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15756	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15757	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15758	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15759	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15760	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15761	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15762	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15764	Iporanga/SP	-24,58	-48,58
15783	Iporanga/SP	-24,58	-48,58
15838	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15839	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15848	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15849	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15851	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15852	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15853	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15857	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15933	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15934	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15935	Pariquera-açu/SP	-24,71	-47,88
15889	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15891	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15896	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15899	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15900	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15901	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
15902	Eldorado/SP	-24,52	-48,1
FE001	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
FE002	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
FE003	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
FE005	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
FE007	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
FE008	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
FE009	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
FE010	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
FE011	Bocaiúva do sul/Paraná	-25,18	-49,13
AD770	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD767	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD768	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD769	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41

AD772	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD775	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD778	Ribeirão Pires/SP	-23,71	-46,41
AD809	Sta Isabel do rio Negro/AM	-0,4	-65,03
AD832	Barcelos/AM	-1	-62,96
AD893	Barcelos/AM	-1	-62,96
LA001	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
LA002	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
LA003	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
LA004	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
LA005	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
LA006	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
LA007	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
LA008	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
LA009	Gruta da Saúva - DF	-15,32	-47,52
FM38	Porto Nacional - TO	-10,7	-48,3
MZTO01	Dois Irmãos - TO	-5,28	-48,08
MZTO02	Dois Irmãos - TO	-5,28	-48,08
MZTO3	Dois Irmãos - TO	-5,28	-48,08
MZTO4	Dois Irmãos - TO	-5,28	-48,08
FM35	Cananéia - SP	-25,01	-47,95
FM36	Cananéia - SP	-25,01	-47,95
FM37	Cananéia - SP	-25,01	-47,95
ICC01	Ilha das Cavianas - PA	0,1	-50
ICC02	Ilha das Cavianas - PA	0,1	-50
ICC03	Ilha das Cavianas - PA	0,1	-50
ICC04	Ilha das Cavianas - PA	0,1	-50
ICC05	Ilha das Cavianas - PA	0,1	-50
ICC07	Ilha das Cavianas - PA	0,1	-50
ICC10	Ilha das Cavianas - PA	0,1	-50
ICC11	Ilha das Cavianas - PA	0,1	-50
MCP0625	Palmares do Sul - RS	-30,26	-50,51
MCP0626	Palmares do Sul - RS	-30,26	-50,51
258009	Passo Durazhero/RS	-28,61	-56,03
235845	Harmonia/RS	-29,53	-51,43
235844	Harmonia/RS	-29,53	-51,43
235862	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235860	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235859	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235858	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235855	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235856	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235853	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235852	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235854	Candelária/RS	-27,63	-54,15

235851	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235850	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235849	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235848	Candelária/RS	-27,63	-54,15
235846	Candelária/RS	-27,63	-54,15
202327	Belém/PA	-1,45	-48,48
97044	Ilha do Taiuma/TO		
97046	Ilha do Taiuma/TO		
97047	Ilha do Taiuma/TO		
97050	Ilha do Taiuma/TO		
97051	Ilha do Taiuma/TO		
97045	Ilha do Taiuma/TO		
97048	Ilha do Taiuma/TO		
97049	Ilha do Taiuma/TO		
97310	Ilha do Taiuma/TO		
97311	Ilha do Taiuma/TO		
97052	Ilha do Taiuma/TO		
97312	Ilha do Taiuma/TO		
97313	Ilha do Taiuma/TO		
97314	Ilha do Taiuma/TO		
97327	Ilha do Taiuma/TO		
141380	São Sebastião/SP	-23,8	-47,35
141381	São Sebastião/SP	-23,8	-47,35
361767	Belém/PA	-1,45	-48,48
361768	Belém/PA	-1,45	-48,48
361769	Belém/PA	-1,45	-48,48
361770	Belém/PA	-1,45	-48,48
361771	Belém/PA	-1,45	-48,48
282164	Teresópolis/RJ	-22,43	-42,98
391103	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391104	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391105	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391106	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391107	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391109	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391110	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391111	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391112	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391113	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391114	Sete Lagoas/MG	-19,45	-44,23
391115	Lagoa Santa/MG	-19,63	-43,88
391116	Lagoa Santa/MG	-19,63	-43,88
391117	Lagoa Santa/MG	-19,63	-43,88
391118	Lagoa Santa/MG	-19,63	-43,88
391119	Lagoa Santa/MG	-19,63	-43,88

391120	Lagoa Santa/MG	-19,63	-43,88
391121	Lagoa Santa/MG	-19,63	-43,88
391122	Lagoa Santa/MG	-19,63	-43,88
555709	Floresta Nacional do Araripe/CE	-7,23	-39,38
549501	Ilha Jabuti/PA	-3,63	-52,36
530988	80KM norte Manaus/AM	-3,11	-60,02
549500	Ilha Jabuti/PA	-3,63	-52,36
62890	Santa Teresa, Nova Lombardia/ES	-19,91	-40,6
40245	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40250	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40252	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40253	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40256	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40257	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40261	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40262	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40265	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40266	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40267	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40268	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40274	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40276	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40277	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40284	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
40286	Riode Janeiro/RJ	-22,53	-43,23
16479	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16480	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16481	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16482	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16484	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16485	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16486	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16487	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16488	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16489	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16492	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16493	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16494	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16496	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16497	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16498	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16499	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16502	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16503	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16504	Itapira/SP	-22,43	-46,83

16508	Itapira/SP	-22,43	-46,83
16509	Itapira/SP	-22,43	-46,83
40203	Itapira/SP	-22,43	-46,83
40204	Itapira/SP	-22,43	-46,83
40206	Itapira/SP	-22,43	-46,83
40208	Itapira/SP	-22,43	-46,83
40214	Itapira/SP	-22,43	-46,83
40215	Itapira/SP	-22,43	-46,83
40218	Itapira/SP	-22,43	-46,83
MZUSP16651	Nova Olinda/CE	-6,2167	-40,5667
MZUSP16652	Nova Olinda/CE	-6,2167	-40,5667
MZUSP16653	Nova Olinda/CE	-6,2167	-40,5667
MZUSP16661	Nova Olinda/CE	-6,2167	-40,5667
MZUSP16672	Nova Olinda/CE	-6,2167	-40,5667
MZUSP16673	Nova Olinda/CE	-6,2167	-40,5667
MZUSP16674	Nova Olinda/CE	-6,2167	-40,5667
MZUSP16789	Nova Olinda/CE	-6,2167	-40,5667
MZUSP16666	14Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16667	14Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16668	14Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16685	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16686	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16687	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16688	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16689	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16690	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16691	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16692	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16693	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16694	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16695	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16696	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16737	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16738	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16739	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16740	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16741	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16742	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16743	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16744	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16745	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16746	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16747	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16748	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16749	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167

MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167
MZUSP16684	Serrote das Lajes, 17 Km sul de Exu/PE	-7,51667	-39,7167