



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO

SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA



Dissertação de Mestrado

Rodovias atuam como barreira para o fluxo gênico de roedores subterrâneos?

O caso de Ctenomys minutus (Ctenomyidae)

Isadora Beraldi Esperandio

Porto Alegre, fevereiro de 2014

Rodovias atuam como barreira para o fluxo gênico de roedores subterrâneos?

O caso de Ctenomys minutus (Ctenomyidae)

Isadora Beraldi Esperandio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Thales R. O. de Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Andreas Kindel

Comissão Examinadora

Prof. Dra. Gislene Lopes Gonçalves - UFRGS

Prof. Dr. Demétrio Luis Guadagnin - UFRGS

Prof. Dra. Clara Bentes Grilo – UA (PT)

Porto Alegre, fevereiro de 2014

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ecologia pela formação e pelo suporte ao projeto e à CAPES pela bolsa concedida durante estes dois anos.

À Ligia Tchaicka, pelo interesse em participar do projeto, por disponibilizar o material coletado e pelas diversas dúvidas respondidas.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Evolução pela ajuda e prestatividade, principalmente Mayara Medeiros, Gisele Oliveira e Sandra Bülau, à Tatiane Noviski e ao Fabrício Bertuol por me ajudarem a dar os primeiros passos no mundo da genética, à Tatiane Trigo pela ajuda nas análises genéticas, e mais do que todos, à Graziela Iob, que além de mãe de duas meninas, é mãe de muitos amigos e não hesita em nos ajudar, mesmo nos momentos de aperto ou de férias.

Aos Nerfianos, novos e velhos, próximos e distantes, pela companhia, amizade e aprendizado. Por compartilharem o tesão de trabalhar com Ecologia de Rodovias e por mostrarem a maravilha de um trabalho em grupo. Tenho muito orgulho de fazer parte disso! Um agradecimento especial à Fernanda Zimmermann Teixeira, que eu considero como minha tutora e mais do que isso, amiga.

Ao meu co-orientador e grande amigo Prof. Dr. Andreas Kindel, pelos quase 5 anos de trabalho, pela confiança depositada em mim, pela inspiração e motivação contagiante, pelos momentos de terapia e discussões sobre vida, regados a chocolate!

Ao meu orientador Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas, por embarcar nesse projeto, por abrir este espaço para mim, por me dar todo o suporte logístico, e claro, pela orientação!

Aos meus colegas de mestrado, especialmente à Dirleane Ottonelli, Elise Rocha, Fernando Luz e Laís Mozzaquattro, pela amizade, companheirismo e pelos momentos de desopilação!

Aos colegas do PPG com quem compartilhei inúmeras horas dentro das salas de aula, que fizeram os momentos de estudo muito mais prazerosos!

Aos meus amigos, aqueles do colégio, da faculdade ou da vida, pela amizade, pelo apoio e pelas conversas de corredor ou de bar que clarearam as minhas ideias. Em especial à Mariana Bahlis por estar sempre presente desde o primeiro dia de aula na faculdade (literalmente!). À Karine Costa e à Bruna Meneses, presentes que encontrei pelos corredores da Bio/Eco e que levarei pra vida! À Fernanda Busnello, que é parte de mim, por incontáveis horas ao telefone ouvindo meus desabafos, por trazer lucidez nos meus momentos de turbidez mental, por todas as risadas proporcionadas, por todos os incentivos, por sempre me ajudar nas minhas decisões. Sua amizade não tem preço!!

Ao Abel Vitor da Cunha, meu nego, que me incentivou e me cobrou, que me acalmou e que me animou, que foi minha válvula de escape durante nove longos meses, obrigada meu amor!

Ao Abel Antônio, Gisele e Paula Cunha por me acolherem em sua casa!

Aos meus irmãos, pela paciência, pelos conhecimentos compartilhados, especialmente à Isabela que sempre foi minha professora e hoje é também minha revisora!

Por fim, agradeço e dedico este trabalho aos meus pais, Eunice e Miguel, que sacrificaram muitas coisas pela nossa educação, que estabeleceram uma base forte pra que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos sem medo de assumir os riscos. Obrigada pelo amor, pela confiança e pelo apoio!

Resumo

Rodovias podem fragmentar populações por dois mecanismos, mortalidade e evitamento. Como espécies que evitam rodovias são raramente atropeladas por veículos e, então, não são detectadas em monitoramentos de fauna atropelada, outras abordagens são necessárias para identificar se eles estão sendo afetados. *Ctenomys minutus* (tuco-tuco) é um roedor subterrâneo que habita campos arenosos nas margens de rodovias e são raramente registrados em monitoramentos de fauna atropelada. Buscamos identificar se as rodovias são uma barreira para o fluxo gênico de tuco-tuco baseado em nove *loci* de microssatélite. Coletamos amostras de tecido epitelial de indivíduos de quatro populações: duas com a presença (Weber e Amaral) e, como controle, duas com a ausência de rodovia (Maribo I e Maribo II). Mensuramos diversidade genética, diferenciação genética (estatística F) e acessamos estrutura genética (agrupamento bayesiano). Não observamos redução na variabilidade genética e encontramos um baixo nível de isolamento entre Weber e Amaral e um isolamento ainda menor entre Maribo I e Maribo II. O método bayesiano separou os indivíduos em dois grupos, onde Maribo I e Maribo II são um grupo consistente e Weber e Amaral possuem fracas diferenciações. Os resultados nos indicam que um efeito de barreira entre as populações separadas pela rodovia está em processo e que é necessário mais tempo para observarmos de forma mais clara o isolamento. São necessários mais estudos genéticos e comportamentais para certificar este padrão. Sob aspectos práticos, seria adequado monitorar as populações afetadas e, eventualmente, aplicar alguma medida de mitigação na estrada pra proporcionar conectividade. Por fim, a abordagem genética se mostrou muito interessante para avaliar este impacto.

Palavras-chave Evitamento, Efeito de barreira, Microssatélite, Fragmentação de hábitat, Diferenciação genética.

Abstract

Roads can fragment populations by two mechanisms, mortality and avoidance behavior. Since species that avoid roads are rarely killed by vehicles and thus cannot be detected in roadkill surveys, other approaches are necessary to identify whether they are affected. *Ctenomys minutus* (tuco-tuco) is a subterranean rodent who inhabits sand fields including at the margins of roads, however is rarely recorded on roadkill surveys. We aimed to identify if roads are a barrier to the gene flow of tuco-tuco based on nine microsatellite loci. We collected tissue samples from individuals of four populations: a pair with the presence (Weber and Amaral) and, as control, a pair with absence of a road (Maribo I and Maribo II). We measured the genetic diversity, the genetic differentiation (F-statistics), and assessed the genetic structure (Bayesian clustering). We observed no reduction in genetic variability and a low isolation level in pairwise comparison of Weber and Amaral, which was even lower between Maribo I and Maribo II. The Bayesian method separated individuals into 2 clusters, where Maribo I and Maribo II are one consistent cluster and Weber and Amaral present weak differentiations. The results indicate that a barrier effect between populations separated by roads is in process. More genetic and behavioral studies are needed to confirm this pattern. Under practical aspects, it would be appropriate to monitor the affected populations and possibly apply some mitigation measure on the road to provide connectivity. Finally, genetic approach proved very interesting to evaluate this impact.

Key words Road avoidance, Barrier effect, Microsatellite, Habitat fragmentation, Genetic differentiation.

Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de figuras	2
Lista de tabelas	3
Introdução geral.....	3
Rodovias atuam como barreira para o fluxo gênico de roedores subterrâneos? O caso de <i>Ctenomys minutus</i> (Ctenomyidae).....	6

Lista de figuras

Figura 1 Mapa da Planície Costeira do sul do Brasil com o desenho amostral do estudo. Círculos amarelos representam áreas de coleta deste estudo. Círculos vermelhos representam áreas de coleta de Lopes (2011) mostrando outras populações da espécie no entorno. As estrelas representam as cidades conectadas pela estrada RS-030. Em cinza áreas de pastagens e campos arenosos, em azul sistema lagunar. 12

Figura 2 Resultados do Structure para $K = 2$ (acima) e $K = 3$ (abaixo). Associação proporcional (eixo Y) de cada indivíduo em dois ou três grupos de população. Cada indivíduo é identificado por uma barra vertical, e cada grupo por uma cor. No eixo X estão as localidades: (1) Weber, (2) Amaral, (3) Maribo I e (4) Maribo II..... 18

Lista de tabelas

- Tabela 1 Sumário das informações básicas dos nove loci de microssatélite nas populações amostradas. Número de alelos por locus, heterozigosidades observadas e esperadas (H_o e H_e , respectivamente), resultados dos testes exatos de equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE valor P), e a estimativa global de FIS sobre os alelos, de acordo com Weir & Cockerham (1984). Em negrito, valores significativos de P , considerando $P < 0,00139$ (após correção de Bonferroni).....16
- Tabela 1 Estimativas pareadas de F_{ST} (abaixo da diagonal) e estimativas pareadas de R_{ST} (acima da diagonal). Resultados com todos os *loci* e sem os *loci* HAI12 e SOC1, que desviaram de HWE. Em negrito, valores baixos de F_{ST}17
- Tabela 3 Probabilidades de associação dos indivíduos (q) para cada grupo, considerando $K = 3$ e intervalos de probabilidade de 90% (IP (90%)). Em negrito, a maior probabilidade para cada indivíduo.....18

Introdução geral

Os efeitos ecológicos das rodovias e ferrovias sobre a biota estão sendo identificados e estudados. O efeito mais abordado é a mortalidade de fauna por colisão com veículos, mas existem muitos outros impactos importantes: perda e modificação do hábitat, criação de corredor para dispersão de espécies exóticas, poluição, mudança de hidrologia, aumento na pressão de predação, perturbação/efeito de borda, alteração de comportamento animal e efeito de barreira (Forman & Alexander 1998; Trombulak & Frissell 2000). A presença de rodovias fragmentando ecossistemas pode ocasionar o isolamento reprodutivo das populações, impedir o fluxo gênico, diminuir a diversidade genética e o tamanho das populações, diminuir a probabilidade de recolonização de áreas desocupadas, aumentando os riscos de extinção local de inúmeras espécies (Balkenhol & Waits 2009). O isolamento de populações em função da redução da conectividade entre manchas de hábitat é considerado uma das maiores ameaças à persistência de espécies causada pela fragmentação (Reed 2004).

Kociolek & Clevenger (2007) recomendam investigar os efeitos da mortalidade e do comportamento de evitamento sobre os indivíduos e populações e os subseqüentes efeitos demográficos e genéticos. Alguns estudos empíricos com essa abordagem já foram realizados desde grilos e besouros até anfíbios e mamíferos (Holderegger & Di Giulio 2010). A maioria dos trabalhos revisados por Holderegger & Di Giulio (2010) encontraram efeitos negativos sobre a diversidade genética e aumentos na diferenciação ou distância genética. Não foram encontrados efeitos da rodovia sobre algumas populações de besouros, sapos, salamandras, pequenos roedores, e mamíferos de médio e grande porte, podendo ser uma resposta

condicionada a alguns fatores, como um intervalo de tempo entre o processo causal (estrutura atual da paisagem) e a resposta biológica (estrutura genética) (Balkenhol *et al.* 2009).

Para estes estudos genéticos, diversos marcadores moleculares foram utilizados: mtDNA (DNA mitocondrial), ISSR (regiões genômicas entre *loci* de microssatélite), VNTR (número variável de repetições em tandem - minissatélites), RAPD (Fragmentos de DNA amplificados ao acaso), isoenzimas, e SSR (sequência simples repetida - microssatélite). Cada tipo de marcador possui suas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas na escolha do método. O marcador molecular mais amplamente utilizado em trabalhos de ecologia de rodovias é o microssatélite, porque sua alta taxa de mutação e alta variação propiciam relativamente alto poder de detectar subdivisão genética entre populações fragmentadas. O microssatélite, então, é uma região altamente variável e não codificadora do DNA nuclear que consiste em séries de repetições de 2-6 pares de base. Eles são codominantes, altamente polimórficos, com uma taxa de mutação alta (duas ou três vezes maior do que aloenzimas) (Ashley & Dow 1994).

Neste trabalho, avaliaremos o possível efeito de barreira de rodovias sobre o fluxo gênico do roedor fossorial *Ctenomys minutus* (Ctenomyidae) a partir de *loci* de microssatélites.

**Rodovias atuam como barreira para o fluxo gênico de roedores
subterrâneos? O caso de *Ctenomys minutus* (Ctenomyidae)**

Rodovias atuam como barreira para o fluxo gênico de roedores subterrâneos? O caso do tuco-tuco *Ctenomys minutus* (Ctenomyidae)¹

I. B. Esperandio², A. Kindel², L. Tchaika³, T. R. O. de Freitas²

Resumo

Rodovias podem fragmentar populações por dois mecanismos, mortalidade e evitamento. Como espécies que evitam rodovias são raramente atropeladas por veículos e, então, não são detectadas em monitoramentos de fauna atropelada, outras abordagens são necessárias para identificar se eles estão sendo afetados. *Ctenomys minutus* (tuco-tuco) é um roedor subterrâneo que habita campos arenosos nas margens de rodovias e são raramente registrados em monitoramentos de fauna atropelada. Buscamos identificar se as rodovias são uma barreira para o fluxo gênico de tuco-tuco baseado em nove *loci* de microssatélite. Coletamos amostras de tecido epitelial de indivíduos de quatro populações: duas com a presença (Weber e Amaral) e, como controle, duas com a ausência de rodovia (Maribo I e Maribo II). Mensuramos diversidade genética, diferenciação genética (estatística F) e acessamos estrutura genética (agrupamento bayesiano). Não observamos redução na variabilidade genética e encontramos um baixo nível de isolamento entre Weber e Amaral ($F_{ST} = 0,04$; $Nm = 1,86$) e um isolamento ainda menor entre Maribo I e Maribo II ($F_{ST} = 0,02$; $Nm = 3,64$). O método bayesiano separou os indivíduos em dois grupos, onde Maribo I e Maribo II são um grupo consistente e Weber e Amaral possuem fracas diferenciações. Os resultados nos indicam que um efeito de barreira

¹ Artigo a ser submetido para o periódico Molecular Ecology.

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Maranhão.

entre as populações separadas pela rodovia está em processo e que é necessário mais tempo para observarmos de forma mais clara o isolamento. São necessários mais estudos genéticos e comportamentais para certificar este padrão. Sob aspectos práticos, seria adequado monitorar as populações afetadas e, eventualmente, aplicar alguma medida de mitigação na estrada pra proporcionar conectividade. Por fim, a abordagem genética se mostrou muito interessante para avaliar este impacto.

Palavras-chave: Evitamento de estradas, Efeito de barreira, Microsatélite, Fragmentação de habitat, Diferenciação genética

Introdução

Rodovias são estruturas importantes para o desenvolvimento socioeconômico, mas causam diversas alterações ambientais durante sua construção e operação, com efeitos conhecidos nas populações animais (Fahrig & Rytwinski 2009). Alguns estudos empíricos (Vos *et al.* 2001; Bhattacharya *et al.* 2003; Keller & Largiadèr 2003; Riley *et al.* 2006; Marsh *et al.* 2007; Shepard *et al.* 2008) e outros estudos usando dados simulados (e.g. Jackson & Fahrig 2011) têm demonstrado que rodovias podem fragmentar populações e reduzir a diversidade genética por dois mecanismos: mortalidade e evitamento (tanto da superfície da rodovia, do fluxo de veículos ou da presença de veículos). Jackson & Fahrig (2011), em um estudo de simulação, demonstraram que a mortalidade é o principal mecanismo de perda de diversidade genética porque remove continuamente indivíduos das populações diminuindo sua abundância. No entanto, tanto a mortalidade quanto o evitamento devem ter um importante efeito na persistência da população pela redução da variabilidade genética e/ou restauração demográfica

em sistemas fonte-dreno (Jaeger *et al.* 2005). O principal método empregado para avaliação de impacto de rodovias nas populações animais é o monitoramento de fauna atropelada e, sendo que espécies que evitam rodovias são raramente atropeladas e registradas nestes monitoramentos, outras abordagens metodológicas são necessárias para identificar se as espécies com esse comportamento são afetadas.

Entre mamíferos, as menores espécies são as mais prováveis a exibirem o comportamento de evitamento da rodovia (Rytwinski & Fahrig 2013). Diversos estudos com os métodos de translocação e/ou captura-marcação-recaptura têm sido utilizados para verificar o efeito das rodovias no movimento de diferentes espécies de pequenos mamíferos. Tais estudos demonstraram que indivíduos conseguem atravessar a rodovias quando são translocados, mas eles evitam fazê-lo espontaneamente (Oxley *et al.* 1974; Swihart & Slade 1984; Mader 1984; Burnett 1992; Richardson *et al.* 1995; Clark *et al.* 2001; Goosem 2001; Rondinini & Doncaster 2002). Poucos estudos foram realizados para verificar as consequências deste comportamento no fluxo gênico e na diversidade genética das populações (Holderegger & Di Giulio 2010). Um estudo de Gerlach & Musolf (2000) encontrou um efeito de barreira em *Clethrionomys glareolus* baseado em baixos, mas significantes valores de F_{ST} , causado por uma migração limitada através da rodovia. Porém, não encontrou este resultado para estrada de chão ou ferrovia. Conrey & Mills (2003) detectaram um decréscimo no fluxo gênico dependente das espécies amostradas e dos tipos de rodovia. No entanto, Redeker *et al.* (2006) and Gauffre *et al.* (2008) não encontraram estruturação genética nas populações de pequenos mamíferos separadas pelas rodovias, possivelmente porque eram populações grandes e com altas taxas de dispersão (todos os três estudos citados utilizaram a estatística F). Baseado nas

informações acima, nós podemos esperar que uma espécie de pequeno mamífero que tenha um tempo de geração curto, com um tamanho populacional e mobilidade reduzidos, deva ser mais sensível ao efeito de barreira de rodovias.

Na planície costeira do sul do Brasil, encontramos populações de *Ctenomys minutus* (tuco-tuco) habitando campos arenosos em margens de rodovias; no entanto, raramente são registrados indivíduos atropelados. Tuco-tuco é um pequeno roedor subterrâneo com hábitos solitários e sedentários, que vive em populações descontínuas (popularmente chamadas de tuqueiras) e com baixa habilidade de dispersão (Fonseca 2003; Marinho & Freitas 2006): uma coleção de atributos que poderiam torná-lo vulnerável à fragmentação de população por rodovias.

Neste estudo, objetivamos identificar se as populações de tuco-tuco estão sob efeito de barreira. Utilizamos *loci* de microsatélite para avaliar a diversidade e a diferenciação genética entre duas tuqueiras separadas por rodovias e duas tuqueiras separadas por distância similar sem uma barreira física (controle). Esperamos que as tuqueiras separadas pela rodovia apresentem uma menor diversidade genética e uma maior diferenciação quando comparadas com as tuqueiras separadas apenas pela distância.

Material e Métodos

Espécie de estudo

Ctenomys minutus Nehring, 1887 é um roedor que habita campos arenosos e pastagens na planície costeira do sul do Brasil. Esta espécie é subterrânea, sendo que cada indivíduo vive solitariamente em galerias defendidas agressivamente de outros indivíduos, e compartilhadas

apenas durante a reprodução. Apesar do territorialismo, as espécies ocorrem em populações descontínuas, agregadas e relativamente densas (média de 10 indivíduos por hectare) por causa da baixa frequência de deslocamentos e sua curta distância (Fonseca 2003; Marinho & Freitas 2006). Os indivíduos são sedentários e saem das galerias apenas para forragear na superfície, buscar parceiros reprodutivos ou dispersar. A reprodução é anual e o acasalamento ocorre de Julho a Outubro. O cuidado parental perdura até os filhotes tornarem-se juvenis e dispersarem para as margens da mesma tuqueira, para outra tuqueira ou para áreas vazias. Os indivíduos levam de seis a sete meses para atingir a maturidade sexual (Fonseca 2003). Esta espécie já é impactada por rodovias: indivíduos expostos à emissão de automóveis têm mostrado um aumento no número de células com dano no DNA, especialmente as fêmeas adultas. Dados químicos mostram que elevados níveis de hidrocarbonetos, metais e NO₂ estão associados com os danos celulares observados em tuco-tuco (Heuser *et al.* 2002).

Área de estudo

Nosso estudo foi conduzido na Planície Costeira no sul do Brasil, em uma área de campo utilizado para o gado, com solo arenoso, coberto predominantemente por gramíneas e ciperáceas.

Amostramos populações de tuco-tuco durante os anos de 2000 e 2001 em lados opostos da rodovia RS-030 (fazenda “Weber” -50.13°, -29.93° e fazenda “Amaral” -50.22°, -29.95°), cada população estando 100 m distantes da margem da rodovia e 1 km distantes uma da outra. Também amostramos duas populações controle (fazenda “Maribo I” -50.16°, -29.91° e fazenda “Maribo II” -50.16°, -29.91°), separadas 700 m uma da outra, sem rodovias ou outra barreira física aparente entre elas (Figura 1). A rodovia RS-030 é pavimentada e possui quatro

pistas, com canteiro central. Conecta as cidades de Gravataí e Tramandaí (no litoral norte do Rio Grande do Sul), mas a área amostrada encontra-se no trecho entre Osório e Tramandaí. Esta rodovia foi pavimentada em 1974 e duplicada em 1990. O tráfego é constante de Março a Outubro, aumentando consideravelmente durante o verão; o tráfego diário médio anual é 11.608 veículos (baseado no ano 2004, DAER).

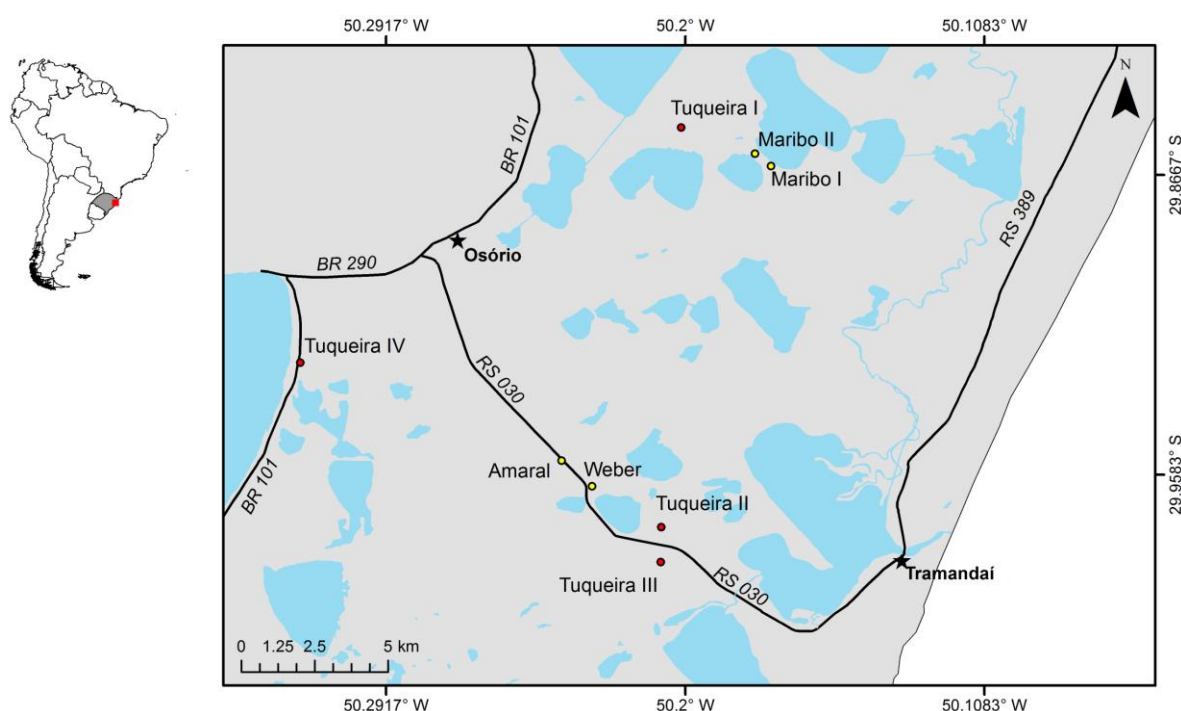


Figura 1 Mapa da Planície Costeira do sul do Brasil com o desenho amostral do estudo. Círculos amarelos representam áreas de coleta deste estudo. Círculos vermelhos representam áreas de coleta de Lopes (2011) mostrando outras populações da espécie no entorno. As estrelas representam as cidades conectadas pela estrada RS-030. Em cinza áreas de pastagens e campos arenosos, em azul sistema lagunar.

Coleta de dados e genotipagem

Os indivíduos de tuco-tuco foram capturados usando armadilhas do tipo Oneida Victor, anestesiados, individualizados, e um pequeno pedaço de tecido de sua cauda foi coletado. A amostragem foi conduzida com a permissão do Ministério Brasileiro do Meio Ambiente

(IBAMA; número das licenças 101/99-DIFAS e 130/2002-CGFAU/LIC). Manipulação e cirurgia foram realizadas sob anestesia com Cetamina (Rhoipharma, BR), e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento. O tecido foi estocado em etanol em um freezer à -20 °C até sua utilização em laboratório. A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo de Medrano *et al.* (1990), usando precipitação com sal. Para este estudo, selecionamos amostras de vinte indivíduos de cada tuqueira baseado na qualidade do material de DNA. Usamos o equipamento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) para mensurar a razão 260/280 de ácido nucléico e selecionamos o material com a razão acima de 0,8.

Para genotipagem, utilizamos um *locus* microsatélite desenvolvido para *Ctenomys haigi* (HAI12; Lacey *et al.* 1999), quatro *loci* desenvolvidos para *Ctenomys sociabilis* (SOC1, SOC2, SOC4, SOC5; Lacey 2001), e quatro *loci* desenvolvidos para *Ctenomys torquatus* (TOR1, TOR2, TOR4, TOR5; Roratto *et al.* 2011). A amplificação de cada *primer* foi realizada em uma reação com volume de 20 µl contendo, para os *primers* HAI e SOC que já possuíam fluorescência, 14 µl de H₂O, 2 µl de tampão para PCR, 0,6 µl de MgCl₂, 0,4 µl de dNTP, 0,4 µl de cada *primer*, 0,2 µl de Taq e 2 µl de solução de DNA, e, para os *primers* TOR, contendo 13,1 µl de H₂O, 2,5 µl de tampão para PCR, 1 µl de MgCl₂, 0,4 µl de dNTP, 0,4 µl de *primer reverse*, 0,1 µl de *primer forward*, 0,3 µl de fluorescência (Hex ou Fam), 0,2 µl de Taq e 2 µl de solução de DNA. A amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada com uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 59 °C (SOC2, SOC5), 57 °C (TOR2) ou 55 °C (outros *primers*) por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s, e uma extensão final a 72 °C por 1 min. Os produtos do PCR foram genotipados pelos sequenciadores Applied Biosystems 3730xl e

ABI PRISM 310, e todos os alelos foram registrados manualmente usando o software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystem 2006).

Análise dos dados

Acessamos o número de alelos, a heterozigosidade observada e esperada, F_{IS} (Índice de Fixação da estatística F), desvio do equilíbrio Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação, e número estimado de migrantes – usando alelos privativos -, e mensuramos a diferenciação de população através do cálculo, por pares de população, da estatística F (F_{ST}) e estatística Rho (R_{ST}), com todos os *loci* e sem os *loci* que desviaram do HWE, usando Genepop 4.2.1 (Rousset 2008). A fim de corrigir os efeitos causados por vários testes, aplicamos sequencialmente os ajustes de Bonferroni para o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e para o desequilíbrio de ligação (Rice 1989).

Para acessar a estrutura genética, utilizamos um método de agrupamento Bayesiano não espacial. O agrupamento Bayesiano é um método que utiliza os genótipos *multilocus* para definir grupos genéticos e designar indivíduos amostrados ao seu mais provável grupo de origem. Este método foi implementado no software STRUCTURE 2.3.2.1 (Falush *et al.* 2003), e, como hipotetizamos que a rodovia é uma barreira linear separando duas populações, utilizamos um número fixo de populações possíveis (K) igual a 2 e 3, a fim de minimizar a influência do isolamento por distância. Realizamos as análises com modelo de mistura e assumimos frequências alélicas correlacionadas. Utilizamos um *burn-in* de 100.000, seguido de 1.000.000 iterações MCMC.

Resultados

Os nove *loci* de microssatélite foram polimórficos em todas as amostras totalizando 63 alelos e uma média de 6,8 alelos por *locus*, variando de 4 a 11 alelos. Dois de 36 testes de desvio do equilíbrio Hardy-Weinberg mostraram deficit de heterozigosidade, HAI12 e SOC1 em Amaral, com $p < 0,00139$ (Tabela 1), e nenhum dos testes mostraram desequilíbrio de ligação ($p < 0,00139$). O número de migrantes (Nm) para todas as tuqueiras, após correção pelo tamanho amostral, foi 2,37, o Nm entre Weber e Amaral foi 1,86 e o Nm entre Maribo I e Maribo II foi 3,64.

Tabela 2 Sumário das informações básicas dos nove *loci* de microssatélite nas populações amostradas. Número de alelos por *locus*, heterozigosidades observadas e esperadas (H_o e H_e , respectivamente), resultados dos testes exatos de equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE valor P), e a estimativa global de F_{IS} sobre os alelos, de acordo com Weir & Cockerham (1984). Em negrito, valores significativos de P, considerando $P < 0,00139$ (após correção de Bonferroni).

		HAI12	SOC1	SOC2	SOC4	SOC5	TOR1	TOR2	TOR4	TOR5
	No. de alelos	4	9	11	4	10	8	6	4	5
Weber	H_o	5	16	16	6	9	13	13	7	12
	H_e	9,31	15,72	14,95	6,74	12,90	16,28	13,26	10,23	12,61
	HWE valor P	0,01	0,75	0,40	0,58	0,05	0,11	0,33	0,10	0,39
	Fis	0,47	-0,02	-0,07	0,11	0,31	0,21	0,02	0,32	0,05
Amaral	H_o	5	9	18	12	11	14	15	11	14
	H_e	12,08	16,02	16,67	8,54	13,40	13,70	15,38	11,27	13,27
	HWE valor P	0,001	0,0005	0,87	0,15	0,23	0,43	0,90	0,35	0,61
	Fis	0,59	0,44	-0,08	-0,42	0,18	-0,02	0,02	0,02	-0,06
Maribo I	H_o	10	11	11	7	2	9	9	14	14
	H_e	11,10	14,87	10,88	11,28	5,91	12,19	11,20	11,82	12,33
	HWE valor P	0,83	0,007	0,51	0,02	0,003	0,43	0,04	0,79	0,81
	Fis	0,10	0,26	-0,01	0,38	0,67	0,27	0,20	-0,17	-0,14
Maribo II	H_o	6	9	9	9	5	9	13	14	14
	H_e	11,08	8,43	10,85	12,13	4,63	11,20	12,38	13,15	12,89
	HWE valor P	0,003	0,61	0,34	0,02	1,00	0,43	0,96	0,93	0,43
	Fis	0,46	-0,07	0,17	0,26	-0,08	0,20	-0,05	-0,06	-0,09

Estimativas de F_{ST} e R_{ST} tiveram resultados similares e apresentaram mudanças quando removemos os *loci* em desequilíbrio de Hardy-Weinberg (HAI12 e SOC1; Tabela 2). Eles mostraram que as populações Weber e Amaral são mais isoladas das populações Maribo I e Maribo II (F_{ST} variando entre 0,2149 e 0,2923, e R_{ST} variando entre 0,2770 e 0,3217). Também mostrou que existe algum fluxo gênico entre as populações Weber e Amaral ($F_{ST} = 0,0486$, $R_{ST} = 0,0703$) e um fluxo gênico ainda maior entre as populações Maribo I e Maribo

II ($F_{ST} = 0,0104$, $R_{ST} = 0,0406$). Considerando os resultados similares, discutiremos apenas os valores de F_{ST} .

Tabela 3 Estimativas pareadas de F_{ST} (abaixo da diagonal) e estimativas pareadas de R_{ST} (acima da diagonal). Resultados com todos os *loci* e sem os *loci* HAI12 e SOC1, que desviaram de HWE. Em negrito, valores baixos de F_{ST} .

Área	TODOS <i>LOCI</i>				SEM HAI12 E SOC1			
	Weber	Amaral	Maribo I	Maribo II	Weber	Amaral	Maribo I	Maribo II
Weber		0,0538	0,2437	0,3022		0,0703	0,3003	0,2770
Amaral	0,0430		0,2201	0,2719	0,0486		0,2770	0,3217
Maribo I	0,2547	0,1986		0,0246	0,2923	0,2362		0,0406
Maribo II	0,2625	0,2158	0,0253		0,2687	0,2149	0,0104	

Os resultados do agrupamento do Structure indicaram que três populações é o que melhor encaixa nos dados ($\ln P(D)$ 1732,4), com probabilidades muito similares para duas populações ($\ln P(D)$ 1739,6). No entanto, considerando $K = 2$, podemos ver uma clara separação de Weber e Amaral como uma população, e Maribo I e Maribo II como outra. Considerando $K = 3$, Weber e Amaral são separados em duas diferentes populações, mas sem designação precisa dos indivíduos (Figura 2). Nesta situação, indivíduos das populações Weber e Amaral possuem valores de associação (q) aos grupos I e/ou II variando de 0,327 a 0,668 (Tabela 3). O décimo quinto indivíduo da tuqueira Weber tem uma ancestralidade mista, apresentando probabilidades similares de pertencer a qualquer um dos três grupos ($q = 0,312$, $q = 0,37$ e $q = 0,318$, grupos I, II e III, respectivamente).

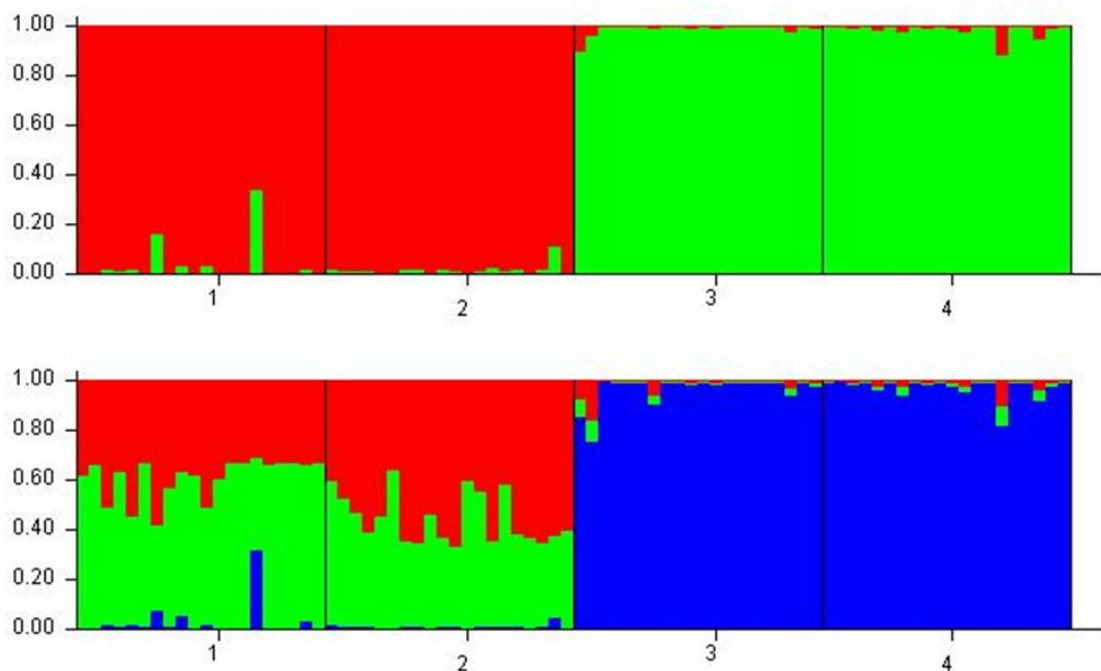


Figura 2 Resultados do Structure para $K = 2$ (acima) e $K = 3$ (abaixo). Associação proporcional (eixo Y) de cada indivíduo em dois ou três grupos de população. Cada indivíduo é identificado por uma barra vertical, e cada grupo por uma cor. No eixo X estão as localidades: (1) Weber, (2) Amaral, (3) Maribo I e (4) Maribo II.

Tabela 4 Probabilidades de associação dos indivíduos (q) para cada grupo, considerando $K = 3$ e intervalos de probabilidade de 90% (IP (90%)). Em negrito, a maior probabilidade para cada indivíduo.

Tuqueira	Indivíduo	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
		q	IP (90%)	q	IP (90%)	q	IP (90%)
Weber	1	0,382	(0,000; 1,000)	0,614	(0,000; 1,000)	0,003	(0,000; 0,017)
Weber	2	0,342	(0,000; 1,000)	0,654	(0,000; 1,000)	0,004	(0,000; 0,021)
Weber	3	0,509	(0,000; 1,000)	0,473	(0,000; 1,000)	0,018	(0,000; 0,129)
Weber	4	0,371	(0,000; 1,000)	0,621	(0,000; 1,000)	0,008	(0,000; 0,051)
Weber	5	0,543	(0,000; 1,000)	0,438	(0,000; 1,000)	0,019	(0,000; 0,139)
Weber	6	0,334	(0,000; 1,000)	0,658	(0,000; 1,000)	0,008	(0,000; 0,046)
Weber	7	0,583	(0,000; 1,000)	0,339	(0,000; 1,000)	0,077	(0,000; 0,403)
Weber	8	0,429	(0,000; 1,000)	0,563	(0,000; 1,000)	0,008	(0,000; 0,053)
Weber	9	0,367	(0,000; 1,000)	0,581	(0,000; 1,000)	0,052	(0,000; 0,325)
Weber	10	0,383	(0,000; 1,000)	0,614	(0,000; 1,000)	0,003	(0,000; 0,014)
Weber	11	0,51	(0,000; 1,000)	0,469	(0,000; 1,000)	0,022	(0,000; 0,158)
Weber	12	0,394	(0,000; 1,000)	0,602	(0,000; 1,000)	0,005	(0,000; 0,023)
Weber	13	0,329	(0,000; 1,000)	0,668	(0,000; 1,000)	0,003	(0,000; 0,016)

<i>Tuqueira</i>	Indivíduo	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
		<i>q</i>	IP (90%)	<i>q</i>	IP (90%)	<i>q</i>	IP (90%)
Weber	14	0,335	(0,000; 1,000)	0,661	(0,000; 1,000)	0,003	(0,000; 0,016)
Weber	15	0,312	(0,000; 1,000)	0,37	(0,000; 1,000)	0,318	(0,000; 0,751)
Weber	16	0,34	(0,000; 1,000)	0,656	(0,000; 1,000)	0,004	(0,000; 0,018)
Weber	17	0,33	(0,000; 1,000)	0,665	(0,000; 1,000)	0,005	(0,000; 0,024)
Weber	18	0,329	(0,000; 1,000)	0,668	(0,000; 1,000)	0,003	(0,000; 0,016)
Weber	19	0,339	(0,000; 1,000)	0,628	(0,000; 1,000)	0,033	(0,000; 0,212)
Weber	20	0,33	(0,000; 1,000)	0,667	(0,000; 1,000)	0,003	(0,000; 0,017)
Amaral	1	0,407	(0,000; 1,000)	0,575	(0,000; 1,000)	0,018	(0,000; 0,121)
Amaral	2	0,475	(0,000; 1,000)	0,514	(0,000; 1,000)	0,011	(0,000; 0,056)
Amaral	3	0,529	(0,000; 1,000)	0,461	(0,000; 1,000)	0,009	(0,000; 0,051)
Amaral	4	0,611	(0,000; 1,000)	0,381	(0,000; 1,000)	0,008	(0,000; 0,042)
Amaral	5	0,543	(0,000; 1,000)	0,452	(0,000; 1,000)	0,005	(0,000; 0,027)
Amaral	6	0,363	(0,000; 1,000)	0,632	(0,000; 1,000)	0,005	(0,000; 0,029)
Amaral	7	0,647	(0,000; 1,000)	0,341	(0,000; 1,000)	0,012	(0,000; 0,082)
Amaral	8	0,653	(0,000; 1,000)	0,339	(0,000; 1,000)	0,008	(0,000; 0,055)
Amaral	9	0,536	(0,000; 1,000)	0,458	(0,000; 1,000)	0,006	(0,000; 0,030)
Amaral	10	0,633	(0,000; 1,000)	0,356	(0,000; 1,000)	0,012	(0,000; 0,079)
Amaral	11	0,665	(0,000; 1,000)	0,327	(0,000; 1,000)	0,008	(0,000; 0,045)
Amaral	12	0,402	(0,000; 1,000)	0,594	(0,000; 1,000)	0,004	(0,000; 0,022)
Amaral	13	0,448	(0,000; 1,000)	0,542	(0,000; 1,000)	0,01	(0,000; 0,061)
Amaral	14	0,645	(0,000; 1,000)	0,343	(0,000; 1,000)	0,013	(0,000; 0,086)
Amaral	15	0,419	(0,000; 1,000)	0,567	(0,000; 1,000)	0,013	(0,000; 0,095)
Amaral	16	0,621	(0,000; 1,000)	0,367	(0,000; 1,000)	0,012	(0,000; 0,079)
Amaral	17	0,629	(0,000; 1,000)	0,367	(0,000; 1,000)	0,005	(0,000; 0,023)
Amaral	18	0,653	(0,000; 1,000)	0,336	(0,000; 1,000)	0,011	(0,000; 0,071)
Amaral	19	0,627	(0,000; 1,000)	0,328	(0,000; 1,000)	0,045	(0,000; 0,311)
Amaral	20	0,603	(0,000; 1,000)	0,392	(0,000; 1,000)	0,005	(0,000; 0,025)
Maribo I	1	0,073	(0,000; 0,369)	0,077	(0,000; 0,364)	0,85	(0,542; 1,000)
Maribo I	2	0,158	(0,000; 1,000)	0,088	(0,000; 0,938)	0,753	(0,000; 1,000)
Maribo I	3	0,003	(0,000; 0,016)	0,003	(0,000; 0,015)	0,994	(0,963; 1,000)
Maribo I	4	0,004	(0,000; 0,019)	0,004	(0,000; 0,018)	0,993	(0,955; 1,000)
Maribo I	5	0,005	(0,000; 0,028)	0,005	(0,000; 0,025)	0,99	(0,936; 1,000)
Maribo I	6	0,004	(0,000; 0,021)	0,004	(0,000; 0,018)	0,992	(0,953; 1,000)
Maribo I	7	0,062	(0,000; 0,367)	0,037	(0,000; 0,272)	0,901	(0,566; 1,000)
Maribo I	8	0,005	(0,000; 0,025)	0,005	(0,000; 0,024)	0,991	(0,943; 1,000)
Maribo I	9	0,004	(0,000; 0,022)	0,004	(0,000; 0,021)	0,992	(0,949; 1,000)
Maribo I	10	0,01	(0,000; 0,058)	0,01	(0,000; 0,059)	0,98	(0,870; 1,000)
Maribo I	11	0,007	(0,000; 0,035)	0,006	(0,000; 0,032)	0,987	(0,921; 1,000)
Maribo I	12	0,009	(0,000; 0,044)	0,007	(0,000; 0,037)	0,984	(0,903; 1,000)

<i>Tuqueira</i>	Indivíduo	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
		<i>q</i>	IP (90%)	<i>q</i>	IP (90%)	<i>q</i>	IP (90%)
Maribo I	13	0,004	(0,000; 0,022)	0,004	(0,000; 0,021)	0,991	(0,949; 1,000)
Maribo I	14	0,006	(0,000; 0,032)	0,005	(0,000; 0,025)	0,989	(0,933; 1,000)
Maribo I	15	0,004	(0,000; 0,022)	0,004	(0,000; 0,021)	0,991	(0,949; 1,000)
Maribo I	16	0,006	(0,000; 0,030)	0,006	(0,000; 0,028)	0,989	(0,931; 1,000)
Maribo I	17	0,006	(0,000; 0,031)	0,005	(0,000; 0,027)	0,989	(0,931; 1,000)
Maribo I	18	0,029	(0,000; 0,208)	0,032	(0,000; 0,226)	0,939	(0,670; 1,000)
Maribo I	19	0,007	(0,000; 0,038)	0,007	(0,000; 0,035)	0,986	(0,915; 1,000)
Maribo I	20	0,013	(0,000; 0,091)	0,012	(0,000; 0,081)	0,975	(0,840; 1,000)
Maribo II	1	0,005	(0,000; 0,026)	0,005	(0,000; 0,025)	0,99	(0,939; 1,000)
Maribo II	2	0,004	(0,000; 0,019)	0,003	(0,000; 0,017)	0,993	(0,956; 1,000)
Maribo II	3	0,011	(0,000; 0,059)	0,01	(0,000; 0,055)	0,979	(0,868; 1,000)
Maribo II	4	0,005	(0,000; 0,028)	0,005	(0,000; 0,026)	0,99	(0,936; 1,000)
Maribo II	5	0,022	(0,000; 0,140)	0,016	(0,000; 0,094)	0,961	(0,757; 1,000)
Maribo II	6	0,007	(0,000; 0,035)	0,005	(0,000; 0,027)	0,988	(0,926; 1,000)
Maribo II	7	0,026	(0,000; 0,181)	0,034	(0,000; 0,212)	0,94	(0,717; 1,000)
Maribo II	8	0,004	(0,000; 0,021)	0,004	(0,000; 0,019)	0,992	(0,953; 1,000)
Maribo II	9	0,009	(0,000; 0,052)	0,009	(0,000; 0,053)	0,982	(0,883; 1,000)
Maribo II	10	0,005	(0,000; 0,024)	0,005	(0,000; 0,023)	0,991	(0,944; 1,000)
Maribo II	11	0,013	(0,000; 0,079)	0,013	(0,000; 0,077)	0,974	(0,834; 1,000)
Maribo II	12	0,024	(0,000; 0,174)	0,021	(0,000; 0,149)	0,956	(0,737; 1,000)
Maribo II	13	0,004	(0,000; 0,022)	0,004	(0,000; 0,022)	0,991	(0,948; 1,000)
Maribo II	14	0,005	(0,000; 0,024)	0,004	(0,000; 0,022)	0,991	(0,945; 1,000)
Maribo II	15	0,101	(0,000; 0,499)	0,081	(0,000; 0,433)	0,818	(0,406; 1,000)
Maribo II	16	0,004	(0,000; 0,022)	0,004	(0,000; 0,019)	0,992	(0,951; 1,000)
Maribo II	17	0,005	(0,000; 0,027)	0,005	(0,000; 0,026)	0,99	(0,937; 1,000)
Maribo II	18	0,04	(0,000; 0,247)	0,043	(0,000; 0,251)	0,917	(0,663; 1,000)
Maribo II	19	0,014	(0,000; 0,097)	0,011	(0,000; 0,070)	0,975	(0,837; 1,000)
Maribo II	20	0,004	(0,000; 0,021)	0,004	(0,000; 0,019)	0,992	(0,952; 1,000)

Discussão

Nós observamos evidências de que um efeito de barreira entre as populações separadas pela rodovia está em processo. O valor de F_{ST} maior entre Weber e Amaral comparado com Maribo I e Maribo II, e a diferença no número estimado de migrantes são nossas primeiras evidências. Como a estatística F é fortemente baseada na heterozigosidade, ela é influenciada

pelo nível de diversidade dentro da população (que é frequentemente elevada para microssatélites), e então a proporção de diversidade entre as populações se restringe a ser pequena mesmo quando a divergência é alta (Charlesworth 1998; Hedrick 1999). Portanto, para melhor interpretar os resultados, nós utilizamos categorias criadas por Nei (1978) para padronizar os valores de F_{ST} : $F_{ST} < 0,05$ é considerado baixo nível de isolamento; $0,05 < F_{ST} < 0,15$ é nível mediano de isolamento; e $F_{ST} > 0,15$ é alto nível de isolamento.

Então, os valores de F_{ST} mostraram um alto nível de isolamento entre os dois blocos de tuqueiras: Maribo I e Maribo II contra Weber e Amaral, o que é coerente com os 12 km de distância entre eles. Um baixo nível de isolamento foi encontrado no par Weber e Amaral (que são separados pela rodovia), e Maribo I e Maribo II (que são separados por distância). No entanto, Weber e Amaral apresentaram um valor de F_{ST} mais alto e um menor número de migrantes quando comparado com Maribo I e II, indicando um possível processo de diferenciação genética. Esta possibilidade também é suportada por um dos pressupostos do F_{ST} , o qual afirma que a população já tenha atingido um equilíbrio genético entre a migração (que mantém o fluxo gênico entre as populações) e a deriva genética (que promove a diferenciação), mas isto pode levar muitas gerações se o tamanho da população for grande e/ou se a taxa de migração for baixa (Whitlock & McCauley 1999).

Lopes (2007) avaliou a estrutura genética, usando dados de microssatélite, de populações de tuco-tuco ao longo de toda distribuição da espécie. Estas populações tiveram uma distância média de 194,75 km (variando de 4,37 km a 486 km). Ela encontrou altos níveis de diferenciação genética e um baixo número estimado de migrantes entre quase todas as populações, e estes se apresentaram correlacionados com as distâncias geográficas. As poucas

comparações com $F_{ST} < 0,05$ tiveram um Nm entre 6,6 e 8,5, o que é bem maior do que os encontrados na nossa amostragem.

A comparação de estudos que utilizam a estatística F deve muito cuidadosa, pois os valores de F_{ST} são dependentes da heterozigosidade das populações, variando amplamente entre as espécies estudadas. Gerlach & Musolf (2000) concluíram que a rodovia tem um efeito de barreira sobre o fluxo gênico de *bank voles* baseado em valores médios de F_{ST} igual a 0,025. Conrey & Mills (2003) encontraram que rodovias de duas pistas reduziram o fluxo gênico de *vagrant shrews* ($F_{ST} = 0,081$ lados opostos da rodovia e $F_{ST} = 0,011$ mesmo lado da rodovia) e que rodovias de quatro pistas reduziram o fluxo gênico de *vagrant shrews* ($F_{ST} = 0,008$ lados opostos e $F_{ST} = 0,004$ mesmo lado) e de *deer mice* ($F_{ST} = 0,055$ lados opostos e $F_{ST} = 0,043$ mesmo lado). Estes resultados ressaltam a importância de realizarmos estudos com áreas controle para que os valores possam ser comparados dentro da mesma espécie.

Uma das possíveis interpretações dos nossos resultados é de que a rodovia tem um efeito neutro sobre as populações, como encontrado em outras espécies de pequenos mamíferos. No entanto, pode ser que este efeito neutro aparente seja somente temporário, ou seja, ainda não houve tempo suficiente para identificar o efeito de barreira. O único estudo com mamífero subterrâneo mostrou uma resposta positiva: Huey (1941) reportou um caso de expansão do *pocket gopher* (*Thomomys* sp.) nas margens de uma rodovia recentemente construída no deserto do Arizona, na primeira metade do século XX. Ele descreveu como a espécie se estabeleceu na área e comentou que os hábitos fossoriais dos *gophers* tiveram vantagem sobre os ratos cangurus em um menor número de atropelamentos. Outros estudos já reportaram efeitos neutros e positivos para pequenos mamíferos (ver a revisão Fahrig & Rytwinski 2009)

e para melhor entender essas respostas às rodovias Rytwinski & Fahrig (2013) conduziram um estudo simulado no qual encontraram que espécies de pequeno porte que evitam atravessar rodovias, mas não são perturbadas pelo tráfego, são preditas a não serem afetadas pela rodovia em diferentes níveis de densidade da mesma. Eles consideraram que espécies de pequeno porte possuem pequenos territórios, pequena área de movimentação, e altas taxas reprodutivas, e por causa disso, mesmo com a fragmentação causada pelo aumento da densidade de rodovias, pequenos mamíferos poderiam manter populações viáveis, se, obviamente, a paisagem em questão mantivesse a qualidade de hábitat. No entanto, tuco-tuco não se reproduz na mesma taxa que outros pequenos mamíferos (como os ratos *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor*, os quais têm mais de 24 filhotes por ninhada por ano; Castro & Fernandez 2004) e não deve ter a mesma resposta populacional.

Mais evidência suporta a conclusão de que um processo de isolamento genético está em curso: as variações nas probabilidades de associação dos indivíduos de Weber e Amaral e a forte probabilidade de o melhor número de grupos serem três, apresentados pela análise de agrupamento. Quando do Structure designa indivíduos aos grupos, podemos ver claramente uma designação correta em dois blocos de tuqueiras, corroborando para os resultados do F_{ST} . Apesar dos valores estatísticos indicarem que $K = 3$ melhor encaixa com os dados, observamos que indivíduos de Weber e Amaral apresentam 40-60% de probabilidade de pertencer às tuqueiras nas quais foram capturados. Isto mostra que não existe diferenciação genética suficiente para separá-los em duas populações. Quando toda a amostra foi avaliada para diferentes valores de K (análises preliminares), as probabilidades de associação de indivíduos à Maribo I e II não variaram, mostrando que esta é uma população consistente.

Reforçamos aqui a ideia de que o isolamento seja um evento recente e que não tenha ainda se estabelecido como uma barreira genética. A rodovia foi pavimentada na década de 70 e duplicada na década de 90, com um grande aumento de tráfego desde então. Barreiras físicas ainda mais antigas, como rios, já apresentaram este padrão em outros estudos com espécies do mesmo gênero. Lopes *et al.* (2013) encontrou que os rios Mampituba e Araranguá (com larguras aproximadas de 100 e 170 m, respectivamente, mais largas que a estrada) não agiram como barreiras geográficas efetivas para o fluxo gênico de *C. minutus*, possivelmente por causa do passado transiente da foz destes rios. Um estudo com *Ctenomys magellanicus* na Argentina mostrou colonização da espécie para além do rio Rio Grande, sugerindo que este rio também não agiu como barreira natural para esta espécie (Fasanella *et al.* 2013).

Um dos pressupostos para a análise de fluxo gênico foi invalidado, o que comprometeria os resultados das análises, mas removemos os fatores causais e solucionamos este problema. Os dois pressupostos para a análise de fluxo gênico são: equilíbrio Hardy-Weinberg e o equilíbrio de ligação. Em nossa amostra encontramos déficit de heterozigosidade em dois de 36 testes. Este déficit pode ser explicado por (i) a presença de alelos nulos, (ii) um significativo nível de endogamia, e (iii) uma população estruturada (e.g., o efeito de Wahlund). O isolamento genético decorrente do efeito de Wahlund depende do tamanho das populações isoladas. Se a população for dividida em partes isoladas, o resultado do isolamento será similar ao do acasalamento consanguíneo: um aumento na frequência de homozigotos na população (Hartl & Clark 1997). Além disso, a estruturação da população pode ser uma consequência do alto territorialismo e baixas taxas de dispersão. A possibilidade de ter alelos nulos é minimizada, mas não excluída, com o aumento do número de *loci* usados. No entanto, alguns valores altos

de F_{IS} podem corroborar com a endogamia como explicação para o déficit de heteroziguidade. A remoção dos *loci* em desequilíbrio resolveu o desvio dos dados. O segundo pressuposto, desequilíbrio de ligação, refere-se à independência dos genótipos de um *locus* com os genótipos de outro *locus*, e não encontramos nenhum desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci*.

Apesar de termos encontrado diferentes valores de F_{ST} entre as tuqueiras, não encontramos redução na variabilidade (H_o e H_e) entre Weber e Amaral contra Maribo I e Maribo II como esperado, apenas uma alteração na distribuição das frequências alélicas. Isto pode ser em virtude do fluxo potencial de outras tuqueiras do entorno, efeito este que não foi controlado no desenho amostral deste estudo (ver populações amostradas por Lopes (2011) na Figura 1).

Uma hipótese alternativa para a ausência de redução de variabilidade dentro das *tuqueiras* e/ou a falta de um isolamento forte entre Weber e Amaral é que os indivíduos de tuco-tuco estão encontrando uma maneira de driblar o efeito de barreira. Sabemos que a dispersão ocorre acima do solo, o que é principalmente realizada por indivíduos não-reprodutivos (Malizia *et al.* 1995), e que distâncias de dispersão acima de 160 m já foram registradas para *C. australis* (Mora *et al.* 2010) e 250 m e 900 m para *C. flamarioni* (Stolz 2006; Garcias 2013). Talvez a rodovia não seja uma barreira recente, mas sim uma barreira permeável, e migrantes eventuais possam fornecer algum fluxo gênico. Um indivíduo de tuco-tuco foi registrado habitando o canteiro central da RS-030 (Thales R. O. de Freitas, observação pessoal), o que pode indicar uma tentativa de atravessar a rodovia utilizando o canteiro central como trampolim. Outra indicação é que sabemos que esta espécie tem cavado galerias sob a rodovia BR-101, a qual possui duas pistas, alto aterramento, tráfego muito menor e é

localizada mais ao sul, demonstrando a viabilidade de uma rota alternativa para cruzar a estrada, indício como este nunca foi observado na RS-030.

Considerando aspectos mais práticos, se as populações estão sob efeito de barreira, seria adequado monitorar as populações afetadas (possivelmente com telemetria) e, eventualmente, aplicar alguma medida de mitigação na estrada pra proporcionar conectividade, como redutores de velocidade para os horários de atividade de tuco-tucos. Por outro lado, se a população estiver driblando a barreira, a fragmentação por rodovias não será uma preocupação desde que a substituição do uso da terra, predominantemente por condomínios luxuosos de veraneio, seja contida e que a qualidade de habitat para a espécie seja mantida. No entanto, para confirmar qualquer uma destas hipóteses, mais estudos são necessários, tanto genéticos, para monitorar a diversidade e estrutura das populações em longo prazo, quanto comportamentais, para observar como ocorre a dispersão, em qual momento do dia, quão distantes eles dispersam, e como os indivíduos se comportam próximos à rodovia.

Por fim, o método Bayesiano de agrupamento, como o utilizado pelo software Structure, tem sido o melhor método para detectar corretamente barreiras em menor tempo (Blair *et al.* 2012). No nosso estudo, este método foi o mais sensível, com resultados mais refinados. Esta abordagem torna-se muito interessante em duas situações. Primeiro, em casos de regularização ambiental de rodovias antigas, como no Brasil, onde 55.000 km de rodovias federais foram construídas sem licença ambiental (antes de 1986) e precisam ter seus impactos mensurados e mitigados nos próximos 20 anos (de acordo com a Portaria Interministerial 289, publicada em Julho de 2013). Segundo, em projetos de desfragmentação por espécies/grupos

de espécies de particular interesse e/ou potencialmente sensíveis e que não são registradas em monitoramentos de fauna atropelada.

Agradecimentos

Agradecemos aos senhores Zeferino Amaral, Belmiro Weber e aos diretores da fazenda Maribo por permitirem o uso das áreas para coleta de dados. Os dados coletados para este estudo foram apoiados pela Capes, FAPERGS, CNPq e WWF. Agradecemos aos colegas que colaboraram nos processos laboratoriais e nas revisões das versões anteriores deste manuscrito.

Referências

- Ashley M V., Dow BD (1994) The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications. In: *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications* Experientia Supplementum. (eds Schierwater B, Streit B, Wagner GP, DeSalle R), pp. 185–201. Birkhäuser Basel, Basel, Switzerland.
- Balkenhol N, Gugerli F, Cushman S a. *et al.* (2009) Identifying future research needs in landscape genetics: where to from here? *Landscape Ecology*, **24**, 455–463.
- Balkenhol N, Waits LP (2009) Molecular road ecology: exploring the potential of genetics for investigating transportation impacts on wildlife. *Molecular ecology*, **18**, 4151–64.
- Bhattacharya M, Primack RB, Gerwein J (2003) Are roads and railroads barriers to bumblebee movement in a temperate suburban conservation area? *Biological Conservation*, **109**, 37–45.
- Biosystem A (2006) Peak Scanner™ Software Version 1.0. , 68.
- Blair C, Weigel DE, Balazik M *et al.* (2012) A simulation-based evaluation of methods for inferring linear barriers to gene flow. *Molecular ecology resources*, **12**, 822–33.
- Burnett S (1992) Effects of a Rainforest Road on Movements of Small Mammals: Mechanisms and Implications. *Wildlife Research*, **19**, 95.
- Castro EBV de, Fernandez FAS (2004) Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic forest fragments in Brazil. *Biological Conservation*, **119**, 73–80.
- Charlesworth B (1998) Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. *Molecular biology and evolution*, **15**, 538–43.
- Clark BK, Clark BS, Johnson LA, Haynie MT (2001) Influence of roads on movements of small mammals. *The Southwestern Naturalist*, **46**, 338–344.

- Conrey RY, Mills LS (2003) *Highways as potential barriers to movement and genetic exchange in small mammals*. Helena, MT.
- Fahrig L, Rytwinski T (2009) Effects of Roads on Animal Abundance: an Empirical Review and Synthesis. *Ecology and Society*, **14**, 21.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567–87.
- Fasanella M, Bruno C, Cardoso Y, Lizarralde M (2013) Historical demography and spatial genetic structure of the subterranean rodent *Ctenomys magellanicus* in Tierra del Fuego (Argentina). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **169**, 697–710.
- Fonseca MB da (2003) Biologia populacional e classificação etária do roedor subterrâneo tuco-tuco *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 (Rodentia, Ctenomyidae) na planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Forman RTT, Alexander LE (1998) Roads and their major ecological effects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**, 207–231.
- Garcias FM (2013) Aspectos da ecologia populacional do tuco-tuco-das-dunas (Travi, 1981) (*Ctenomys flamarioni* – Rodentia – Ctenomyidae) na Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Gauffre B, Estoup a, Bretagnolle V, Cosson JF (2008) Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape. *Molecular ecology*, **17**, 4619–29.
- Gerlach G, Musolf K (2000) Fragmentation of Landscape as a Cause for Genetic Subdivision in Bank Voles. *Conservation Biology*, **14**, 1066–1074.
- Goosem M (2001) Effects of tropical rainforest roads on small mammals: inhibition of crossing movements. *Wildlife Research*, **28**, 351–364.
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick PW (1999) Perspective: Highly Variable Loci and Their Interpretation in Evolution and Conservation. *Evolution*, **53**, 313–318.
- Heuser VD, Silva J da, Moriske H-J *et al.* (2002) Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environmental and molecular mutagenesis*, **40**, 227–235.
- Holderegger R, Di Giulio M (2010) The genetic effects of roads: A review of empirical evidence. *Basic and Applied Ecology*, **11**, 522–531.
- Huey LM (1941) Mammalian Invasion via the Highway. *Journal of Mammalogy*, **22**, 383–385.

- Jackson ND, Fahrig L (2011) Relative effects of road mortality and decreased connectivity on population genetic diversity. *Biological Conservation*, **144**, 3143–3148.
- Jaeger JAG, Fahrig L, Ewald KC (2005) Does the configuration of road networks influence the degree to which roads affect wildlife populations? In: *ICOET 2005 Proceedings*, pp. 151–163.
- Keller I, Largiadèr CR (2003) Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **270**, 417–23.
- Kociolek A V., Clevenger AP (2007) Highway Median Impacts on Wildlife Movement and Mortality. In: *Road Ecology Center, John Muir Institute of the Environment, UC Davis*
- Lacey E a (2001) Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity*, **86**, 628–37.
- Lacey EA, Maldonado JE, Clabaugh JP, Matocq MD (1999) Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular ecology*, **8**, 1753–1768.
- Lopes CM (2007) Filogeografia de *Ctenomys minutus* (Rodentia : Ctenomyidae).
- Lopes CM (2011) História evolutiva de *Ctenomys minutus* e *Ctenomys lami* na planície costeira do Sul do Brasil (Rodentia , Ctenomyidae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Lopes CM, Ximenes SSF, Gava a, de Freitas TRO (2013) The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity*, **111**, 293–305.
- Mader H-J (1984) Animal habitat isolation by roads and agricultural fields. *Biological Conservation*, **29**, 81–96.
- Malizia AI, Zenuto RR, Busch C (1995) Demographic and reproductive attributes of dispersers in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Canadian journal of zoology*, **73**, 732–738.
- Marinho JR, Freitas TRO De (2006) Population structure of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Ctenomyidae) on the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Theriologica*, **51**, 53–59.
- Marsh DM, Page RB, Hanlon TJ *et al.* (2007) Effects of roads on patterns of genetic differentiation in red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Conservation Genetics*, **9**, 603–613.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *BioTechniques*, **8**, 43.
- Mora MS, Mapelli FJ, Gaggiotti OE, Kittlein MJ, Lessa EP (2010) Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC genetics*, **11**, 9.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.

- Oxley D, Fenton M, Carmody G (1974) The effects of roads on populations of small mammals. *Journal of Applied Ecology*.
- Redeker S, Andersen LW, Pertoldi C *et al.* (2006) Genetic structure, habitat fragmentation and bottlenecks in Danish bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, **71**, 144–158.
- Reed DH (2004) Extinction risk in fragmented habitats. *Animal Conservation*, **7**, 181–191.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical -tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Richardson JH, Shore RF, Treweek JR, Larkin SB (1995) Are major roads a barrier to small mammals ? *Journal of Zoology (London)*, **243**, 840–846.
- Riley SPD, Pollinger JP, Sauvajot RM *et al.* (2006) A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular ecology*, **15**, 1733–41.
- Rondinini C, Doncaster CP (2002) Roads as barriers to movement for hedgehogs. *Functional Ecology*, **16**, 504–509.
- Roratto PA, Bartholomei-Santos ML, Freitas TRO De (2011) Tetranucleotide microsatellite markers in *Ctenomys torquatus* (Rodentia). *Conservation Genetics Resources*, **3**, 725–727.
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, **8**, 103–6.
- Rytwinski T, Fahrig L (2013) Why are some animal populations unaffected or positively affected by roads? *Oecologia*, **173**, 1143–56.
- Shepard DB, Kuhns a. R, Dreslik MJ, Phillips C a. (2008) Roads as barriers to animal movement in fragmented landscapes. *Animal Conservation*, **11**, 288–296.
- Stolz JFB (2006) Dinâmica populacional e relações espaciais do tuco-tuco-das-dunas (Rodentia - Ctenomyidae) na Estação Ecológica do Taim - RS / Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Swihart RK, Slade NA (1984) Road crossing in *sigmodon hispidus* and *Microtus ochrogaster*. *Journal of Mammalogy*, **65**, 357–360.
- Trombulak SC, Frissell CA (2000) Review of Ecological Effects of Roads on Terrestrial and Aquatic Communities. *Conservation Biology*, **14**, 18–30.
- Vos CC, Antonisse-De Jong a G, Goedhart PW, Smulders MJ (2001) Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity*, **86**, 598–608.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$. *Heredity*, **82**, 117–25.

Referências bibliográficas

- Ashley M V., Dow BD (1994) The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications. In: *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications* (eds Schierwater B, Streit B, Wagner GP, DeSalle R), pp. 185–201. Birkhäuser Basel, Basel, Switzerland.
- Balkenhol N, Gugerli F, Cushman S a. *et al.* (2009) Identifying future research needs in landscape genetics: where to from here? *Landscape Ecology*, **24**, 455–463.
- Balkenhol N, Waits LP (2009) Molecular road ecology: exploring the potential of genetics for investigating transportation impacts on wildlife. *Molecular ecology*, **18**, 4151–64.
- Forman RTT, Alexander LE (1998) Roads and their major ecological effects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**, 207–231.
- Holderegger R, Di Giulio M (2010) The genetic effects of roads: A review of empirical evidence. *Basic and Applied Ecology*, **11**, 522–531.
- Kociolek A V., Clevenger AP (2007) Highway Median Impacts on Wildlife Movement and Mortality. In: *Road Ecology Center, John Muir Institute of the Environment, UC Davis*
- Reed DH (2004) Extinction risk in fragmented habitats. *Animal Conservation*, **7**, 181–191.
- Trombulak SC, Frissell CA (2000) Review of Ecological Effects of Roads on Terrestrial and Aquatic Communities. *Conservation Biology*, **14**, 18–30.