



GISLENE LOPES GONÇALVES

Diferenciação genética e geográfica intra-específica em
Ctenomys Blainville, 1826 (Mammalia: Rodentia) nos Campos Sulinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia Comparada

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre

2007

DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E GEOGRÁFICA INTRA-ESPECÍFICA EM
CTENOMYS BLAINVILLE, 1826 (MAMMALIA: RODENTIA) NOS CAMPOS SULINOS

GISLENE LOPES GONÇALVES

Banca examinadora:

Prof^a Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky (UFRGS)

Prof. Dra. Larissa Rosa de Oliveira (PUCRS)

Prof. Dr. Guillermo D'Elía (Universidad de Concepción, Chile)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética e Evolução, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), contando com o auxílio financeiro de:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

*Aos meus pais, Márcia e Geraldo,
pelo investimento em educação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço as seguintes pessoas e instituições pela fundamental colaboração durante desenvolvimento desse trabalho.

Thales Freitas, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, orientação, convivência amigável e por incentivar a continuidade dos meus interesses científicos com a genética evolutiva dos tuco-tucos.

Aos pesquisadores da Universidad de La Republica/Montevideo: Enrique Lessa, Guillermo D'Elía e Ivanna Tomasco pelas sugestões metodológicas, bibliográficas e colaboração nas discussões dos resultados.

Gilson Moreira (UFRGS), pelo estímulo acadêmico-profissional, leitura (bastante crítica), correções prévias da dissertação e especialmente pelo desafio de ilustrar as colorações dos tuco-tucos de maneira tão dedicada.

Colegas do Laboratório de Citogenética e Evolução (Depto. de Genética/UFRGS) por compartilhar a rotina de trabalhar em pesquisa e colaborar de forma significativa para o desenvolvimento desse estudo. Em particular ao Fabiano Fernandes pelo companheirismo nos trabalhos de campo, taxidermia e citogenética; Gabriela Fernandez, Tatiane Trigo, Tatiane Noviski, Rodrigo Fornel, Carla Lopes, Márcia Moreira, Lígia Tchaicka, Simone Ximenes, Pedro Estrela, Eunice Matte, Camila Castilhos, Gisele Rebelato, José Stolz e Elise Giacomoni pela assistência em procedimentos de laboratório, *corel draw*, discussões de marcadores, auxílio nas análises e pela agradável convivência e descontração na rotina acadêmica.

Professores e colegas do Departamento de Genética: Loreta Freitas, pelas discussões em filogeografia e sistemática filogenética, e Karen Haag, pela literatura em genética de populações e evolução molecular; Valéria Muschner e Aline Lorenz-Lemke pelo grande auxílio ao uso dos programas para análise de filogenia molecular e recorrentes dúvidas na interpretação dos resultados.

Ao Loreci Silva (CECLIMAR) pela ajuda em campo e comunicação com moradores da região da campanha em busca da ocorrência *daquele ratinho que vive em baixo da terra e faz barulho*. Aos proprietários que permitiram as coletas de tuco-tucos em terras particulares nos municípios de Uruguaiana, Alegrete e Rosário do Sul.

Meus pais, Márcia e Geraldo; irmãs e irmãos, Marluci, Soraya, Glauber e Glaucir, (bem como os agregados não-humanos da família) pelo incentivo e herança de amor por todos os gêneros e espécies animais.

Ao Gilson, por manter-me no foco acadêmico e tornar-se parte da minha *life history*.

Aos membros da banca, pela significativa colaboração na melhoria desta dissertação, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida nos últimos 12 meses.

SUMÁRIO

	Páginas
i. AGRADECIMENTOS.....	V
ii. SUMÁRIO.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 O gênero <i>Ctenomys</i>	01
1.2 <i>Ctenomys torquatus</i>	04
1.3 O bioma Campos Sulinos.....	06
1.4 Contexto genético.....	07
1.4.1 Marcadores moleculares em estudos populacionais.....	07
1.4.1.1 DNA mitocondrial.....	08
1.4.1.2 <i>Loci</i> de microssatélites.....	10
1.4.2 Filogeografia intra-específica e estrutura populacional.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
4. Variação intra-específica e estrutura genética populacional do roedor subterrâneo <i>Ctenomys torquatus</i> utilizando seqüências do gene citocromo b e <i>loci</i> de microssatélites.....	26
4.1 Resumo.....	27
4.2 Introdução.....	28
4.3 Material e Métodos.....	30
4.4 Resultados.....	37
4.5 Discussão.....	47
4.6 Referências Bibliográficas.....	57
5. CONCLUSÕES.....	68
6. ANEXOS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Ctenomys* Blainville, 1826

São reconhecidas aproximadamente 60 espécies de *Ctenomys* Blainville, 1826 (Ctenomyidae, Hystricognathi; Woods, 1982), distribuídas de forma endêmica em áreas abertas da América do Sul, entre 10° e 54° de latitude Sul (Contreras & Bidau, 1999), desde o nível do mar até 4.000 m de altitude na região Andina (Reig et al., 1990). Considera-se que tal diversidade de espécies tenha sido alcançada em um curto período de tempo, em torno de 1,8 milhões de anos (Cook et al., 2000; Lessa & Cook, 1998; Reig et al., 1990). O respectivo evento é caracterizado como especiação explosiva (Cook & Lessa, 1998; Lessa & Cook, 1998).

O surgimento do gênero é atribuído entre o plioceno tardio e o pleistoceno, no centro da Argentina (Contreras et al., 1987; Reig et al., 1990; Lessa & Cook, 1998; Verzi et al., 1999). Entretanto, em estudos mais recentes, Verzi (2002) reportou fosseis de *Ctenomys* em formações do período terciário, na província de Buenos Aires (Argentina). Tal fato implica na extensão da antiguidade do gênero para em torno de três milhões de anos. Considera-se que subseqüentemente *Ctenomys* tenha explorado, de forma dominante, o nicho subterrâneo na região Neotropical (Reig et al., 1990; Cook & Lessa, 1998; Lessa & Cook, 1998; Maschereti et al., 2000).

O grande interesse evolutivo sobre esses roedores advém do paradigma de especiação que eles representam. O gênero *Ctenomys* contrasta em diversidade com o gênero monoespecífico *Spalacopus*, também subterrâneo (Vrba & Gould, 1986).

Os tuco-tucos habitam sistemas de galerias de túneis subterrâneos (Nowak, 1999), em solos principalmente arenosos ou pouco compactos (Contreras, 1973). Tal sistema pode ser construído por um ou vários indivíduos (Lacey et al., 2000). Entretanto, considera-se que a grande maioria das espécies tenha hábito solitário.

A constatação da presença das galerias subterrâneas no campo é feita através da observação de um amontoado de solo (montículos que sobressaem à superfície), que corresponde ao bloqueio construído pelos indivíduos para isolar as tocas do meio externo (Pearson et al., 1968).

São animais herbívoros, alimentando-se principalmente de gramíneas. Considera-se que eles exerçam forte influência sobre as comunidades de plantas correspondentes à área de ocorrência (Nevo, 1979; Gallardo, 1991; Zenuto & Busch, 1995; Borrel et al., 1998; Altuna et al., 1999; Busch et al., 2000). A maior parte das espécies de *Ctenomys* são consideradas territoriais e possuem baixa capacidade de dispersão (Busch et al., 2000).

Os tuco-tucos formam um dos clados cariotipicamente mais diverso, com números cromossômicos diplóides variando de $2n = 10$ em *C. steinbachi*, a $2n = 70$ em *C. pearsoni* (Reig & Kiblisky, 1969; Kiblisky et al., 1977; Gallardo, 1979; Lessa & Langguth, 1983; Freitas & Lessa, 1984; Ortells et al., 1990; Ortells, 1995; Massarini et al., 1991; Freitas 1990, 1994, 1997; Gimenez et al., 1997, 1999; Mascheretti et al., 2000; Garcia et al., 2000; Slamovits et al., 2001). Além disso, as espécies comportam-se diferentemente em relação aos tipos de rearranjos cromossômicos, quantidade e distribuição de heterocromatina (Reig et al., 1992), bem como na variação no número diplóide em si (Slamovits et al., 2001). Para algumas espécies também tem sido reportada variação cariotípica dentro de um mesmo indivíduo (*C. talarum*, García et al., 2000; *C. porteousi*, Massarini et al., 1991), possivelmente devido a um mecanismo pós-zigótico de segregação somática (García et al.,

2000). Reig & Kiblicky (1969) propuseram que os tuco-tucos representam um exemplo de especiação cromossômica.

Uma vez que a correspondente variação cariotípica ocorre dentro de um único clado, são geradas especulações sobre os mecanismos responsáveis por tal variabilidade (Nevo, 1999). Sugere-se que a diversificação dos ctenomídeos tenha sido facilitada pelo tipo de estrutura populacional que eles apresentam (Reig et al., 1990). Partindo da idéia clássica de especiação cromossômica, as populações pequenas mantêm condições suscetíveis à ação da deriva genética e à uma eventual fixação de rearranjos cromossômicos parcialmente deletérios em heterozigose. Entretanto, Tomasco & Lessa (no prelo), analisando fragmento de DNA mitocondrial (região controladora) para diversos cariomorfos de *C. pearsoni*, rejeitam a hipótese de fixação dos cariótipos nas populações de tamanho reduzido.

A estrutura genética populacional verificada nos ctenomídeos é consequência da baixa vagilidade e dos baixos níveis de fluxo gênico (D'Elia et al., 1998). Descrever a respectiva estrutura a partir de diferentes espécies é fundamental para a respectiva elucidação, especialmente através de estimativa de parâmetros populacionais críticos como fluxo gênico. A partir desses dados será possível especular sobre a dinâmica de diferenciação dos tuco-tucos (Wlasiuk et al., 2003).

O conhecimento sobre a variação cariotípica em *Ctenomys* tem aumentado. Verifica-se tal fato através do número de trabalhos publicados nos 10 últimos anos (*e.g.*, Freitas, 1997; Gimenez et al., 1997, 1999; Massarini et al., 1998; Mascheretti et al., 2000, Garcia et al., 2000, Slamovits et al., 2001; Gava & Freitas, 2004; Massarini & Freitas, 2005). Além disso, existe um considerável volume de estudos sobre a diferenciação genética em roedores subterrâneos (*e.g.* Steinberg & Patton, 2005). Os tuco-tucos estão representados na literatura por um número cada vez maior de trabalhos, incluindo abordagens filogeográficas

e avaliação da estrutura genética populacional. Utilizou-se desde alozimas em *C. maulinus* (Gallardo et al., 1995) e *C. rionegrensis* (D'Elía et al., 1998), até marcadores moleculares potencialmente mais sensíveis, como DNA mitocondrial e microssatélites em *C. perrensi* (Giménez et al., 2002), *C. rionegrensis* (Wlasiuk et al., 2003), *C. talarum* (Cutrera et al., 2006), *C. australis* (Mora et al., 2006), *C. pearsoni* (Tomasco & Lessa, no prelo) e *C. flamarioni* (Fernandez et al., no prelo).

Entretanto, apesar dos tuco-tucos serem alvo de estudos de diferentes áreas, como ecologia, sistemática e genética, ainda existe pouca compreensão sobre os mecanismos que conduzem a diferenciação nesse gênero (Lessa, 2000).

1.2 *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830

Segundo Freitas (2006), são válidas quatro espécies para o gênero *Ctenomys* no sul do Brasil: *C. flamarioni* Travi, 1981; *C. lami* Freitas, 2001; *C. minutus* Nehring, 1887 e *C. torquatus*, focada neste estudo.

C. torquatus apresenta a maior área de ocorrência, em relação às espécies brasileiras. Ocupa os campos arenosos com florestas de galeria, classificados por Fonseca et al. (1996) como Campos Sulinos. Está distribuído da metade norte do Uruguai até metade sul do Estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil (Freitas, 1995).

Kiblisky et al. (1977) descreveram polimorfismos cromossômicos para a espécie no Uruguai, com $2n = 44, 56, 64, 70$ e 72 . Freitas & Lessa (1984) analisaram os cariótipos das formas brasileiras de *C. torquatus* e confirmaram a existência de $2n = 44$, bem como a existência de $2n = 46$, sendo o último restrito a uma pequena área, isolada pelo canal São Gonçalo e as áreas alagadas adjacentes (Rio Grande, RS). Ainda, especularam que a forma

2n=44 seja a mais antiga, devido a maior distribuição geográfica. Além disso, consideram que a forma 2n=46 tenha sido originada a partir de uma fissão centromérica.

Lessa & Langguth (1983), posteriormente, atribuíram os demais cariótipos descritos por Kiblicky et al. (1977) à *C. pearsoni*, espécie presente no sul do Uruguai.

Morfológicamente as espécies são semelhantes e, além disso, são consideradas filogeneticamente próximas (D'Elia et al., 1999, Slamovits et al., 2001, A. Parada, UdelaR, comunicação pessoal). *C. torquatus* também apresenta proximidade filogenética com as espécies argentinas *C. perrensi* e *C. dorbygni* (Giménez et al., 2002).

As espécies citadas, assim como *C. torquatus*, também apresentam polimorfismos cariotípicos. Tal fato sugere a necessidade de estudos mais específicos, utilizando abordagens integradas que compreenda todas espécies em grupo. Dessa forma, é importante determinar os mecanismos responsáveis pela variabilidade cariotípica em *Ctenomys*.

Os indivíduos considerados típicos para *C. torquatus* caracterizam-se por possuírem coloração castanha no dorso e flancos, esbranquiçada no ventre e colar branco.

Estudos preliminares sugeriram existência de mais uma espécie de *Ctenomys* no Sul do Brasil (*Ctenomys* sp.), baseado no cariótipo e na coloração da pelagem (Freitas, 2006). Durante a elaboração do plano de manejo da Reserva Biológica de Ibirapuitã (município de Alegrete) foram coletados tuco-tucos com pelagem marrom, com manchas brancas na região posterior. Posteriormente, foi feita uma análise cariotípica, indicando a presença de 2n = 40. Dessa forma, tais indivíduos foram caracterizados como uma espécie potencialmente nova. A distribuição da nova forma e do novo cariótipo encontrava-se até então restrita as áreas adjacentes do município de Alegrete (Figura 1.1). Diante do exposto, porém, quanto a considerável variação fenotípica e cariotípica conhecida para estes

roedores, seria desejável confirmar o status específico correspondente com base outros métodos, tal como aqueles calcados na morfometria geométrica e biologia molecular, adotada neste estudo.

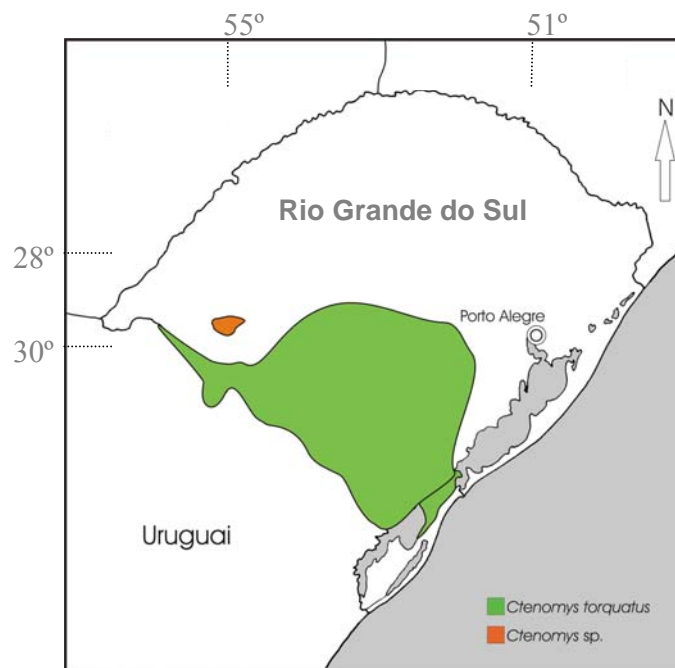


Figura 1.1. Distribuição de *Ctenomys sp.* e *C. torquatus*, no Rio Grande do Sul.

1.3 O bioma Campos Sulinos

Os campos da região sul do Brasil são denominados, de maneira geral, de pampa. No entanto, esta denominação corresponde somente a um dos tipos de campos, encontrado mais ao sul do Rio Grande do Sul (RS), compreendendo o Uruguai e a Argentina. No RS, tal tipo de campo é encontrado na região da campanha, compreendendo vegetações herbáceas, intercaladas com florestas de galeria (Marchiori, 2004).

O estado de conservação do bioma Campos Sulinos é pouco conhecido, uma vez que a avaliação da cobertura dos remanescentes de vegetação permanece incipiente (H. Hasenack, UFRGS, comunicação pessoal). O Rio Grande do Sul, onde está concentrada a maior extensão de campos, possui mais de 13.000.000 ha de área, em diferentes estágios de conservação e antropização (Fonseca et al., 1997). Outro fator relevante é a pouca representatividade de Campos Sulinos no sistema de unidades de conservação. Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (2000), a forte pressão sobre as comunidades vegetais, em particular a incidência do fogo, introdução de espécies forrageiras, o plantio de soja e a atividade da pecuária, tem levado algumas áreas ao processo de desertificação.

São reconhecidas 102 espécies de mamíferos no bioma Campos Sulinos, sendo cinco delas endêmicas (Arruda, 2001). Apesar da respectiva fauna ser relativamente conhecida, poucas localidades foram inventariadas de modo satisfatório. Dessa forma, existe uma grande lacuna no conhecimento taxonômico e biogeográfico da maioria dos gêneros e espécies de vertebrados, no extremo sul do Brasil. Verifica-se tal fato na medida em que novas espécies e localidades de ocorrência são geralmente registradas a cada estudo realizado naquela região (Costa, 2005).

1.4 Contexto genético

1.4.1 Marcadores moleculares em estudos populacionais

A genética molecular tem proporcionado numerosas técnicas de acesso à variabilidade genética dentro e entre as populações, tanto através de polimorfismos de proteínas, quanto de DNA (Avise, 1994). Por serem altamente polimórficos e possuírem altas taxas de mutação, alguns dos marcadores moleculares mais utilizados em estudos populacionais e filogenéticos são o DNA mitocondrial e os *loci* de microsatélites.

1.4.1.1 DNA mitocondrial (mtDNA)

O DNA mitocondrial dos animais é uma molécula pequena (15-20kb) e circular. É composta de 37 genes que codificam para 22 tRNAs, dois rRNAs e 13 mRNAs, sendo este último o único codificante, principalmente para a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa da mitocôndria (Avisé, 2000). Considera-se que o arranjo do genoma mitocondrial não contenha íntrons, e apresente poucos espaçadores intergênicos.

O mtDNA é um marcador aplicado em estudos de diferenciações genéticas, uma vez que possui alta taxa de substituição (Brown et al., 1979). Várias hipóteses têm sido consideradas sobre a rápida evolução deste: i) o relaxamento das limitações funcionais, ii) a alta taxa de mutação devido à ineficiência dos mecanismos de reparo de DNA mitocondrial em relação ao nuclear, e iii) o fato de não possuir histonas (Avisé, 2000).

Diferentes regiões do genoma mitocondrial evoluem a diferentes taxas (Saccone et al., 1991) permitindo a escolha de regiões específicas, conforme a questão a ser abordada. O mtDNA é herdado maternalmente na maioria das espécies. Além disso, não apresenta recombinação (Hayashi et al., 1985), embora algumas evidências de recombinação sejam reportadas (Eyre-Walker et al., 1999; Hagelberg et al., 1999). Os indivíduos são homoplásmicos para um haplótipo mitocondrial, ou seja, cada molécula reflete uma única história genealógica através das linhagens maternas. Tal característica permite a caracterização de linhagens filogenéticas sem a ambigüidade causada pela recombinação meiótica ocorrente nos genes nucleares.

A neutralidade do DNA mitocondrial tem sido alvo de discussões (e.g. Rand & Kann, 1996). Uma vez que tal molécula codifica para proteínas, é provável que haja restrições funcionais. Além disso, não apresenta uniformidade nas taxas de substituição,

sendo que a segunda posição do códon substitui menos que a primeira, e muito menos que a terceira.

Considera-se que a evolução do mtDNA seja mais provável pelo modelo próximo a neutralidade. Com base em testes de neutralidade de dados moleculares a partir de 14 diferentes estudos, Fry (1999) sugere que muitas espécies apresentam um excesso de haplótipos raros e que esses haplótipos carregam mutações levemente deletérias. A taxa de substituição heterogênea entre as linhagens e o relativo excesso de polimorfismos de substituição (substituições que conduzem a mudanças não-sinônimas de aminoácidos), também sustentam a idéia de que a seleção atue no polimorfismo do mtDNA. Além disso, a deriva genética é considerada o principal processo responsável pela evolução mitocondrial (Ballard & Kreitman, 1995).

A análise da divergência no mtDNA pode ser utilizada para revelar grupos geográficos de indivíduos relacionados, ou analisar as relações entre as matrilineagens dentro de uma população. Também pode ser utilizado para traçar eventos históricos, como gargalo-de-garrafa, ou para analisar zonas híbridas (Avise, 1994). Devido à herança materna, o modo de herança não-recombinante e a rápida evolução, o mtDNA proporciona múltiplos haplótipos que podem ser ordenados filogeneticamente dentro de uma espécie. Dessa forma, permitem inferir árvores genealógicas de genes (Avise, 1994).

O citocromo b é um dos genes envolvidos na cadeia transportadora de elétrons, sendo o único citocromo codificado pelo mtDNA (Lowe et al., 2006). Embora evolua lentamente em termos de substituição não-sinônimas, a taxa de evolução em posições silenciosas é relativamente rápida (Irwin et al., 1991). O amplo uso do citocromo b gerou o *status* de molécula universal, possibilitando que os estudos possam ser facilmente comparados. Considera-se que seja variável o suficiente para resolver questões em nível

populacional e conservada o suficiente para esclarecer relações filogenéticas mais profundas.

A abordagem filogenética a partir do citocromo b tem sido utilizada em diversos níveis taxonômicos, entre táxons de vertebrados (Irwin et al., 1991; Moritz et al., 1992; Da Silva & Patton, 1993; Graybeal, 1993; Lamb & Lydeard, 1994; Moore & DeFilippis, 1997; Nunn & Stanley, 1998; D'Elia et al., 1999; Mascheretti et al., 2000).

1.4.1.2 **Loci de Microssatélites**

Os microssatélites são seqüências de DNA nuclear denominadas de SSRs (*Simple Sequence Repeats*, Kashi et al., 1997). O uso desse marcador permite superar algumas limitações de outras técnicas moleculares, como mtDNA (Jarne & Lagoda, 1996), por possuir caráter altamente polimórfico (Tautz, 1993). Outra vantagem no uso deste marcador é que são seletivamente neutros e acumulam mutações a uma taxa relativamente constante.

Os microssatélites são pequenas seqüências repetidas *in tandem*, formadas por unidades de repetição de 1 a 6 pares de bases, altamente abundantes no genoma de eucariotos (Tautz, 1989). Em mamíferos, estima-se que os motivos de repetição mais comuns (GT/AC) ocorram em média a cada 30kb. A maioria dos microssatélites encontra-se em cópia simples, facilitando a identificação dos alelos sem ambigüidade (Schlötterer, 1998).

As mutações em regiões de microssatélites são mudanças no número de unidades de repetição causadas por um mecanismo de mutação intramolecular caracterizado como DNA *slippage* (Schlotterer & Tautz, 1992). Tal evento caracteriza-se pelo fato de que as repetições dentro de um determinado arranjo são idênticas. Com isso, as duas cadeias de DNA homólogas podem ser facilmente alinhadas fora de fase durante a replicação. A resolução dos produtos de *slippage* por reparo de DNA, ou outros mecanismos, podem

permitir o ganho ou perda de unidades de repetição, mudando o tamanho final do arranjo (Amos & Hoeltzel, 1992; Tautz, 1993; Comings, 1998). Os alelos dos loci de microssatélites podem ser acessados pela análise da reação em cadeia da polimerase, a qual requer quantidades inferiores de DNA, em relação a outros métodos moleculares (Bennet et al., 1991).

A utilização dos microssatélites tem aumentado de maneira significativa nos últimos 10 anos. Verifica-se a aplicação em estudos sobre a estrutura populacional (Broders et al., 1999; Ciofi & Bruford, 1999; Waits et al., 2000; Lacey et al., 2001; Wlasiuk et al., 2003), relações filogeográficas (Wyner et al., 1999; Johnson et al., 1999; Fernandez et al., no prelo) e parentesco (Cutrera et al., 2005).

I.5.2 Filogeografia intra-específica e estrutura populacional

A evolução é o princípio central na biologia, e a filogenia, da evolução (Lowe et al., 2006). A partir do surgimento dos métodos moleculares, tornou-se possível investigar as relações evolutivas e analisar filogeneticamente as mutações diferenciais entre variantes genéticas. Utilizando-se marcadores combinados, como mtDNA e microssatélites, é possível avaliar a estrutura populacional contemporânea e ancestral, utilizando populações locais de uma mesma espécie.

Em geral, as populações naturais não mantêm acasalamentos aleatórios (panmixia). Isso quer dizer que a probabilidade de reprodução entre dois indivíduos não é sempre a mesma. Tal fato depende de fatores biológicos e demográficos (Lowe et al., 2006). A ausência de panmixia é o principal fator pelo qual a variabilidade genética é distribuída de maneira diferenciada ao longo da área de distribuição de uma espécie. Os fatores que limitam a panmixia incluem a capacidade de deslocamento dos adultos, seleção de habitat,

filopatria, cruzamento com escolha de parceiro, distância e barreiras geográficas (Wright, 1978).

O estudo da estrutura populacional tem como principal característica a estimativa de níveis de fluxo gênico entre as populações. Através dessa estimativa é possível determinar a extensão em que cada população local é uma unidade geneticamente diferenciada (Slatkin, 1994).

Os padrões históricos da distribuição geográfica da diversidade genética, e dos respectivos princípios e processos, são definidos através dos estudos filogeográficos.

A filogeografia constitui-se em uma disciplina interdisciplinar, que une dados da genética molecular, de populações, demografia e geografia histórica. O principal objetivo de tal abordagem é acessar a história evolutiva das linhagens genealógicas, especialmente em nível intraespecífico (Avise, 1998; Bermingham & Moritz, 1998; Avise, 2000).

Informações provenientes da filogeografia permitem compreender os processos biogeográficos e áreas de endemismo. Além disso, também possibilita a identificação de linhagens evolutivas dentro de uma espécie. Tal informação pode ser utilizada para fins de manejo, como Unidades Evolutivamente Significantes (UES) e Unidades de Manejo (UM) (Moritz, 1994). Dessa forma, auxilia elaboração de propostas prioritárias para a conservação das biodiversidades taxonômicas e locais (Rojas, 1995; Bermingham & Moritz, 1998; da Silva & Patton, 1998; Firestone et al., 1999).

2. OBJETIVOS

1. Caracterizar o *status* de *Ctenomys* sp., da localidade de Alegrete, de maneira a:
 - i*) estabelecer os limites da respectiva distribuição;
 - ii*) verificar a existência de zonas de contato entre *Ctenomys* sp. e *C. torquatus*;
 - iii*) descrever os diferentes padrões de coloração da pelagem;

2. Estabelecer as relações filogenéticas entre *Ctenomys* sp. e *C. torquatus*, a partir de seqüências do gene do citocromo b (mtDNA);

3. Caracterizar a estrutura populacional de *Ctenomys* sp. e *C. torquatus*, no que se refere à variabilidade genética e diferenciação geográfica, através da utilização de marcadores moleculares nucleares (*loci* de microssatélites), e mitocondrial (citocromo b);

4. Estabelecer se as populações locais comportam-se como unidades evolutivas independentes, sugerindo possíveis Unidades de Manejo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(De acordo com as normas de *Genetica – Journal of Genetics and Evolution*, Anexo 1)

- ALTUNA CA, FRANCESCO LI G, TASSINO B, IZQUIERDO I (1999) Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida: el caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) en el Uruguay. *Etología* 7: 47-54.
- AMOS B, HOELZEL AR (1992) Applications of molecular genetic techniques to the conservation of small populations. *Biological Conservation* 61: 133-144.
- ARRUDA MB (2001) *Ecosistemas Brasileiros*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- AVISE JC (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York.
- AVISE JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 771–779.
- AVISE JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- BALLARD JWO, KREITMAN M (1995) Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in Ecology and Evolution* 10: 485-488.
- BENNET KD, TZEDAKIS PC, WILLIS KJ (1991) Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography* 18: 103-115.
- BERMINGHAM P, MORITZ C (1998) Comparative phylogeography concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-370.

- BORREL N, CAMPOS CM, GIANNONI SM, BORGHI A (1998) Effects of herbivorous rodents (cavies and tuco-tucos) on a shrub community in the Monte desert, Argentina. *Journal of Arid Environments* 39: 33-37.
- BRODERS HG, MAHONEY SP, MONTEVECCHI WA, DAVIDSON WS (1999) Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of moose *Alces alces* in Canada. *Molecular Ecology* 8: 1309-1315.
- BROWN WM, GEORGE MJR, WILSON AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 1967-1971.
- BUSCH C, ANTINUCHI CD, DEL VALLE JC, KITTLEIN MJ et al (2000) Population ecology of subterranean rodents. In Lacey E, Patton J, Cameron G (eds) *Life underground: the biology of subterranean rodents*. University of Chicago Press, Chicago.
- CIOFI C, BRUFORD MW (1999) Genetic structure and gene flow among Komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology* 8: 17-30.
- COMINGS DE (1998) Poligenic inheritance and micro/minisatellites. *Molecular Psychiatry* 3: 21-31.
- CONTRERAS JR, BIDAU CJ (1999) Líneas generales del panorama evolutivo de los roedores excavadores sudamericanos del género *Ctenomys* (Mammalia, Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Ciencia Siglo XXI* 1: 1-22.
- CONTRERAS JR (1973) El tuco-tuco y sus relaciones con los problemas del suelo en Argentina. *Idia* 24:14-36.
- CONTRERAS LC, TORRES-MURA JC, YÁÑEZ JL (1987) Biogeography of octodontid rodents: an eco-evolutionary hypothesis. *Fieldiana Zoology* 39: 401-411.

- COOK J, LESSA EP (1998) Are rates of diversification in subterranean South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) unusually high? *Evolution* 52: 1521–1527.
- COOK JA, LESSA EP, HARDLY EA (2000) Paleontology, phylogenetic patterns, and Macroevolutionary processes in subterranean rodents. In Lacey E, Patton J, Cameron G (eds) *Life underground: the biology of subterranean rodents*. University of Chicago Press, Chicago.
- COSTA RGA (2005) Revisão bibliográfica de recentes adições a avifauna da Campanha Gaúcha, Rio Grande do Sul. *Atualidades Ornitológicas* 127: 28-31.
- CUTRERA AP, LACEY EA, BUSCH C (2005) Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology* 14: 2511-2523.
- D'ELÍA G, LESSA EP, COOK JA (1998) Geographic structure, gene flow, and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae). *International Journal of Mammalian Biology* 63: 285–296.
- D'ELÍA G, LESSA EP, COOK JA (1999) Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae): evaluation of the mendocinus species group and the evolution of asymmetric sperm. *Journal of Mammalian Evolution* 6: 19–38.
- DA SILVA MN, PATTON JL (1993) Patterns of evolutionary divergence in arboreal Amazonian echimyid rodents: the perspective of mtDNA sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2: 243–255.
- DA SILVA MN, PATTON JL (1998) Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology* 7: 475-486.
- EYRE-WALKER A, SMITH NH, MAYNARD SMITH J (1999) How clonal are human mitochondria? *Proceedings of Royal Society of London* 266: 477-483.

- FERNÁNDEZ-STOLZ GP, STOLZ JFB, FREITAS TRO Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco-das-dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. Journal of Mammalogy (no prelo)
- FIRESTONE KB, ELPHINSTONE MS, SHERWIN WB, HOULDEN BA (1999) Phylogenetical population structure of tiger quolls *Dasyurus maculates* (Dasyuridae Marsupialia) an endangered carnivorous marsupial. Molecular Ecology 8: 1613-1625.
- FONSECA GAB, HERRMAN G, LEITE YLR, MITTERMEIER RA et al (1996) Lista anotada dos mamíferos do Brasil. Occasional Papers in Conservation Biology 4: 1-38.
- FREITAS TRO, LESSA EP (1984) Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia, Octodontidae). Journal of Mammalogy 65: 637-642.
- FREITAS TRO (1990) Estudos citogenéticos e craniométricos em três espécies do gênero *Ctenomys*. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FREITAS TRO (1994) Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. Cytogenetics and Cell Genetics 67: 193–198.
- FREITAS TRO (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. Studies on Neotropical Fauna and Environment 30: 53-59.
- FREITAS TRO (1997) Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). Revista Brasileira de Genética 20: 1-7.
- FREITAS TRO (2006) Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. Genetica 126: 227–235.
- FRY AJ (1999) Mildly deleterious mutations in avian mitochondrial DNA: Evidence from neutrality tests. Evolution 53: 1617-1620.

- GALLARDO MH (1979) Las especies chilenas de *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) - estabilidad cariotípica. Archivos de Biología y Medicina Experimentales 12: 71-82.
- GALLARDO MH (1991) Karyotypic evolution in *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). Journal of Mammalogy 72: 11–21.
- GALLARDO MH, KÖLLER N, ARANEDA C (1995) Bottleneck effects in local populations of fossorial *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) affected by vulcanism. Heredity 74: 638-646.
- GARCÍA I, PONSÁ M, EGOZCUE J, GARCÍA M (2000) Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). Biological Journal of the Linnean Society 69: 103-120.
- GAVA A, FREITAS TRO (2004). Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southeastern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). Journal of Mammalogy 85: 1201–1206.
- GIMÉNEZ MD, CONTRERAS JR, BIDAÚ CJ (1997) Chromosomal variation in *Ctenomys pilarensis* a recently described species from eastern Paraguay (Rodentia: Ctenomyidae). Mammalia 61:385-398.
- GIMÉNEZ MD, BIDAÚ CJ, ARGÜELLES CF, CONTRERAS JR (1999) Chromosomal characterization and relationship between two new species of *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) from northern Córdoba province, Argentina. International Journal of Mammalian Biology 64: 91-106.
- GIMÉNEZ MD, MIROL PM, BIDAÚ CJ, SEARLE JB (2002) Molecular analysis of populations of *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with high karyotypic variability. Cytogenetic and Genome Research 96: 130-136.

- GRAYBEAL A (1993) The phylogenetic utility of cytochrome b: lessons from bufonid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2: 256–269
- HAGELBERG E, GOLDMAN N, LIÓ P, WHELAN S et al (1999) Evidence for mitochondrial recombination in a human population of island Melanesia. *Proceedings of Royal Society of London* 266: 485-492.
- HAYASHI JI., TAGASHIRA Y, YOSHIDA MC (1985) Absence of extensive recombination between inter and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Experimental Cell Research* 160: 387-395.
- IRWIN DM, KOCHER TD, WILSON CA (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32:128-144.
- JARNE P, LAGODA PJJ (1996) Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- JOHNSON WE, SLATTERY JP, EIZIRIK E, KIM JH et al (1999) Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology* 8:79- 94.
- KASHI Y, KING D, SOLLER M (1997) Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics* 13: 74-77.
- KIBLISKY P, BRUM-ZORILLA N, PÉREZ G, SÁEZ FA (1977) Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Mendeliana* 2: 85-93.
- LACEY EA (2000) Spatial and social systems of subterranean rodents. In Lacey EA, JL Patton, Cameron GN (eds.) *Life Underground, the Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago.

- LACEY EA (2001) Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity* 86: 628-637.
- LAMB T, LYDEARD C (1994) A molecular phylogeny of the gopher tortoises, with comments on familial relationships within the Testudinoidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 283–291
- LANGGUTH A, ABELLA A (1970) Sobre una población de tuco-tucos melánicos (Rodentia: Octodontidae). *Acta Zoológica Lilloana* 28: 101-108.
- LESSA EP, LANGGUTH A (1983) *Ctenomys pearsoni* n. sp. (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. *Comunicaciones de las Jornadas de Ciencias Naturales* 3: 8-86.
- LESSA EP, COOK JA (1998) The molecular phylogenetics of tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Biology and Evolution* 9: 88-99.
- LESSA EP (2000) The evolution of subterranean rodents: a synthesis. In Lacey EA, JL Patton, Cameron GN (eds.) *Life Underground, the Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago.
- LOWE A, HARRIS S, ASHTON P (2006) *Ecological genetics: design, analysis, and application*. Blackwell, Oxford.
- MASCHERETTI S, MIROL PM, GIMÉNEZ MD, CONTRERAS JR et al (2000) Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys*, based on mitochondrial cytochrome b. *Biological Journal of Linnean Society* 70: 361-376.
- MASSARINI AI, BARROS MA, ORTELLS MO, REIG AO (1991) Chromosomal polymorphism and small karyotype differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica* 83: 131-144.

- MASSARINI AI, FREITAS TRO (2005) Morphological and cytogenetics comparison in species of the mendocinus-group (genus *Ctenomys*) with emphasis in *C. australis* and *C. flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae). *Caryologia* 58: 21-27.
- MASSARINI AI, DYZENCHAUTZ FJ, TIRANTI S (1998) Geographic variation of chromosomal polymorfism in nine populations of *Ctenomys azarae* tuco-tucos of the *Ctenomys mendocinus* group (Rodentia: Octodontidae). *Hereditas* 128: 207-211.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2000) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- MOORE WS, DEFILIPPS VR (1997) Taxonomic resolution based on cytochrome b DNA. In Mindell DP(ed) *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego.
- MORA MS, EP LESSA, KITTLEIN MJ, VASSALO AI (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* 87: 1192–1203.
- MORITZ C, SCHNEIDER CL, WAKE DB (1992) Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematics Biology* 41: 273–291.
- NEVO E (1979) Adaptative convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 269-308.
- NEVO E (1999) *Mosaic evolution of subterranean mammals: regression, progression and global convergence*. Oxford University Press, New York.
- NOWAK RM (1999) *Walker's mammals of the world*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore.

- NUNN GB, STANLEY SE (1998) Body size effects and rates of cytochrome b evolution in tube-nosed seabirds. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1360–1371.
- ORTELLS MO (1995) Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. *Biological Journal of Linnean Society* 54: 43–70.
- ORTELLS MO, CONTRERAS JR, REIG AO (1990) New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia: Octodontidae) from north-eastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. *Genetica* 82: 189-291.
- PEARSON OP, BINZTEIN N, BOIRY L, BUSCH C et al (1968) Estructura social, distribución espacial y composición por edades de una población de tuco-tuco (*Ctenomys talarum*). *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 13: 47-80.
- MARCHIORI JNC (2004) Fitogeografía do Rio Grande do Sul, Campos Sulinos. Est, Porto Alegre.
- RAND DM, KANN LM (1996) Excess amino acid polymorphism in mitochondrial DNA: Contrasts among genes from *Drosophila*, mice, and humans. *Molecular Biology and Evolution* 13: 735-48.
- REIG OA, BOSCH C, CONTRERAS JR, ORTELLS MO (1990) An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics and molecular biology in *Ctenomys*. In Nevo E, Reig O, Liss AR (eds) *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular level*. Liss, New York.
- REIG OA, KIBLISKY P (1969) Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Chromosoma* 28: 211-244.

- REIG OA, ORTELLS MO, MASSARINI AI, BARROS MA et al (1992) New karyotypes and C banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia* 56: 603-623.
- ROJAS M (1995) The species problem and conservation what are we protecting? In Eherenfeld D (ed) *Genes, Populations and Species*. Blackwell, Cambridge.
- SACCONE C, PESOLE G, SBISA E (1991) The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution* 33: 83-91.
- SCHLÖTTERER C, TAUTZ D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211-215.
- SCHLÖTTERER C (1998) Microsatellites. In Hoelzel AR (ed) *Molecular Genetic Analysis of Populations, a practical approach*. Oxford University Press, London.
- SLAMOVITS CH, COOK JA, LESSA EP, ROSSI MS (2001) Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1708–1719.
- SLATKIN M (1994) Gene flow and population structure. In Real LA (Ed) *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton.
- STEINBERG EK, PATTON JL (2000) Genetic structure and the geography of speciation in subterranean rodents: opportunities and constraints for evolutionary diversification. In Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (eds.) *Life Underground, the Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago.
- TAUTZ D (1989) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research* 17: 6463-6471.

- TAUTZ D (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Eppelen TJ, Jeffreys AJ (eds) DNA fingerprinting: state of the science. Birkhauser Verlag, Basel.
- TOMASCO I, LESSA EP Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. In Kelt DA, Lessa EP, Salazar-Bravo J, Patton JL (eds) The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson. University of California Publications in Zoology, Berkeley (no prelo).
- VERZI DH (2002) Patrones de evolución morfológica en Ctenomyinae (Rodentia: Octodontidae). Mastozoología Neotropical 9: 309-328.
- VERZI DH, MONTALVO CL, VUCETICH MG (1999) Afinidades y significado evolutivo de *Neophanomys biplicatus* (Rodentia: Octodontidae) del Mioceno tardio-Plioceno temprano de Argentina. Ameghiniana 36: 83-90.
- VRBA ES, GOULD SJ (1986) The hierarchical expansion of sorting and selection: sorting and selection cannot be equated. Paleobiology 12: 217-228.
- WAITS L, TABELERT P, SWENSON JE, SANDEGREN F, FRANZEN R (2000) Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctus*). Molecular Ecology 9: 421-431.
- WLASIUK G, GARZA JC, LESSA EP (2003) Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. Evolution 57: 913-926.
- WOODS CA (1982) The history and classification of the South American Hystricognath rodents: reflections on the far away and long ago. In Mares MA, Genoways HH (eds) Mammalian Biology in South America. University of Pittsburgh Press, Linesville.

WRIGHT S (1978) Evolution and the genetics of populations. University of Chicago Press, Chicago.

WYNER YM, AMATO G, DESALLE R (1999) Captive breeding reintroduction and the conservation genetics of black and white ruffed lemurs *Varecia variegata variegata*. *Molecular Ecology* 8: 107-115.

ZENUTO RR, BUSCH C (1995) Influence of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a sand-dune grassland. *International Journal of Mammalian Biology* 60: 277-285.

4. VARIAÇÃO INTRA-ESPECÍFICA E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DO ROEDOR SUBTERRÂNEO *CTENOMYS TORQUATUS* (CTENOMYIDAE) UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DO GENE CITOCROMO B E *LOCI* DE MICROSSATÉLITES.

Gislene L. Gonçalves¹ & Thales R. O. de Freitas²

¹*PPG Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500. Agronomia. CEP: 91501-970. Porto Alegre RS Brasil. (Fone: +55-51-3308-6726; Endereço eletrônico: gilopesg@yahoo.com.br).*

^{1,2}*Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, C.P. 15053. Av. Bento Gonçalves, 9500. Agronomia. CEP: 91501-970. Porto Alegre RS Brasil (Fone: +55-51-3308-6733; Endereço eletrônico: thales.freitas@ufrgs.br).*

Autor correspondente:

Gislene L. Gonçalves. Telefone: +55 51 3308.6726/ E-mail: gilopesg@yahoo.com.br.

A ser submetido: Genetica – International Journal of Genetics and Evolution

4.1 Resumo

Os tuco-tucos (gênero *Ctenomys*) são roedores subterrâneos que apresentam grande variabilidade intra e inter-populacional. *C. torquatus* ocorre no extremo sul do Brasil, no bioma Campos Sulinos. É caracterizado por apresentar populações com variação em relação ao número diplóide e a coloração da pelagem. Tais polimorfismos conduziram a especulação preliminar de que uma dada localidade (Alegrete), apresentando indivíduos com padrão diferenciado de coloração e cariótipo compreenderia uma nova espécie. O objetivo principal deste trabalho é avaliar o *status* desta população, tendo indivíduos caracterizados inicialmente como *Ctenomys* sp., e descrever a variação fenotípica e genética entre as populações. Para isso foi construída uma filogenia a partir de seqüências do gene citocromo b. Também foram empregados nove *loci* de microssatélites, de modo a avaliar os processos populacionais contemporâneos. Identificaram-se sete diferentes haplótipos e 48 alelos de microssatélites, em 85 indivíduos coletados. A diferenciação genética foi consistente com o modelo de isolamento por distância ($r = 0.56$, $p < 0.05$), a partir dos microssatélites. A análise de *mismatch distributions*, os testes de neutralidade, e a topologia da genealogia dos genes não demonstraram padrão de expansão populacional recente. A árvore de máxima verossimilhança não apresentou monofilia para a população de Alegrete. Considerou-se esta linhagem uma variação intra-específica de *C. torquatus*. As populações apresentaram estruturação ($R_{st} = 0.21$), mas não demonstraram estar isolada a tempo suficiente para atingir a monofilia. Apesar da filogenia, os resultados apontam que a população de Alegrete pode ser considerada uma linhagem evolutiva diferenciada. Dessa forma, é sugerido tratar a população correspondente como uma Unidade de Manejo.

Palavras-chave: Campos Sulinos, Ctenomyidae, diferenciação genética, DNA mitocondrial, filogenia intra-específica, polimorfismo cromático.

4.2 Introdução

A variação dentro de uma espécie é um conceito fundamental da genética ecológica e possui três componentes: diversidade, diferenciação e distância genética (Lowe et al., 2006). Em estudos de variação intra-específica, é essencial compreender como essa variação é distribuída dentro e entre populações locais, e descrever esses padrões é fundamental para identificar unidades evolutivas (D'Anatro & Lessa, 2006). A disponibilidade de marcadores moleculares como seqüências de DNA mitocondrial e frequências de microssatélites, possibilita acessar inúmeros caracteres polimórficos e estimar os níveis de variação genética entre as populações. Além disso, também permite inferir os processos que originaram esse polimorfismo (Hoffman et al., 2006).

De acordo com D'Elía et al. (1998), existem pelo menos três possibilidades para explicar os padrões de diferenciação quando populações variam em frequências gênicas: i) as populações foram moldadas por seleção natural, com os agentes de seleção espacialmente estruturados; ii) representam os efeitos da deriva genética, e iii) os padrões resultam da mistura de diferentes estoques (*i.e.*, fluxo gênico). Essas possibilidades não são mutuamente excludentes e podem atuar combinadas para produzir os padrões de variação geográfica observados.

Os roedores subterrâneos, particularmente os tuco-tucos (gênero *Ctenomys*; família Ctenomyidae), são organismos-modelo para testar hipóteses sobre os processos que levam a divergência evolutiva de linhagens (Patton et al., 1996). Ocorrem em torno de ambientes naturalmente fragmentados, em pequenas unidades genética e apresentam extensa variação cariotípica (Patton & Smith, 1990; Smith, 1998; Wlasiuk et al., 2003). Estão distribuídos na região Neotropical, compreendendo 60 espécies descritas (Reig et al., 1990; Lacey et

al., 2000). Formam um dos clados cariotipicamente mais diverso, com números cromossômicos diplóides, variando de 10 a 70 (Cook et al., 1990; Gallardo, 1991; Reig et al., 1992; Ortells, 1995). Reig & Kiblicky (1969) propuseram que esses roedores representam um exemplo de especiação cromossômica. Essa ampla variação em números diplóides em um único clado tem gerado especulações a respeito dos mecanismos correspondentes (Nevo, 1999). A diversificação dos ctenomídeos pode ter sido facilitada pelo isolamento de pequenos demes que caracterizam a estrutura populacional na maioria das espécies (Reig et al., 1990). Acessar a estrutura das populações, especialmente a estimativa de parâmetros populacionais críticos, como fluxo gênico, é fundamental na compreensão da dinâmica de diferenciação dos tuco-tucos (Wlasiuk et al., 2003).

De acordo com Freitas (2006), ocorrem quatro espécies para o gênero *Ctenomys* no sul do Brasil: *C. flamarioni*, *C. lami*, *C. minutus* e *C. torquatus*, sendo a última focada nesse estudo. Como a maioria das espécies de tuco-tucos, *Ctenomys torquatus* é altamente territorial. Os indivíduos são solitários e habitam amplos sistemas de túneis subterrâneos, ocupando áreas arenosas em campos com florestas de galeria, classificados por Fonseca et al. (1996) como Campos Sulinos. *C. torquatus* distribui-se da metade norte do Uruguai até metade sul do Estado do Rio Grande do Sul (RS), no Brasil (Freitas 1995). Kiblicky et al. (1977) descreveram o número diplóide para a espécie no Uruguai, com $2n = 44$. Freitas & Lessa (1984) analisaram os cariótipos das formas brasileiras de *C. torquatus* e confirmaram a existência de $2n = 44$, bem como a existência de $2n = 46$, sendo o último restrito a uma pequena área, isolada pelo canal São Gonçalo e as áreas alagadas adjacentes (Pelotas, RS). A espécie caracteriza-se por possuir coloração castanha no dorso e flancos, esbranquiçada no ventre e colar branco.

Estudos preliminares sugerem a existência de uma quinta espécie de *Ctenomys* no Sul do Brasil (*Ctenomys* sp.), baseado no cariótipo e na coloração da pelagem (Freitas, 2006). Indivíduos com pelagem marrom, com manchas brancas na região posterior, foram encontrados em uma população de tuco-tucos localizada no extremo oeste do RS (município de Alegrete), e a análise cariotípica indicou a presença de $2n = 40$. Devido à sobreposição geográfica desta com àquela de *C. torquatus*, surgiu a necessidade de testar o *status* de *Ctenomys* sp., que é o objetivo principal deste estudo.

A comparação dos padrões obtidos a partir de marcadores com diferentes taxas evolutivas pode ser utilizada como base para elucidar se as populações funcionam como unidades evolutivas independentes (espécies) ou se respondem por variação intra-específica. Assim, a partir de seqüências nucleotídicas do gene mitocondrial do citocromo b, construiu-se uma filogenia parcial para *Ctenomys* sp. Além disso, foram comparadas as relações entre a distância genética e geográfica ao longo de sua distribuição, utilizando dados de frequências alélicas de microssatélites, de modo a investigar a estrutura genética das populações correspondentes.

4.3 Material e Métodos

Área de estudo e amostragem

O estudo foi conduzido na região oeste do Estado do Rio Grande do Sul, nos Campos Sulinos (Figura 4.1). Foram amostradas seis localidades, abrangendo populações de *Ctenomys* sp. e de *Ctenomys torquatus* contendo variações cariotípicas ($2n = 40$ e $2n = 44$) e de coloração da pelagem (marrom e marrom com manchas brancas) previamente conhecidas.

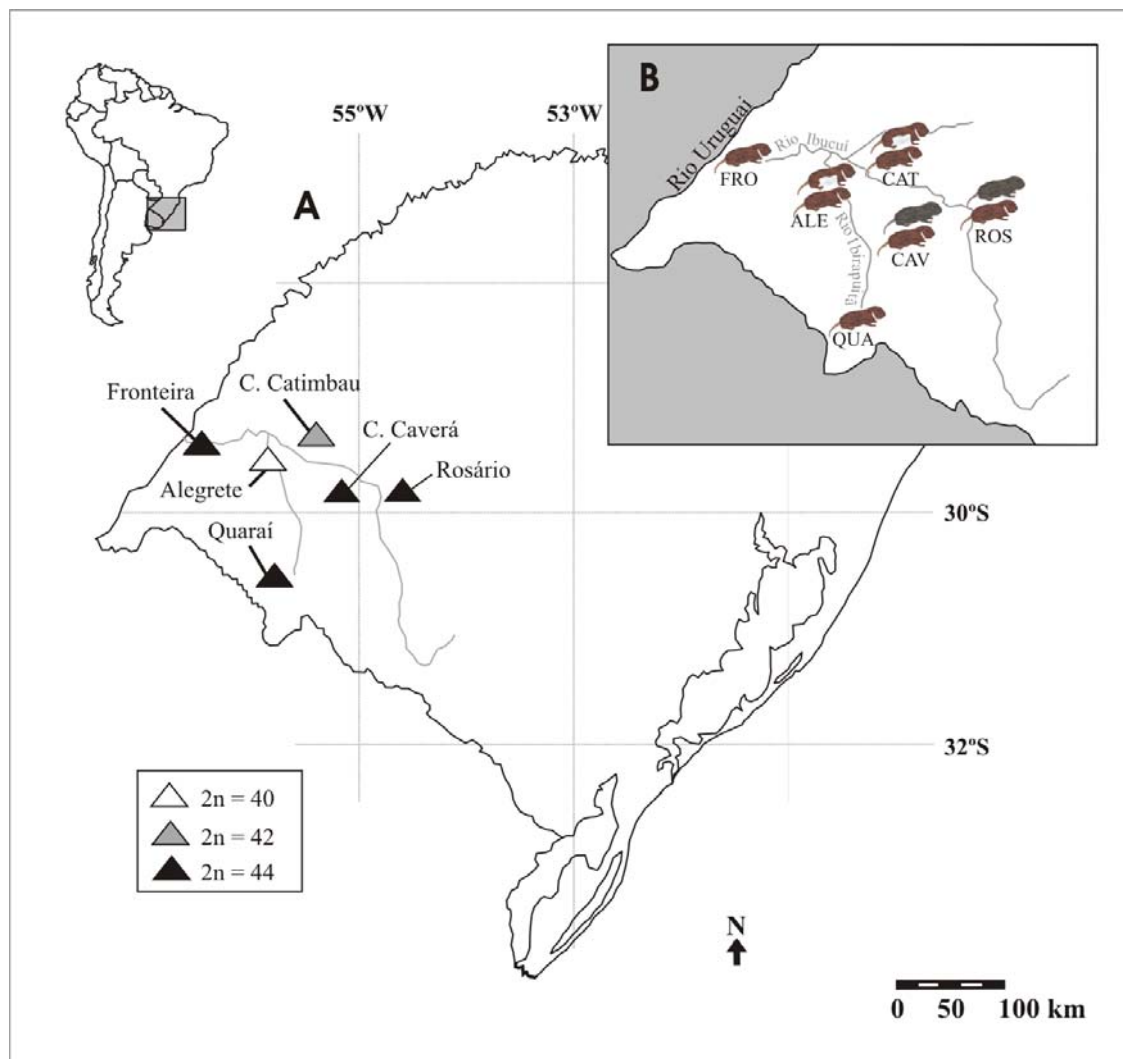


Figura 4.1 Mapa da área de ocorrência das populações polimórficas de *C. torquatus* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A) Os triângulos indicam a variação cariotípica encontrada nas populações; B) Indivíduos de cores diferentes representam a variação na coloração da pelagem (marrom, marrom com manchas brancas e cinza). As coordenadas geográficas das localidades representadas são: Alegrete (ALE, S29°53'430 W55°43'266), Catimbau (CAT, S29°50'437 W55°45'509), Caverá (CAV, S30°06'416 W55°33'147), Rosário (ROS, S30°13'319 W54°54'514), Quaraí (QUA, S30°28'032 W56°19'487) e Fronteira (FRO, S29°24'262 W56°38'308).

Os indivíduos (n = 85) foram capturados com armadilhas Oneida Victor[®] número 0. Foram coletadas amostras de tecido da orelha e do fígado, fixadas em etanol 95% e posteriormente estocadas a -20°C para extração de DNA. Exemplares testemunhos foram taxidermizados e depositados na coleção do Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, sob números LCEM 970 a LCEM 1055.

Para a reconstrução das relações filogenéticas a partir de seqüências do gene citocromo b (cit b) do DNA mitocondrial (mtDNA), foram utilizadas 65 amostras de seis populações. Foram incorporadas à análise seqüências de *C. torquatus* provenientes do Uruguai, as quais foram reportadas por D'Elía et al. (1999) e obtidas do GENE BANK (números de acesso: AF111911, AF111910 e AF1119109). Como grupo externo foram utilizadas três espécies de *Ctenomys* adicionais: *C. talarum*, *C. pearsoni* e *C. perrensi*, sendo que as duas últimas foram incorporadas na construção da rede de haplótipos (*network*). As seqüências correspondentes também foram obtidas do GENE BANK (número de acesso: AF144283, AF1119108 e AF500057).

Para estimativas de parâmetros populacionais críticos, como fluxo gênico e variação geográfica, foram genotipados 70 indivíduos com nove *loci* heterólogos de microssatélites, sendo estes pertencentes as quatro populações que apresentaram maior grau de polimorfismo de coloração da pelagem e cariótipo.

Técnicas de laboratório

Para extração do DNA genômico total das amostras foi utilizado o protocolo descrito por Medrano et al. (1990), que utiliza cloreto de sódio e não fenol-clorofórmio para a remoção das proteínas do DNA. Através da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram

amplificados dois fragmentos sobrepostos, que cobriam todo gene do citocromo b, utilizando os seguintes *primers*: MVZ 05 (5-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTT-3) (Smith & Patton, 1993), TUCO 06 (5-GTGAAATGGAATTTTGTCTGA-3), TUCO 07 (5-TACAGCAATAGTAATAAT-3, e TUCO 14A (5-CCAATGTAATTTTTATAC-3) (Wlasiuk et al., 2003). O volume final da reação de PCR foi de 20µl, e as condições de amplificação foram as mesmas descritas por Lessa & Cook (1998). Os produtos foram verificados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, e purificados com as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e *Exonuclease I* (Invitrogen, Carlsbad, California). As seqüências foram submetidas à corrida em gel de poliacrilamida desnaturante a 4%, utilizando o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems Inc., Foster City, California). As diferentes seqüências foram depositadas no GENE BANK com os números de acesso de EF372280 a EF372291 (Anexo 2). Os eletroferogramas foram inspecionados visualmente e editados utilizando-se o programa CHROMAS 1.45 (<http://www.thecnelysium.com.au/chromas.html>). O alinhamento foi feito no programa CLUSTALW (implementado no MEGA 3.1; Kumar et al., 2004).

Além das seqüências de mtDNA, também utilizou-se nove *loci* de microssatélites heterólogos, desenvolvidos para as espécies argentinas *Ctenomys sociabilis* (Soc 1, Soc 2; Lacey, 2001) e *Ctenomys haigi* (Hai 2, Hai 3, Hai 4, Hai 5, Hai 9, Hai 10, Hai 12; Lacey et al., 1999). O volume final da reação de PCR foi 20µl, contendo 25-100 ng DNA, 0.2 mM de cada primer, 0.2 mM dNTP, 2x PCR buffer, 1.6 mM MgCl₂ e 0.5 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações de PCR foram realizadas em termocicladores e as condições foram aquelas descritas por Wlasiuk et al. (2003). Os produtos amplificados, marcados com bases nucleotídicas fluorescentes (FAM e REX; Invitrogen), foram

submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 4%, em sequenciador automático ABI 3100. Foi adicionado às amostras o padrão de tamanho LIZ 500 (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut). O tamanho dos fragmentos e os genótipos foram determinados utilizando o programa GENEMAPPER (Applied Biosystems Inc.).

Análise estatística de seqüências de mtDNA

Para determinar o modelo de evolução nucleotídica das seqüências, utilizamos o critério de informação *Akaike* (AIC), implementado no programa MODELTEST 3.6 (Posada & Crandall, 1998). As relações filogenéticas entre os haplótipos de citocromo b de *Ctenomys* sp. e *C. torquatus* foram inferidas utilizando o programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 1998) a partir de dois diferentes critérios: i) a máxima parcimônia, com a busca heurística utilizando 200 replicações de adições aleatórias de táxons, e ii) a máxima verossimilhança, incorporando o modelo evolutivo JC69 (Jukes & Cantor, 1969). Em ambos os casos, foram utilizados 100 replicações (*bootstrap*) para avaliar o suporte dos nós. Uma análise filogenética separada utilizando inferência bayesiana foi empregada através do programa MRBAYES 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), incorporando também o modelo evolutivo de JC69 (Jukes & Cantor, 1969). Duas corridas separadas de cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC) foram realizadas com 100.000 a 200.000 gerações, amostrando as árvores a cada 100 gerações. Foram descartadas as primeiras 200 e 400 árvores (*burn-in*), respectivamente as gerações. A topologia das relações entre os haplótipos de citocromo b foi estimada utilizando-se dois diferentes métodos: i) a parcimônia estatística implementada no programa TCS 1.18 (Clement et al., 2000), com as conexões limitadas por 95% de intervalo de confiança, e ii) a abordagem por *median-joining* (Bandelt et al., 1999), implementada no programa NETWORK 4.1.0.8 (www.fluxus-engineering.com). A

diversidade nucleotídica e haplotípica foi inferida através do programa ARLEQUIN 3.1 (Schneider et al., 2000; <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>)

Análise estatística de loci de microssatélites

A diversidade genética dentro de cada população foi medida pelo número de alelos por locus (N), por locus por população (N_i), número médio alelos (riqueza alélica, A), porcentagem de loci polimórficos (%P), heterozigosidade observada (H_o) e a heterozigosidade esperada (H_e ; Nei, 1978) a partir das proporções de Hardy-Weinberg (HW). Para tal, utilizou-se os programas FSTAT 2.9.1 (Goudet, 1995; <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>) e GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset, 1995; <http://genepop.curtin.edu.au/>). As análises do desequilíbrio de ligação (LD), assim como os testes de desvios do Equilíbrio de HW, utilizando o teste exato baseado no método descrito por Guo & Thompson (1992), foram implementadas no ARLEQUIN 3.1. Os níveis de significância para os desvios do equilíbrio de HW e LD foram ajustados segundo o método sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações (Rice, 1989), $\alpha = 0.05$.

Estruturação populacional

A estatística F de Wright (Wright, 1951) foi utilizada para analisar a estrutura populacional F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984). A análise correspondente foi implementada no programa GENEPOP 3.4 e ARLEQUIN 3.1, a partir de *loci* de microssatélites e seqüências de mtDNA, respectivamente. Como medida alternativa da diferenciação populacional, foi utilizado, o índice de R_{ST} (Michalakis & Excoffier, 1996), o qual baseia-se na variância no tamanho dos alelos, utilizando o modelo de mutação passo a passo (*stepwise mutation*). Estimativas do nível global de fluxo gênico foram calculadas através do método de alelos exclusivos (Slatkin, 1985) e haplótipos únicos, utilizando GENEPOP 3.4 e ARLEQUIN 3.1,

respectivamente. Os níveis de significância também foram ajustados segundo método seqüencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Para examinar os padrões de isolamento por distância, foram utilizadas estimativas de fluxo gênico e a distância geográfica linear, comparada entre populações pareadas (Slatkin, 1993). Foi utilizado o teste não paramétrico de Mantel (Mantel, 1967) para acessar a significância da correlação entre a estimativa de fluxo gênico e a distância geográfica, processado no programa ARLEQUIN 3.1, computado para dados de mtDNA e microssatélites.

De modo a investigar a existência de níveis hierárquicos da estrutura populacional, foi empregada uma análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992) implementada no ARLEQUIN 3.1, utilizando-se dados de microssatélites. Para tal, foram agrupadas populações com cariótipos similares. Sendo elas: i) Alegrete, $2n = 40$; ii) Catimbau, $2n = 42$ e iii) Caverá e Rosário, $2n=44$.

A ocorrência de eventos passados no tamanho populacional (expansão ou contração) foi inferida através da análise de *mismatch distribution* (Rogers & Harpending, 1992) a partir de diferentes haplótipos de mtDNA. Estimativas de testes de neutralidade, tais como D de Tajima (Tajima, 1989) e F_S de Fu (Fu, 1997), foram computadas utilizando-se DNASP (Rozas et al., 2003; <http://www.ub.es/dnasp>) e ARLEQUIN 3.1.

Para investigar os padrões espaciais da variação genética, foi usada uma análise de componentes principais (PCA), através da ordenação multivariada dos genótipos dos indivíduos, a partir das frequências gênicas, através do programa PCAGEN (<http://www.unil.ch/izea/software/pcagen.html>).

Para testar se indivíduos amostrados em áreas geograficamente separadas são equivalentes ao número de populações distintas geneticamente, tomou-se como base o

método de agrupamento bayesiano do programa STRUCTURE 2.0 (Pritchard et al., 2000; http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2_1.html). O modelo assume o equilíbrio de HW e LD entre os locus (assumindo que estes são independentes) e dentro de cada população; a existência de desvios do equilíbrio leva a população a ser dividida em subpopulações. Através do teste de associação, os indivíduos foram relacionados a uma população fonte (k), a partir do genótipo. O teste correspondente foi processado considerando cada indivíduo associado a um dos quatro grupos, utilizando previamente a informação populacional (opção USEPOININFO = 1). Foram utilizados 50.000 a 1.000.000 de repetições da MCMC como *burn-in*. O maior valor de *likelihood* indicou o número de populações geneticamente distintas na amostra.

4.4 Resultados

Variação intraespecífica

Foram encontradas variações na coloração da pelagem tanto dentro como entre as populações de *C. torquatus* no oeste do Rio Grande do Sul (Figura 4.1). Além da existência da coloração típica (marrom com colar branco), verificou-se também o padrão marrom com manchas brancas e cinza, sendo este descrito pela primeira vez para a espécie (Figura 4.2).

Também foi registrado um novo número diplóide ($2n = 42$), encontrado apenas na população de Catimbau (Figura 4.1).

Variabilidade genética do mtDNA e microssatélites

A partir do alinhamento da seqüência de 1110 pares de base do gene do cit b foram definidos 11 sítios variáveis, três *singletons* e oito sítios parcimônia-informativa, compreendendo sete diferentes haplótipos (Tabela 4.1).

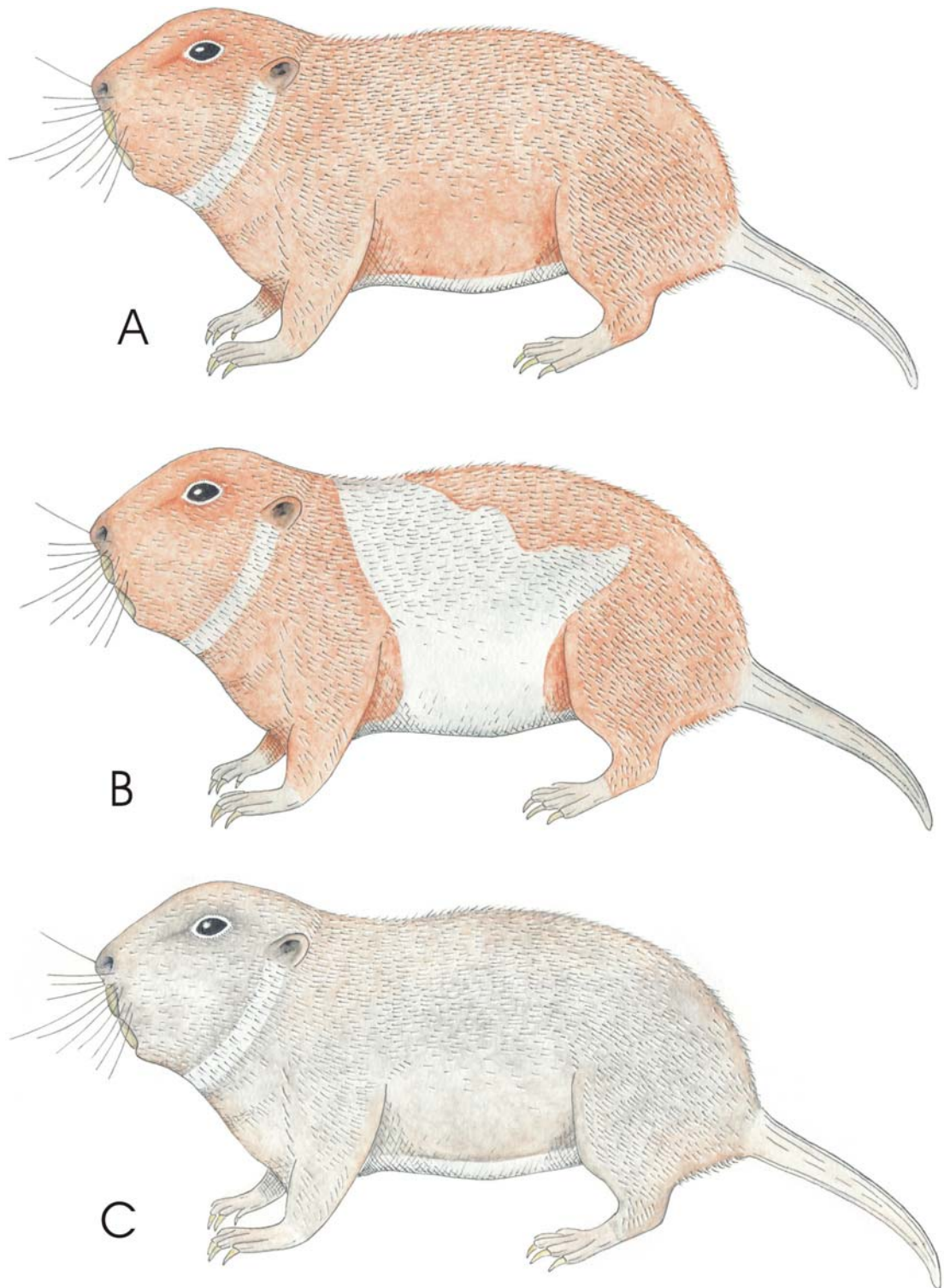


Figura 4.2 Representação esquemática da variação de pelagem nas populações de *C. torquatus*. A) marrom, B) marrom com manchas brancas e C) cinza.

Todos os polimorfismos observados foram substituições de um par de bases e consistiu-se de 11 transições. Nenhum *gap* (inserção-deleção) foi encontrado entre as seqüências. Os valores da diversidade haplotípica variaram de zero (Caverá, Rosário e Fronteira) a 0.6 (Quaraí), apresentando média de 0.679 (Tabela 4.2).

Todos os *loci* de microssatélites utilizados apresentaram-se polimórficos. O número total de alelos por locus variou de 2 (Hai 5) a 12 (Hai 6), com uma média de 4.2 alelos. A diversidade alélica (*A*) variou de 2.6 (Catimbau) a 5.2 (Caverá). Os valores de heterozigosidade esperada (*He*), em média sobre todos os *loci*, variaram de 0.40 (Rosário) a 0.54 (Caverá) (Tabela 4.2). Os testes exatos de desequilíbrio de ligação (tanto o global como o subpopulacional) indicaram valores não-significantes ($p > 0.05$), sugerindo que os *loci* são independentes.

Foram encontrados valores estatisticamente significativos para desvio do equilíbrio de HW em três *loci*, sobre três populações (Hai 6: Catimbau, Rosário; Hai 10: Alegrete, Soc 1: Rosário). Quando aplicado o teste global sobre todos os *loci* entre as populações, a hipótese de equilíbrio foi rejeitada ($p < 0.001$). A tabela de freqüência de alelos de microssatélites está apresentada no Apêndice 1.

Estrutura genética e isolamento por distância

Os níveis globais e fluxo gênico estimados pelo índice de fixação pareada foi de 0.21 para dados de microssatélites, e de 0.03 para dados de mtDNA. As comparações entre as populações, para dados de seqüências, apresentaram valores variando de 0.05 entre Alegrete e Caverá, a 0.006 entre Alegrete e Rosário e para dados de freqüências alélicas, de 0.14 e 0.37, respectivamente (Tabela 4.3).

Tabela 4.1 Sítios polimórficos do gene citocromo b do mtDNA para populações de *C. torquatus* (n = 65). Os nucleotídeos são numerados de 1 a 1130. Estão representadas as distribuições de cada haplótipo, por localidade (ALE, Alegrete; CAT, Catimbau; CAV, Caverá; ROS, Rosário, QUA, Quaraí; FRO, Fronteira) e o número total de indivíduos por haplótipo.

Nº haplótipo	Nº sítio											Distribuição do haplótipo por localidade						
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	ALE	CAT	CAV	ROS	QUA	FRO	Total
	2	2	2	3	3	3	4	5	6	9	0							
H1 (EF372280)	C	T	C	T	A	C	T	A	G	T	T	22	-	9	-	-	-	31
H2 (EF372282)	C	.	A	1	-	-	-	-	-	01
H3 (EF372283)	T	.	T	.	G	T	A	2	-	-	8	2	-	12
H4 (EF372286)	T	C	T	C	G	T	.	.	.	C	A	1	6	-	-	3	-	10
H5 (EF372289)	T	C	T	C	G	T	1	-	-	-	-	-	01
H6 (EF372290)	T	.	T	.	G	T	C	G	.	.	.	-	-	-	-	-	7	07
H7 (EF372291)	T	T	-	-	3	-	-	-	03

Tabela 4.2 Resumo da variabilidade genética em *C. torquatus* a partir de nove loci de microssatélites e seqüências de mtDNA. *n*, tamanho da amostra; *A*, número médio de alelos por locus; %*P*, porcentagem de loci polimórficos; *Ho*, heterozigosidade média observada; *He*, heterozigosidade média esperada; *nh*, número de haplótipos; *Hd*, diversidade haplotípica e π , diversidade nucleotídica. As populações (Pop.) correspondem àquelas da Figura 2.

Pop.	Citocromo b													
	Microssatélites					<i>n</i>	<i>nh</i>	<i>Hd</i>	π	Tajima's <i>D</i>		Fu's <i>F_s</i>		
	<i>n</i>	<i>A</i>	% <i>P</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>					<i>D</i>	<i>p</i>	<i>D</i>	<i>p</i>	
ALE	25	4.77	100	0.36	0.56*	25	5	0.30	0.0024	-1.38	0.05	0.59	0.64	
CAT	10	2.66	100	0.28	0.40	6	1	0.00	0.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	
CAV	20	5.22	100	0.24	0.54*	15	2	0.28	0.0009	0.24	0.35	1.38	0.71	
ROS	15	4.33	88	0.33	0.47	8	1	0.00	0.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	
QUA	-	-	-	-	-	5	2	0.60	0.0020	1.57	0.46	2.24	0.86	
FRO	-	-	-	-	-	6	1	0.00	0.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	
Todas pops.	70	4,24	97	0.30	0.49	65	7	0.67	0.0017	-0.86	0.30	2.38	0.48	

*Valores significantes após a correção de Bonferroni, $p < 0.01$.

O teste de Mantel não apresentou diferença significativa entre a distância genética e geográfica a partir de dados de seqüências, e as estimativas de fluxo gênico não revelaram um padrão de isolamento por distância ($r = 0.40$; $p > 0.05$). Entretanto, quando realizado o mesmo teste a partir de dados de frequências alélicas, o resultado obtido foi uma correlação marginalmente significativa ($r = 0.56$; $p = 0.04$) (Figura 4.3).

Expansão populacional

Os testes D de Tajima e F_S de Fu não foram significantes para todas populações. A maior parte das localidades apresentou valores positivos para esses testes (Tabela 4.2). O teste D de Tajima foi negativo, porém não significativo ($D = -0.86$, $p > 0.10$). No total, o teste F_S de Fu foi positivo e também não significativo ($F_S = 2.38$, $p > 0.10$). A análise de *mismatch distributions* apresentou distribuição multimodal e alto número de diferenças nucleotídicas, sendo $k = 3.06$ (Figura 4.4).

Varição geográfica

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a variação está distribuída proporcionalmente entre os três níveis hierárquicos: entre grupos cariotípicos (33.08%), entre populações dentro dos grupos (34.81%) e dentro das populações (31.11%). Todos esses componentes de variação foram estatisticamente significantes (Tabela 4.4).

Análise de componentes principais (PCA)

Os padrões de diferenciação genética estão representados por um diagrama multivariado de componentes principais (Figura 4.5). Os escores individuais de PCA, plotados dentro dos dois primeiros eixos dos componentes principais, PC-I e PC-II, explicaram respectivamente 19.43% e 10.53% do total de diversidade genética.

Tabela 4.3 Estimativas pareadas de fluxo gênico baseado em R_{ST} (metade abaixo da matriz) e F_{ST} (metade acima da matriz). Populações: 1, ALE; 2, CAT; 3, CAV; 4, ROS. O asterisco indica significância estatística ($\alpha < 0.01$).

Pop.	1	2	3	4
1		0.052	0.061	0.006
2	0.170*		0.003	0.025
3	0.144*	0.156*		0.017
4	0.377*	0.355*	0.239*	

Tabela 4.4 Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA), a partir de *loci* de microsatélites, representando a distribuição da variação genética em *C. torquatus*. Estão representados os índices de fixação e os respectivos componentes de variação. O asterisco indica significância estatística ($\alpha < 0.01$).

	Componente de variação	% de variação	Índice de fixação
Entre regiões	1.640	33.08	$F_{CT} = 0.321^*$
Entre populações dentro das regiões	1.658	34.81	$F_{SC} = 0.291^*$
Dentro das populações	1.534	31.11	$F_{ST} = 0.344^*$

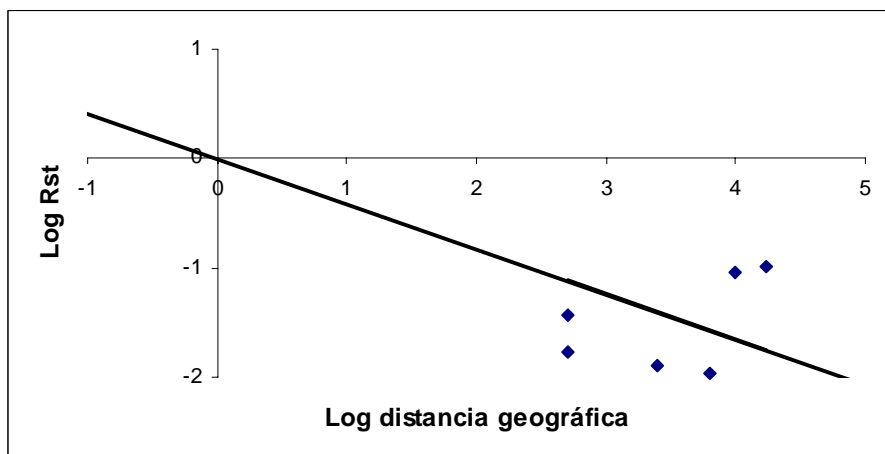


Figura 4.3 Relação entre a distância geográfica pareada e as estimativas de fluxo gênico, em populações de *C. torquatus*, a partir de freqüências de microssatélites, baseado em R_{ST} . As relações entre as variáveis foram marginalmente significantes ($p < 0.05$).

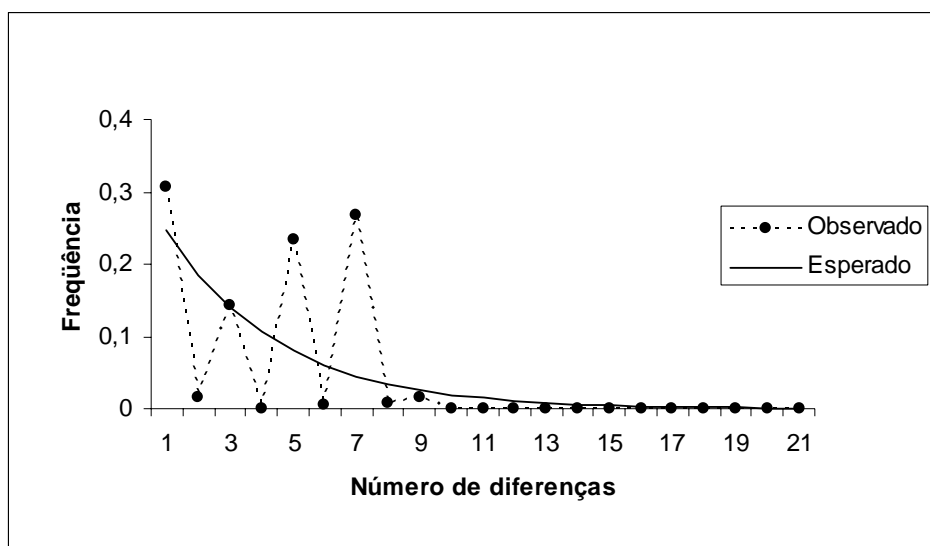


Figura 4.4 *Mismatch distributions* sobre as diferenças nucleotídicas pareadas em populações de *C. torquatus*. Os círculos sólidos representam a distribuição observada e a linha contínua a distribuição esperada.

As amostras de Alegrete e de Rosário se agruparam separadamente na parte superior direita e esquerda do diagrama de PCA, respectivamente. Indivíduos das populações de Catimbau e Caverá agruparam-se separadamente na parte inferior do diagrama de PCA, embora apresentando uma grande mistura na região central.

Inferência bayesiana

A análise bayesiana de grupos detectou entre quatro e seis populações geneticamente distintas, sendo que a probabilidade maior foi de $k = 4$. As amostras de Alegrete, Catimbau, Caverá e Rosário foram associadas a grupos distintos, tendo $q > 0.70$ (Tabela 4.5).

Os valores das proporções de associação de indivíduos não modificaram dentre as cinco simulações independentes. Os resultados demonstraram que a maior parte das amostras foram associadas a uma única população com a probabilidade de $q \geq 0.7$ (Tabela 4.6).

Relações filogenéticas

Os métodos de parcimônia, verossimilhança e análise bayesiana resultaram em árvores topologicamente equivalentes, que diferiram apenas em ramos com valores de *bootstrap* inferiores a 50%. A árvore de máxima verossimilhança foi escolhida, de maneira conservadora, por apresentar os menores valores de *bootstrap* (Figura 4.6).

A análise correspondente, baseada no modelo evolutivo de JC69 (Jukes & Cantor, 1969), resultaram em um escore de $-\ln L = 2497.65$.

Ctenomys sp. e *C. torquatus* não foram reciprocamente monofiléticos (Figura 4.6). Foi verificado um clado fortemente suportado, incluindo linhagens polifiléticas de *Ctenomys* sp. e *C. torquatus* proveniente do Rio Grande do Sul e Uruguai (Figura 4.6A).

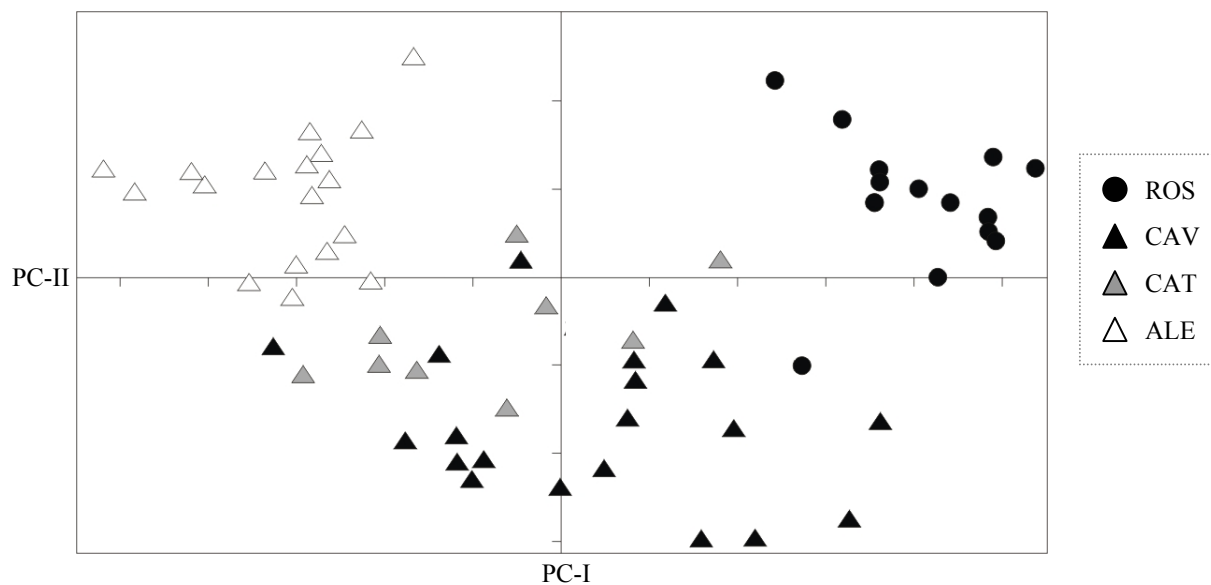


Figura 4.5 Análise de componentes principais representando os escores dos genótipos de *C. torquatus* plotados nos dois primeiros eixos (PC-I, PC-II). Populações: ALE, Alegrete; CAT, Catimbau; CAV, Caverá; ROS, Rosário.

Tabela 4.5 Análise de agrupamentos bayesianos em populações de *C. torquatus* (70 indivíduos: 9 *loci*). Estão representadas as identidades de cada população (Pop.) geográfica pré-definida em cada um dos quatro *clusters* inferidos pelo algoritmo bayesiano. Pop.: ALE, Alegrete; CAT, Catimbau; CAV, Caverá; ROS, Rosário.

Pop.	Cluster			
	I	II	III	IV
ALE	0.015	0.009	0.890	0.086
CAT	0.064	0.887	0.029	0.020
CAV	0.036	0.108	0.034	0.764
ROS	0.870	0.023	0.017	0.114

Tabela 4.6 Resultados do teste de associação bayesiana. Estão indicados os números e a porcentagem de indivíduos associados à respectiva população original. Pop.: ALE, Alegrete; CAT, Catimbau; CAV, Caverá; ROS, Rosário.

Pop.	ALE	CAT	CAV	ROS	Não associados	Porcentagem
ALE	23	0	2	0	0	92.0%
CAT	0	10	0	0	0	100%
CAV	0	3	13	1	1	76.4%
ROS	0	0	2	15	0	88.2%

A estrutura geográfica e a subdivisão em relação ao cariótipo ou coloração da pelagem foram limitadas. *C. torquatus* definiu-se como grupo-irmão de *C. perrensi* e *C. pearsoni*. As relações dos haplótipos produzida através do NETWORK e TCS foram quase idênticas, sendo apenas a primeira apresentada (Figura 4.7).

4.5 Discussão

Aspectos filogenéticos

A análise filogenética evidenciou *Ctenomys* sp. como uma variação intra-específica de *C. torquatus*, dada a ausência de monofilia, condição essencial para caracterizar uma unidade evolutiva independente. No entanto, considera-se que tal resultado represente uma árvore de genes e não necessariamente uma árvore de espécies. Dessa forma, *Ctenomys* sp. e *C. torquatus* podem ser espécies divergentes, sob outros caracteres sistemáticos. No entanto a árvore de mtDNA não recobriu tal divergência, possivelmente devido ao pouco tempo transcorrido desde a separação.

Os haplótipos de *Ctenomys* sp. e *C. torquatus* formaram um clado fortemente estruturado, incluindo os haplótipos provenientes de indivíduos do Uruguai. Tal clado posicionou-se como grupo-irmão de *C. pearsoni* e *C. perrensi*, cujo resultado é consistente com as análises filogenéticas anteriores a esse estudo (D'Elía et al., 1999; Slamovits et al., 2001). Assim como a árvore de máxima verossimilhança, a rede de haplótipos (*network*) apresentou populações polifiléticas.

Através dos dados de seqüências, infere-se que apenas *C. torquatus* constitua uma unidade evolutiva independente, sendo cromossomicamente politípica.

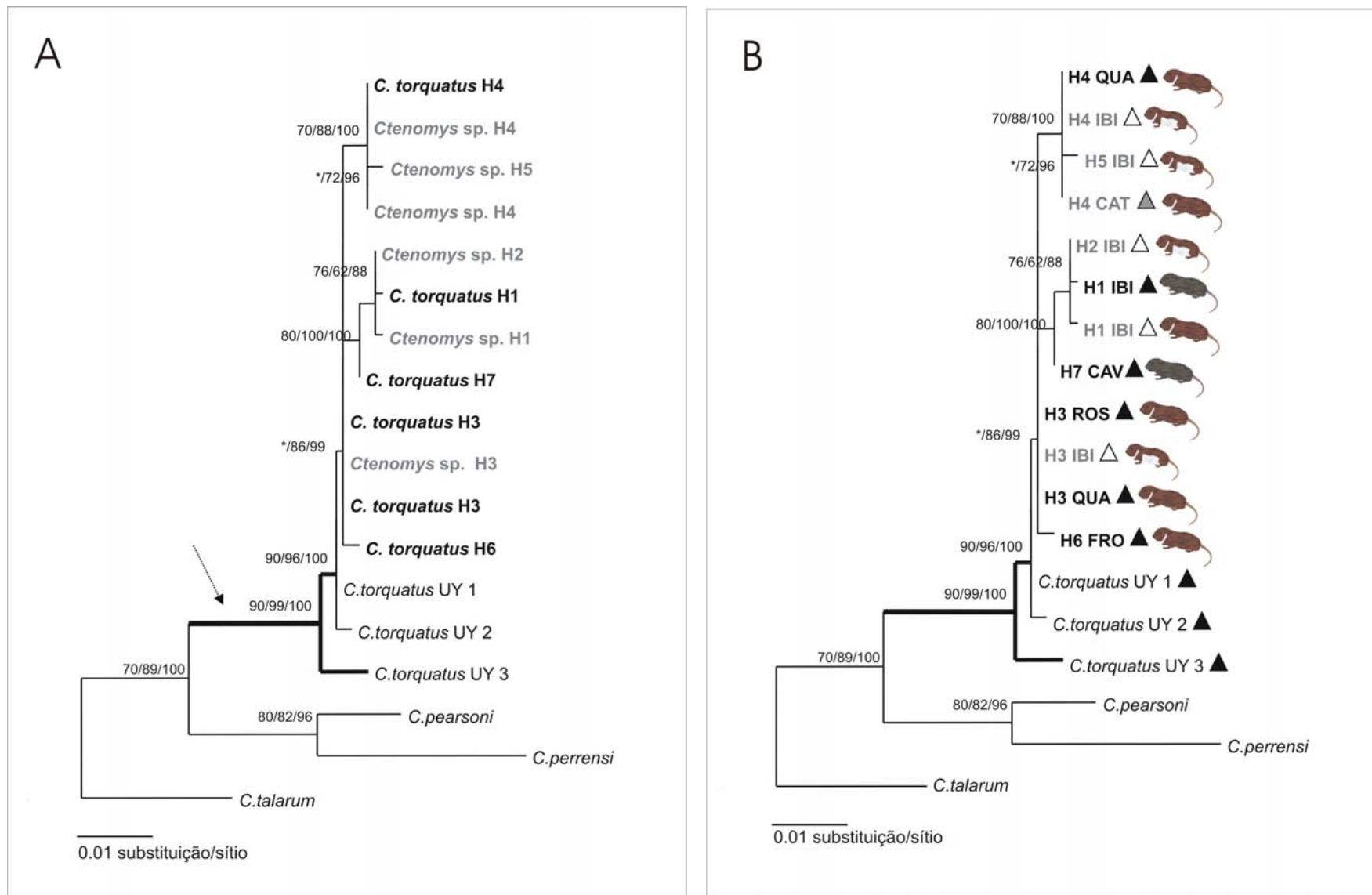


Figura 4.3 Árvore de Máxima Verossimilhança (ML), construída a partir de haplótipos de mtDNA, com base em 1110 pb do citocromo b. Os valores acima dos ramos indicam o suporte de cada nó baseado nos métodos de parcimônia/ML/Inferência bayesiana. Os asteriscos indicam um valor de *bootstrap* inferior a 50%. A) A seta indica o ramo que contém uma monofilia de *C. torquatus*, B) Os triângulos à direita indicam o número diplóide dos indivíduos: preto, 2n=44; branco, 2n=40 e cinza, 2n=42. Indivíduos de cores diferentes representam a variação na coloração da pelagem (marrom, marrom com manchas brancas e cinza).

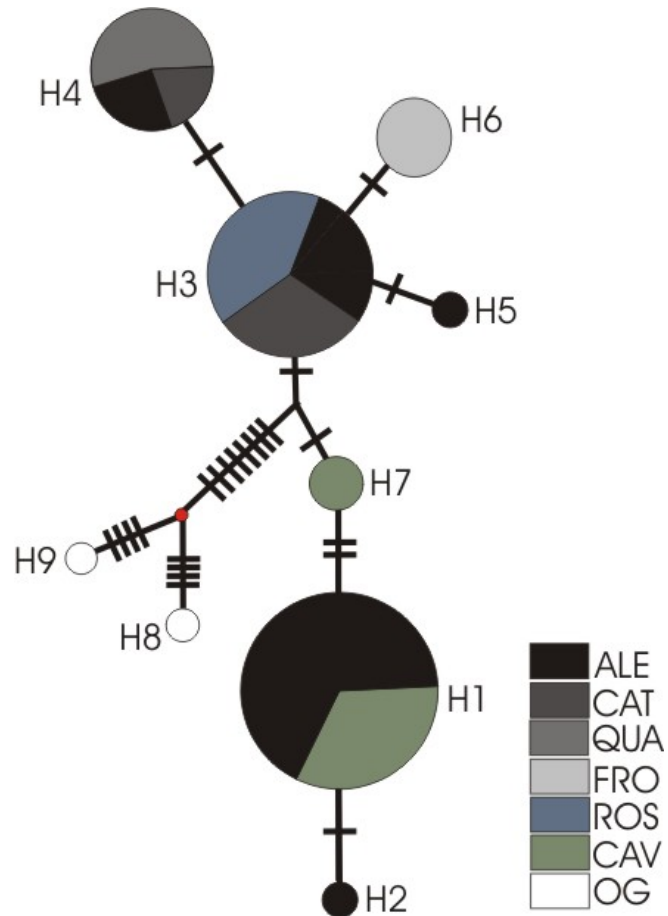


Figura 4.4 *Network* construído a partir do método de *median-joining* para nove haplótipos de mtDNA de *C. torquatus* + grupo externo. Os círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos. O círculo vermelho indica o vetor intermediário. Os números correspondem àqueles da tabela 1. As cores indicam as localidades, sendo ALE, Alegrete; CAT, Catimbau; CAV, Caverá; ROS, Rosário; QUA, Quaraí; FRO, Fronteira; OG, outgroup.

A idéia clássica de especiação cromossômica baseia-se no princípio de que diferentes rearranjos representam unidades biológicas distintas, considerando que os novos rearranjos atuam como barreira reprodutiva pós-zigótica (Lande, 1984). Entretanto, os resultados obtidos não são compatíveis com tal ponto de vista.

Os diferentes rearranjos encontrados em *C. torquatus*, inicialmente especulados como nova espécie, estão fixados localmente (em populações específicas).

Os resultados a partir de mtDNA e loci de microssatélites apresentaram diferentes estimativas de fluxo gênico e isolamento geográfico. O primeiro marcador apresentou alto nível de fluxo gênico. Entretanto, o segundo indicou de moderada a alta diferenciação genética e geográfica entre as populações. Tal fato demonstra que as populações de *Ctenomys* sp. e *C. torquatus* estão em processo de estruturação, mas não isoladas a tempo suficiente para alcançar à monofilia recíproca.

Tomasco & Lessa (no prelo) sugerem que, para compreender os mecanismos da fixação de diferentes rearranjos, seria necessário conhecer as bases genéticas das mudanças. Dessa forma, é essencial compreender a influência que os correspondentes rearranjos exercem no processo de especiação em si.

Varição cariotípica inter-populacional

O tempo esperado para uma determinada linhagem atingir a monofilia (em condições de neutralidade), é quatro vezes maior para os rearranjos cromossômicos em relação ao mtDNA (Lande, 1984). Logo, a monofilia deveria ser esperada, pelo menos, para o cariótipo mais derivado. No entanto, os grupos cariotípicos foram polifiléticos para mtDNA.

O padrão de ausência de monofilia também foi caracterizado para espécies com alta variação cariotípica, filogeneticamente próximas a *C. torquatus*, sendo elas: *C. dorbigny*, *C. roigi*, *C. perrensi* (Giménez et al., 2002) e *C. pearsoni* (Tomasco & Lessa, no prelo). Esses estudos evidenciaram que a fixação de novos rearranjos é um processo freqüente em tuco-tucos.

A partir da análise de componentes principais, as populações de Rosário e Alegrete apresentaram tendência à diferenciação, de acordo com as respectivas freqüências gênicas, enquanto em Catimbau e Caverá houve uma grande mistura que não permitiu diferenciá-las claramente. Este resultado sugere também que, quando as populações estão em processo de estruturação, a ordenação multivariada não é tão sensível para acessar as relações entre os indivíduos (Randi et al., 2001). As abordagens probabilísticas, que inferem o número de populações distintas em uma amostra e associa indivíduos às populações, são consideradas mais sensíveis (Pritchard et al., 2000).

Os resultados da análise bayesiana permitiram identificar uma estruturação mais clara, na medida em que foram reconhecidas quatro unidades populacionais, a partir das amostras de quatro localidades. O percentual de indivíduos associados à respectiva população amostrada indica a tendência à diferenciação. No entanto, o diagrama de PCA apresentou pouca concordância com as associações bayesianas. Os indivíduos com as maiores porcentagens de correta associação (Catimbau e Caverá) foram os que obtiveram uma considerável mistura nos clusters do PCA. As amostras da localidade de Catimbau apresentaram o maior valor de associação, sendo que os indivíduos correspondentes foram 100% agrupados à população fonte. Porém, considera-se que o número amostral nessa localidade possa exercer influência sobre a inferência bayesiana. Sugere-se que tal análise

deva ser reavaliada a partir de um maior número de dados, de forma a confirmar os resultados obtidos.

Apesar do número amostral baixo, houve indicação que a população de Catimbau pode representar duas possibilidades, não excludentes mutuamente: i) híbridos entre as formas extremas $2n=40$ e $2n=44$, ou seja, um novo rearranjo cromossômico, e ii) apresentar um polimorfismo neutro e transitório. No entanto, para compreender os processos da evolução cariotípica e o valor adaptativo de tais rearranjos, é necessário um estudo detalhado da homologia cromossômica entre os diferentes grupos cariotípicos de *C. torquatus*.

As estimativas de diferenciação genética, a partir dos microssatélites, entre as populações de Alegrete e Caverá, apresentaram valores inferiores quando comparado a Alegrete e Catimbau. Considera-se a possibilidade de os indivíduos com $2n=40$ ser mais próximo geneticamente aos com $2n=44$, do que com $2n=42$. Tal hipótese é também suportada pelos resultados da análise de componentes principais, em que os indivíduos $2n=40$ estão agrupados com os indivíduos com $2n=44$.

O cenário hipotetizado acima parece concordar com o modelo de cascata de White (King, 1993). O modelo correspondente propõe que novas raças cromossômicas surgem dentro da distribuição dos parentais, possivelmente pelo acúmulo de diferentes rearranjos. Dessa forma, algumas raças mostram-se geneticamente mais próximas do que outras.

Variação fenotípica intra e inter-populacional

O polimorfismo cromático é definido pela presença de dois ou mais tipos distintos morfológicos, geneticamente determinados, dentro de uma única população intercruzante (Huxley, 1955). Exemplos de variação intra-específica da coloração da pelagem em roedores incluem as seguintes espécies: *Peromyscus crinitus*, *Peromyscus maniculatus*,

Peromyscus polionotus, *Thomomys bottae*, *Chaetodipus intermedius* (Hoekstra & Nachman, 2005), *Ctenomys rionegrensis* (Altuna et al., 1985), e *C. pearsoni* (G. D'Elía, UnC, comunicação pessoal).

As populações de *C. torquatus* apresentam três tipos distintos de pelagem, sendo que em algumas localidades certas colorações estão fixadas, enquanto em outras, ocorrem diferentes combinações. A partir de seqüências do gene do citocromo b testou-se uma possível monofilia para os três fenótipos. Entretanto, tal condição não foi verificada. Reig et al. (1965) sugeriram que a coloração da pelagem possui utilidade secundária na sistemática de tuco-tucos, uma vez que a variação intra e inter-específica são muito altas.

Hoekstra et al. (2004) buscaram relacionar o fenótipo com o genótipo no roedor *Chaetodipus intermedius*, utilizando seqüências de genes que não intervêm na coloração (COIII, ND3; mtDNA) e genes relacionados com a cor da pelagem (*MC1R*). A filogenia construída a partir das seqüências de mtDNA apresentou fenótipos polifiléticos. Porém, quando analisado os alelos do gene *MC1R* foi encontrada forte correlação entre os traços fenotípicos e genotípicos. Tal fato sugere que os fenótipos polifiléticos encontrados em *C. torquatus*, a partir de seqüências de citocromo b, deveria ser esperado, na medida em que se se utilizou um gene neutro, para traços associados à pigmentação.

Para investigar a possível origem da variação na coloração de *C. torquatus*, deveriam ser empregados genes, *a priori*, associados a diferenças na coloração da pelagem, como o *MC1R* e o *agouti/ASIP* (Eizirik et al., 2003).

Variabilidade genética

Os níveis de diversidade alélica dentro das populações foram de moderados a altos, quando comparados com outras espécies de tuco-tucos. O número médio de alelos por *locus* reportado para outras espécies de *Ctenomys* foi de 2.3 (variando de 1 a 3) para *C.*

sociabilis (Lacey, 2001); 2.5 (variando de 2 a 3) para *C. lami* (El Jundi & Freitas, 2004); 5.1 (variando de 3 a 8) para *C. flamarioni* (Fernandez et al., no prelo); 7.5 (variando de 3 a 13) para *C. haigi* (Lacey, 2001); 8.3 (variando de 6 a 14) para *C. rionegrensis* (Wlasiuk et al., 2003) e 9.3 (variando de 5 a 15) para *C. minutus* (Gava & Freitas, 2004).

A estimativa de riqueza alélica apresentou os menores valores para a população de Catimbau, apesar desta ser polimórfica para todos os *loci*. Além disso, a população apresentou-se monomórfica para dados de seqüências. Tal fato indica um possível efeito da deriva sobre uma população moderadamente restrita ao fluxo gênico.

As estimativas de diversidade, a partir de seqüências, apresentaram baixa variação, com apenas três populações polimórficas. Foi verificado um reduzido número de haplótipos para *C. torquatus*, quando comparado com a espécie uruguaia *C. rionegrensis* (15 haplótipos; Wlasiuk et al., 2003). O mesmo padrão é observado em relação à variação na região controladora do mtDNA, para *Ctenomys australis* (24 haplótipos; Mora et al., 2006) e *C. pearsoni* (22 haplótipos; Tomasco & Lessa, no prelo). No entanto, *C. torquatus* apresenta valores similares a *C. flamarioni*, reportado por Fernandez et al. (no prelo) com seis haplótipos para a região controladora.

Os baixos valores da diversidade haplotípica, verificado para todas as populações, sugere que houve redução nos tamanhos populacionais ancestrais. Considerando que as populações apresentam uma incipiente estruturação, provavelmente a deriva genética tenha eliminado, de maneira aleatória, variantes de haplótipos.

Estrutura genética e geográfica

Em geral os valores de F_{ST} pareados, a partir dos alelos de microssatélites, indicaram moderada a alta diferenciação genética entre as subpopulações (Harlt & Clark, 1997; Hudson et al., 1992; Wright, 1978). As estimativas de F_{ST} e R_{ST} foram similares, sugerindo

que as populações diferenciaram-se recentemente por deriva genética, e não devido a novas mutações. Porém, os valores de F_{ST} a partir dos dados de seqüências evidenciaram baixa estruturação genética.

Segundo os dados correspondentes, as localidades de Alegrete e Rosário comportam-se como uma única população, a despeito das variações cariotípicas apresentadas. Tais dados contrastam com aqueles obtidos pelos microssatélites. Os polimorfismos encontrados nas populações devem ser ancestrais, refletindo então os processos populacionais históricos, e não os atuais níveis de fluxo gênico.

A AMOVA demonstrou que a variação genética está igualmente distribuída entre os grupos, dentro das populações entre as localidades, e dentro das populações. Os índices de fixação indicaram que a estruturação genética é tão moderada entre populações dentro de um grupo cariotípico, como entre todas as populações do estudo. Foi verificado um padrão de isolamento por distância, através dos valores de R_{ST} correlacionados com a distância geográfica entre pares de populações. Segundo Slatkin (1993), uma espécie cuja dispersão é restrita, exibe o padrão correspondente quando submetida em um regime de migração estável, sob baixos níveis de fluxo gênico, por tempo suficiente para atingir o equilíbrio. O padrão de isolamento observado sugere estabilidade e equilíbrio entre deriva e migração. Evidências adicionais advêm dos testes de neutralidade de Fu e Tajima, que detectam mudanças demográficas. Não foram encontrados resultados significantes em ambos os testes, indicando que as populações estão em equilíbrio e apresentam tamanho populacional estável. A população de Alegrete apresentou valores negativos para D de Tajima, um possível desequilíbrio da neutralidade, porém os valores foram estatisticamente não significantes. O indício de desequilíbrio pode ser devido ao grande número de haplótipos divergentes dentre dessa população, representando uma mistura local recente.

A forma interna da filogenia, com ramos curtos e estrutura pouco robusta, sugerem a ocorrência de uma expansão populacional recente (Avise, 1994). No entanto, o número de diferenças nucleotídicas entre pares de seqüências ao longo do *mismatch distributions*, e a forma multimodal da curva, não representam expansão populacional. Segundo Mora et al. (2006), eventos como gargalos-de-garrafa também geram ondas na distribuição de diferenças nucleotídicas pareadas. Porém, ao contrário da expansão, a contração populacional mantém diversos alelos (ou classes de alelos) ao longo do tempo. No modelo de gargalos-de-garrafa, os pares de indivíduos diferem, em média, em relação ao número de mudanças nucleotídicas. Tal fato gera distribuições com diversos picos, e amplos valores das diferenças pareadas (Harpending et al., 1998; Rogers & Harpending, 1992). A topologia entre haplótipos, estimada pelo método de *median-joining*, também não suporta a hipótese de expansão populacional, uma vez que não apresenta o modelo tipo estrela (*starlike*) típica (Harpending et al., 1998; Slatkin & Hudson, 1991). Com base apenas nos dados de seqüências, os resultados indicam que é mais provável o cenário de um evento ocorrido no passado, como gargalos-de-garrafa, para descrever a histórica demográfica de *C. torquatus*, do que uma expansão populacional recente. No entanto, para inferir de maneira concreta sobre a ocorrência de tal evento, sugere-se também a utilização de dados de microssatélites.

Unidade de manejo

A partir da estrutura genética verificada em *C. torquatus*, identificou-se que a população de Alegrete apresenta divergência nas freqüências alélicas e haplotípicas, a despeito da ausência de distinção filogenética dos alelos. Através da análise de componentes principais verificou-se a tendência desta população ao agrupamento em separado, resultado corroborado pela associação bayesiana.

Segundo Moritz (1994), as populações que não apresentam monofilia recíproca para dados de seqüências de mtDNA, mas que divergem em frequências alélicas, são significantes para a conservação. Tais populações estão conectadas por baixos níveis de fluxo gênico e são funcionalmente independentes.

Dessa forma, sugere-se incluir a população de Alegrete (compreendendo os indivíduos especulados como *Ctenomys* sp.) no correspondente critério de conservação, de maneira a preservar a linhagem diferenciada desta localidade.

Agradecimentos

Ao Departamento de Florestas e Áreas Protegidas do Estado do Rio Grande do Sul (DEFAP), pela autorização de efetuar coletas em uma unidade de conservação. Ao Jorge Marinho (URI), pelo fornecimento de parte das amostras; Simone Ximenes (UFRGS), pela cariotipagem e Fabiano Fernandes (UFRGS), pela coleta e taxidermia do material testemunho. A CAPES pela concessão de bolsa a G.L. Gonçalves. Este trabalho foi parcialmente financiado pelo CNPq, FINEP e FAPERGS.

4.6 Referências Bibliográficas

- ALTUNA CA, UBILLA M, LESSA EP (1985) Estado actual del conocimiento de *Ctenomys rionegrensis* Langguth y Abella, 1970 (Rodentia, Octodontidae). Actas Jor. Zool. Uruguay 1: 8-9.
- AVISE JC (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York.
- BANDELT HJ, FORSTER P, ROHL A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37-48.

- CLEMENT M, POSADA D, CRANDALL K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660.
- COOK JA, ANDERSON S, YATES TL (1990) Notes on Bolivian mammals (volume 6). The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern highlands. *American Museum Novitates* 2980: 1-27.
- D'ANATRO A, LESSA EP (2006) Geometric morphometric analysis of geographic variation in the Rio Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Ctenomyidae). *International Journal of Mammalian Biology* 71: 288-298.
- D'ELÍA G, LESSA EP, COOK JA (1998) Geographic structure, gene flow, and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae). *International Journal of Mammalian Biology* 63: 285–296.
- D'ELÍA G, LESSA EP, COOK JA (1999) Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae): evaluation of the mendocinus species group and the evolution of asymmetric sperm. *Journal of Mammalian Evolution* 6: 19–38.
- EIZIRIK E, YUHKI N, JOHNSON WE et al (2003) Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Current Biology* 13: 448–453.
- EL JUNDI TARJ, FREITAS TRO (2004) Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae). *Hereditas* 140: 18–23
- 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* 131: 479–491.
- FERNÁNDEZ-STOLZ GP, STOLZ JFB, FREITAS TRO Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco-das-dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* (no prelo).

- FONSECA GAB, HERRMAN G, LEITE YLR et al (1996) Lista anotada dos mamíferos do Brasil. Occasional Papers in Conservation Biology 4: 1-38.
- FREITAS TRO, LESSA EP (1984) Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia, Octodontidae). Journal of Mammology 65: 637-642.
- FREITAS TRO (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. Studies on Neotropical Fauna and Environment 30: 53-59.
- FREITAS TRO (2006) Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. Genetica 126: 227–235.
- FU YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915–925.
- GALLARDO M (1991) Karyotypic evolution in *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). Journal of Mammalogy 72: 11–21.
- GAVA A, FREITAS TRO (2004) Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southeastern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). Journal of Mammalogy 85: 1201–1206.
- GIMÉNEZ MD, MIROL PM, BIDAU CJ et al (2002) Molecular analysis of populations of *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with high karyotypic variability. Cytogenetic and Genome Research 96: 130-136.
- GOUDET J (1995) FSTAT: a computer program to calculate F-statistics. Heredity 86: 485–486.
- GUO SW, THOMPSON EA (1992) Performing the exact test for Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48: 361–372.
- HARLT DL, CLARK AG (1997) Principles of population genetics. Sinauer, Massachusetts.

- HARPENDING HC, BATZER MA, GURVEN M et al (1998) Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 1961–1967.
- HOEKSTRA HE, DRUMM KE, NACHMAN MW (2004) Ecological genetics of adaptive color polymorphism in pocket mice: geographic variation in neutral and selected genes. *Evolution* 58: 1329-1341.
- HOEKSTRA HE, NACHMAN MW (2005) Coat-color variation in rock pocket mice (*Chaetodipus intermedius*): from phenotype to genotype. In Lacey E, Myers P (eds) *Mammalian Diversification: from Chromosomes to Phylogeography*. University of California Press, Berkeley.
- HOFFMAN EA, SCHUELER FW, JONES AG et al (2006) An analysis of selection on a colour polymorphism in the northern leopard frog. *Molecular Ecology* 15: 2627–2641.
- HUDSON RR, SLATKIN M, MADDISON WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583–589.
- HUELSENBECK JP, RONQUIST F (2001) MRBAYES: bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- HUXLEY J (1955) Morphism in birds. *Acta of International Ornithology Congress* 11: 309–328.
- JUKES TH, CANTOR CR (1969) Evolution of protein molecules. In Munro HN (ed) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.
- KIBLISKY P, BRUM-ZORRILLA N, PEREZ G (1977) Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia- Octodontidae). *Mendeliana* 2: 85- 93.
- KING M (1993) *Species evolution: the role of chromosomal change*. Cambridge University Press, Cambridge.

- KUMAR S, TAMURA K, NEI M (2004) Mega: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 1-2.
- LACEY EA, MALDONADO JE, CLABAUGH JP (1999) Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology* 8: 1753-1768.
- LACEY EA (2000) Spatial and social systems of subterranean rodents. In Lacey EA, JL Patton, Cameron GN (eds.) *Life Underground, the Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago.
- LACEY EA (2001) Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity* 86: 628-637.
- LANDE R (1984) The expected fixation rate of chromosomal inversions. *Evolution* 38: 743-752
- LANGGUTH A, ABELLA A (1970) Sobre una población de tuco-tucos melánicos (Rodentia: Octodontidae). *Acta Zoológica Lilloana* 28: 101-108.
- LESSA EP, COOK JA (1998) The molecular phylogenetics of tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Biology and Evolution* 9: 88-99.
- LESSA EP, LANGGUTH A (1983) *Ctenomys pearsoni* n. sp. (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. *Comunicaciones de las Jornadas de Ciencias Naturales* 3: 8-86.
- LOWE A, HARRIS S, ASHTON P (2006) *Ecological genetics: design, analysis, and application*. Blackwell, Oxford.
- MANTEL N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.

- MEDRANO JF, AESEN E, SHARROW L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- MICHALAKIS Y, EXCOFFIER L (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci. *Genetics* 142: 1061-1064.
- MORA MS, LESSA EP, KITTLEIN MJ, VASSALO AI (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* 87: 1192–1203.
- MORITZ C (1994) Defining Evolutionarily Significant Units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 1-3.
- NEI M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEVO E (1999) Mosaic evolution of subterranean mammals: regression, progression and global convergence. Oxford University Press, New York.
- ORTELLS MO (1995) Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. *Biological Journal of Linnean Society* 54: 43–70.
- PATTON JL, SMITH M (1990) The evolutionary dynamics of the pocket gopher *Thomomys bottae*, with emphasis on California populations. University of California Publications in Zoology 123: 1–161.
- PATTON JL, DA SILVA MNF, MALCOLM JR (1996) Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents. *Molecular Ecology* 5: 229–238.

- POSADA D, CRANDALL KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY PJ. 2000. Inferences of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- RANDI E, PIERPAOLI M, BEAUMONT M, RAGNI B, SFORZI A (2001) Genetic identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*), and their hybrids using Bayesian clustering methods. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1679–1693.
- RAYMOND M, ROUSSET F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- REIG OA, CONTRERAS JR, PIANTANIDA MJ (1965) Contribucion a la elucidacion de la sistemática de las entidades del género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Contribuciones Cientificas (Serie Zoología)* 2: 297-352.
- REIG OA, KIBLISKY P (1969) Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Chromosoma* 28: 211-244.
- REIG OA, BOSCH C, CONTRERAS JR, ORTELLS MO (1990) An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, and molecular biology in *Ctenomys*. In Nevo E, Reig OA, Liss AR (eds) *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular level*. Liss, New York.
- REIG OA, ORTELLS MO, MASSARINI AI, BARROS MA, TIRANTI S, DICHENHAUSZ A (1992) New karyotypes and C Banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia* 56: 603-623.
- RICE W (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- ROGERS AR, HARPENDING H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552–569.

- ROZAS J, SANCHEZ-DELBARRIO JC, MESSEGUER X, ROZAS R (2003) DNAsp 4.0, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.
- SCHNEIDER S, KUEFFER JM, ROESLI D, EXCOFFIER L (2000) Arlequin: software for population genetic data analysis. University of Geneva, Geneva.
- SLAMOVITS CH, COOK JA, LESSA EP, ROSSI MS (2001) Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia-Octodontidae): a phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1708-1719.
- SLATKIN M (1985) Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- SLATKIN M (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47: 264–279.
- SLATKIN M, HUDSON RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555–562.
- SMITH MF (1998) Phylogenetic relationships and geographic structure in pocket gophers in the genus *Thomomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 1–14.
- SMITH MF, PATTON JL (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of Linnean Society* 50: 149-177
- SWOFFORD DL (1998) PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Sinauer, Massachusetts.
- TAJIMA F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.

- TOMASCO I, LESSA EP Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. In Kelt DA, Lessa EP, Salazar-Bravo J, Patton JL (eds) The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson. University of California Publications in Zoology, Berkeley (no prelo).
- WEIR BS, COCKERHAM CC (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- WLASIUK G, GARZA JC, LESSA EP (2003) Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57: 913-926.
- WRIGHT S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- WRIGHT S (1978) *Evolution and the genetics of populations*, vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.

Apêndice 1

Frequência alélica dos nove *loci* de microssatélites nas quatro populações de *Ctenomys torquatus*.

<i>Locus/ Alelos</i>	População				Total
	Alegrete	Catimbau	Caverá	Rosário	
Hai 2					
1	0.000	0.000	0.048	0.000	0.014
2	0.000	0.000	0.033	0.000	0.007
3	0.771	0.650	0.476	0.000	0.500
4	0.000	0.000	0.000	0.033	0.007
5	0.063	0.250	0.214	0.833	0.300
6	0.167	0.100	0.214	0.100	0.157
7	0.000	0.000	0.048	0.000	0.014
Hai 3					
1	0.087	0.000	0.095	0.000	0.059
2	0.000	0.000	0.000	0.100	0.022
3	0.674	0.722	0.714	0.067	0.559
4	0.087	0.000	0.071	0.233	0.103
5	0.152	0.278	0.024	0.567	0.221
6	0.000	0.000	0.024	0.000	0.007
7	0.000	0.000	0.071	0.000	0.022
8	0.000	0.000	0.033	0.000	0.007
Hai4					
1	0.146	0.100	0.429	0.200	0.236
2	0.042	0.000	0.000	0.000	0.014
3	0.083	0.850	0.000	0.000	0.150
4	0.042	0.000	0.000	0.033	0.021
5	0.583	0.000	0.048	0.000	0.214
6	0.000	0.000	0.119	0.233	0.086
7	0.042	0.050	0.048	0.167	0.071
8	0.042	0.000	0.238	0.333	0.157
9	0.000	0.000	0.024	0.033	0.014
10	0.021	0.000	0.095	0.000	0.036
Hai5					
1	0.417	0.450	0.667	1.000	0.621
2	0.58	0.550	0.333	0.000	0.379
Hai6					
1	0.619	0.150	0.024	0.100	0.246
2	0.000	0.000	0.000	0.167	0.037

Apêndice 1. Continuação

<i>Locus/ Alelos</i>	População				Total
	Alegrete	Catimbau	Caverá	Rosário	
Hai 6					
3	0.000	0.000	0.000	0.167	0.037
4	0.024	0.000	0.024	0.400	0.104
5	0.000	0.050	0.357	0.000	0.119
6	0.024	0.000	0.167	0.000	0.060
7	0.262	0.350	0.214	0.100	0.224
8	0.048	0.150	0.024	0.000	0.045
9	0.000	0.000	0.048	0.000	0.015
10	0.024	0.000	0.119	0.000	0.045
11	0.000	0.000	0.024	0.000	0.007
12	0.000	0.300	0.000	0.067	0.060
Hai9					
1	0.200	0.000	0.000	0.033	0.068
2	0.050	0.050	0.024	0.000	0.030
3	0.350	0.000	0.190	0.133	0.197
4	0.375	0.850	0.738	0.800	0.659
5	0.025	0.100	0.024	0.000	0.030
6	0.000	0.000	0.024	0.000	0.008
7	0.000	0.000	0.000	0.033	0.008
Hai10					
1	0.313	0.944	0.853	0.643	0.617
2	0.229	0.000	0.088	0.000	0.109
3	0.104	0.056	0.029	0.000	0.055
4	0.104	0.000	0.000	0.179	0.078
5	0.229	0.000	0.000	0.071	0.102
6	0.021	0.000	0.029	0.000	0.016
7	0.000	0.000	0.000	0.107	0.023
Soc1					
1	0.045	0.000	0.000	0.000	0.015
2	0.000	0.000	0.225	0.133	0.098
3	0.000	0.000	0.000	0.033	0.008
4	0.023	0.000	0.625	0.000	0.197
5	0.136	0.333	0.000	0.100	0.114
6	0.318	0.000	0.050	0.533	0.242
7	0.068	0.000	0.000	0.167	0.061
8	0.409	0.667	0.100	0.033	0.265
Soc2					
1	0.000	0.000	0.150	0.000	0.043
2	0.000	0.000	0.050	0.000	0.014
3	0.875	0.850	0.700	0.933	0.833
4	0.000	0.000	0.000	0.033	0.007
5	0.063	0.000	0.050	0.033	0.043
6	0.063	0.150	0.000	0.000	0.043
7	0.000	0.000	0.050	0.000	0.014

5. CONCLUSÕES

1. A partir da análise filogenética *Ctenomys* sp. foi considerado como uma variação intra-específica de *C. torquatus*, dada a ausência de monofilia, condição essencial para caracterizar uma unidade evolutiva independente. Dessa forma, sugere-se que seja tratada como uma população polimórfica (Alegrete) de *C. torquatus*.
2. A forma cariotípica $2n = 40$ foi restrita a população de Alegrete. Distante dessa localidade, a 15 quilômetros em linha reta (na direção Alegrete-Rosário do Sul) foi verificado $2n = 42$, um potencial híbrido entre as formas $2n = 40$ e $2n = 44$.
3. As populações amostradas entre Alegrete e Rosário do Sul compreenderam variações intra-específicas de *C. torquatus*, sendo considerada uma espécie cromossomicamente politípica.
4. A coloração da pelagem marrom com manchas brancas na região posterior, inicialmente registrada na população de Alegrete, foi também verificada na população de Catimbau, cujo número diplóide é $2n=42$. Também foi registrada a coloração escura (e melânica) entre populações de Caverá e Rosário. Uma vez que tais padrões apresentarem alta frequência, considera-se que as colorações da pelagem não estão fixadas localmente.

5. A estrutura populacional mostrou ser alta a partir dos loci de microssatélites, indicando baixo fluxo gênico entre elas. Entretanto, quando avaliada a partir dos haplótipos mitocondriais, apresentou-se baixa, sugerindo assim maior conectividade histórica entre as populações.
6. O teste de Mantel mostrou uma correlação significativa entre as matrizes de distancia genética e geográfica apenas para os microssatélites, indicando um incipiente padrão de isolamento por distância.
7. As reconstruções filogenéticas, através dos diferentes métodos (parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana) evidenciaram relações pouco profundas entre os haplótipos e alto grau de polifilia entre as populações.
8. As análises de *Network* demonstraram haplótipos altamente compartilhados, e a topologia não indicou expansão populacional recente.
9. Frente à ausência de monofilia na genealogia dos alelos, nenhuma população ou grupo cariotípico foi considerado uma unidade evolutiva independente.
10. A partir dos resultados, percebeu-se que a população de Alegrete apresentou características diferenciadas das demais, como riqueza alélica e diversidade haplotípica, a despeito da ausência de monofilia. Dessa forma, propomos que seja tratada com uma Unidade de Manejo.

6. ANEXOS

Anexo 1. Normas para publicação do periódico *Genetica - International Journal of Genetics and Evolution*.

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of *Genetica* the option of using our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible (no postal delays!), we encourage authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://gene.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for *Genetica* offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Electronic figures

You should supply the electronic versions of your figures. We prefer figures in TIFF, EPS, PS, PDF and Microsoft® Office format. Be aware that we may not be able to use other file formats and that the hard copy may be scanned instead. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica. Figures should be saved in separate files. The figure legends should be included in the text file.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

Manuscript Presentation

The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. British English (American English) spelling and terminology should be used consistently throughout the article. Manuscripts should be printed or typewritten on A4 or US Letter bond paper, one side only, leaving adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense. Number the pages consecutively with the first page containing:

Title page

The title page should list in order: the title of the manuscript; the authors names and their institutional affiliations with concise addresses; the name, address, telephone and fax numbers, and E-mail address.

Abstract

The abstract should consist of a single paragraph of approximately 200 words which summarizes the subject. References should not be cited in the abstract.

Key words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations and their explanations should be collected in a list.

Text

Four levels of headings should be used in the text. The first level should be bold-faced, freestanding and positioned flush to the left margin. This heading level should be reserved for blocks or text that constitute a major fraction of the article (e.g. **Materials and methods**). The second level of headings should be italics, freestanding, flush left. This heading level is used to group two or more closely related third-level heads in long-papers. The third level heading is the most frequently used subhead. It is italics, flush left with no white line underneath and is used to initiate the first paragraph of a sub-topic. The fourth level heading is paragraph-initiating italic followed by a colon. Desired location of tables and figures should be indicated in the margins. Text citations with three or fewer authors should include all names while those with four or more authors should cite the first author and et al. Only articles that are published or in press should be cited. Citations of personal communications or unpublished results should list all names and initials. Numbers of ten or less should be written in full unless part of a date, a fraction or decimal, a percent or a unit of measurement.

Taxonomic names

Taxonomic names of genera and lower taxa should be italicized. Authors are requested to mention the authorities of any taxa named in the articles.

Appendices

This section should be reserved for large bodies of data of mathematical derivations that would disrupt the main text.

Cross-Referencing

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples:

Winograd (1986, p. 204)

(Winograd, 1986a, b)

(Winograd, 1986; Flores et al., 1988)

(Bullen, Beauchamp & Bennett, 1990)

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

2. Inclusion of issue number (optional):

Saunders DS (1976) The biological clock of insects. *Sci Am* 234(2):114–121

3. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

4. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

5. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York

6. Book, authored:

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

7. Book, edited:

Smith J, Brown B (eds) (2001) *The demise of modern genomics*. Blackwell, London

8. Chapter in a book in a series without volume titles:

Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) *Handbook of environmental chemistry*, vol 2E. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

9. Chapter in a book in a series with volume title:

Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) *Neuromuscular junction*. *Handbook of experimental pharmacology*, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

10. Proceedings as a book (in a series and subseries):

Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) *PRICAI'96: topics in artificial intelligence*. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. *Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence)*, vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

11. Proceedings with an editor (without a publisher):

Aaron M (1999) *The future of genomics*. In: Williams H (ed) *Proceedings of the genomic researchers*, Boston, 1999

12. Proceedings without an editor (without a publisher):

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: *Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms*, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Paper presented at a conference:
Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

14. Patent:
Name and date of patent are optional Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

15. Dissertation:
Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

16. Institutional author (book):
International Anatomical Nomenclature Committee (1966) *Nomina anatomica. Excerpta Medica*, Amsterdam

17. Non-English publication cited in an English publication:
Wolf GH, Lehman P-F (1976) *Atlas der Anatomie*, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

18. Non-Latin alphabet publication:
The English translation is optional. Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) *Nadmolekulyarnaya struktura polimerov* (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

19. Published and In press articles with or without DOI:

19.1 In press
Wilson M et al (2006) References. In: Wilson M (ed) *Style manual*. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)

19.2. Article by DOI (with page numbers)
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

19.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

19.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s801090000086

20. Internet publication/Online document
Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999

20.1. Online database
Healthwise Knowledgebase (1998) *US Pharmacopeia*, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited

21 Sept 1998 Supplementary material/private homepage Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000 University site
Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999
FTP site Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999
Organization site ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labeled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail). Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours. Please do not make any changes to the PDF file. Minor corrections (10) should be sent as an e-mail attachment to: proofscorrection@springer.com. Always quote the four-letter journal code and article number and the DO No. from your proof in the subject field of your e-mail. Extensive corrections must be clearly marked on a printout of the PDF file and should be sent by first-class mail (airmail overseas).

Offprints

50 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions except for colour pages. Up to two (2) colour pages (irrespective of the number of individual figures on them) will be published free of charge if the Editor and Referees consider this essential. Additional colour pages will be charged accordingly.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Anexo 2. Sequências de *C. torquatus* depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Sequências nucleotídicas (disponibilizadas em 21 de fevereiro, 2007)

EF372280	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H1IBI320 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372281	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H1CAV940 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372282	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H2IBI401 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372283	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H3IBI413 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372284	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H3ROS934 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372285	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H3QUA914 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372286	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H4IBI917 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372287	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H4QUA913 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372288	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H4CAT964 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372289	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H5IBI963 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
EF372290	<i>Ctenomys torquatus</i> voucher H6FRO958 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial
