

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Genética

ANÁLISE DE PARENTESCO EM TRÊS SUBPOPULAÇÕES
DE *CTENOMYS LAMI* (RODENTIA-CTENOMYIDAE) ATRAVÉS
DE MARCADORES DE MICROSSATÉLITES

EUNICE M. MATTE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

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

Porto Alegre, Fevereiro de 2006.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

I – RESUMO.....	05
II – SUMMARY.....	07
III – INTRODUÇÃO	09
I.1. Considerações Gerais	09
I.2. A Ordem Rodentia	11
I.3. O Gênero <i>Ctenomys</i>	12
I.4. A Espécie <i>Ctenomys lami</i>	14
I.5. Área de Estudo: Região de Itapuã	18
I.6. Estrutura de Parentesco em Espécies de Comportamento Solitário de <i>Ctenomys</i>	22
I.7. Estudos com Microsatélites	23
I.8. Estudo de Análise de Paternidade e de Parentesco	25
IV – OBJETIVOS	28
V – ARTIGO.....	29
Resumo.....	30
V.1.Introdução.....	31
V.2.Material e Métodos	33
V.2.1. Área de estudo	33

V.2.2. Extração de DNA e amplificação por PCR	33
V.2.3. Estrutura Genética	34
V.3. Resultados	36
V.4. Discussão.....	41
V.5. Referências	44
V.6 Anexos	48
Figura 01	58
Tabela 01	49
Tabela 02	50
Tabela 03	51
Tabela 04	52
Tabela 05	53
VI – DISCUSSÃO	55
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
VIII – ANEXOS	73
Tabela 06	73
Tabela 07	74
Tabela 08	75
Tabela 09	77

I - RESUMO

Ctenomys lami é um roedor fossorial endêmico de uma região da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil, conhecida como Coxilha das Lombas. Pouco se sabe, ainda, sobre a ecologia, comportamento e genética dessa espécie que foi descrita por Freitas (2001), considerando que esses conhecimentos são fundamentais no entendimento dos intrincados padrões evolutivos da mesma e principalmente do gênero do qual faz parte, tendo em vista que é um dos com maior diversidade de espécies entre os mamíferos. Além da importância na resolução de questões evolutivas, conhecimentos gerais sobre a espécie são necessários para o desenvolvimento de planos de conservação e preservação.

Este trabalho teve como objetivo identificar relações genéticas dentro e entre três possíveis subpopulações de *C. lami* através da análise do fluxo gênico (F_{st} , F_{is} , ρ_{st} , Nm), de informações gerais como PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica), média de alelos por *locus*, heterozigosidade, deficiência de heterozigotos e das relações de paternidade e parentesco. Para isso foram utilizados 89 indivíduos da população (subpopulação A: n=19; B: n=37; C: n=33) de uma área localizada na região de Itapuã, mais exatamente na borda leste da Lagoa Negra (S 30°21'35,6"/WO 51°00'32,9"), município de Viamão, RS. Para executar a análise genética foram utilizados marcadores de microssatélites descritos para espécies cogenéricas - *Soc1*, *Soc2*, *Soc3*, *Soc4*, *Soc5*, *Soc6*, *Soc7* e *Soc 8* desenvolvidas a partir de *C. sociabilis* e *Hai2*, *Hai3*, *Hai4*, *Hai5* e *Hai12* de *C. haigi* por Lacey (1999; 2001).

Os resultados identificam que há um grande fluxo gênico, demonstrando assim, que não há uma subdivisão significativa entre as subpopulações sugeridas, mas também demonstram que parece haver uma estruturação incipiente, onde a distância e a baixa mobilidade dos indivíduos têm papel fundamental. A verificação da estrutura populacional através da análise de paternidade e parentesco indicou que a baixa variabilidade dos *loci* estudados impede uma definição real de paternidade e não oferecem dados suficientes para definir estruturação e comportamento dessa espécie. Sugere-se que essa baixa variabilidade seja resultado de um Efeito Fundador ocorrido recentemente na população.

II - SUMMARY

Ctenomys lami was recently described by Freitas (2001) as a fossorial rodent, living only in Coxilha das Lombas, a region of the Coastal Plain of Rio Grande do Sul. The ecology, behavior and genetics of this species are not well known, although such knowledge is essential for understanding the intricate evolution patterns of this species as well as of the genus, which is one with the highest diversity among the mammals. Besides the importance of clarifying the evolution questions, general knowledge about this species is needed for developing conservation strategies.

This work has the goal of identifying genetic relationships within and between three possible subpopulations of *C. lami* through the analysis of (i) genetic flow (F_{st} , F_{is} , ρ_{st} , Nm), (ii) general information like PIC (Polymorphic Information Content), allele mean per *locus*, heterozygosity, heterozygote deficiency and (iii) relatedness among individuals. Eighty-nine individuals from a population (subpopulation A: n=19; B: n=37; C: n=33) were analyzed in the area located in the region known as Itapuã, at the east banks of Lagoa Negra (S 30°21'35,6"/WO 51°00'32,9"), in Viamão, RS. To execute the genetic analysis, we used microsatellite markers described to cogeneric species (*Hai2*, *Hai3*, *Hai4*, *Hai5* e *Hai12*, developed from *C. haigi*; and *Soc1*, *Soc2*, *Soc3*, *Soc4*, *Soc5*, *Soc6*, *Soc7* e *Soc 8*, from *C. sociabilis*) by Lacey (1999; 2001).

Results showed that there is high gene flow, and thus the three suggested sub-populations are not significantly divided. However, the population is not structured and the distance and low motility of individuals play an important role in this situation. When verifying the population structure through relatedness

analysis, we found that the low variability of the studied *loci* does not allow a correct definition of paternity, and does not provide enough data to define structure and behavior of this species. We thus suggest that this low variability is an effect of a recent founder effect in this population.

III – INTRODUÇÃO

I.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Espécies fossoriais são encontradas em diferentes famílias da classe Mammalia, assim entre os mamíferos existem quatro ordens com espécies de hábito fossorial: Xenarthra, Marsupialia, Insectivora e Rodentia. Dentre essas, percebe-se que ocorreram adaptações a esse modo de vida tais como corpo fusiforme com redução das orelhas, olhos e cauda, modificações nas patas e nos incisivos para escavação e o desenvolvimento de um comportamento especializado (Ellerman 1956; Nevo 1979; Pearson 1984; Reichman & Smith 1990).

Esses animais vivem a maior parte de sua vida dentro de túneis que constroem, só saindo ocasionalmente (Nevo 1979). Por essas características, os mamíferos fossoriais acabam tendo forma e tamanho semelhantes em diferentes regiões zoogeográficas (Pearson 1959; Nevo 1979; Eisenberg 1981).

Três fatores geoclimáticos foram importantes para o desenvolvimento do hábito fossorial: as formações montanhosas, as regressões marinhas associados a mudanças climáticas ocorridas durante o Cenozóico (Webb 1977). Considera-se que períodos secos causaram a transformação das áreas de florestas, que teria regredido e dado espaço a formações como savanas, desertos, estepes e campos. Neste período ocorreu a evolução e expansão da fauna de herbívoros tanto cursoriais como fossoriais (Nevo 1979).

Na região Neotropical, os fossoriais estão representados pelos gêneros de roedores *Spalacopus*, *Aconaemys* da família Octodontidae e *Ctenomys* da família Ctenomyidae que ocorrem preferencialmente em formações abertas (Andersen 1987). As outras regiões em que roedores fossoriais ocorrem são a Paleártica, Neártica, Etiópica e Oriental (Nevo 1979).

Esses roedores vivem em túneis construídos por um animal ou por uma comunidade. Os túneis apresentam um número variável de saídas, as quais sempre são mantidas com um tampão de areia bloqueando a entrada para proteção e manutenção das condições climáticas internas. A forma de escavação é similar entre os roedores fossoriais (Andersen 1988). Diferentes autores (Altuna 1983; Andersen 1988; Cameron *et al.* 1988) verificaram que não há uma relação entre densidade de vegetação e a direção na escavação dos túneis.

Quanto à estrutura das populações, esses roedores têm a tendência a serem solitários, sendo que cada adulto mantém seu próprio sistema de túneis (Lacey 2000). Mais especificamente, entre os octodontóides, o gênero *Spalacopus* é social, já em *Ctenomys* a maioria vive isoladamente, havendo somente a descrição de uma espécie colonial. E embora a maioria apresente hábito solitário, pode haver a formação de casais durante a fase de acasalamento e um comportamento social em relação à prole, quando ainda há a necessidade de cuidado parental (Pearson *et al.* 1968; Pearson & Christie 1987; Bretschneider 1987).

Em relação à manutenção da variabilidade, sugere-se que o nível de polimorfismo gênico seja explicado pela estrutura de cruzamento e pelo tamanho efetivo da população. Desse modo, as populações grandes e amplamente

distribuídas teriam maior variabilidade que as pequenas, já que estas últimas estariam mais isoladas entre si (Lacey 2001; Lacey & Wieczorek 2004). Em contrapartida, Nevo (1979; 1982; 1986) e Heth & Nevo (1981) sugerem que o ambiente heterogêneo seria o sustentador da variação gênica. Assim as espécies generalistas seriam as mais polimórficas, enquanto que as especialistas possuiriam menor variabilidade. Dessa forma, os roedores fossoriais, por serem especialistas, possuiriam menor variabilidade genética. Comparando com os roedores de superfície, os fossoriais realmente possuem baixa diversidade genética (Nevo 1979).

I.2. A ORDEM RODENTIA

A ordem Rodentia, pertencente aos Euarchontoglires, um dos quatro clados de mamíferos placentários definidos, teria divergido do táxon que originou as ordens Carnivora, Cetartiodactyla, Perissodactyla e Chiroptera há aproximadamente 67,5-102,3MA (considerando um grau de confiança de 95%) e posteriormente teria se separado há 64-73,9 MA do clado do qual evoluíram os primatas (Eizirik *et al.* 2001; Murphy *et al.* 2001).

Na ordem, que possui entre 30 e 33 famílias, um dos problemas mais interessantes em sua sistemática é a relação entre as famílias dentro da subordem Hystricognathi, um grupo monofilético possuidor de um grande número de características derivadas associadas com a mandíbula, origem e inserção dos músculos mastigatórios, membranas fetais, características dentárias, características do ouvido médio e sistema circulatório (Bugge 1971; Woods 1972;

Lockett 1985; Jaeger 1988; Wyss *et al.* 1993). Tradicionalmente as subordens são divididas em dois grupos que teriam se separado há aproximadamente 33 a 39 MA: o grupo do Velho Mundo (Phiomorpha) representado por quatro famílias primariamente ocorrendo na África e o grupo do Novo Mundo (Caviomorpha) consistindo de 12 famílias que são encontradas em sua maioria na América do Sul (Huchon & Douzery 2001; Nedbal *et al.* 1994). O grupo Caviomorpha apareceu subitamente e diversificou-se no início do Oligoceno (há 31 MA) (Wyss *et al.* 1993; Vucetich *et al.* 1999). Dentro deste, o clado Octodontoidea mostra uma origem monofilética, sendo que a família Ctenomyidae está mais proximamente relacionada à Octodontidae (Nedbal *et al.* 1994; Köhler *et al.* 2000).

1.3. O GÊNERO *CTENOMYS*

As primeiras espécies ligadas à origem dos ctenomídeos são descritas na fauna Chasicana, já espécies relacionadas aos atuais *Ctenomys* são encontradas na fauna Huyaqueriana, no final do Mioceno, período em que ocorreu um pico de diversidade. No intervalo Plio-pleistoceno ocorreu a extinção de grande parte dos táxons existentes (82,6% dos gêneros e 50% das subfamílias) e a origem de novas famílias e subfamílias, associada a importantes eventos climáticos e tectônicos que causaram mudanças no ambiente austral, tornando-o mais árido. Ocorreu então, uma segunda radiação que marcou a renovação da fauna de Hystriognatos da América do Sul, com as primeiras ocorrências das típicas famílias e subfamílias conhecidas atualmente da sub-região Patagônica (Vucetich *et al.* 1999; Vucetich & Verzi 1999). Atualmente a

família Ctenomyidae apresenta apenas o gênero *Ctenomys*, com mais de cinquenta espécies, sendo que no mínimo seis outros gêneros foram extintos anteriormente (Cook *et al.* 2000).

Os primeiros representantes do gênero *Ctenomys* são registrados no final do Pleistoceno (Reig & Kiblicky 1969; Vucetich *et al.* 1999) e a radiação estimada para os tuco-tucos fica entre 0.3 e 1.4 MA (Lessa & Cook 1998). A adaptação a um ambiente subterrâneo, com pequenas variações climáticas permitiu a radiação desse gênero, ocupando os mais variados ambientes. A partir de sua origem, no extremo sul da Argentina, dispersaram-se por toda sub-região Patagônica, expandindo-se ao norte e ocupando desde a Terra do Fogo até o sul do Peru (Pearson 1959; Reig *et al.* 1990; Nowak 1991).

Com sua distribuição restrita à região Neotropical e totalizando cerca de 56 espécies nominadas (Nowak 1991; Woods 1993), tem sido considerado um dos gêneros com a mais explosiva radiação dentre os mamíferos (Lessa & Cook 1998; Cook & Lessa 1998).

Características como alta variabilidade cromossômica intra e interespecífica, $2n=10$ a 70 (Reig & Kiblicky 1969; Kiblicky *et al.* 1977; Freitas & Lessa 1984; Ortells *et al.* 1990; Gallardo 1991; Massarini *et al.* 1991; Freitas 1997; 2001; Slamovits *et al.* 2001), estruturação em demes, baixa mobilidade, territorialidade e alta individualidade têm sido descritas, sugerindo a importância da evolução cromossômica associada à deriva genética no modelo de especiação desse gênero (Reig & Kiblicky 1969), bem como presença de ampliações e deleções de DNA satélite podem ser consideradas fundamentais para a ocorrência deste modelo de especiação (Gallardo 1999; Slamovits *et al.* 2001).

Distribuem-se em uma ampla variação de latitude e altitude, desde o nível do mar até 4.000 m nas regiões andinas (Reig *et al.* 1990). No Estado do Rio Grande do Sul ocorrem quatro espécies de *Ctenomys*: *C. flamarioni*, *C. minutus*, *C. torquatus* e *C. lami* (Freitas 1990; 1995; 1997; Freitas & Lessa 1984).

Possuem um tamanho pequeno, raramente ultrapassando 250 mm de comprimento de corpo, cauda de 60 a 110 mm, massa variando de 100 g a 700 g nas diferentes espécies (Nowak 1991).

1.4. A ESPÉCIE *CTENOMYS LAMI*

Antes da descrição feita por Freitas (2001), a espécie era considerada como parte integrante de *C. minutus* (Reig & Kiblicky 1969). Freitas (1994; 1995; 1997) sugere que essa população em questão fosse representante de um táxon à parte e, finalmente, em Freitas (2001) foi definida como uma nova espécie pelos resultados de análises citogenéticas e características morfológicas.

A espécie *Ctenomys lami* (Fig. 1) possui uma alta diversidade cariotípica ($2n=54, 55a, 55b, 56a, 56b, 57$ e 58) e é endêmica de uma região restrita, conhecida como Coxilha das Lombas no Rio Grande do Sul (Fig. 3 e Fig. 4). É morfológicamente similar a *C. minutus* que se deduz ser uma espécie derivada de *C. lami* por um processo de especiação baseado em rearranjos cromossômicos (Freitas 2001; *no prelo*).

A variação cariotípica dessa espécie se deve a rearranjos tais como fusões cêntricas e inversões pericêntricas (Freitas *no prelo*). Essa diversidade foi dividida em quatro blocos populacionais (A, B, C e D), sendo que o bloco A possui os

cariótipos $2n= 54$, $55a$ e $56a$; o bloco B com $2n= 57$ e 58 ; C com $2n= 54$ e $55a$; e D com $2n= 55b$ e $56b$ (Freitas 1990). A variação foi estudada por Fornel (2005) através de morfometria de crânio e os resultados corroboraram a presença dos diferentes blocos populacionais, com formas específicas para cada um deles, sugerindo haver uma associação entre variação cromossômica e variação morfológica.

Moreira *et al.* (1991), utilizando amostras analisadas por Freitas (1990), estudou polimorfismos protéicos (*20 loci*) em 87 indivíduos distribuídos em 10 populações ao longo da Coxilha das Lombas. Um total de 40 alelos foi descrito, sendo quase 50% destes compartilhados por animais de todas as populações e, somente três alelos população-específicos. Uma homogeneidade relativa entre as populações foi observada, demonstrada pelo fato de que normalmente o mesmo alelo é fixado ou predominante em todas as populações, em 80% dos *loci* analisados. O número de alelos por *locus* observado foi de 1,15 a 1,75 com uma proporção de *loci* polimórficos de 0,15 a 0,5 e heterozigidade observada variando de 12 a 20%. Ao analisar os Coeficientes de Similaridade Genética em blocos definidos a partir da variação nas freqüências dos cariótipos (Blocos A, B, C e D), os autores descrevem valores em uma faixa de 0,68 a 0,90 entre as populações par a par, com uma divisão das populações em dois grupos. Um dos grupos possui populações dos Blocos A e B e o outro, populações dos Blocos C e D, com Coeficiente de Similaridade médio intra-grupos 0,83 e 0,85, respectivamente maiores que o Coeficiente médio inter-grupos (0,73). Por outro lado, uma correlação negativa significativa foi observada entre os Coeficientes de

Similaridade Genética e Distância Geográfica, indicando fluxo gênico e isolamento pela distância entre as populações analisadas.

El Jundi & Freitas (2004) estudaram a variabilidade genética de três possíveis subpopulações (A, B e C – localizadas dentro do bloco A) de *C. lami* na região próxima ao Parque Estadual de Itapuã (Fig. 4) através de marcadores moleculares de microssatélites. Identificaram, pela análise de diferenciação entre as populações par a par, valores de F_{st} de 0,0007; 0,0463 e 0,0589 (entre AxB, BxC e AxC, respectivamente) e consideraram como partes de uma única população. A análise da distribuição das frequências dos diferentes alelos indicou a existência de um recente efeito Gargalo de Garrafa nessa população. Por outro lado, o pequeno número de alelos observados e a baixa mobilidade nessa espécie, associados a eventos de extinção e recolonização, poderiam indicar a possibilidade de um Efeito Fundador ser o responsável por esta baixa variabilidade. Pelo fato de não terem sido encontrados adultos compartilhando o mesmo sistema de túneis e por haver dimorfismo sexual El Jundi (2003) sugeriu que seja uma espécie solitária como *C. flamarioni* (Fernández 2002) e *C. haigi* (Lacey *et al.* 1998), por exemplo.



Figura 1: Exemplar de *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae).

I.5. ÁREA DE ESTUDO: REGIÃO DE ITAPUÃ

A área de ocorrência da espécie *C. lami* é conhecida como Coxilha das Lombas e faz parte da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Fig. 2), mais especificamente situada a nordeste do Lago Guaíba e estendendo-se até a margem da Lagoa do Barros, por uma faixa de aproximadamente 78 km. Essa região tem como limite noroeste o Banhado dos Pachecos e, ao sudeste, o Banhado dos Touros. A formação dessa área está relacionada à formação de toda a costa do Rio Grande do Sul, constituída pela sucessão de eventos de transgressão e regressão marinha e de depósitos eólicos. Após a transgressão do Mioceno, seguiram-se outros eventos semelhantes que originaram o sistema de barreiras que deu origem à formação atual (Villwock 1989). Durante a regressão no final do Plioceno, formou-se uma área de depósitos clásticos, atravessado por um sistema de canais em direção ao mar. Após o primeiro ciclo de transgressão-regressão durante o Pleistoceno Inferior formou-se a Barreira das Lombas que isolou o sistema de Lagunas Guaíba-Gravataí (Villwock 1989).

A barreira é descrita como um conjunto de colinas convexas formadas por areias quartzosas, com quantidades variáveis de silte e argila, com uma cor predominantemente avermelhada e castanho-amarelada. As alturas variam de 20 a 158 metros, possuindo uma extensão de 78 km e largura de 12 km (Arienti, 1986) (Fig. 3). Essa região caracteriza-se por apresentar pastagens e vegetação antrópica que ocorre em solos arenosos (Fig. 4).



Fig. 2: Mapa do Rio Grande do Sul com a localização da região focada no estudo.



Fig. 3: Desenho da Coxilha das Lombas e distribuição de *C. lami* (Figura adaptada do Atlas ambiental de Porto Alegre).

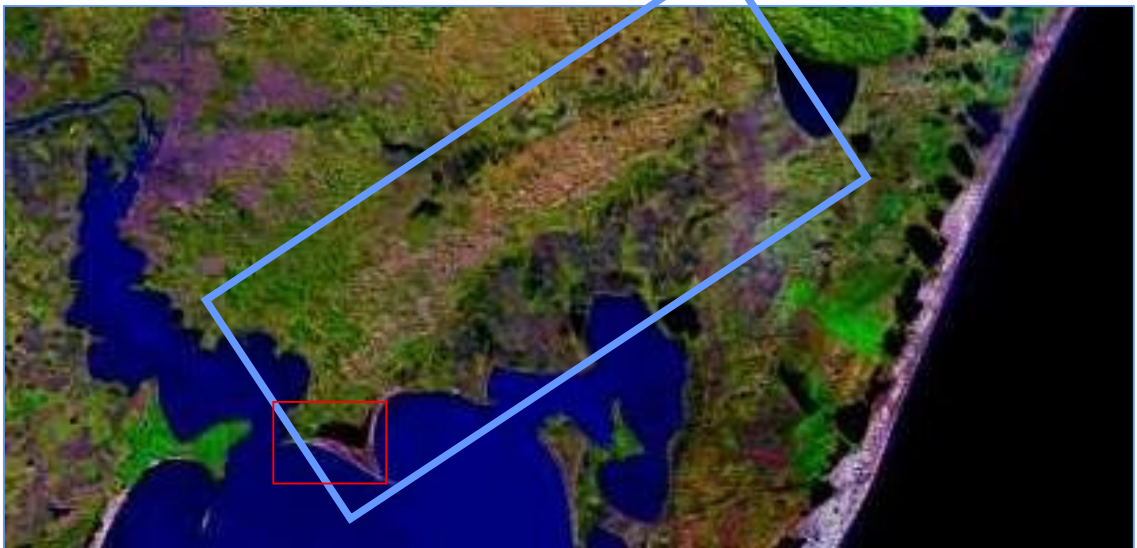


Fig. 4: Mapa da Coxilha das Lombas (em azul) e da região de Itapua (em vermelho). Adaptação do site Google Earth (<http://earth.google.com/>).

Na extremidade sul da Coxilha das Lombas, localiza-se o Parque Estadual de Itapua no Município de Viamão, a 57 km de Porto Alegre (Fig. 4), sendo uma área que protege a última amostra dos ecossistemas originais da Região Metropolitana de Porto Alegre, com campos, dunas, lagoas, ilhas, praias e morros, às margens do Lago Guaíba e da Laguna dos Patos. Nas suas formações vegetais, características dos morros graníticos, ocorrem mais de 300 espécies, destacando-se a figueira, a corticeira-do-banhado, o jerivá, o butiazeiro, além de orquídeas, cactos e bromélias. Abriga várias espécies animais, como o bugio-ruivo (*Alouatta guariba*), os graxains do campo e do mato (*Pseudalopex gymnocercus* e *Cerdocyon thous*, respectivamente), a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), a lontra (*Lontra longicaudis*), o tuco-tuco e o jacaré-do-papo-

amarelo (*Caiman latirostis*). A Lagoa Negra, com 1.750 ha, é importante ponto de parada de aves migratórias e refúgio para 200 outras espécies.

Ao lado do Parque Estadual de Itapuã localiza-se o Hospital de Itapuã, que tem contato com a Lagoa Negra e é a região em torno dela que será utilizada para o objetivo deste estudo, sendo que as três populações de tuco-tucos analisadas estão localizadas no terreno do Hospital (Fig. 5).



Fig. 5: Mapa da região de Itapuã, Viamão, RS, Brasil e localização da área de coleta das amostras de *C. lami*.
Adaptação do site Google Earth (<http://earth.google.com/>).

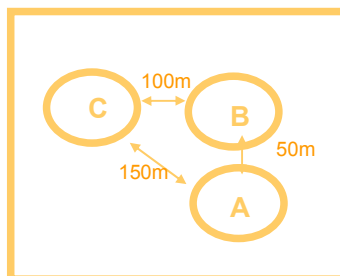


Fig. 6: Ampliação da área marcada na Figura 5 (região de Itapuã, Viamão, RS), com a distribuição e distância das possíveis três subpopulações de *C. lami*.

I.6. - ESTRUTURA DE PARENTESCO EM ESPÉCIES DE COMPORTAMENTO SOLITÁRIO DE *CTENOMYS*

Estudos de populações como em *C. talarum* (Cutrera *et al.* 2005) indicam a existência de estruturação social de indivíduos aparentados em espécies solitárias. No caso de *C. talarum* não há evidências de que existam interações sociais entre indivíduos adultos fora do período reprodutivo (Zenuto *et al.* 2002) e por isso a distribuição de indivíduos relacionados não deveria ser influenciada por seleção de parentesco ou outros benefícios adaptativos que requerem uma restrita proximidade espacial entre parentes. No entanto, a estrutura familiar provavelmente surge devido à consistente distribuição de distâncias de dispersão individuais em torno de uma média população-específica (Cutrera *et al.* 2005). Nesse estudo, distâncias entre parentes próximos foram consistentes com a distribuição de Poisson. Assumindo que essas distâncias refletem padrões de dispersão natal, parece que a distribuição de indivíduos estritamente relacionados pode seguir uma distribuição estatística e, portanto, criar um relacionamento previsível entre distâncias e parentesco. Outro estudo com essa mesma espécie (Zenuto *et al.* 1999) indica a existência de poliginia, característica identificada na maioria das espécies do gênero (Lacey *et al.* 2000) e normalmente baseada tanto na distribuição espacial, quanto na proporção sexual em adultos (Reig *et al.* 1990). Como já comentado, sugere-se que *C. lami* seja uma espécie solitária e também poligínica (Freitas 2001; El Jundi & Freitas 2004). Quando analisado o equilíbrio de Hardy-Weinberg em *C. lami* (El Jundi & Freitas 2004) não foi demonstrado um decréscimo no número de heterozigotos observados, o que

pode ser esperado no caso de endocruzamento, poliginia e/ou estruturação (Dobson 1998; Zenuto *et al.* 1999).

I.7. ESTUDOS COM MARCADORES DE MICROSSATÉLITES

Marcadores moleculares são utilizados nos estudos de genética de populações e filogeografia comparada. Dentre as diversas ferramentas utilizadas atualmente, pode-se destacar os microssatélites.

Microssatélites são definidos como seqüências moderadamente repetitivas dispersas pelo genoma dos eucariotos, formadas por repetições em tandem, de 1 a 6 pares de bases. Formam conjuntos de cinco a centenas de repetições por *locus*, podendo variar em tamanho e possuindo um caráter altamente polimórfico (Tautz 1993). Por não serem seqüências codificantes e não estando, aparentemente, expostas aos mecanismos de seleção natural, sua variabilidade é mantida. As variações podem ser causadas, principalmente, por um alinhamento incorreto das fitas do DNA e/ou recombinação (Tautz 1993; Comings 1998; Li *et al.* 2002).

Os microssatélites têm se mostrado bons marcadores por sua grande quantidade e distribuição no genoma, associada à alta variabilidade, torna-os capazes de gerar uma maior definição e resolução, permitindo seu uso em análise de estrutura populacional, estrutura genética, estimativa de fluxo gênico, padrões de dispersão e relações de parentesco nas mais variadas espécies (Exs.: coalas – Fowler, *et al.* 1998; peixes – Avise 2002; Ostracoda – Finston 2002; cavalos – Cunningham *et al.* 2001; cães – Koskinen 2003; sagüis – Nievergelt *et al.* 2000;

cervos - Sorin 2004; vison – Yamaguchi *et al.* 2004; e diferentes roedores – Baker *et al.* 1999; Moro & Spencer 2003; Bishop *et al.* 2004).

Por outro lado, as análises devem ser cuidadosas no momento da utilização destes marcadores, principalmente ao considerar a possibilidade de estabilização ou mesmo deleção de grandes partes do mesmo, causados por eventos mutacionais de inserções/deleções que interrompem as repetições (Taylor *et al.* 1999). Junto a isso, estudos têm demonstrado a associação entre o grau de repetição de mini e microsatélites e desordens diversas (Comings 1998), abrindo a possibilidade de que semelhanças em tamanho não ocorram em função de fluxo gênico ou homogeneidade entre populações, mas sim em função das limitações das variações de alelos existentes.

Entre os trabalhos feitos em *Ctenomys* utilizando marcadores do tipo microsatélites pode ser citado o estudo de Lacey (2001), que determinou e analisou 13 *loci* de microsatélites para duas espécies, inicialmente para *C. haigi* e depois para *C. sociabilis*, relatando maior variabilidade em *C. haigi*. Tal fato é atribuído tanto a fatores comportamentais, já que *C. sociabilis* é social e *C. haigi* é solitário, quanto a fatores históricos de ocorrência de gargalos de garrafa nas populações; em Tchaicka (2002) foram utilizados seis *loci* de microsatélites na determinação da estrutura genética de populações de *C. minutus* e do fluxo gênico entre elas em uma região com duas possíveis barreiras geográficas; Fernández (2002) no qual foi analisada a variabilidade genética e a estrutura populacional em três populações de *C. flamarioni*; em El Jundi (2003) foi feita a análise de variabilidade em *C. lami* a partir dos marcadores de microsatélites *Hai*, no qual foram definidos os *loci* polimórficos na espécie e analisada a

estrutura populacional; em Castilho (2004) foi feita uma análise em uma zona de hibridação intra-específica de *C. minutus*; e em Gava & Freitas (2002; 2003; 2004) microssatélites foram utilizados para inferir relacionamentos genéticos entre populações cromossomicamente divergentes de *C. minutus* e também entre esta espécie e *C. lami*.

I.8. ANÁLISE DE PATERNIDADE E DE PARENTESCO

As técnicas de análise de paternidade ainda encontram muitas dificuldades como amostras incompletas (desconhecimento de ambos os pais ou a falta de indivíduos da prole); presença de indivíduos relacionados ao trio prole-pai-mãe na lista de candidatos a genitores, desconsiderando o pai e mãe verdadeiros, o que pode resultar numa redução na confiança do teste; ou ainda pouco conhecimento sobre comportamento da espécie a ser estudada. Por isso, diferentes métodos foram criados para reduzir os danos da falta de informações no processo de análise de paternidade e de parentesco. Entre os mais usados e com melhores resultados estão as probabilidades categórica e fracional, a reconstrução genotípica e a técnica de exclusão (Jamieson & Taylor 1997; Neff *et al.* 2000; García *et al.* 2002; Fiumera *et al.* 2002; Jones *et al.* 2003).

O método de probabilidade categórica para a paternidade atribui fracionalmente a paternidade a todos indivíduos não excluídos da análise, baseado em sua probabilidade relativa de paternidade. Esse enfoque permite que padrões de paternidade ao nível populacional sejam acessados. (Smouse & Meagher 1994; Marshall *et al.* 1998). Comparando a probabilidade categórica com

a fracional, Smouse & Meagher (1994) concluíram que a segunda é superior porque utiliza todos os dados avaliados, diferente da primeira. No entanto, ele pode subestimar sistematicamente a variação no sucesso reprodutivo dos machos (Smouse & Meagher 1994). Dentro das possibilidades a técnica de exclusão se mostra ser a melhor para sua finalidade, pois os indivíduos são avaliados par a par, sendo excluídos da lista de possíveis genitores aqueles não apresentam ao menos um alelo em comum para cada *locus* em relação à prole testada. Dentre os possíveis genitores, são testadas as probabilidades de cada um em relação à prole, e então, definidos os indivíduos com maior chance de serem os pais verdadeiros (Marshall *et al.* 1998).

Diferentes marcadores moleculares (RFLPs, RAPD, minissatélites e microssatélites) podem ser usados para providenciar informações de interesse para definição de questões de parentesco (Thomas *et al.* 2000). A habilidade de estimar relacionamentos genéticos entre dois indivíduos de uma linhagem desconhecida em uma população natural deve ser usada em duas áreas de conhecimento, entre outras: o estudo da evolução do comportamento social, que freqüentemente depende criticamente do conhecimento da relação genética entre indivíduos (Queller & Goodnight 1989) e o controle de programas de reprodução em cativeiro para espécies ameaçadas através da minimização de endocruzamentos, que se mostram freqüentes quando dados sobre as linhagens são inexistentes (Haig *et al.* 1990; Hedrick & Miller 1992). Na análise de parentesco é necessário que haja um razoável número de *loci* altamente polimórficos, ou muitos *loci* quando a variabilidade não se mostra tão grande, sempre considerando *loci* não ligados. A precisão da relação entre indivíduos em

diferentes categorias também pode depender da frequência alélica dos *loci* utilizados (Chakraborty & Jin 1993; Blouin *et al.* 1996). Assim, é possível que quase todas as relações de parentesco sejam definidas.

IV - OBJETIVOS

A Planície Costeira do Sul do Brasil é um laboratório natural (Villwock 1989) e, certamente, todas as variações anteriormente descritas na espécie *C. lami* estão associadas às modificações que aconteceram na história desta região, principalmente na Coxilha das Lombas.

O objetivo deste estudo é aumentar o conhecimento sobre a espécie *C. lami* e também a compreensão sobre padrões ambientais, demográficos, genéticos e, principalmente, sociais envolvidos na extensa diversidade existente na mesma, possibilitando, também a comparação com fenômenos semelhantes observados em outras espécies do gênero. Além disso, destacar a importância da análise da evolução dessa espécie associada à formação da região.

Dentre os objetivos específicos destacam-se:

- 1) Genotipar os indivíduos de três subpopulações para oito marcadores microssatélites *Soc*, definidos como polimórficos para algumas espécies do gênero. Reunindo esses dados com os 5 *loci* já genotipados por El Jundi 2003 (*Hai2*, *Hai3*, *Hai4*, *Hai5* e *Hai12*);
- 2) Analisar a diversidade intra e interpopulacional das três subpopulações;
- 3) Analisar relações de parentesco entre indivíduos das diferentes subpopulações;

V – ARTIGO

Estrutura Genética e Análise de Parentesco em *Ctenomys lami*

(Rodentia, Ctenomyidae)

EM Matte*, TARJ El Jundi* & TRO Freitas*

*Departamento de Genética, CP 15053, Universidade Federal do Rio Grande do

Sul, Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brasil

e-mail para contato: nicematte@gmail.com

2006

Artigo em preparação

Resumo

A variabilidade em treze *loci* de microssatélites foi avaliada em 89 indivíduos de *Ctenomys lami*, uma das espécies conhecidas como tuco-tucos, divididas em três possíveis subpopulações, em uma região restrita e em ambiente contínuo, para analisar a estrutura genética das subpopulações e relações de parentesco. As possíveis subpopulações foram identificadas por processo de captura, marcação e recaptura, para identificar limites geográficos, possíveis migrantes e identificação de prole recente. Cinco dos treze *loci* foram acessados anteriormente através de El Jundi & Freitas (2004). O fato dos valores de F_{st} variarem entre 0.0129 e 0.0666, e de ρ_{st} entre 0.0032 e 0.0810 e o número de migrante por geração ser de 7,75 sugerem uma população única, mas valores de F_{is} 0.094 a 0.178 indicam a possibilidade de essa subestruturação existir, mesmo que incipiente. Apesar de valores de F_{is} e F_{st} maiores em fêmeas não é clara a existência de uma dispersão sexo-dependente. Para análise de paternidade, o PIC encontrado é relativamente baixo (0.358), com média de 2.7 alelos por *locus*, resultando um poder de exclusão do primeiro genitor de 0.66 e 0.89 para o segundo genitor. A permanência média reduzida de polimorfismos nos *loci* estudados mantém a sugestão da ocorrência de um recente Efeito Fundador nessa população.

Introdução

Os primeiros registros do gênero *Ctenomys* são identificados no final do Pleistoceno, sendo que sua origem é reportada para o início do Pleistoceno na Argentina (Reig & Kiblicky 1969; Contreras *et al.* 1987; Vucetich *et al.* 1999; Lacey *et al.* 2000). A adaptação a um ambiente subterrâneo, com pequenas variações climáticas permitiu a radiação desse gênero, ocupando os mais variados ambientes. A partir de sua origem, no extremo sul da Argentina, espalhou-se por toda sub-região Patagônica, expandindo-se ao norte e ocupando desde a Terra do Fogo até o sul do Peru (Pearson 1969; Reig *et al.* 1990; Nowak 1991). Sua distribuição é restrita a região Neotropical compreende mais de 50 espécies identificadas, sendo considerado um dos gêneros com uma das mais explosivas radiações entre os mamíferos (Cook & Lessa 1998; Lessa & Cook 1998).

Ctenomys lami, uma das espécies conhecidas popularmente como tuco-tuco, tem distribuição restrita a uma região localizada na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, conhecida como Coxilha das Lombas, situada ao nordeste do Lago Guaíba e estendendo-se até a margem da Lagoa dos Barros, por uma faixa de aproximadamente 78 km. A descrição da espécie é recente (Freitas 2001), pois era, até então, considerada parte integrante de *C. minutus*. Por esse motivo, estudos publicados sobre sua estrutura demográfica, genética e comportamento ainda são poucos, podendo citar os estudos prévios à definição da espécie (Freitas 1994; 1995; 1997), nos quais foi sugerido que as populações distribuídas pela Coxilha das Lombas seriam representantes de um táxon a parte, além do

estudo que definiu a nova espécie (Freitas 2001) e da pesquisa sobre sua estrutura demográfica e genética (El Jundi & Freitas 2004).

Estudos de análise de parentesco podem ajudar na definição organização social e padrões de comportamento de espécies diversas, sendo usadas diferentes técnicas para esse fim. Dentre elas o uso de RFLPs, minissatélites, RAPDs e microssatélites (Thompson 1975; Ritland 1996; Queller & Goodnight 1989; Thomas 2000) podem fornecer informações de interesse sobre a população, permitindo estimativas de relacionamentos em uma base de pareamento (Thomas 2000).

Neste trabalho são utilizados marcadores de microssatélites para análise de parentesco que são comumente usados nas mais variadas espécies de vertebrados, sendo exemplos *Verasper moseri*, uma espécie de peixe (Romo *et al.* 2006) *Monias benschi*, uma ave subdesértica da família Mesitornithidae (Seddon *et al.* 2005), *Oryctolagus cuniculus*, coelho selvagem Europeu (SurrIDGE *et al.* 1999), *Lemmus sibiricus*, um roedor da família Cricetidae conhecido como lemingue siberiano (Ehrich & Stenseth 2001). Neste caso, os marcadores foram desenvolvidos a partir de espécies co-genéricas de *C. lami*.

O objetivo deste estudo é identificar dispersão dos indivíduos entre três possíveis subpopulações de *C. lami*. Inicialmente, verificado entre os três demes, a migração dos dois sexos separadamente, finalmente examinar, através da determinação de parentesco, a relação entre os indivíduos entre e dentro das três prováveis subpopulações. Com isso propõe-se esclarecer padrões ambientais, demográficos, genéticos e sociais e relacionar a evolução da espécie, relacionada à formação da região.

Material e Métodos

Área de estudo

A área estudada localiza-se ao lado do Parque Estadual de Itapuã, na borda leste da Lagoa Negra (S 30°21'35,6"/WO 51°00'32,9"), município de Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil (Fig.1). As amostras foram coletadas no período de Março de 1998 a Outubro de 1999 por El Jundi e colaboradores através do método de captura, marcação e recaptura (Marinho & Freitas 2006). Informações como peso, medidas corporais e condições reprodutivas das fêmeas foram colhidas. Amostras de tecido e sangue de 89 indivíduos (subpopulação A, N=19; subpopulação B, N=37 e subpopulação C, N=33) foram coletadas para posterior análise em laboratório. As três subpopulações identificadas possuem distâncias de 150, 300 e 450 m, AxB, BxC e AxC, respectivamente.

Extração de DNA e amplificação por PCR

O DNA das amostras foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Medrano *et al.* (1990), com modificações, sendo utilizado para amostras de sangue e de tecido. Oito grupos de *primers* para microssatélites desenvolvidos por Lacey *et al.* (1999) a partir da espécie co-genérica *C. sociabilis*, os quais foram identificados como sendo polimórficos para diferentes espécies do gênero (Lacey *et al.* 2001, Cutrera 2005), foram utilizados - Soc1, Soc2, Soc3, Soc4, Soc5, Soc6, Soc7 em Soc8. As reações de amplificação foram feitas com volume

final de 20 μ l (0.7mM dNTP; 0.27 μ M de cada *primer*; 1x Taq Buffer; 1.5 mM MgCl₂ e 0.65 U Taq DNA polimerase) nas condições descritas a seguir: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1min, 35 ciclos com temperatura de anelamento variando entre 58 e 64°C para os diferentes *primers*, terminando com extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR foram separados em géis de poliacrilamida não-desnaturante 6% e desnaturante 10% com glicerol, e revelados com nitrato de prata para visualização dos resultados. Os *loci Hai* (*Hai2*, *Hai3*, *Hai4*, *Hai5* e *Hai12*) desenvolvidos por Lacey *et al.* (1999) foram analisados em El Jundi & Freitas (2004) e suas informações adicionais podem ser acessadas através do mesmo.

Estrutura Genética

Relações entre populações foram examinadas usando o programa Genepop 3.1 (Raymond & Rousset 1995), onde foi verificada diferenciação populacional (número de migrantes, F_{st} , ρ_{st} , F_{is}) (Weir & Cockerham 1984). A análise dos valores de F_{st} , para verificar isolamento e diferenciação entre as subpopulações, foi feita levando em conta a classificação feita por Nei (1978), sendo considerado um valor "baixo", o $F_{st} < 0,05$; médio, $0,05 < F_{st} < 0,15$ e alto, $F_{st} > 0,15$. O fluxo gênico foi estimado através do número de migrantes efetivos (Nm) pela fórmula: $Nm = [1/F_{st} - 1]/4$ (Wright 1951; 1977; Slatkin 1994) e valores de F_{st} .

Verificou-se heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), diversidade gênica (Nei 1987). Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada *locus*, pelos valores exatos de p, e o desequilíbrio de ligação entre os

loci foi testado pelo Método de Fisher, ambos usando o método da Cadeia de Markov (100 *dememorization*, 100 *batches*, 100 *iterations*) (Guo & Thompson 1992; Rousset & Raymond 1995), usando correção de Bonferroni (Rice 1989) posteriormente.

Dispersão sexo-dependente foi verificada através do programa Fstat293, separando indivíduos machos e fêmeas no momento da análise. E o conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade média, média de alelos por *locus*, simulações e análise de parentesco foram realizadas pelo programa Cervus 2.0 (Marshall *et al.* 1998) para identificar a mais provável mãe e o mais provável pai de cada indivíduo da prole. Posteriormente cada sexo foi testado separadamente para selecionar os indivíduos com maior possibilidade de paternidade para cada indivíduo da progênie testado. As simulações foram desenvolvidas por 10.000 ciclos, taxa de erro de tipagem de 0,010, confiança relaxada de 80 % e estrita de 95%.

Resultados

Estrutura Genética

Foi observado um total de 27 diferentes alelos (14 nos 5 *loci Hai* e 13 nos 8 *Soc*), 24 na subpopulação A, 26 na B e 25 em C. O alelo 3 do *Hai 4* está ausente na subpopulação C; o alelo 3 do *locus Hai5* é exclusivo de B; o alelo 2 do *locus Soc7* é exclusivo de C e o *locus Soc7* não apresenta o alelo 3 em A.

Dos oito *loci* analisados no presente trabalho (*Soc 1 a 8*), dois (*Soc5* e *Soc 6*) se mostraram monomórficos e um (*Soc4*) não produziu produtos de PCR bem resolvidos, sendo descartado das análises. Nos cinco *loci* que apresentaram variabilidade, juntamente com os cinco *Hai* analisados em El Jundi & Freitas (2004), a variação de cada *locus* foi pequena, ficando entre dois e três alelos. A média do número de alelos por *locus* observada ficou em 2.21, incluindo os quatro *loci* monomórficos (*Hai9*, *Hai11*, *Soc5* e *Soc 6*) e 2.7 alelos por *locus* considerando apenas os polimórficos. A heterozigosidade média observada apresentou valores de 0.253 para a população total (Tab. 1) e de 0.2237; 0.2514 e 0.2860, para as subpopulações A, B e C respectivamente.

Análises de diferenciação entre as subpopulações par a par indicaram valores baixos de F_{st} de 0.0129; 0.0321 e 0.0666 (subpopulações AxB, BxC e AxC respectivamente) e o número de migrantes (Nm) por geração foi de 7.75 entre as três subpopulações e analisando os sexos separadamente as fêmeas apresentaram um Nm de 7.89 e os machos, de 1.0321. Considerando as subpopulações par a par, a partir dos valores de F_{st} (Wright 1951), o número de migrantes foi de 19.13; 7.78 e 3.50 (AxB, BxC e AxC, respectivamente) (Tab. 2).

Portanto, as análises dos dados como um todo, sugerem uma única população considerando a classificação de Nei (1978), apesar do valor de F_{st} 0.0666. A análise de desequilíbrio de ligação sugere ligação entre *Hai3/Hai12*, *Hai3/Hai4* e *Hai5/Hai6*, mas após a correção de Bonferroni ser aplicada, nenhum desequilíbrio significativo foi encontrado. As análises de equilíbrio de Hardy-Weinberg demonstraram um desvio significativo em apenas um *locus* (*Hai4*), depois de aplicar a correção de Bonferroni, indicando um déficit de heterozigotos ($p < 0.05$). Valores de F_{is} foram de 0.1467 para A; 0.1837 para B; e 0.0935 para C, e foram observados oito *loci* com valores positivos e dois negativos (*Hai12* e *Soc1*) (Tab. 1).

Os valores de ρ_{st} são baixos em sua maioria, sendo que quando comparadas par a par, as subpopulações apresentam valores de 0.0032; 0.0398; e 0.0824, para AxB, BxC e AXC, respectivamente (Tab. 4). Valores altos (acima de 0,2) foram encontrados nos *loci* *Hai4* e *Hai5* na população total, apenas o *Hai12* na análise par a par para as populações AxC. Quando analisados os sexos separadamente, fêmeas adultas apresentaram valores acima de 0.2 nos *loci* *Hai4*, *Hai5*, *Soc2* e *Soc3* e os machos apenas em *Hai3* e *Soc8*.

Na análise por *locus* do Equilíbrio de HW foi verificada uma deficiência de heterozigotos no *Hai3* na subpopulação C; no *Hai4* nas subpopulações A e B ($p < 0.05$); no *Hai5* em B; e no *Soc2*, nas subpopulações A e B. Uma deficiência de heterozigotos em fêmeas adultas, foi encontrada no *Hai3* na pop C, no *Hai4* nas pop A e B e no *Soc2*, na pop B. Em machos, não foi identificada deficiência de heterozigotos. Analisando *locus* por *locus*, verifica-se que as fêmeas apresentam deficiência de heterozigotos em quatro *loci* (*Hai3*, *Hai4*, *Hai5* e *Soc2*), mas apenas

Hai4 e *Hai5* se mostraram significativos para a deficiência na população total após correção de Bonferroni.

Quando testados todos *loci* de cada população verificou-se que as fêmeas dos três subgrupos apresentam deficiência de heterozigotos. E verificando valores nas subpopulações, incluindo ambos os sexos, a deficiência é verificada nas subpopulações A e B.

Na análise de paternidade através do programa Cervus 2.0 obteve-se um poder de exclusão baixo, sendo para o primeiro genitor de 0.66, e 0.89 para o segundo genitor. O valor de PIC (Conteúdo de informação polimórfica) de 0.358 também se mostrou baixo, não tendo, através do presente conjunto de dados analisados, a possibilidade de definições de paternidade. Mesmo assim foi testada a prole conhecida, jovens e sub-adultos coletados nas três subpopulações, contra as fêmeas adultas e em seguida, contra os machos adultos da população total. As probabilidades de não-exclusão foram obtidas, além do valor relativo à probabilidade dos indivíduos adultos com maiores possibilidades de serem os genitores (Tab. 5). Considerando prole e dois genitores pertencentes à mesma subpopulação, obteve-se 10 possíveis famílias (duas na subpopulação A: TJ04, TJ08 e TJ06; TJ70, TJ10 e TJ88; três em B: TJ19, TJ34 e TJ83; TJ58, TJ25 e TJ83; TJ82, TJ92 e TJ56; e seis em C: TJ41, TJ77 e TJ40; TJ43, TJ63 e TJ33; TJ44, TJ28 e TJ33; TJ67, TJ74, TJ40; J75, TJ49 e TJ33; TJ87, TJ66 e TJ38 - considerando sempre prole, mãe e pai, respectivamente) de um total de 26 indivíduos jovens e subadultos testados. Verificando a prole presente em uma mesma subpopulação que a possível mãe apenas, obteve-se sete casos (um em A: TJ68 e TJ55, três em B: TJ21 e TJ24;

TJ59 e TJ24; TJ84 e TJ07; e três em C: TJ46 e TJ47; TJ67 e TJ74; TJ76 e TJ47 - considerando prole e mãe, respectivamente) o mesmo (sete casos) ocorrendo quando considerada a prole com apenas o possível pai na mesma subpopulação (um em A: TJ69 e TJ89; dois em B: TJ31 e TJ90; TJ57 e TJ83; e quatro em C: TJ42 e TJ33; TJ44 e TJ33; TJ65 e TJ38; TJ78 e TJ52 - considerando prole e machos, respectivamente). No caso de ambos possíveis genitores estarem em uma mesma subpopulação e a prole em uma diferente (os dois casos em C: TJ64 e TJ38; TJ63 e TJ36, considerando fêmeas e machos dos indivíduos TJ29 e TJ80 da prole, respectivamente), obtivemos duas ocorrências, e dois também, foram os casos de que cada indivíduo (possível pai, possível mãe e prole) foi identificado em uma subpopulação diferente (TJ45, TJ16 e TJ89; TJ71; TJ63 e TJ26) (Tab. 5).

No caso de um macho ou uma fêmea ser o possível genitor de mais de um indivíduo da prole, temos uma ocorrência maior dessa situação em machos, em que temos um caso em que há a possibilidade de um macho ser o progenitor de quatro indivíduos da prole (TJ33 - TJ42, TJ43, TJ44 e TJ75, todos da subpopulação C); três casos que há a possibilidade de um indivíduo ser pai de três (TJ38C - possível progenitor de TJ29B, TJ65C e TJ87C; TJ83 - possível pai de TJ19, TJ57 e TJ58, todos da mesma subpopulação; TJ89A - TJ69A, TJ59B e TJ45C) e quatro situações em um indivíduo do sexo masculino pode ser o pai de dois (TJ40 - possível pai de TJ41 e TJ67, todos de C; TJ88A - TJ70A e TJ46C; TJ26B - TJ68A e TJ71A; e TJ56B - TJ76C e TJ82B). Em fêmeas há duas possibilidades de uma fêmea ser mãe de três indivíduos da prole (TJ24B - possível mãe de TJ21B, TJ59B e TJ78C; TJ28B - TJ42C, TJ44C e TJ65C) e quatro casos em que uma fêmea pode ser progenitora de dois (TJ64C - de TJ29B

e TJ43C; TJ47 - de TJ46 e TJ76, todos de C; TJ63C - TJ71A e TJ80B; e TJ85C - TJ31B e TJ69A).

Discussão

Verificando os valores de F_{st} par a par (AxB, BxC e AxC) encontrados, a existência de uma estruturação em subpopulações não é significativa, isto é, eles indicam a existência de uma única população, considerando o baixo F_{st} encontrado nos três pares analisados usando os parâmetros de Nei (1978). Mas considerando o fato de não serem encontrados indivíduos de uma subpopulação em outra, quando da ocorrência de recapturas, e de que quanto maior a distância, maior o F_{st} e conseqüentemente menor o número de migrantes, além de ser verificada a existência de alelos não compartilhados pelas três subpopulações mostram uma possível estruturação incipiente. Valores de F_{is} mostraram haver uma similaridade genética alta dentro das subpopulações.

A média reduzida de polimorfismos em todos *loci* testados indica que possivelmente que um efeito Fundador tenha ocorrido recentemente nessa população. Considerando resultados encontrados para toda a distribuição da espécie (considerando os cinco *loci Hai* - média de 1,33 a 3,2 alelos por *locus*) (El Jundi & Freitas 2004), também é provável que o um efeito de Gargalo-de-garrafa tenha ocorrido na espécie como um todo, ao verificarmos a variabilidade da espécie co-genérica *C. minutus*, vizinha e provavelmente derivada de *C. lami*, onde o número médio de alelos por *locus* varia de 7.33 a 8, utilizando os mesmos conjuntos de *primers* (Castilho 2004).

Considerando um hábitat fragmentado com migração restrita, a deriva genética deve, junto com a seleção natural e mutações, levar a uma diferenciação local. Já em habitats contínuos, no entanto, onde nenhuma fragmentação óbvia

pode ser detectada a diferenciação genética pode também se fazer presente (Ehrich & Stenseth 2001). A deriva genética ocorre localmente e pode criar uma estrutura genética, por um processo conhecido como isolamento por distância (Wright 1943).

O padrão resultante de similaridade local e o aumento da diferenciação com o aumento da distância podem, por um considerável período de tempo, estender-se a grandes áreas geográficas. Em tais grandes distâncias, eventos históricos tais como gargalo-de-garrafa, área de expansão ou colonização podem, em adição ao movimento individual, formar a estrutura espacial observada (Avice 1994). A ausência de um padrão observado de isolamento pela distância pode sugerir que a espécie tenha recentemente colonizado a região. Como nos lemingues siberianos (Ehrich & Stenseth 2001) a estrutura genética fragmentada pode ser interpretada como um sistema que ainda não alcançou um equilíbrio migração-deriva após o estabelecimento das populações na região ou depois de um evento de uma "grande mistura". Apesar das frequências gênicas nas amostras locais não terem mostrado qualquer padrão de isolamento pela distância, as análises de genótipos individuais revelam uma leve tendência ao decréscimo da similaridade genética com o aumento da distância.

Os valores de F_{is} em fêmeas, maiores que nos machos, um maior número de migrantes e a deficiência de heterozigotos mais acentuada sugere a existência de uma dispersão fêmea-dependente, mesmo não sendo significativa. Valores de F_{is} , F_{st} e ρ_{st} maiores em fêmeas demonstram uma similaridade genética maior entre elas, podendo sugerir uma dispersão fêmea-depedente (Tab.3 e 4).

Outro resultado interessante é que há indícios de poliginia na espécie, pois entre outros aspectos, foi identificada uma maior recorrência de machos serem possíveis progenitores de mais de um indivíduo da prole, em relação às fêmeas. Esse comportamento poligínico, já reportado para diferentes espécies do gênero (Zenuto *et al.* 1999; Lacey 2001) foi sugerido em *C. lami* por El Jundi & Freitas, (2004).

Na análise de paternidade e parentesco os resultados não satisfizeram a necessidade de um bom grau de confiança nas relações sugeridas entre indivíduos (possíveis progenitores e prole), ainda mais considerando o baixo valor no conteúdo de informação polimórfica e o baixo poder de exclusão para o primeiro e segundo genitores. Mesmo assim, pode-se inferir possíveis relações entre indivíduos adultos e prole. Assim verificou-se diversos casos em que os possíveis pais e mães se mostram presentes na mesma subpopulação que a prole. Mas há casos em que isso não ocorre, podendo sugerir que os indivíduos subadultos da prole possam ter migrado para outras subpopulações. Considerando que nem todos os indivíduos da população foram coletados, podemos estar inferindo a paternidade erroneamente, considerando que pode não ter ocorrido a captura de todos os indivíduos adultos sexualmente ativos, e conseqüentemente, nem todos os progenitores verdadeiros. E levando em conta que nas populações há várias relações familiares, e que não temos o conhecimento delas, o teste perde confiança, pois podemos estar testando indivíduos proximalmente relacionados com a prole e assim, estimar a paternidade a indivíduos apenas aparentados.

Para ter resultados positivos para o trabalho com essa população será necessário aumentar o número de *locus* testados, para aumentar o número total de alelos, o que aumentará o grau de confiabilidade dos resultados. A falta de mais conjuntos de *primers* para o gênero, compatíveis com a espécie, tornou-se o principal fator para a limitação do trabalho em laboratório e conseqüentemente, para os valores insatisfatórios para melhores conclusões.

Referências

- Avise JC (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Contreras LC, Torres-Mura JC & Yáñez JL (1987) Biogeography of Octodontid rodents: an eco-evolutionary hypothesis. *Fieldiana Zoology* 39: 401-411.
- Cook JA & Lessa EP (1998) Are rate of diversification in subterranean South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) unusually high? *Evolution* 52:1521-1527.
- Ehrich D & Stenseth NC (2001) Genetic structure of Siberian lemmings (*Lemmus sibiricus*) in a continuous habitat: large patches rather than isolation by distance. *Heredity* 86: 716-730.
- El Jundi TARJ & Freitas (2004) Genetic & demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae). *Hereditas* 140: 18-23.
- Freitas TRO (2001) Tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae) in southern Brazil: *Ctenomys lami* Spec. Nov. separated from *C. minutus* Nehring, 1887. *Stud Neotrop Environ* 36(1): 1-8.
- Lacey EA (2001) Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity* 86:628-637.
- Lacey EA, Maldonado JE, Clabaugh JP & Matocq MD (1999) Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia – Ctenomyidae). *Mol Ecol* 8:1754-1756.
- Lacey, E. A., J. L. Patton, and G. N. Cameron. 2000. Introduction. Pp. 1-18. In. *Life underground: the biology of subterranean rodents* (Lacey EA., Patton JL, and Cameron GN, eds.). The University of Chicago Press.
- Lessa EP & Cook JA (1998) The Molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Mol Phylogenet Evol* 9, 88–99.

- Marinho JR & Freitas TRO (2006) Structure of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi) population in the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Theriol (in press)* 51: 53-60.
- Medrano JF, Aesen E & Sharrow L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8:43.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press.
- Pearson OP (1959). Biology of subterranean rodents, *Ctenomys*, in Peru. *Memorias del Museo de Historia Natural "Javier Prado"*, 9: 1-56.
- Queller DC & Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.
- Reig OA & Kiblicky P (1969) Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Chromosoma* 28: 211-244.
- Ritland K (1996) Estimator for pair-wise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genet Res* 67: 175-185.
- Romo MDMOV, Suzuki S, Nakajima M & Taniguchi N (2006) Genetic evaluation of interindividual relatedness for broodstock management of the rare species barfin flounder *Verasper moseri* using microsatellite DNA markers. *Fisheries Sci* 72: 33–39
- Seddon N, Amos W, Adcock G, Johnson P, Kraaijeveld K, Kraaijeveld-Smit FJL, Lee W, Senapathi GD Mulder RA & Tobias JA (2005) Mating system, philopatry and patterns of kinship in the cooperatively breeding subdesert mesite *Monias benschi*. *Mol Ecol* 14: 3573-3583.
- Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. In: Real, LA (ed.) *Ecological Genetics*. Princeton, Princeton University Press: 3-17.

- Smouse PE & Meagher TR (1994) Genetic analysis of male reproduction contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae). *Genetics* 136: 312-322.
- SurrIDGE AK, Bell DJ, Ibrahim KM & Hewitt GM (1999) Population structure and genetic variation of European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in East Anglia. *Heredity* 82: 479-487.
- Thomas *et al.* (2000) Estimating variance components in natural populations using inferred relationships. *Heredity* 84: 427-436.
- Thompson BS (1975) The estimation of pair-wise relationship. *Ann Hum Genet* 39: 173-188.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 139-156.
- Wright S (1977) *Evolution and genetic population: experimental results and evolutionary deductions*. University of Chicago Press, 3: 611.
- Zenuto RR, Lacey EA, Busch C (1999). DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Mol Ecol* 8: 1529-1532.

Anexos

Figuras:

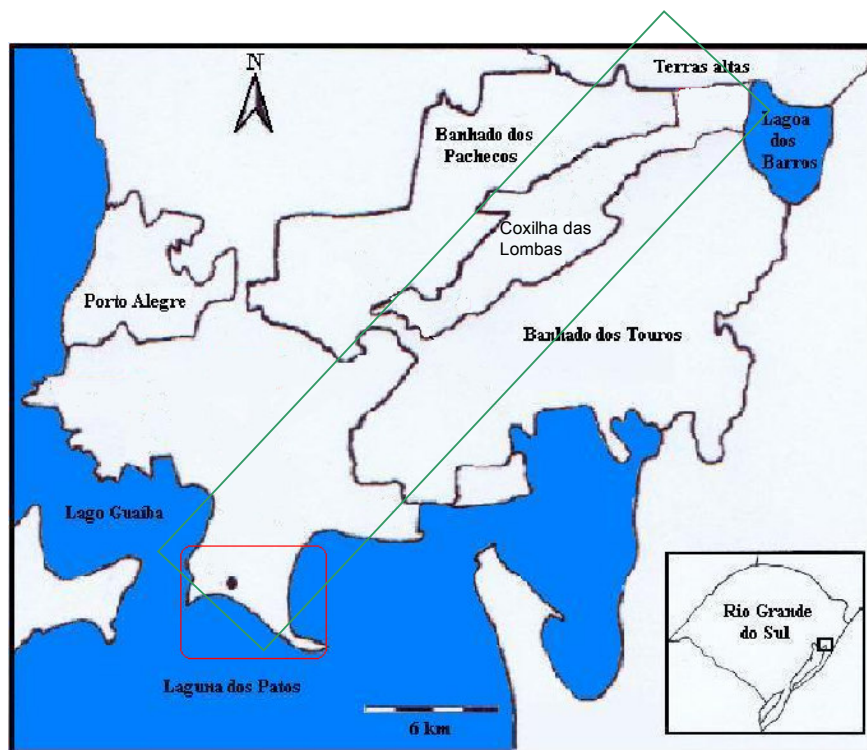


Figura 1: Mapa da Coxilha das Lombas (em verde) destacando a região de Itapuã, Viamão, RS, Brasil (em vermelho), onde foram feitas as coletas (ponto preto). (Figura modificada de Freitas 1990).

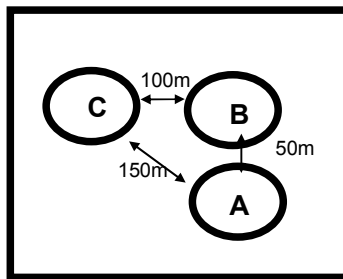


Figura 2: Área com a distribuição e distância entre as três possíveis subpopulações de *C. jami* na região de Itapuã, Viamão, RS, Brasil

Tabelas

Tabela 1: Número total de alelos, heteroziguidade e F_{is} observados e deficiência de heterozigotos em uma população de *Ctenomys lami*. Ho= heteroziguidade observada; He= heteroziguidade esperada.

<i>Locus</i>	Nº de Alelos	Ho	He	F_{is}	(valor de p) def heterozigotos
<i>Hai2</i>	2	0,348	0,391	0,109	0,4286
<i>Hai3</i>	3	0,545	0,654	0,167	0,0300
<i>Hai4</i>	3	0,215*	0,414	0,482	0,0003**
<i>Hai5</i>	3	0,341	0,469	0,274	0,0001**
<i>Hai6</i>	1	0	0	-	-
<i>Hai9</i>	1	0	0	-	-
<i>Hai12</i>	3	0,636	0,633	-0,005	0,8905
<i>Soc1</i>	2	0,282	0,258	0,115	0,8081
<i>Soc2</i>	3	0,488	0,585	0,190	0,0168
<i>Soc3</i>	3	0,274	0,332	0,120	0,1654
<i>Soc5</i>	1	0	0	-	-
<i>Soc6</i>	1	0	0	-	-
<i>Soc7</i>	3	0,265	0,299	0,068	0,4566
<i>Soc8</i>	2	0,164	0,177	0,041	0,2907
Total	27#	0,253	0,300	0,1561#	0,3087#

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; # *loci* monomórficos não considerados

Tabela 2: Valores de F_{st} (acima da diagonal) e o número de migrantes por geração (Nm) baseada nos valores de F_{st} (abaixo da diagonal)

	Subpopulação	Subpopulação	Subpopulação
	A	B	C
Subpop. A	-	0,0129	0,0666
Subpop. B	19,13	-	0,0321
Subpop. C	3,50	7,78	-

$p < 0,001$

Tabela 3: Estimativa de F_{is} , F_{st} e ρ_{st} e Nm para todos *loci* para população total, para fêmeas e para machos

	F_{is}	F_{st}	ρ_{st}	Nm
População total	0.1405	0.0373	0,0911	7,75
Fêmeas	0.1963	0.0663	0,1575	7,89
Machos	0.0514	0.0499	-0,0137	1,0321

Tabela 4: Estimativa de F_{st} e ρ_{st} para subpopulações par a par, para todos os *loci*

	AxB		BxC		AxC	
	F_{st}	ρ_{st}	F_{st}	ρ_{st}	F_{st}	ρ_{st}
total	0.0129	0.0032	0.0321	0.0398	0.0666	0.0824
fêmeas	0.0390	0.0137	0.0701	0.0785	0.0813	0.0994
machos	0.0273	-0.0006	0.0457	0.0318	0.0644	0.0978

Tabela 5: Relação dos mais prováveis progenitores, separados por sexo, de cada indivíduo da prole da população total, identificação da subpopulação proveniente, probabilidade de não-exclusão e valor de LOD de cada provável parental.

Prole	Pop	Provável mãe	Pop	Probab Não exclusão	LOD Provável mãe	Provável Pai/pop	Pop	Probab Não exclusão	LOD provável pai
TJ04	A	TJ08	A	0,330	2,387	TJ06	A	0,330	3,248
TJ19	B	TJ34	B	0,579	1,551	TJ83	B	0,579	2,297
TJ21	B	TJ24	B	0,539	2,663	TJ15	A	0,539	1,556
TJ29	B	TJ64	C	0,434	2,130	TJ38	C	0,434	2,110
TJ31	B	TJ85	C	0,258	2,031	TJ90	B	0,258	1,682
TJ41	C	TJ77	C	0,172	3,104	TJ40	C	0,172	1,794
TJ42	C	TJ28	B	0,591	1,627	TJ33	C	0,591	2,657
TJ43	C	TJ64	C	0,169	1,120	TJ33	C	0,169	1,678
TJ44	C	TJ28	B	0,230	2,407	TJ33	C	0,230	2,567
TJ45	C	TJ16	B	0,258	3,216	TJ89	A	0,258	0,845
TJ46	C	TJ47	C	0,635	2,071	TJ88	A	0,635	1,309
TJ57	B	TJ13	A	0,701	1,648	TJ83	B	0,701	0,973
TJ58	B	TJ25	B	0,266	1,782	TJ83	B	0,266	1,271
TJ59	B	TJ24	B	0,130	3,384	TJ89	A	0,130	0,596
TJ65	C	TJ28	B	0,104	2,760	TJ38	C	0,104	3,650
TJ67	C	TJ74	C	0,105	1,793	TJ40	C	0,105	2,152
TJ68	A	TJ55	A	0,165	2,378	TJ26	B	0,165	2,016
TJ69	A	TJ85	C	0,307	1,825	TJ89	A	0,307	0,886
TJ70	A	TJ10	A	0,331	2,273	TJ88	A	0,331	2,476
TJ71	A	TJ63	C	0,427	1,428	TJ26	B	0,427	0,481
TJ75	C	TJ49	C	0,434	2,371	TJ33	C	0,434	1,862
TJ76	C	TJ47	C	0,135	3,136	TJ56	B	0,135	2,358
TJ78	C	TJ24	B	0,228	3,238	TJ52	C	0,228	0,079
TJ80	B	TJ63	C	0,164	1,249	TJ36	C	0,164	1,144
TJ82	B	TJ92	B	0,693	1,789	TJ56	B	0,693	3,266
TJ84	B	TJ07	B	0,536	1,227	TJ39	C	0,536	1,876
TJ87	C	TJ66	C	0,0660	2,978	TJ38	C	0,0660	0,808

VI – DISCUSSÃO

A análise da distribuição das freqüências dos diferentes alelos indicou a possível existência de um recente efeito Gargalo de Garrafa na espécie *Ctenomys lami*, já sugerido por El Jundi & Freitas (2004; *no prelo*). Por outro lado, o pequeno número de alelos observados na população e a baixa mobilidade nessa espécie, associados a eventos de extinção e recolonização, poderiam indicar a possibilidade de um Efeito Fundador ser o responsável por esta baixa variabilidade na população em questão, sendo um ponto de grande importância a ser resolvida futuramente, aumentando os estudos sobre essas populações.

Pelo fato de não terem sido encontrados adultos compartilhando o mesmo sistema de túneis e por haver dimorfismo sexual, El Jundi (2003) sugeriu que seja uma espécie solitária como *C. flamarioni* (Fernandez 2002) e *C. haigi* (Lacey *et al.* 1998), por exemplo. E resultados sugerindo possíveis machos como progenitores de vários indivíduos da prole dando a entender a existência de poliginia na espécie.

Os resultados não apresentam um bom grau de confiança nas relações sugeridas entre indivíduos (possíveis progenitores e prole), ainda mais considerando o baixo valor no conteúdo de informação polimórfica e o baixo poder de exclusão para o primeiro e segundo genitores. Outro aspecto importante, que impede uma confiança maior nos resultados é a falta de informações sobre possíveis grupos familiares, considerando que o conhecimento poderia excluir possíveis parentes próximos das análises de paternidade, já que estes compartilham um número maior de genes em comum. Além disso, o fato de

não ter ocorrido a captura de todos indivíduos da população, vários indivíduos que teriam uma probabilidade maior de serem os reais progenitores podem não ter sido coletados.

Mas mesmo com diversas limitações, vemos que a população, está recentemente subdividida em três, apresentando um sinal de estruturação, que não se mostrou significativa, mas é aparente. E por esse motivo, através desse trabalho, infere-se que seja uma população com uma subestruturação incipiente e que ainda não atingiu um equilíbrio.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altuna CA (1983) Sobre la estructura de las construcciones de *Ctenomys pearsoni* Lessa & Langguth, 1983 (Rodentia - Octodontidae). Res Com J C Nat Montevideo 3:397-401.
- Andersen DC (1987) Below-ground herbivory in natural communities: a review emphasizing fossorial animals. Q Rev Biol 62:261-285.
- Andersen DC (1988) Tunnel-construction methods and foraging path of a fossorial herbivore, *Geomys bursarius*. J Mammal 69:565-582.
- Arienti ML (1986) Evolução paleogeográfica da Bacia do Rio Gravataí. Dissertação de mestrado. CPG Geociências, UFRGS, Porto Alegre.
- Atlas Ambiental de Porto Alegre (Menegat R coord.) (1998), Ed Universidade, UFRGS, Porto Alegre.
- Avise JC (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Avise JC, Jones AG, Walker DE, DeWoody JA, *et al.* (2002) by Annual Reviews. Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: Lessons for Ecology and Evolution. Annu Rev Genet 36:19–45.
- Baker RJ, Makova KD & Chesser RK (1999) Microsatellites indicate a high frequency of multiple paternity in *Apodemus* (Rodentia). Mol Ecol 8(1): 107-111.

- Bishop MJ , Jarvis JUM, Spinks AC, Bennett NC & O’Ryan C (2004) Molecular insight into patterns of colony composition and paternity in the common mole-rat *Cryptomys hottentotus hottentotus*. Mol Ecol 13:1217-1229.
- Blouin MS, Parsons M, Lacaille V & Lotz S (1996) Use microsatellite *loci* to classify individuals by relatedness. Mol Ecol 5: 393-401.
- Bretschneider DS (1987) Alguns aspectos da biologia e ecologia de *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981 (Rodentia-Ctenomyidae). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Bugge J (1971) The cephalic arterial system in New and Old World hystricomorphs, and in bathyergoids, with special reference to the systematic classification of rodents. Acta Anat 80: 516-536.
- Cameron GN, Spencer SR, Eshelman BD, Williams LR & Gregory MJ (1988) Activity and burrow structure of Atwater’s pocket gophers (*Geomys attwateri*). J Mammal 69:667-678.
- Castilho CS (2004) Análise cromossômica e de microssatélites em uma zona de hibridação intra-específica de *Ctenomys minutus* (Rodentia – Ctenomyidae). Dissertação de Mestrado. PPGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Chakraborty R & Jin L (1993) Determination of relatedness between individuals using DNA fingerprinting. Hum Biol 65: 875-895.

- Comings DE (1998) Polygenic inheritance and micro/minisatellites. *Mol Psychiatry* 3:21-31.
- Contreras LC 1987, Torres-Mura JC & Yáñez JL (1987) Biogeography of Octodontid rodents: an eco-evolutionary hypothesis. *Fieldiana Zoology* 39: 401-411.
- Cook JA & Lessa EP (1998) Are rate of diversification in subterranean South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) unusually high? *Evolution* 52:1521-1527.
- Cook JA, Anderson S & Yates TL (1990) Notes on Bolivian mammals 6. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the Highlands. *American Museum Novitates* 2980: 27pp.
- Cook JA, Lessa EP & Hadley EA (2000) Paleontology, phylogenetic patterns, and macroevolution process in subterranean rodents. Lacey EA, Patton JL & Cameron GN, eds. *The University Chicago press*, Chicago London.
- Cunningham EP, Dooley JJ, Splan RK & Bradley DG (2001) Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Anim Genet* 32:360-364.
- Cutrerera AP, Lacey AE & Bush C (2005) Genetic structure in solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship social. *Mol Ecol* 14: 2511-2523.
- Dobson FS 1998. Social structure and gene dynamics in mammals. *J. Mammal* 79: 667-670.

- Ehrich D & Stenseth NC (2001) Genetic structure of Siberian lemmings (*Lemmus sibiricus*) in a continuous habitat: large patches rather than isolation by distance. *Heredity* 86: 716-730.
- Eisenberg JF (1981) Mammalian radiations. Chicago Univ. Chicago Press.
- Eizirik E, Murphy WJ & O'Brien SJ (2001) Molecular dating and biogeography of the early placental mammals radiation. *J Hered* 92: 212-219.
- El Jundi TARJ & Freitas (2004) Genetic & demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae). *Hereditas* 140: 18-23.
- El Jundi TARJ (2003) Estudos da variabilidade cromossômica em *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae) ao longo de sua distribuição através de marcadores moleculares. Tese de Doutorado. PPGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Ellerman JR (1956) The subterranean mammals of the world. *Trans Roy Soc South Africa* 35:11-20.
- Fernández GP (2002) Análise da estrutura populacional e da variabilidade genética em três populações de *Ctenomys flamarioni* (Rodentia – Ctenomyidae) através de *loci* de microssatélites. Dissertação de Mestrado. PPGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Finston T (2002) Geographic patterns of population genetic structure in *Mytilocypris* (Ostracoda: Cyprididae): interpreting breeding systems, gene flow and history in species with differing distributions. *Mol Ecol* 11: 1931-1946.

- Fiumera, AC, Dewoody AJ, Asmussen MA & Avise JC (2002) Estimating the proportion of offspring attributed to candidates adults. *Evol Ecol* 16:549-565.
- Fornel R (2005) Estudo da variação morfológica craniana entre quatro blocos populacionais de *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae) através de morfometria geométrica. Dissertação de Mestrado. PPGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Fowler EV, Houlden BA, Sherwin WB, Hoeben P & Timms P (1998) Genetic Variation in Captive Koalas (*Phascolarctos cinereus*): Parentage Determination and Individual Identification. *Biochem Genet* 36(5/6):193-206.
- Freitas TRO & Lessa EP (1984) Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia – Octodontidae). *Mendeliana* 2: 85-93.
- Freitas TRO (1990) Estudos citogenéticos e craniométricos em três espécies do gênero *Ctenomys*. Tese de Doutorado. PPGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Freitas TRO (1994) Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia- Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. *Cytogenet Cell Genet* 67: 193-198.
- Freitas TRO (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in Southern Brazil. *Stud Neotrop Environ* 30:53-59.
- Freitas TRO (1997) Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia – Octodontidae). *Rev Bras Genet* 20: 1-7.

- Freitas TRO (2001) Tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae) in southern Brazil: *Ctenomys lami* Spec. Nov. separated from *C. minutus* Nehring, 1887. *Stud Neotrop Environ* 36(1): 1-8.
- Gallardo M (1991) Karyotype evolution in *Ctenomys* (Rodentia-Ctenomyidae). *J Mammal* 72: 11-21.
- García D, Carleos C, Parra D & Cañón J (2002) Sib-parentage testing using molecular markers when parents are unknown. *Anim Genet* 33:364-371.
- Gava A & Freitas TRO (2002) Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia Ctenomyidae). *J Mammal* 83:843-851.
- Gava A & Freitas TRO (2003) Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica* 119:11-17.
- Gava A & Freitas TRO (2004) The use of microsatellites to infer genetic relationships among chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) *J Mammal* (85)1201-1206.
- Goudet J, Perrin N & Waser P (2002) Tests for sex-biased dispersal using biparentally markers. *Mol Ecol* 11: 1103-1114.
- Guo, SW & Thompson, EA (1992) Performing the exact tests for Hardy-Weinberg proportion of multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.

- Haig SM, Ballou JD, Derrickson SR (1990) Management options for preserving genetic diversity: reintroduction of Guam rails to the wild. *Conserv Genet* 4: 290-300.
- Hedrick P, Miller PS (1992) Conservation genetics: Techniques and fundamentals. *Ecol Appl* 2: 30-46.
- Heth G & Nevo E (1981) Origin and evolution of ethological isolation in subterranean mole rats. *Evolution* 35:259-274.
- Huchon D & Douzery EJP (2001) From the Old World to the New World: A Molecular Chronicle of the Phylogeny and Biogeography of Hystricognath Rodents. *Mol Phylogenet Evol* 20: 238–251
- Jaeger JJ (1988) Rodent phylogeny: new data and old problems. In: *The Phylogeny and Classification of the tetrapods* (Benton MJ ed) Oxford Univ press, New York, 177-199.
- Jamieson A & Taylor St.CS (1997) Comparison of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim Genet* 28:397-400.
- Jones AG & Ardren WR (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol Ecol* 12:2511-2523.
- Kiblicky P, Brum-Zorrilla N, Perez G & Saez FA (1977) Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). *Mendeliana* 2:85-93.

- Köhler N, Gallardo MH, Contreras LC & Torres-Mura JC (2000) Allozymic variation and systematic relationships of the Octodontidae and allied taxa (Mammalia, Rodentia). *J Zoo (Lond)* 252: 243-250.
- Koskinen MT (2003) Individual assignment using microsatellite DNA reveals unambiguous breed identification in the domestic dog. *Anim Genet* 34(4):297-301.
- Lacey EA & Wieczorek JR (2004) Kinship in colonial tuco-tucos: evidence from group composition and population structure. *Behav Ecol* 15: 988-996.
- Lacey EA (2001) Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity* 86:628-637.
- Lacey EA, Braude SH & Wieczorek JR (1998) Burrow sharing by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*). *J Mammal* 78(2):556-562.
- Lacey EA, Maldonado JE, Clabaugh JP & Matocq MD (1999) Inter-specific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia – Ctenomyidae). *Mol Ecol* 8:1754-1756.
- Lacey, E. A., J. L. Patton, and G. N. Cameron. 2000. Introduction. Pp. 1-18. In: *Life underground: the biology of subterranean rodents* (Lacey EA., Patton JL, and Cameron GN, eds.). The University of Chicago Press.
- Lessa EP & Cook JA (1998) The Molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Mol Phylogenet Evol* 9, 88–99.

- Li Y, Korol AB, Fahima T, Beiles A & Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453-2465.
- Luckett WP & Hartenberger JL (1985) Superordinal and intraordinal affinities of rodents: development evidence from the dentition and placentation. In *Evolutionary Relationships among rodents: a multidisciplinary analysis* (Luckett WP & Hartenberger eds) Plenum, New York, 333-354.
- Malizia & Busch Malizia, A. I. and Busch, C. 1991. Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia-Octodontidae). *Mammalia* 55: 293-305.
- Marinho JR & Freitas TRO (2006) Structure of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi) population in the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Theriol (in press)*, 51: 53-60.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk, LEB & Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 7(5):639-655.
- Massarini A, Barros MA, Ortells MO *et al.* (1991) Evolutionary biology of fossorial Ctenomyine rodents (Caviomorph: Octodontidae). I. Chromosomal polymorphism and small Karyotypic differentiation in Central Argentinian population of tuco-tucos. *Genetica* 83:131-144.
- Medrano JF, Aesen E & Sharrow L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8:43.

- Moreira DM, Franco MHL, Freitas TRO & Weimer TA (1991) Biochemical polymorphisms and phenetic relationships in rodents of the genus *Ctenomys* from southern Brazil. *Biochem Genet* 29:601-615.
- Moro D & Spencer PBS (2003) Microsatellite *primers* for the western pebble-mound mouse (*Pseudomys chapmani*) that show cross amplification for the outers species of australian rodents. *Mol Ecol Notes* 3:259-261.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA & O'Brien SJ (2001) Molecular phylogenetics and the origin of placental mammals. *Nature* 409: 614-618.
- Nedbal MA, Allard MW & Honeycutt RL (1994) Molecular systematics of hystricognath rodents: evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Mol Phylogenet Evol* 3: 206-220.
- Neff BD, Repka J & Gross MR (2000) Statistical confidence in parentage analysis within complete sampling: how many *loci* and offspring are needed? *Mol Ecol* 9:529–539.
- Nei M (1975) *Molecular population genetics and evolution*. Amsterdam, North Holland.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press.

- Nevo E (1979) Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annu Rev Ecol Syst* 10:269-308.
- Nevo E (1982) Genic structure and differentiation during speciation in fossorial gerbil rodents. *Mammalia* 4:523-530.
- Nevo E (1986) Mechanisms of adaptive speciation at the molecular and organismal levels. In: Karlin S & Nevo E (eds.) *Evol Proc Theory*, London Academic Press, Inc.
- Nievergelt CM, Digby LJ, Ramakrishnan U & Woodruff DS (2000) Genetic Analysis of Group Composition and Breeding System in a Wild Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Population. *Int J Primatol* 21(1):1-20.
- Nowak RM (1991) Walker's mammals of the world. 5th ed, Ed. Johns Hopkins Univ Press, London 939-941.
- Ortells MO, Contreras JR & Reig OA (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 & Christie MI (1987) Los tuco-tucos (Genero *Ctenomys*) de los Parques Nacionales Lanin y Nahuel Huapi, Argentina. *Hist Nat* 37(5):337-343.
- Pearson OP (1984) Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of patagonia, Southern Argentina. *J Zool (Lond)* 202:225-237.
- Pearson OP, Binsztein N, Boiry L, Bush C, Dipace M, Gallopin G, Penchaszadeh P & Piantanida M (1968) Estructura social, distribución espacial y composición

- por edades de una poblacion de tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *Inv Zool Chilenas* 13:47-80.
- Pearson OP (1959). Biology of subterranean rodents, *Ctenomys*, in Peru. *Memorias del Museo de Historia Natural "Javier Prado"* 9: 1-56.
- Queller DC & Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.
- Raymond M & Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Reichman OJ & Smith SC (1990) Burrow and burrowing behavior by mammals. In Genoways HH (ed.) *Cur Mammal* 2, New York, Plenum press. 197-244.
- Reig OA & Kiblicky P (1969) Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Chromosoma* 28: 211-244.
- Reig OA, Busch C, Ortells MO & Contreras JR (1990) Na overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. (Nevo E, Reig OA and Liss AR, eds) New York, pp.71-96.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ritland K (1996) Estimator for pair-wise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genet Res* 67: 175-185.

- Romo MDMOV, Suzuki S, Nakajima M & Taniguchi N (2006) Genetic evaluation of interindividual relatedness for broodstock management of the rare species barfin flounder *Verasper moseri* using microsatellite DNA markers. *Fisheries Sci* 72: 33–39
- Rousset F & Raymond M (1995) Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, 140: 1413-1419.
- Seddon N, Amos W, Adcock G, Johnson P, Kraaijeveld K, Kraaijeveld-Smit FJL, Lee W, Senapathi GD Mulder RA & Tobias JA (2005) Mating system, philopatry and patterns of kinship in the cooperatively breeding subdesert mesite *Monias benschi*. *Mol Ecol* 14: 3573-3583.
- 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. *Mol Biol Evol* 18(9):1708-1719.
- Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. In: Real, LA (ed.) *Ecological Genetics*. Princeton, Princeton University Press: 3-17.
- Smouse PE & Meagher TR (1994) Genetic analysis of male reproduction contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae). *Genetics* 136: 312-322.
- Sorin AB (2004) Paternity assignment for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): mating across age classes and multiple paternity. *J Mammal* 85(2):356-262.

- SurrIDGE AK, Bell DJ, Ibrahim KM & Hewitt GM (1999) Population structure and genetic variation of European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in East Anglia. *Heredity* 82: 479-487.
- Tautz D (1993) Notes on definition and nomenclature of tandemly repetitive sequences. In: *DNA fingerprinting: State of the science*. Ed Pena SDJ, *et al.* 21-28.
- Taylor JS, Durkin JMH & Breden F (1999) The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Mol Biol Evol* 16:567-572.
- Tchaicka L (2002) Análise de duas barreiras ao fluxo gênico entre populações de *Ctenomys minutus* (Rodentia - Ctenomyidae) da planície costeira do sul do Brasil. Dissertação de mestrado. PPGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Thomas *et al.* (2000) Estimating variance components in natural populations using inferred relationships. *Heredity* 84: 427-436.
- Thompson BS (1975) The estimation of pair-wise relationship. *Ann Hum Genet* 39: 173-188.
- Villwock JA (1989) A summary of the geology of the coastal province of Rio Grande do Sul. *Proc Int Symp on utilization of coastal ecosystems: planning, pollution and productivity* 2:471-484.

- Vucetich MG & Verzi DH (1999) Changes in diversity and distribution the caviomorph rodents during the late Cenozoic in southern South America. In: Rabassa J & Salemme M (eds.) Centro Austral de Invest Cient and Univ Nac de la Patagonia 207-223.
- Vucetich MG, Verzi DH & Hartenberger JL (1999) Review and analysis of the radiation of the South American Hystricognathi (Mammalia, Rodentia). C R Acad Sci Paris Earth Planet Sci 329:763-769.
- Webb SB (1977) A history of savanna vertebrate in the New World. Parts I. Ann Rev Ecol Syst 8:355-380.
- Woods CA (1972) Comparative mycology of jaw, hyoid, and pectoral appendicular regions of New and Old World hystricomorph rodents. Bull. Am Mus Nat Hist 147:117-198.
- Woods CA (1993) Suborder Hystricognathi. In: Mammal Species the World: a Taxonomic and Geographic Reference (eds Wilson DE, Reeder DM), pp. 771–806. Smithsonian Institution Press, Washington DC.
- Wright S (1943) Isolation by distance. Genetics 28: 139-156.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. Annu eugenics 15: 323-354.
- Wright S (1977) Evolution and genetic population: experimental results and evolutionary deductions. University of Chicago Press, 3: 611.

- Wyss AR, Flynn JJ, Norell MA, Swisher CC, Charrier R, Novacek MJ & McKenna MC (1993) South America's earliest rodent and recognition of a new interval of mammalian evolution. *Nature* 365: 434–437.
- Yamaguchi N, Sarno RJ, Johnson WE, O'Brien SJ & Macdonald DW (2004) Multiple paternity and reproductive tactics of free-ranging american minks, *Mustela vison*. *J Mammal* 85(3):432-439.
- Zenuto RR (2002) Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo solitario *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) en condiciones de semicautiverio. *Rev Chil His Nat* 75: 165-177.
- Zenuto RR, Lacey EA, Busch C (1999). DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Mol Ecol* 8: 1529-1532.
- Zenuto RR, Malizia AI, Busch C (1999). Sexual size dimorphism, testes size and mating system in two populations of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J Nat His* **33**: 305–314.

VIII - ANEXOS

Tabela 6: Número de alelos observados em cada *locus* polimórfico *Soc*, tamanho dos alelos em pares de bases referente à população total e motivos de repetição.

<i>Locus</i>	n° alelos	Tamanho dos alelos em pares de base e (n° do alelo)	Motivos de Repetição
<i>Soc1</i>	2	281 (alelo 1) - 279 (alelo 2)	Dinucleotídeo
<i>Soc2</i>	3	155 (alelo 1) - 153 (alelo 2) - 143 (alelo 3)	Dinucleotídeo
<i>Soc3</i>	3	129 (alelo 1) - 125 (alelo 2) - 119 (alelo 3)	Dinucleotídeo
<i>Soc7</i>	3	281 (alelo 1) - 275 (alelo 2) - 273(alelo 3)	Dinucleotídeo
<i>Soc8</i>	2	163 (alelo 1) - 157 (alelo 2)	Dinucleotídeo
Total	27		

Tabela 7: Número de alelos observados em cada *primer* e número codificado para cada um dos alelos em cada uma das três subpopulações por *locus*.

<i>Locus</i>	N° de alelos/subpopulação e n° dos alelos					
	A		B		C	
<i>Hai2</i>	2	1 e 2	2	1 e 2	2	1 e 2
<i>Hai3</i>	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3
<i>Hai4</i>	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3	2	1 e 2
<i>Hai5</i>	2	1 e 2	3	1, 2 e 3	2	1 e 2
<i>Hai12</i>	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3
<i>Soc1</i>	2	1 e 2	2	1 e 2	2	1 e 2
<i>Soc2</i>	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3
<i>Soc3</i>	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3	3	1, 2 e 3
<i>Soc7</i>	1	3	2	1 e 3	3	1, 2 e 3
<i>Soc8</i>	2	1 e 2	2	1 e 2	2	1 e 2
Total	24		26		25	

Tabela 8: Descrição dos genótipos da população total de *C. lami* para os dez *loci* utilizados. (f=fêmeas; m=machos; A, B e C= subpopulações; *= não analisado)

Indivíduos	H2	H3	H4	H5	H12	S2	S3	S1	S8	S7
TJ01fB	1/1	1/3	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ02fB	2/2	1/2	*	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ03mB	1/2	1/1	1/1	2/2	2/2	2/2	1/2	1/1	1/1	3/3
TJ04mA	1/1	1/1	1/1	2/2	1/2	2/2	1/2	1/2	1/1	3/3
TJ05mA	1/1	2/3	1/3	1/2	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ06mA	1/1	1/1	1/1	2/2	1/2	2/2	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ07fB	1/1	1/2	1/1	1/1	*	1/3	1/2	1/2	1/1	1/3
TJ08fA	1/1	1/1	1/1	2/2	1/3	2/2	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ09fB	1/2	2/2	1/1	2/2	2/3	1/1	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ10fA	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ11fA	1/1	1/3	2/2	2/2	1/2	2/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ12fA	1/1	1/3	2/2	2/2	1/2	2/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ13fA	1/2	1/1	1/1	2/2	2/2	1/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ14fB	2/2	1/2	2/2	1/2	1/1	2/2	1/1	1/2	1/2	3/3
TJ15mA	1/2	1/2	2/2	2/2	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	3/3
TJ16fB	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ17fB	1/2	1/2	*	1/2	1/3	2/3	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ18mA	1/1	3/3	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ19mB	1/1	1/3	1/1	2/2	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ20fB	2/2	1/3	2/2	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ21mB	1/2	1/2	*	2/2	1/1	1/2	1/2	1/2	1/2	3/3
TJ22fB	2/2	1/3	2/2	2/2	1/1	2/2	1/2	2/2	1/1	3/3
TJ23fB	2/2	1/3	2/2	2/2	1/1	3/3	1/2	1/2	1/1	3/3
TJ24fB	2/2	1/2	*	2/2	1/3	1/1	2/2	1/1	1/2	3/3
TJ25fB	2/2	1/2	1/1	2/2	1/3	1/2	1/1	1/2	1/2	3/3
TJ26mB	1/1	3/3	*	2/2	1/3	1/3	1/2	1/1	1/1	3/3
TJ27mB	1/1	1/1	1/1	1/2	2/2	2/3	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ28fB	1/1	1/2	1/2	1/2	2/3	2/2	1/1	1/1	1/2	1/3
TJ29mB	1/1	3/3	1/2	1/2	1/3	1/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ30fB	1/2	3/3	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	3/3
TJ31mB	1/1	1/3	1/1	1/1	1/3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/3
TJ32fB	1/2	2/3	1/1	2/2	2/3	1/2	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ33mC	1/1	1/2	1/2	1/1	2/3	1/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ34fB	1/1	2/3	1/1	2/2	2/3	1/1	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ35fB	1/2	1/1	*	1/1	2/3	1/1	2/2	1/1	1/1	3/3
TJ36mC	1/2	1/2	1/2	1/2	1/3	1/2	1/2	1/1	1/1	2/3
TJ37fC	1/2	2/2	1/1	2/2	1/2	*	*	1/1	1/1	3/3
TJ38mC	1/1	3/3	1/2	2/2	1/3	1/1	1/3	1/1	2/2	1/3
TJ39mC	2/2	1/1	1/1	1/2	1/3	1/2	1/1	1/1	1/1	1/3
TJ40mC	1/1	1/3	*	2/2	2/3	2/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ41mC	1/2	3/3	1/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	1/2	1/3
TJ42mC	1/1	1/2	*	1/2	2/3	1/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ43mC	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/3	1/2	1/1	1/2	3/3

Continuação da Tabela

TJ44mC	1/1	1/2	2/2	1/2	1/3	2/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ45mC	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ46mC	1/1	2/3	1/1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/1	3/3
TJ47fC	1/1	3/3	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	1/1	1/1	3/3
TJ48mC	1/2	2/2	1/2	1/2	1/3	2/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ49fC	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	2/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ50fC	1/1	2/2	1/1	1/1	1/3	1/2	2/3	1/1	1/1	1/3
TJ52mC	1/2	2/3	*	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ53fC	1/1	1/3	1/1	1/1	1/2	*	*	*	*	*
TJ54fA	1/2	2/2	1/1	2/2	2/3	3/3	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ55fA	1/1	1/3	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ56mB	1/1	1/3	1/3	1/1	1/2	2/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ57fB	1/2	1/3	1/1	2/2	1/2	*	*	*	*	*
TJ58fB	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ59fB	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/2	1/1	2/2	3/3
TJ60fB	1/2	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	1/2	3/3
TJ61mC	1/1	1/3	1/2	1/2	2/3	2/3	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ62mC	1/2	1/3	1/1	1/1	2/3	2/2	1/1	1/1	2/2	3/3
TJ63fC	1/2	1/2	*	2/2	2/3	2/3	2/2	1/1	1/2	3/3
TJ64fC	1/1	3/3	1/2	1/1	1/3	1/3	1/2	1/1	1/2	3/3
TJ65fC	1/1	2/3	2/2	1/2	1/3	1/2	1/2	1/1	2/2	1/3
TJ66fC	1/2	2/3	1/1	2/2	2/2	1/3	1/1	1/2	1/2	3/3
TJ67fC	1/1	1/3	2/2	1/2	3/3	2/2	1/1	1/1	*	3/3
TJ68mA	1/1	3/3	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ69mA	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/3	1/1	1/1	3/3
TJ70mA	1/1	1/3	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ71mA	1/1	1/2	1/3	2/2	1/3	1/3	1/2	1/2	1/1	3/3
TJ74fC	1/1	3/3	1/2	1/2	2/3	1/2	1/2	1/1	1/1	3/3
TJ75mC	1/1	1/2	1/2	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ76mC	1/1	3/3	1/1	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ77fC	1/1	2/3	2/2	2/2	2/2	2/3	1/1	1/1	1/1	1/1
TJ78mC	1/2	2/2	1/1	2/2	1/3	1/3	1/2	1/2	1/2	3/3
TJ79fA	1/2	1/3	1/1	*	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ80mB	1/2	1/2	1/1	*	1/3	2/2	2/2	1/2	1/1	3/3
TJ81fB	1/1	1/3	1/1	*	1/1	1/2	1/2	1/1	*	3/3
TJ82fB	1/1	1/3	1/3	*	1/2	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ83mB	1/1	1/3	1/1	2/2	1/2	2/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ84mB	1/2	1/1	1/1	1/2	1/2	1/2	1/3	1/2	1/1	1/3
TJ85fC	1/1	1/1	1/1	1/1	2/3	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ86fC	1/2	3/3	1/1	1/2	1/3	1/2	1/1	1/1	1/1	3/3
TJ87mC	1/2	2/2	1/1	2/2	2/3	1/3	1/1	1/1	2/2	1/3
TJ88mA	1/2	2/3	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	3/3
TJ89mA	1/1	1/1	1/1	1/2	1/3	*	*	*	*	*
TJ90mB	1/1	3/3	1/1	1/2	1/3	*	*	*	*	*
TJ92fB	1/2	3/3	1/3	1/1	1/1	*	*	*	*	*
TJ93mB	1/2	*	1/1	3/3	1/1	*	*	*	*	*

Tabela 9: Descrição dos *primers* de microssatélites utilizados em *C. lami* no presente trabalho de acordo com Lacey (1999).

<i>Primer</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	T anel. (°C)	n° acesso Genebank
<i>Soc 1</i>	F: AACCTGAGGCACTGCATTCT R: GGAAACTTTGTCCCAGTCT	58	AY007694
<i>Soc 2</i>	F: TGAGCTTCAACTTCCAGCAA R: AGTGTGTTTCTGCCACCTCC	62	AY007695
<i>Soc 3</i>	F: TGACCTACACAGTGAGACCCTG R: GACTTATGCCCTTTTGGCT	64	AY007696
<i>Soc 4</i>	F: CCCTGCACCAAAGAAATAAAA R: TGGGATGAGTTCTGTGTGGT	Não estabelecida	AY007697
<i>Soc 5</i>	F: GAAGGTTGGCAATGACAGAT R: TGCAGCTAAAAGGTGAAGC	58	AY007698
<i>Soc 6</i>	F: CAAGCTCTTGCCCATCACTT R: ACTGCAGCTCAGGGTAGTG	58	AY007699
<i>Soc 7</i>	F: CCCCCACACTGAAAGCGTTAT R: GACTGCCTGGCAACTCAGGTT	58	AY007600
<i>Soc 8</i>	F: TGCAGTAAGCAGAGGCTGAA R: TTGACAGGAAGAATCTGGGG	58	AY007001