

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Filogeografia de *Ctenomys minutus*
(Rodentia: Ctenomyidae)**

Carla Martins Lopes

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS:

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

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Programa Especial de Taxonomia (PROTAX/CNPq)

AGRADECIMENTOS

As palavras não são suficientes para agradecer todos aqueles que ajudaram a concluir essa dissertação. Caso eu tivesse de dividi-la com cada um que colaborou durante todo meu processo de formação, acredito que a menor parte seria minha...

Ao meu orientador Thales de Freitas, pela liberdade que nos concede na forma de orientar, permitindo assim com que seus orientados tornem-se profissionais mais independentes, pelo relacionamento sempre muito humano e convivência amigável.

À Lúcia, Deisi, Luciano, Elmo e Ellen pelas ajudas com questões burocráticas ou não, sempre muito tranquilos para atender meus momentos de histeria.

À Adriana Gava, Camila Castilho, Lígia Tchaicka e Cristina Freygang pelas coletas e cariótipos dos espécimes utilizados neste estudo.

Aos amigos que ajudaram no meu início em Porto Alegre, tornando as saudades de casa e das pessoas queridas menos difíceis de conviver e que sempre vão morar no meu coração: Jéferson, Tábita, Nice, Vander e Lacinha.

Aos amigos extra laboratoriais, pelas conversas, convívio muitíssimo agradável e pelas festas animadas: Milinho, Renata, Binha, Carla morena, Cristine, Guga e Marcinha.

Aos amigos do laboratório: Tati N., Tati T., Gislene, Rodrigo, Fabiano, Pedro, Loira, Simone, Gabriêla, José, Lívia, Camila, Chico, Nice e Claiton, que formam um time maravilhoso, fazendo jus ao ditado de que a união faz a força, posso dizer com muita segurança que amo como irmã cada um de vocês.

Às amigas Gislene Lopes e Gabriela de Paula Fernández-Stolz, que em todo o processo do mestrado, desde a bancada até a análise dos dados, me auxiliaram com inestimável disposição e paciência, muito obrigada.

À minha irmãzinha e segunda mãe Claudia e meus sobrinhos Vinícius e Juninho, pessoas muito importantes da minha pequena família, mas que preenchem todos os espaços, mesmo distantes eternamente em meu coração.

Ao homem mais importante da minha vida e futuro progenitor da minha F1, Arthur de Freitas Brandão, com quem espero ter o prazer de continuar sendo feliz por muito tempo. Obrigada pelo apoio para alcançar meus objetivos, mesmo que isso custasse nossa distância, muito compreensivo e companheiro, sempre com um sorriso no rosto, uma conversa muito agradável e disposição para me ouvir falar de genética e tuco-tucos.

À mulher mais importante da minha vida, minha amada mãe, Elza Martins, por todo seu investimento na minha educação, por acreditar na minha capacidade e por me permitir correr atrás de um sonho. Pelo exemplo de coragem, perseverança e força que não me deixam desistir nunca. Minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	6
2. ABSTRACT.....	7
3. INTRODUÇÃO.....	9
3.1. Roedores.....	9
3.2. Gênero <i>Ctenomys</i>	9
3.3. <i>Ctenomys minutus</i>	12
3.3.1. Variações cariotípicas.....	13
3.3.2. Zonas híbridas intra e interespecíficas.....	15
3.4. Planície Costeira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina: área de ocorrência de <i>Ctenomys minutus</i>	17
3.4.1. Características gerais.....	17
3.4.2. Fatores físicos na morfogênese local.....	17
3.4.3. Evolução paleogeográfica da Planície Costeira.....	18
3.4.4. <i>Ctenomys minutus</i> e a Planície Costeira.....	21
3.5. Contexto genético.....	21
3.5.1. Marcadores moleculares em estudos populacionais.....	21
3.5.1.1. DNA mitocondrial.....	21
3.5.1.2. <i>Loci</i> de microssatélites.....	23
3.5.2. Filogeografia.....	24
4. OBJETIVOS.....	26
5. CAPÍTULO I.....	27
6. CAPÍTULO II.....	51
7. DISCUSSÃO.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. RESUMO

Ctenomys minutus é um roedor subterrâneo que ocorre em uma estreita faixa da Planície Costeira dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, apresentando onze diferentes números cariotípicos ($2n = 42, 46a, 46b, 47a, 47b, 48a, 48b, 49a, 49b, 50a$ e $50b$). Os esforços deste trabalho se concentraram em caracterizar a variabilidade genética e o fluxo gênico entre diferentes populações de *C. minutus* em associação com a distribuição geográfica e os polimorfismos cromossômicos das populações. A estrutura genética geográfica de *C. minutus* foi avaliada através de 407pb da região controladora do DNA mitocondrial (mtDNA), em toda a distribuição geográfica da espécie, e através de cinco *loci* de microssatélites para espécimes distribuídos desde as proximidades das cidades de Mostardas até Jaguaruna. Foram encontrados 34 haplótipos pela análise de 187 indivíduos através do mtDNA e 65 alelos em 202 espécimes para os dados de microssatélites. Grande parte dos haplótipos encontrados está retribuída a uma única população, sendo que os compartilhados ocorrem entre populações vizinhas pertencentes a zonas híbridas intra-específicas. As análises de diferenciação genética foram consistentes com o modelo simples de isolamento pela distância ($r = 46.98\%$, $P = 0.00$; $r = 34.86\%$, $P = 0.039$), através dos dados de mtDNA e *loci* de microssatélites, respectivamente. Um possível padrão de expansão populacional recente foi rejeitado através dos testes de neutralidade de F_S de Fu e D de Tajima ($F_S = -1.676$, $P = 0.36$; $D = 0.696$; $P = 0.81$) e o gráfico de distribuição de *mismatch*. Os resultados indicaram que, em geral, as populações encontram-se fortemente estruturadas, apresentando baixos níveis ou ausência de fluxo gênico (valor global para mtDNA: $F_{ST} = 0.8561$). Para os dados de microssatélites a maior parte das comparações de fluxo gênico pareadas entre as populações foram significativamente divergentes, com 56.36% e 72.72% dos valores de F_{ST} e R_{ST} maiores do que 0.15, respectivamente. Os espécimes estudados, provavelmente, não são pertencentes a uma população panmítica, e as potenciais barreiras geográficas, como rios, encontrados ao longo da Planície Costeira dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina parecem não ter agido, até o momento, como barreiras efetivas ao fluxo gênico entre diferentes populações de *C. minutus* de acordo com os dados de mtDNA. Os diferentes cariótipos compartilhados por esta espécie também parecem não representar barreiras efetivas ao fluxo gênico, com exceção do sistema “b” ($2n = 46b, 47b, 48b, 49b$ and $50b$) que forma

um agrupamento separado, com seus portadores não hibridizando com os de outros cariótipos. Os resultados obtidos para *C. minutus* neste estudo confirmam alguns pressupostos para roedores subterrâneos, como pequenas populações fragmentadas associadas com baixos níveis de dispersão dos indivíduos com hábitos tipicamente solitários.

2. ABSTRACT

The subterranean rodent *Ctenomys minutus* occurs in a narrow stretch of the Brazilian coastal plain in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, showing eleven different karyotypes ($2n = 42, 46a, 46b, 47a, 47b, 48a, 48b, 49a, 49b, 50a$ and $50b$). In this work the effort was focalized on the genetic variability characterization and gene flow of different *C. minutus* populations in association with the geographical distribution and chromosomal polymorphisms of the populations. The geographical genetic structure of *C. minutus* was accessed using 407 pb of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region, for all range distribution of this species, and five microsatellite loci from specimens distributed from the areas of the town from Mostardas to Jaguaruna. 34 haplotypes were found in the analysis of 187 individuals for mtDNA, and 65 alleles for the 202 specimens for the microsatellite data. Most of the haplotypes were exclusive and the shared ones were observed among populations in the same intra-specific hybrid zone. The analysis of genetic differentiation were consistent with a simple model of isolation by distance ($r = 46.98\%$, $P = 0.00$; $r = 34.86\%$, $P = 0.039$) accordingly to mtDNA and microsatellite data, respectively. A pattern of recent population expansion was rejected according to the Fu's F_S and Tajima's D neutrality tests ($F_S = -1.676$, $P = 0.36$; $D = 0.696$; $P = 0.81$) and the mismatch distribution analysis. Results indicated that the most of the populations are strongly structured, having low levels or absence of gene flow (global mtDNA $F_{ST} = 0.8561$). For the microsatellite data most of the pairwise population gene flow comparisons were significantly divergent, with 56.36% and 72.72% of the F_{ST} and R_{ST} values being longer than 0.15, respectively. The specimens studied probably do not belong to a panmictic population, and the potential geographical barriers, like rivers, along the coastal plain of Rio Grande do Sul and Santa Catarina do not seem to be effective barriers to gene flow among populations of *C. minutus*, until this moment, according to the mtDNA.

Likewise, the different karyotypes observed for this species do not represent effective barriers to reproduction, with the exception of the “b” system ($2n = 46b, 47b, 48b, 49b$ and $50b$), which forms a separate cluster and whose carriers do not hybridize with those of the other karyotypes. These results confirm some predictions for subterranean rodents such as small and fragmented populations associated with low levels of adult dispersal, with typically solitary habits.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Roedores

Considerado o grupo mais diverso entre os mamíferos, a ordem Rodentia possui aproximadamente 2000 espécies distribuídas em 29 famílias e 468 gêneros (Nowak, 1999). Ocorrem em praticamente todos os continentes, ocupando uma grande variedade de habitats. Podem ter hábitos arborícolas, terrestres, adaptações à vida semi-aquática e algumas espécies são especializadas à vida subterrânea (Nowak, 1999).

Os vertebrados que permanecem maior parte de sua existência no interior de túneis fechados sob o solo são considerados fossoriais ou subterrâneos (Lacey *et al.*, 2000). A ordem Rodentia possui um grande número de espécies escavadoras subterrâneas, distribuídas em todos os continentes com exceção da Austrália e Antártica (Nevo, 1979; Lacey *et al.*, 2000). As famílias que apresentam espécies fossoriais são: Bathyergidae (África); Geomyidae (América do Norte); Muridae (Ásia, leste europeu e África) Octodontidae e Ctenomyidae (América do Sul) (Nowak, 1999; Lacey *et al.*, 2000).

3.2. Gênero *Ctenomys*

O gênero *Ctenomys* Blainville, 1826 (família Ctenomyidae, subordem Hystricognathi; Woods, 1982), surgiu provavelmente na província de Buenos Aires – Argentina, onde foram encontrados registros fósseis de *Ctenomys* em formações do Terciário (Formação Chapadmalal, Plioceno Superior), implicando uma antigüidade para o gênero maior do que 3 milhões de anos (Contreras *et al.*, 1987; Reig *et al.*, 1990; Lessa e Cook, 1998; Verzi *et al.*, 1999; Verzi, 2002). A partir de então o gênero passou por uma cladogênese expressiva, e sua especiação é considerada como sendo uma das mais explosivas dentre os gêneros de mamíferos (Reig *et al.*, 1990; Cook e Lessa, 1998; Lessa e Cook, 1998).

A alta velocidade de diversificação no clado tem sido sugerida através de estudos filogenéticos, pela persistência de politomias em filogenias obtidas tanto a partir de seqüências de citocromo-b do DNA mitocondrial (Cook e Lessa, 1998; Lessa e Cook, 1998, Mascheretti *et al.*, 2000; Slamovits *et al.*, 2001) como a partir de dados provenientes do DNA nuclear (fragmentos dos genes da rodopsina e vimentina; Castillo *et al.*, 2005).

O gênero é constituído por aproximadamente 56 espécies vivas, amplamente distribuídas desde elevadas altitudes do Altiplano Andino no sul do Peru e Bolívia até o nível do mar no Chile e através da Argentina até o leste da região sul do Brasil (Reig *et al.*, 1990; Lacey *et al.*, 2000).

Popularmente conhecidos como tuco-tucos, os ctenomídeos ocupam habitats bastante diversos, desde campos mais secos até áreas de florestas, ocorrendo preferencialmente em regiões abertas de solo pouco compacto (Lacey *et al.*, 2000).

Possuem hábitos fossoriais, ocupando tocas individuais que se localizam próximas umas das outras formando o que se conhece por tuqueira (Reig *et al.*, 1990; Nowak, 1999; Lacey *et al.*, 2000). Os espécimes permanecem grande parte de sua existência no interior dos túneis, escavados sob o solo, dentro dos quais realizam grande parte de suas atividades biológicas (Reig *et al.*, 1990). A estrutura do túnel consiste de uma galeria principal e várias ramificações partindo desta, terminando em aberturas ou em um fundo cego. Ao longo das galerias são encontradas câmaras especializadas para o depósito de comida ou defecação (Nevo, 1979; Gallardo e Anrique, 1991; Altuna *et al.*, 1999; Busch *et al.*, 2000).

As tocas são mantidas sempre fechadas, a fim de evitar predação e também manter condições mais estáveis que as do meio externo, com menores flutuações de temperatura, alto grau de umidade relativa, concentrações de O₂ entre 15 e 21% e de CO₂ entre 0,5 e 2% (McNab, 1966).

As espécies deste gênero apresentam adaptações morfológicas relacionadas ao hábito fossorial, como corpo e cabeça robustos, maior desenvolvimento da musculatura (principalmente dos membros anteriores), redução da cauda, pavilhões auditivos e olhos, abertura bucal atrás dos incisivos e patas munidas de grandes garras que juntamente com os incisivos auxiliam na escavação das tocas. Alimentam-se basicamente de raízes e folhas de gramíneas (Reig *et al.*, 1990; Nowak, 1999; Lacey *et al.*, 2000).

São tipicamente solitários e territorialistas, o que determina, em geral, uma baixa densidade populacional (Pearson, 1959; Pearson *et al.*, 1968; Nevo, 1979; Reig *et al.*, 1990; Lacey *et al.*, 1998; Bush *et al.*, 2000). No entanto, foram descritas algumas espécies sociais, como *C. sociabilis*, com machos e fêmeas compartilhando os mesmos túneis (Pearson e Christie, 1985) e espécies semi-sociais como *C. peruanus* e *C. porteousi*, com apenas fêmeas compartilhando as tocas, sendo os machos solitários (Pearson, 1959; Contreras e Maceira, 1970).

Sua estrutura populacional é baseada em pequenas populações semi-isoladas de distribuição fragmentada e baixa vagilidade dos adultos (Pearson, 1959; Busch *et al.*, 1989; Reig *et al.*, 1990; Nowak, 1999; Busch *et al.*, 2000; Lacey, 2000).

Entre os ctenomídeos a distribuição fragmentada é bastante evidente, determinada por condições ecológicas e barreiras geográficas (Nevo, 1979; Reig *et al.*, 1990; Cook *et al.*, 1990; Steinberg e Patton, 2000). A maioria das espécies apresenta distribuição em parapatría e alopatria (Pearson, 1984; Reig *et al.*, 1990), embora existam casos de simpatria (Contreras e Reig, 1965; Malizia *et al.*, 1991; Comparatore *et al.*, 1995).

A baixa vagilidade dos indivíduos parece reforçar o isolamento entre os demes, o que restringe o fluxo gênico entre os grupos (Pearson *et al.*, 1968; Nevo, 1979; Reig *et al.*, 1990; Malizia *et al.*, 1995; Freitas, 1995). Segundo Slatkin (1994) o fluxo gênico entre grupos de indivíduos é um forte determinante de sua estrutura, pois estabelece em que grau esta população é uma unidade evolutiva independente. No entanto, dados obtidos sobre taxas de dispersão para espécies de *Ctenomys* são escassos e o uso de métodos diretos para determinar tais taxas é bastante limitado pela dificuldade de acesso ao ambiente subterrâneo (Smith, 1993; Busch *et al.*, 2000; Lacey, 2000).

O uso do método de marcação e recaptura mostrou um maior índice de recaptura de fêmeas e área de vida maior para machos, indicando que os machos dispersam mais (Fernández, 2002). Malizia *et al.* (1995) sugerem que a procura sexual seja o primeiro determinante na migração dos machos e que outros fatores, como a disponibilidade da área, influenciem a dispersão das fêmeas. Busch *et al.* (2000) salientam que baixas taxas de dispersão descritas podem ser resultantes da dificuldade de documentação para o movimento dos animais entre populações naturais.

Características como populações reduzidas e semi-isoladas, baixa vagilidade dos adultos, territorialismo e hábitos solitários associados à ação da deriva genética parecem favorecer a fixação de rearranjos cromossômicos intra e interespecíficos (Lessa e Cook, 1998).

As espécies deste gênero apresentam grande diversidade cariotípica, com números cromossômicos que variam entre $2n = 10$ em *C. steinbachi* a $2n = 70$ em *C. pearsoni* (Reig *et al.*, 1990), sendo que estes rearranjos cromossômicos podem ser uma das possíveis explicações para tanta diversificação encontrada em *Ctenomys* (Lessa e Cook, 1998).

Tamanha diversidade desperta o interesse de evolucionistas para a escolha de tuco-tucos como um modelo para o estudo de processos evolutivos, particularmente com relação à sua grande diversificação cromossômica, especiação e sociabilidade (Lessa e Cook, 1998).

No Estado do Rio Grande do Sul tem-se atualmente descritas quatro espécies do gênero *Ctenomys*. *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830, é a espécie mais amplamente distribuída e a única que não ocorre na Planície Costeira, habitando a região pampiana, a Depressão Central e o norte do Uruguai (Freitas, 1995). *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981, habita a primeira linha de dunas e sua distribuição estende-se desde Arroio Teixeira, ao norte, até a desembocadura do Arroio Chuí, na divisa com o Uruguai, ao sul (Freitas, 1995; Fernández-Stolz, 2007). *Ctenomys lami* Freitas, 2001, ocorre em uma estreita região conhecida como Coxilha das Lombas, nas proximidades do município de Porto Alegre (Freitas, 2001). *Ctenomys minutus* Nehring 1887, alvo de estudo deste trabalho, será comentado detalhadamente a seguir.

3.3. *Ctenomys minutus*

A espécie *C. minutus* (Figura 1) ocorre na Planície Costeira do sul do Brasil, desde o sul do Estado de Santa Catarina, nas proximidades da praia de Jaguaruna, até o município de São José do Norte no Estado do Rio Grande do Sul (Figura 2; Freygang *et al.*, 2004), ocupando uma extensão linear de aproximadamente 500km.

Dentre todas as espécies de tuco-tucos que ocorrem na Planície Costeira, *C. minutus* é a mais amplamente distribuída, sendo que ao norte de sua ocorrência habita a porção oeste da primeira linha de dunas e campos arenosos correspondentes à segunda linha de dunas e a partir da Lagoa dos Barros em direção ao sul de sua distribuição ocupa apenas áreas de campos arenosos, interiorizando-se cerca de 2Km da costa (Freitas, 1995). A primeira linha de dunas corresponde à quarta barreira geográfica, e a segunda linha de dunas corresponde a terceira e segunda barreiras geográficas, todas elas estabelecidas durante a formação da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Freitas, 1995, 1997).

Ctenomys minutus habita, preferencialmente, solos secos, que não sejam compactos e nem alagáveis, ocorrendo geralmente em taludes de estradas ou encostas de dunas (Rui e Gastal, 1994). Apresenta uma nítida preferência por ambientes abertos, o que pode estar correlacionado com a ventilação e troca de gases das tocas (Gastal, 1994).



Figura 1. Exemplar de *Ctenomys minutus* adulto.

3.3.1. Variações cariotípicas

As populações de *C. minutus* possuem notável variação cariotípica (Gava e Freitas, 2004). Estudos realizados por Freitas (1997), Gava e Freitas (2003) e Freygang *et al.* (2004) demonstraram a existência de seis números diplóides com onze cariótipos diferentes para *C. minutus* ($2n = 42$; $2n = 46a$; $2n = 46b$; $2n = 47a$; $2n = 47b$; $2n = 48a$; $2n = 48b$; $2n = 49a$; $2n = 49b$; $2n = 50a$ e $2n = 50b$; Figura 2). Os polimorfismos cromossômicos encontrados são devidos a rearranjos Robertsonianos e fusões *in tandem*, e no caso de um mesmo número diplóide, porém com cariótipos descritos como “a” ou “b”, o que os diferencia são rearranjos em cromossomos distintos (Freitas, 1997; Freygang *et al.*, 2004).

Os rearranjos cromossômicos envolvidos em cada um dos cariótipos foram identificados através da técnica de banda G. Partindo-se do cariótipo $2n = 50a$, encontrado no extremo norte da distribuição de *C. minutus*, pode-se destacar que os cromossomos identificados como 2, 16, 17, 19, 20, 22, 23 e 24 estão envolvidos em alguma forma de rearranjo nos outros 10 diferentes cariótipos encontrados para esta espécie (Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006). Por exemplo, em todos os espécimes de cariótipo “a” ($2n = 46a$, $47a$,

48a, 49a e 50a) e em $2n = 42$ o par cromossômico 2 encontra-se íntegro, enquanto que em todos os cariomorfos reconhecidos como “b” ($2n = 46b, 47b, 48b, 49b$ e $50b$) o par 2 encontra-se fissionado originando dois cromossomos, correspondentes aos braços 2p e 2q, e o cromossomo correspondente ao braço 2p sofreu uma inversão pericêntrica originando um cromossomo metacêntrico (Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006).

Tamanha diversidade de cariótipos revela a ocorrência de polimorfismos cromossômicos em *C. minutus*, que podem ser reflexo de um isolamento geográfico entre diferentes populações desta espécie (Freitas, 1997; Gava e Freitas, 2002, 2003; Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006).

Cada cariótipo pode ser designado por uma área geográfica particular tendo distribuição contígua ou separada por barreiras geográficas. A população com $2n = 46a$ é distribuída por 135 km lineares da margem sul do rio Araranguá até o leste da Lagoa dos Barros, tendo uma distribuição contígua com as populações de $2n = 48a$ localizadas mais ao norte, sendo este cariótipo encontrado desde a Lagoa dos Barros até as proximidades do município de Mostardas (Figura 2; Gava e Freitas, 2003). O cariótipo $2n = 47a$ se localiza em uma região restrita entre a transição dos dois cariótipos acima citados. Seguindo em direção ao sul, são encontrados espécimes com $2n = 42$, 120 km ao sul de Mostardas, seguido pelos cariótipos $2n = 46b$ e $47b$ localizados a 150 km ao sul do município de Tavares, este último formado entre as zonas de contato de $2n = 46b$ com $2n = 48b$, sendo que espécimes com $2n = 48b$ são encontrados nas proximidades do município de Bujuru (Gava, 2003; Freygang *et al.*, 2004). O cariótipo $2n = 49b$ localiza-se na região de transição entre $2n = 48b$ e $2n = 50b$, este último pertencente ao extremo sul da distribuição de *C. minutus*, no município de São José do Norte (Freygang *et al.*, 2004). Com exceção dos cariótipos $2n = 49a$ e $50a$ que estão distribuídos no extremo norte (praia de Jaguaruna, SC) e separados das populações $2n = 46a$ pelo rio Araranguá, os outros cariótipos tem distribuições contíguas sem qualquer barreira física óbvia atualmente (Figura 2; Gava e Freitas, 2003).

Freygang *et al.* (2004) compararam o cladograma obtido pela distribuição dos cariótipos com a distribuição geográfica de *C. minutus*, e inferiram que inicialmente toda a Planície Costeira era colonizada pelo cariótipo $2n = 50a$. O rio Araranguá pode ter dividido a distribuição de $2n = 50a$ originando $2n = 50b$ do lado sul do rio. Também foi inferido, através do cladograma, que os cariótipos $2n = 48b, 46b$ e $48a$ surgiram do cariótipo $2n =$

50b, sendo que duas explicações são possíveis, uma que os cariótipos surgiram independentemente, e a outra, deduzida por parcimônia, de que o cariótipo $2n = 48b$ apareceu inicialmente dentro da área de distribuição de $2n = 50b$ e através de uma inversão produziu o cariótipo $2n = 48a$ e independentemente por uma fusão originou $2n = 46b$.

Assim a distribuição das diferentes formas cariotípicas ao longo da distribuição de *C. minutus* parece estar relacionada com eventos de formação da Planície Costeira (Freitas, 1997; Freygang *et al.*, 2004).

3.3.2. Zonas híbridas intra e interespecíficas

Dentro da ampla distribuição de *C. minutus* têm-se a formação de quatro zonas híbridas intra-específicas entre os cariótipos: a) $2n = 46a \times 2n = 48a$; b) $2n = 46b \times 2n = 48b$; c) $2n = 42 \times 2n = 48a$; d) $2n = 50b$ e $2n = 48b$ (Figura 2; Freitas, 1997; Marinho e Freitas, 2000; Gava e Freitas, 2002, 2003, 2004; Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006). Ainda uma região de hibridação interespecífica é relatada entre *C. minutus* e *C. lami* (El Jundi, 2003; Gava e Freitas, 2003).

A zona híbrida melhor estudada é a existente entre os cariótipos $2n = 46a$ e $2n = 48a$ com ocorrência do híbrido $2n = 47a$, variação no número diplóide que é acompanhada por pequena variação craniométrica (Marinho e Freitas, 2000; Gava e Freitas, 2002, 2003, 2004).

Gava e Freitas (2004) analisaram várias populações desta área usando seis *loci* de microssatélites e observaram uma forte estruturação entre as populações locais, maior do que a estruturação entre as populações de cariótipos diferentes. Os valores baixos de divergência inter-citótipo sugerem que o polimorfismo cromossômico não tem agido como barreira de isolamento.

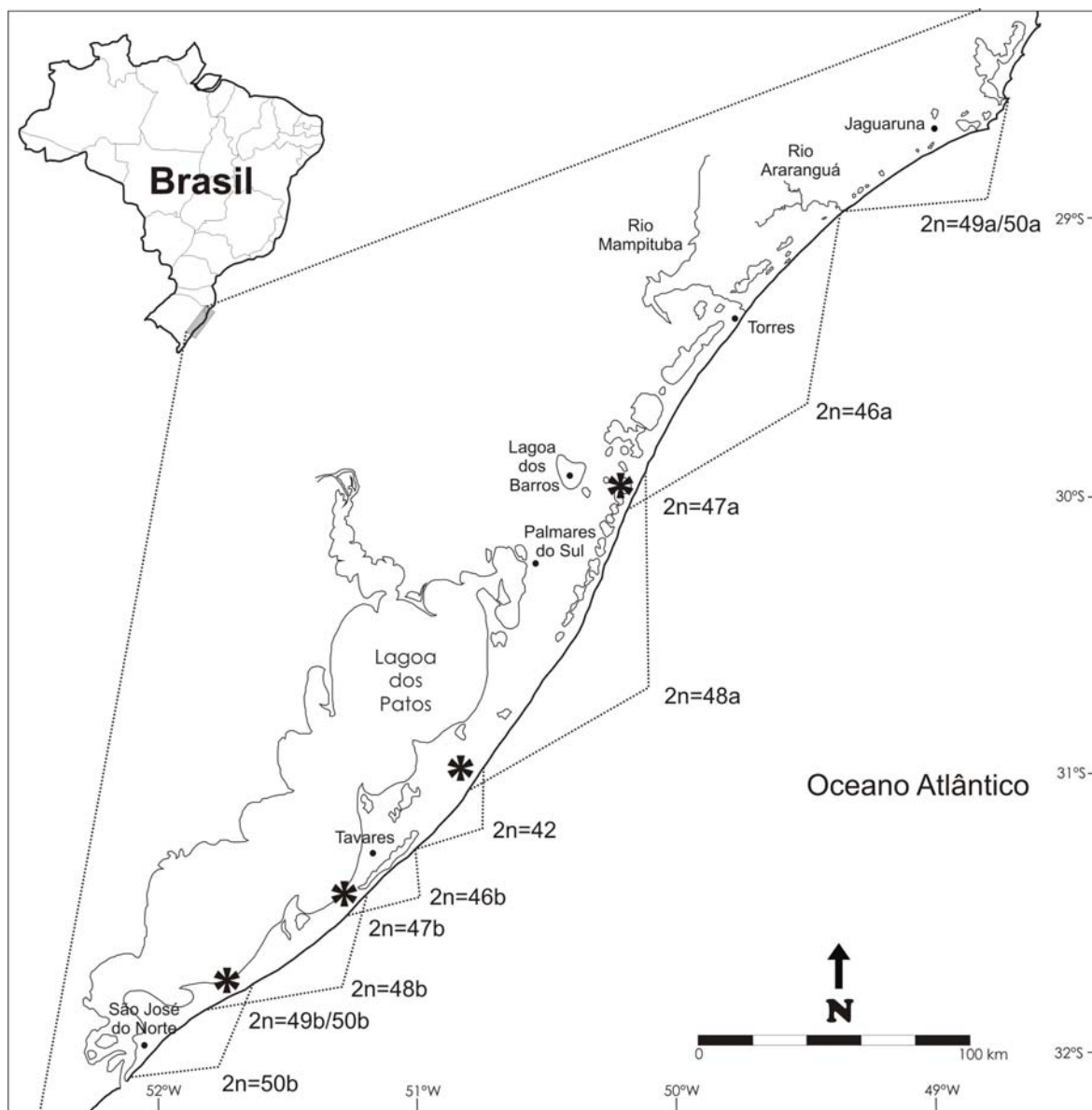


Figura 2. Mapa da distribuição geográfica de *Ctenomys minutus* ao longo da Planície Costeira dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Os limites norte (Jaguaruna) e sul (São José do Norte) da distribuição da espécie e a ocorrência de cada um dos 11 cariótipos estão representados no mapa. Os asteriscos indicam os locais de ocorrência de zonas híbridas intra-específicas.

3.4. Planície Costeira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina: área de ocorrência de *Ctenomys minutus*

3.4.1. Características gerais

A Planície Costeira na qual estão incluídos os litorais do Rio Grande do Sul (RS), parte de Santa Catarina (SC) e o Uruguai pertence ao pacote sedimentar Cenozóico. No Estado do RS a Planície Costeira estende-se através de uma área de aproximadamente 33.000 km², alcançando em alguns pontos uma largura máxima de 100 km, sendo a Planície Costeira mais ampla do país (Tomazelli e Villwock, 2000). A atual linha da costa, praticamente retilínea, possui uma orientação NE-SW e se estende por aproximados 620 km, desde o município de Torres, no extremo norte, até a desembocadura do Arroio Chuí, no extremo sul (Schwarzbold e Schäfer, 1984; Tomazelli e Villwock, 2000).

Apresenta um terreno bastante irregular, tanto nos Estados do RS quanto em SC, geologicamente caracterizado por eventos de depósitos marinhos e eólicos de distintas épocas (Villwock *et al.*, 1986). Tais eventos deram origem a um complexo sistema de lagos, lagoas, rios e dunas que, em alguns casos, podem representar barreiras geográficas naturais ao fluxo gênico entre diferentes populações das espécies do gênero *Ctenomys* que habitam a região (Moreira *et al.*, 1991; Freitas, 2007; Fernández-Stolz, 2007).

Atualmente a Planície Costeira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (até a saída da Laguna) é interrompida de forma permanente em dois locais: as desembocaduras da Laguna de Tramandaí e da Lagoa dos Patos (Tomazelli e Villwock, 2000). Apresenta ainda a desembocadura dos rios Araranguá e Mampituba (Figura 2) e uma área de planície pantanosa nas proximidades do município de Palmares do Sul. Em sua porção leste encontra-se uma extensa zona lacustre que se estende desde o município de Torres até a Lagoa do Peixe nas proximidades do município de Tavares (Figura 2; Freitas, 1995).

3.4.2. Fatores físicos na morfogênese local

O regime de ventos tem um papel fundamental na morfogênese da Planície Costeira já que, além de determinar a dinâmica de formação e erosão de dunas, é o fator básico que modula a hidrodinâmica tanto oceânica quanto dos corpos lagunares da região (Tomazelli e Villwock, 2000). De acordo com Tomazelli (1993) a Planície Costeira encontra-se submetida a um regime bimodal de ventos de alta energia, sendo predominante o originado

no Anticiclone do Atlântico Sul e, como conseqüência de sua incidência NE, as dunas eólicas migram no sentido SW.

Quanto ao regime hidrodinâmico, o transporte e deposição de sedimentos na Planície Costeira estão determinados principalmente pela ação de ondas de longo período proveniente do SE e por vagas locais provenientes principalmente do E-NE (Tomazelli e Villwock, 1992).

Estudos geomorfológicos registram um deslocamento predominante das areias na direção NE, chamado de “deriva litorânea de sedimentos”, confirmado por indicadores geomorfológicos como as desembocaduras não estabilizadas dos rios, arroios e lagunas que deságuam no mar e se deslocam no sentido da deriva. Este fenômeno pode ser exemplificado pela barra da Laguna de Tramandaí que, antes de ser fixada em 1961, migrava em média 200 m por ano. No extremo norte, a desembocadura do rio Mampituba também ilustra esta migração para NE (Tomazelli e Villwock, 2000).

3.4.3. Evolução paleogeográfica da Planície Costeira

Acredita-se que a evolução paleogeográfica da Planície Costeira deu-se a partir do Terciário, através do acúmulo de sedimentos erodidos das terras mais altas adjacentes, originando um sistema de leques aluviais coalescentes ao longo da parte oeste da Planície. Estes depósitos teriam sido subsequenteiramente retrabalhados por no mínimo quatro ciclos transgressivo-regressivos ocorridos durante o Quaternário, sendo os três primeiros associados aos eventos glaciais do Pleistoceno, e o último ao Holoceno, originando quatro sistemas deposicionais complexos chamados de “laguna-barreira” (I – IV; Figura 3) (Villwock *et al.*, 1986; Tomazelli e Villwock, 2000).

O primeiro, e mais antigo, ciclo transgressivo-regressivo ocorreu no início do Pleistoceno, há aproximadamente 400 mil anos, e teria dado origem à região conhecida como Coxilha das Lombas, com cerca de 250 km de extensão, uma largura de 5 a 10 km e orientada no sentido NE-SW. A região ocupada pelo sistema lagunar associado a esta barreira abrange boa parte das bacias do Rio Gravataí e do complexo fluvial do rio Guaíba e sofreu a influência dos eventos transgressivo-regressivos que se sucederam (Villwock *et al.*, 1986; Tomazelli e Villwock, 2000).

O segundo e terceiro ciclos (aproximadamente há 325 e 120 mil anos, respectivamente) deram origem à denominada “Barreira Múltipla Complexa”,

correspondente à segunda linha de dunas, e foram responsáveis pela separação das Lagoas dos Patos e Mirim. A fase regressiva que caracterizou o terceiro ciclo teria atingido o seu máximo há 17 mil anos atrás, dando origem a uma ampla planície que atualmente forma parte da plataforma submarina, retraindo a linha de costa aproximadamente 120m abaixo do seu nível atual (Villwock *et al.*, 1986; Tomazelli e Villwock, 2000).

O quarto e último evento ocorreu por volta do início do Holoceno, teria atingido seu máximo há cerca de 5 mil anos, elevando o nível do mar de 2 a 4 m acima do atual (Tomazelli *et al.*, 2000). A estabilização temporária no final deste evento foi a principal responsável pela implantação de uma barreira de dimensões reduzidas que foi aumentando com o acúmulo de areia e sedimentos fornecidos pela ante-praia inferior e pela plataforma continental interna (Tomazelli e Villwock, 2000). Esta barreira, de natureza dinâmica, constitui hoje o sistema de dunas costeiras, primeira linha de dunas, que se estende ao longo de toda a Planície Costeira do Rio grande do Sul. Além disso, este último evento deu origem a uma depressão lacustre que uniu a Lagoa Mangueira com inúmeras outras lagoas existentes na época (Villwock *et al.*, 1986; Tomazelli e Villwock, 2000).

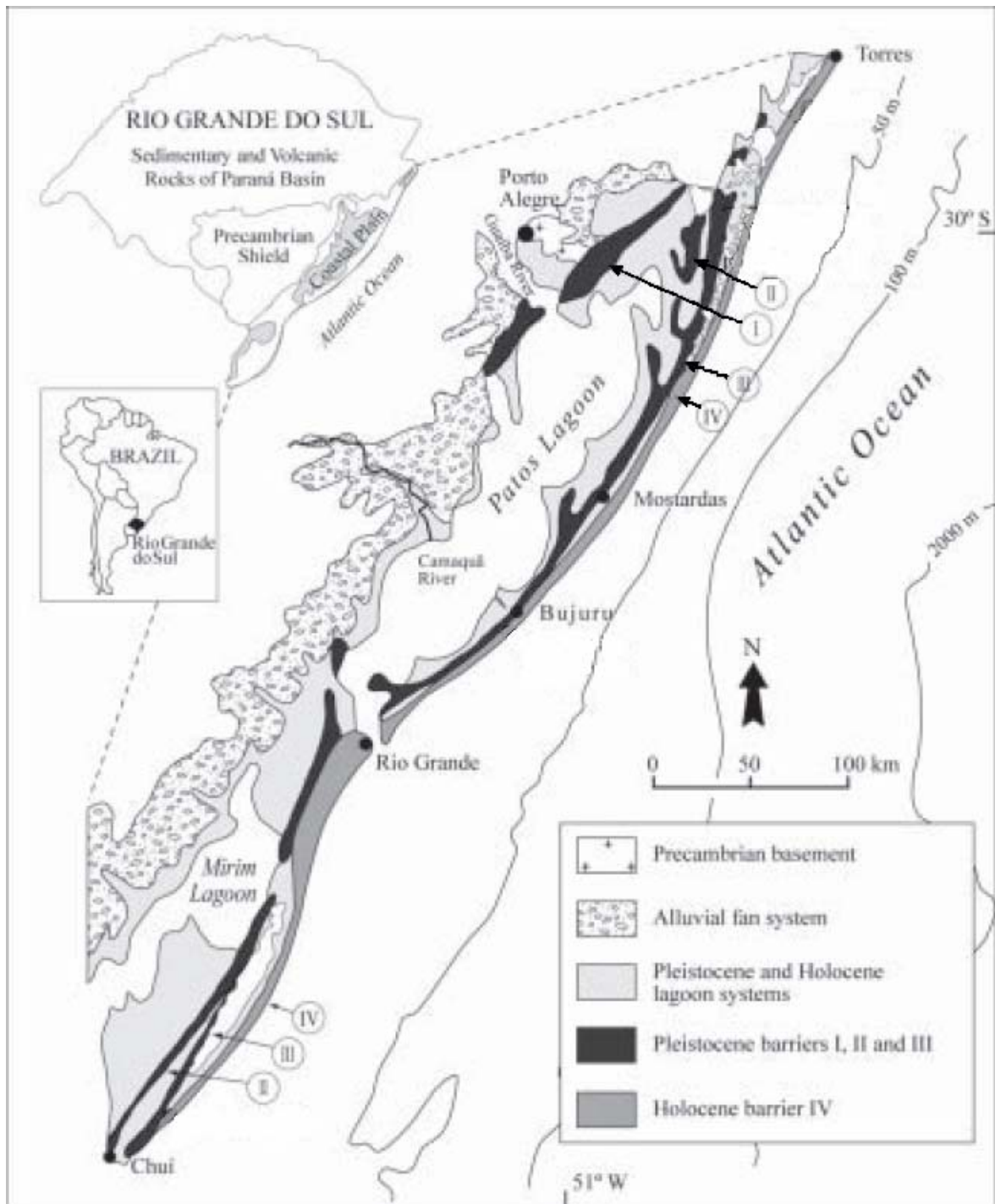


Figura 3. Mapa da localização e geologia simplificada da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Modificado de Tomazelli *et al.* (2000).

3.4.4. *Ctenomys minutus* e a Planície Costeira

Atualmente a distribuição de *Ctenomys minutus* é interrompida pelos rios Mampituba, Araranguá, por terras baixas e alagadiças da região de Palmares do Sul (Freitas, 1995) e por diferentes rodovias e áreas urbanizadas. O Rio Araranguá parece representar uma barreira efetiva ao fluxo gênico entre as populações. Na análise filogenética dos diferentes cariótipos de *C. minutus* o número diplóide $2n = 50a$, que ocorre à sua margem norte, aparece como o mais ancestral dos cariótipos e bastante separado de $2n=46a$ localizado à margem sul (Freygang et al., 2004).

O Rio Mampituba apresenta formação recente e atualmente sua desembocadura encontra-se fixada por molhes para evitar a migração que ocorre para nordeste (Reginato, 1996).

3.5. Contexto genético

3.5.1. Marcadores moleculares em estudos populacionais

A biologia molecular tem proporcionado numerosas técnicas de acesso à variabilidade genética dos organismos, tanto através de polimorfismos de proteínas quanto de DNA (Awise, 1994). Tais técnicas permitem a obtenção de um grande número de marcadores moleculares cobrindo quase todo o genoma do organismo. Métodos estatísticos acompanham este desenvolvimento e têm permitido a manipulação de enormes quantidades de dados (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Por serem bastante polimórficos e possuírem altas taxas de mutação, alguns dos marcadores moleculares mais utilizados em estudos populacionais e filogeográficos são a região controladora do DNA mitocondrial e os *loci* de microsatélites.

3.5.1.1. DNA mitocondrial

O genoma mitocondrial dos animais é haplóide e circular, com um comprimento de 15-20kb. Levando-se em consideração que cada célula possui milhares de mitocôndrias, os organismos apresentam, portanto, milhares de cópias deste genoma (Meyer, 1993; Li e Graur, 2000).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é composto, tipicamente, por 37 genes funcionais, sendo 22 RNAs transportadores, 2 RNAs ribossômicos e 13 RNAs mensageiros, este

último, o único envolvido na síntese de subunidades protéicas que participam da cadeia transportadora de elétrons e da fosforilação oxidativa. Considera-se que o arranjo do genoma mitocondrial não contenha íntrons, e apresente poucos espaçadores intergênicos (Awise, 2000).

O mtDNA é simples em estrutura e econômico em tamanho, sendo que o único grande fragmento não codificante (de aproximadamente 1.000 pb) é a região controladora (*Control Region*, CR), que tem função regulatória na dinâmica da molécula e é predominantemente rica em bases AT (Brown, 1985). Nos vertebrados esta região é referida como *D-loop* (*Displacement-loop*), devido à formação de uma estrutura de fita tripla que gera deslocamentos dinâmicos no começo da replicação do mtDNA (Brown *et al.*, 1986).

A utilização de seqüências do mtDNA para elucidar relações filogenéticas vem sendo amplamente empregadas, pois, apresentam certas vantagens em relação aos marcadores moleculares do DNA nuclear (Awise, 2000). Características como sua herança matrilinear, a ausência de recombinação, altas taxas evolutivas e tamanho efetivo populacional quatro vezes menor do que segmentos equivalentes em autossomos fazem com que o mtDNA seja uma importante ferramenta para os estudos filogenéticos e de eventos evolutivos relativamente recentes, permite ainda revelar grupos geográficos de indivíduos relacionados e analisar as relações entre as matrilineagens dentro de uma população (Hare, 2001; Alberts *et al.*, 2002). Também pode ser utilizado para traçar eventos históricos, como gargalo-de-garrafa, ou para analisar zonas híbridas (Awise, 1994).

Várias hipóteses têm sido consideradas na tentativa de explicar sua rápida evolução: a) o relaxamento das limitações funcionais; b) a alta taxa de mutação devido à ineficiência dos mecanismos de reparo de DNA mitocondrial em relação ao nuclear; e c) o fato de não possuir histonas (Awise, 2000).

A herança materna e a não recombinação entre as moléculas faz com que um genótipo ou haplótipo mitocondrial possa servir para traçar uma genealogia ou mesmo filogenia materna, o que pode auxiliar na compreensão do modo de dispersão de muitos organismos e de acasalamentos preferenciais, dentre outras inferências (Arias e Infante-Malachias, 2001).

Devido às rápidas taxas de substituições de seus nucleotídeos, o mtDNA é adequado para estudos intra e intergenéricos (Bonvicino e Moreira, 2001). De especial

utilidade para estudos que incluam variação em nível intraespecífico ou de espécies fortemente relacionadas, é a região controladora. As taxas de substituição de bases encontram-se acentuadas em duas regiões chamadas de segmentos hipervariáveis (*Hiper-Variable Segment*, HVS) HVS1 e HVS2, com extensões aproximadas de 350 pb e separadas por uma região mais conservada com cerca de 200 pb (Vigilant *et al.*, 1989).

3.5.1.2. *Loci* de microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como STR (*short tandem repeats*) ou SSR (*simple sequence repeats*), consistem em pequenas seqüências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidos *in tandem*, sendo abundantes no genoma dos eucariotos. Em mamíferos, estima-se que os motivos de repetição mais comuns (GT/AC) ocorram em média a cada 30kb (Schlötterer, 1998).

A maioria dos microssatélites encontra-se em cópia simples, facilitando a identificação dos alelos sem ambigüidade. Apresentam-se como locos altamente polimórficos, com alelos codominantes e seletivamente neutros. Outra vantagem no uso deste marcador é que acumulam mutações a uma taxa relativamente constante (Schlötterer, 1998).

As mutações que ocorrem nos microssatélites são mudanças no número de unidades de repetição, causadas por erros no momento da replicação, caracterizado como DNA *slippage*. Durante a fase de replicação, as duas cadeias de DNA homólogas podem ser facilmente alinhadas fora de fase. Estes erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições idênticas, mudando o tamanho final do arranjo, conferindo assim o caráter altamente polimórfico destes locos (Amos e Hoeltzel, 1992; Tautz, 1993; Schlötterer, 1998).

Os alelos dos *loci* de microssatélites podem ser acessados pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), e por apresentarem alelos menores do que 1Kb, permitem a utilização de DNA altamente fragmentado ou em pequenas quantidades (Bruford e Wayne, 1993; Bennett *et al.*, 1998).

São variáveis o suficiente para permitir a identificação dos espécimes amostrados e a realização de inúmeras análises estatísticas de associação dos indivíduos às suas populações de origem (Hansen *et al.*, 2000).

Com relação a aspectos populacionais, *loci* de microssatélites são amplamente utilizados, com diferentes enfoques, em espécies do gênero *Ctenomys*. São aplicados em estudos envolvendo estimativas de fluxo gênico entre populações, inferências sobre deriva genética e migração, diferenciação genética, estrutura populacional, comparações da variabilidade genética entre espécies e populações, paternidade e parentesco (Lacey, 2001; Wlasiuk *et al.*, 2003; El Jundi e Freitas, 2004; Gava e Freitas, 2002, 2003 e 2004; Fernández-Stolz *et al.*, 2007).

3.5.2. Filogeografia

A filogeografia é um campo de estudo baseado nos princípios e processos responsáveis pela distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas intra-específicas ou entre espécies relativamente próximas (Avice, 2000). Para que seja possível analisar e interpretar a forma como são distribuídas as linhagens, um estudo filogeográfico deve utilizar o máximo de informações possíveis, incluindo dados de genética molecular, genética de populações, demografia, filogenética, geologia, geografia histórica, entre outros (Avice, 2000).

Desta forma, a filogeografia constitui-se em um esforço integrativo, entre diversas disciplinas micro e macroevolutivas. De modo geral, a filogeografia age como uma ponte de ligação entre as disciplinas de filogenia e genética de populações (Avice *et al.*, 1987).

A ferramenta molecular mais usada neste tipo de abordagem é a análise de mtDNA, que permite o acompanhamento de rastros genealógicos além dos limites genéticos entre as populações, espécies e grupos taxonômicos mais elevados. O sucesso da filogeografia baseada no DNA mitocondrial deve-se principalmente à descrição aperfeiçoada da distribuição geográfica, relações filogenéticas, distâncias genéticas e tempos de divergência entre linhagens evolutivas de animais (Bermingham e Moritz, 1998; da Silva e Patton, 1998).

Isto levou a melhor compreensão de biogeografias regionais e áreas de endemismo, auxiliando na elaboração de propostas prioritárias para a conservação das biodiversidades taxonômicas e locais (Rojas, 1995; Bermingham e Moritz, 1998; da Silva e Patton, 1998; Firestone *et al.*, 1999).

Estudos filogeográficos utilizando as espécies *C. pearsoni* (Tomasco e Lessa, 2007), *C. australis* (Mora *et al.*, 2006), *C. talarum* (Mora *et al.*, 2007) e *C. flamarioni*

(Fernández-Stolz, 2007), baseados em seqüências da região controladora do mtDNA, têm sido realizados com sucesso devido à possibilidade de melhor descrição dos padrões de distribuições geográficas, de relações filogenéticas e de distâncias genéticas e fluxo gênico entre as diferentes linhagens de cada uma das espécies.

4. OBJETIVOS

- Analisar a variabilidade genética de *Ctenomys minutus* ao longo de toda sua distribuição geográfica na Planície Costeira do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC), utilizando como marcador molecular uma seqüência da região controladora do mtDNA;
- Analisar através de cinco *loci* de microssatélites a variabilidade genética de populações de *C. minutus*, localizadas desde o extremo norte da distribuição da espécie, na praia de Jaguaruna em SC até as proximidades do município de Mostardas no RS;
- Verificar a existência de fluxo gênico entre os diferentes citótipos e as diferentes populações de *C. minutus* através dos marcadores moleculares acima citados;
- Inferir os padrões filogeográficos de *C. minutus* relacionando os resultados obtidos pelos dois marcadores (mtDNA e *loci* de microssatélites) com a existência de barreiras geográficas e os citótipos dos espécimes;
- Contribuir com a compreensão taxonômica e sistemática do gênero *Ctenomys* dentro do Rio Grande do Sul, através da caracterização molecular das diferentes linhagens de *C. minutus*.

5. CAPÍTULO I

PHYLOGEOGRAPHY OF *Ctenomys minutus* (RODENTIA: CTENOMYIDAE)

Carla Martins Lopes^{1,2} & Thales R. O. de Freitas^{1,3,4}

1 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Prédio 43323, P. O. BOX 15053, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Phone: +55-51-3308-6733; E-mail: cmlopes82@hotmail.com

3 Departamento de Genética, Prédio 43323, P. O. BOX 15053, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil

4 (Phone: +55-51-3308-6733; E-mail: thales.freitas@ufrgs.br)

Artigo em preparação

Abstract

Eleven different karyotypes are found within populations of the subterranean rodent *Ctenomys minutus*, along a narrow stretch of the Brazilian coastal plain in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. We examined the geographical genetic structure of this species using mitochondrial DNA (mtDNA) control region sequences. 34 haplotypes were found in the analysis of 407 pb sequences in 187 individuals. Shared haplotypes were observed between populations in the same intra-specific hybrid zone. Genetic differentiation was consistent with a simple model of isolation by distance ($r = 46.98\%$; $P = 0.00$), and a pattern of recent population expansion was rejected according to the Fu's F_S -test ($F_S = -1.676$, $P = 0.36$), Tajima's D -test ($D = 0.696$; $P = 0.81$) and the mismatch distribution analysis. Results indicate that most of the populations are strongly structured, with little or no gene flow among them (global $F_{ST} = 0.8561$). Potential geographical barriers along the coastal plain of Rio Grande do Sul and Santa Catarina do not seem to be effective barriers to gene flow among populations of *C. minutus*. Likewise, the different karyotypes observed for this species do not represent effective barriers to reproduction, with the exception of the "b" system ($2n = 46b, 47b, 48b, 49b$ and $50b$), which forms a separate cluster and whose carriers do not hybridize with those of other karyotypes.

Keywords: subterranean rodents, mitochondrial DNA, control region, karyotypes, geographical barriers

Introduction

Subterranean rodents, specifically tuco-tucos (Ctenomyidae), are exciting organisms for testing hypotheses about evolutionary processes, particularly with regard to chromosomal diversification, divergence of lineages, and speciation (Patton et al., 1996; Lessa and Cook, 1998; Mora et al., 2007). The species of this genus generally occur in relatively small and fragmented populations, have low levels of adult dispersal, and typically solitary habits. Probably because of these characteristics, they show extensive karyotypic variation and commonly occur in small genetic units where genetic variation is low and interpopulation divergence is high (Patton and Smith, 1990; Reig et al., 1990; Smith, 1998; Nowak, 1999; Wlasiuk et al., 2003; Mora et al., 2006). In general, local

differentiation under limited gene flow is expected to characterize species of subterranean rodents (Patton, 1985; Wlasiuk et al., 2003; Alvarez-Castañeda and Patton, 2004; El Jundi and Freitas, 2004; Mora et al., 2006). An assessment of population structure and processes, especially estimation of critical population parameters such as gene flow could be the key to understanding the evolutionary dynamics of the group (Wlasiuk et al., 2003).

The species of the genus *Ctenomys* inhabit the southern part of the Neotropical realm, from 17°S to 54°S latitude and from the Andes to the Atlantic Ocean (Reig et al., 1990). This is the most speciose group of all subterranean rodents, and they are among the most geographically variable mammals (Reig et al., 1990; Cook and Lessa, 1998; Lessa and Cook, 1998; Lessa, 2000; Slamovits et al., 2001; Castillo et al., 2005).

Ctenomys minutus Nehring, 1887, occurs in southern Brazil, along a 500 km stretch of the coastal plain from Jaguaruna Beach in the state of Santa Catarina to the city of São José do Norte in the state of Rio Grande do Sul (Figure 1; Freygang et al., 2004). This species occupies second, third, and fourth barrier-lagoon systems, formed during the Pleistocene-Holocene periods in the course of four transgressive-regressive changes in the level of the Atlantic Ocean (Villwoock et al., 1986). In the northern portion of its distribution, it occupies sandy fields and dunes (first dunes line), while to the south near Barros Lake, the animals live only in sandy fields (second dunes line) (Freitas, 1995). The landscape of the coastal plain of Rio Grande do Sul and Santa Catarina is characterized by lakes, lagoons, rivers, and dunes that can sometimes represent natural geographical barriers to gene flow between different populations of *Ctenomys* that inhabit this region (Moreira et al., 1991; Freitas, 2007; Fernández-Stolz, in prep.).

The populations of *C. minutus* have a notable chromosomal variation. Studies by Freitas (1997), Gava and Freitas (2003), and Freygang et al. (2004) demonstrated the existence of eleven different karyotypes for *C. minutus* ($2n = 42, 46a, 46b, 47a, 47b, 48a, 48b, 49a, 49b, 50a$ and $50b$). The chromosomal polymorphisms found are due to Robertsonian rearrangements and tandem fusions. In the case of the same diploid number with karyotypes described as “a” or “b”, the difference is based on rearrangements in different chromosomes and a pericentric inversion in one chromosome for the “b” system (Freitas, 1997; Freygang et al., 2004).

The distribution of these karyotypes is interesting, because the $2n = 50$ is found at both ends of the geographical range. However, at the center of the chromosomal range it is

reduced to $2n = 42$ through chromosomal rearrangements, suggesting that this distribution only occurs because the coastal plain of southern Brazil is narrow (Freitas, 1997; Freygang et al., 2004) (see Figure 1).

Among these eleven karyotypes, there are intra-specific hybrids between: a) 46a x 48a; b) 42 x 48a; c) 46b x 48b; d) 48b x 50b (Freitas, 1997; Marinho and Freitas, 2000; Gava and Freitas, 2002, 2003, 2004; Freygang et al., 2004; Freitas, 2006).

These characteristics reveal that the chromosomal polymorphisms in *C. minutus* may reflect geographical isolation among different populations of this species (Freitas, 1997; Gava and Freitas, 2002, 2003; Freygang et al., 2004; Freitas, 2006).

The goals of this study were to analyze the genetic variation and gene flow of different *C. minutus* populations throughout its entire distribution, using sequences of the mtDNA control region. Specifically, we correlated these results with the occurrence of hypothetical geographical barriers to gene flow and to the different karyotypes described for this species.

Material and Methods

Sample collection

The tissue samples (organs or a biopsy of ear and tail, preserved in 95% ethanol and stored at -20°C) were obtained from 187 individuals of *C. minutus*. All individuals were collected and karyotyped previously in other studies (Freitas, 1997; Freygang et al., 2004). Samples comprised between 1 to 20 individuals from each of 31 localities along the entire distributional range of the species (see Table 1).

Laboratory techniques

DNA extraction followed the protocol of Medrano et al. (1990). A fragment of the mtDNA control region was amplified by polymerase chain reaction using the primers TucoPro (5' - TTC TAA TTA AAC TAT TTC TTG - 3'; Tomasco and Lessa, 2007) and TDKD (5' - CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG - 3'; Kocher et al., 1989). Amplification was carried out in a total volume of 20.0 μL containing the following components: 2.0 μL of DNA (10 – 50 ng/ μL) used as a template, 0.2 μM of each primer, 0.2 μM dNTP, 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl_2 and 1.0 unit of Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL Life

Sciences/ Invitrogen, Carlsbad, California). Polymerase chain reaction amplifications were performed with an initial denaturation of 1 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 48°C, and 1 min of extension at 72°C, and a final extension of 5 min at 72°C (following Tomasco and Lessa, 2007). PCR products were purified using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (GIBCO-BRL Life Sciences/Invitrogen, Carlsbad, California), performed following the guidelines of the suppliers, and sequenced in an ABI Prism 3100 (Applied Biosystem) automated sequencer, using the TucoPro primer used in the PCR.

Statistical analysis and population genetic structure

Sequence electropherograms were visually inspected using CHROMAS 2.31 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), and aligned using the CLUSTAL W algorithm with default options, implemented in MEGA3.1 (Kumar et al., 2004). The ambiguous sequences were reamplified as many times as needed to obtain a clean electropherogram. Alignments were checked and edited by hand if necessary. We used DNAsp 4.10.9 (Rozas et al., 2003) to assess the polymorphic sites, to define haplotypes and to estimate haplotype diversity (Hd – Nei, 1987), and ARLEQUIN 3.11 (Excoffier and Schneider, 2005) to determine gene diversity (h , the probability that two randomly chosen mtDNA lineages were different in the sample), nucleotide diversity (π per nucleotide site, the probability that two randomly chosen homologous nucleotides were different in the sample) and neutrality tests such as Tajima's D (Tajima, 1989) and Fu's F_S (Fu, 1997) at global and within population levels.

The program ARLEQUIN 3.11 was used for computing global and pairwise estimates of gene flow (Hudson et al., 1992). Genetic differentiation between populations was characterized by estimating pairwise F_{ST} (Weir and Cockerham, 1984). Sequential Bonferroni corrections were applied to correct for multiple comparisons (Rice, 1989), with $\alpha = 0.05$ to adjust the statistical significance levels. With this same program we calculated the mean number of migrants per generation (Nm).

An analysis of molecular variance (AMOVA – Excoffier et al., 1992) was performed with ARLEQUIN 3.11 to estimate the partitioning of genetic variation and to test the hypothesis that the present geographical barriers provide a good explanation for the genetic divergence observed in *C. minutus*. Two different tests were considered. First, the

samples were separated into 5 groups considering karyotypes and possible geographical barrier characteristics: i) the population from Jaguaruna and Jaguaruna Beach localities, isolated on the northern edge by the Araranguá River; ii) populations from Passo de Torres, Gaivotas Beach, and Morro dos Conventos Beach, isolated on the north by the Mampituba River and on the south by the Araranguá River; iii) populations from Barco Beach and Guarita, which inhabit only the dunes line; iv) all populations from Mostardas to Traíras and Caieiras lakes, which inhabit only sandy fields without any apparent geographical barrier, and v) only specimens with the “b” karyotype, which have a inversion on chromosome 2 and do not show a hybrid zone between them and the other karyotypes. The second test also considered 5 groups, but separated according to the results of the phylogenetic tree, minimum spanning tree, and the proximity of the populations: i) specimens from Morro dos Conventos Beach to Jaguaruna and Jaguaruna Beach; ii) populations from Barco Beach to Gaivotas Beach; iii) populations from Palmares do Sul to Traíras and Caieiras lakes; iv) specimens from Mostardas to Km 53 on the Capivari-Tavares road; and, v) only specimens with the “b” karyotype.

To test for positive correlations between gene flow estimates and geographical distances (Slatkin, 1993), a Mantel nonparametric test (Mantel, 1967), implemented in ARLEQUIN 3.11, was used to examine patterns of isolation by distance. The logarithmic values of pairwise F_{ST} and geographical distances were plotted on a graph. Statistical significance was tested using 10.000 random permutations.

To assess the demographic history of populations, we did an analysis of mismatch distribution (Rogers and Harpending, 1992) in ARLEQUIN 3.11, with 1000 random permutations of bootstrap, to check for the occurrence of past events affecting the population size, such as contractions or expansions. This result was compared with the result from the neutrality tests.

Phylogenetic analysis

To determine the appropriate model of nucleotide sequence evolution, we used the Akaike Information Criterion (AIC) as implemented in MRMODELTEST 2.2 (Nylander, 2004), which is a modified version of David Posada's Modeltest 3.6, used to choose among 24 different models the appropriate one to apply in a phylogenetic Bayesian inference. The substitution model that provided the best fit to our datasets was Hasegawa-Kishino-Yano

(HKY; Hasegawa et al., 1985), with a proportion of invariable sites (I) = 0.7381, and the correction gamma value (G) = 0.6011. A phylogenetic analysis using Bayesian inference was performed with MRBAYES 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). A Markov chain Monte Carlo search was performed with 2.000.000 simulations, sampling trees every 1.000 generations. The first 500 trees (burn-in) were discarded. Homologous sequences of other species of this genus (*C. rionegrensis* and *C. torquatus*) were used as a outgroups in the phylogenetic tree.

The topological relationship between the control region haplotypes was estimated using the minimum spanning tree (MST) approach (Figure 3; Excoffier and Smouse, 1994) implemented in ARLEQUIN 3.11.

Results

Genetic diversity

We obtained 407 pb of the control region sequenced from 187 specimens with: 44 variable sites, 1 singleton, 41 parsimony informative sites, and a total of 47 mutations. Only one gap (insertions–deletions) was found among sequences in the site 159. For the analysis of phylogenetic relationships, all 187 sequences were used. For population analysis, samples were pooled together from localities no more than 20 km distant in continuous regions (between km 96 and km 115 on the Capivari-Tavares road, for example) with no obvious geographical barriers that could restrict gene flow, or no more than 7 km distant in regions with apparent geographical barriers or human disturbance (between Fortaleza and Suzana lakes, for example). These joinings among localities were done to consider a single population (see Table 1).

Population divergence

We found 34 different haplotypes for *C. minutus* (Gene Bank accession numbers XXXX to XXXX). Eight were shared among neighboring populations located in the hybrid zones between karyotypes 46a x 48a or between karyotypes 48a x 42 (see Figure 3). The longest distance between two populations that shared haplotypes (H9) was 49 km between the localities km final and km 96 of the Capivari-Tavares road (see Figure 3 and Table 1). The other 26 haplotypes were exclusive. The total haplotype diversity was (Hd) = 0.958.

Measures of genetic variability, including haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity, for all populations sampled are shown in Table 2.

The gene flow estimates among all 20 populations yielded a high F_{ST} value (0.8561). However, for the 190 pairwise F_{ST} combinations obtained, only 27 showed non-significant P values ($\alpha_c = 0.0002631$), ranging from -0.1026 between EB and CT populations to 1.000 in 15 different comparisons (population abbreviations given in Table 1). The largest values of the pairwise comparisons showed F_{ST} up to 0.25, considered high values, and suggested absent or reduced gene flow among a large part of the *C. minutus* populations.

The Nm values supported this pattern of reduced gene flow between the *C. minutus* populations. 92.63% of the Nm pairwise estimates values were between 0.00 to 0.80, the other Nm values were between 0.82 to 2.15, and only one comparison showed a high value ($Nm = 12.58$) between populations MR and FR (population abbreviations given in Table 1).

The two AMOVA tests showed that a large percentage of genetic variation was explained among the considered groups, 42.96% ($F_{CT} = 42.96$; $P = 0.00$) in the first structure, and 52.02% ($F_{CT} = 59.44$; $P = 0.00$) in the second. The second test demonstrated a higher percentage of genetic variation for the comparisons among groups compared to the first. These results can be interpreted as the second group subdivision being more realistic to explain the partition of genetic variation in *C. minutus* geographical distribution (Table 3).

Mantel's test detected a significant, positive correlation between genetic and geographical distances for the set of sequences ($r = 46.98\%$; $P = 0.00$). This pattern of isolation by distance was also detected in the plot of pairwise geographical distances and F_{ST} estimates (Figure 4).

The neutrality tests showed differences in global values and significances. The global F_s -test was negative and non-significant ($F_s = -1.676$; $P = 0.36$). The overall Tajima's D^* -test was both positive and non-significant ($D = 0.696$; $P = 0.81$). The majority of the localities showed positive and non-significant values (Table 2).

The mismatch distribution analysis not recovered a recent history of population expansion (Figure 5).

Phylogenetic relationships among haplotypes

The Bayesian phylogenetic tree (Figure 2) showed a polytomy at the origin of four clusters, each one corresponding to a geographical region. Each cluster contained neighbor population haplotypes, with the exception of haplotype 23 (H23) present in specimens from East Barros Lake and Trairas Lake, which grouped in the cluster formed by specimens from the first dunes line. Polytomies may be the result of insufficient or conflicting data, and therefore a technique artifact, or they may indicate a real event, practically simultaneous, of cladogenesis, in more than two lineages within the same species, which seems to be the case for the different *C. minutus* lineages. The haplotypes H32 from MC Beach and H33 from population Jg remained together and formed a separate branch from H34 formed by Jg population specimens.

The minimum spanning tree resembled a tree pattern: haplotypes linked among neighbor population haplotypes, showing a biased relationship with the geographical distribution (Figure 3). However, haplotypes H33 and H34, from the same population (Jg), were linked in extremely different parts of the network. Haplotype 23 was newly grouped with haplotypes formed by individuals that live in the first dunes line.

Discussion

Ctenomys minutus has a linear-like geographical distribution along the coastal plain of Santa Catarina and Rio Grande do Sul States in Brazil. When species have a linear distribution, the dispersal and gene flow will be restricted or limited to a single direction. This feature, when associated with the low vagility characteristic of subterranean rodents including tuco-tucos (Smith and Patton, 1984; Lacey, 2000), can cause a pattern of isolation by distance. Species of tuco-tucos that inhabit coastal areas, such as *C. pearsoni* (Tomasco and Lessa, 2007), *C. flamarioni* (Freitas, 1994; Fernández-Stolz et al., 2007), *C. australis* (Contreras and Reig, 1965; Vassallo et al., 1994, Mora et al., 2006), and *C. talarum* (Mora et al., 2007), also show a strong association with a narrow coastal dune habitat, with a predominant linear distribution. In the cases of *C. pearsoni*, *C. flamarioni*, and *C. talarum*, the pattern of isolation by distance, associated with its nearly linear geographical distribution, was described. In addition, these species also have populations

showing a regime of local differentiation under limited gene flow (see Tomasco and Lessa, 2007; Mora et al., 2007; Fernández-Stolz, in prep.).

The significance of Mantel's test, the Bayesian tree topology, the pairwise gene flow and Nm estimates, the plot of geographical distances versus estimates of gene flow, and the linear distributional range corroborate these expectations in the case of *C. minutus*.

In Table 1 and in the MST topology (Figure 3), only eight haplotypes of a total of 34 found, are shared among neighbor populations, which was considered a low value compared with other species of this genus, which generally have many shared haplotypes among different populations (see Mora et al., 2006; Tomasco and Lessa, 2007; Fernández-Stolz et al., in prep.).

Most of the 190 pairwise combinations showed high values of F_{ST} (> 0.25). Only 27 combinations showed significant P -values, demonstrating the absence of or limited gene flow among these populations. This fact can be explained by at least three factors: a) a technique artifact, because some populations have few individuals ($n = 3$), which can distort the analysis; b) most of the haplotypes are not shared among populations; and c) mtDNA is a maternally inherited marker, and the results should be interpreted as an indication of low levels of female dispersion rather than truly limited gene flow.

The analyses performed to assess the possibility that the populations of *C. minutus* have experienced a recent population expansion fail to reject a scenario of constant population size.

Significant negative values of a neutrality test are indicative of an excess of low frequency and recent mutations, under the standard neutral model, which suggests a recent population expansion. Tajima's D -test was positive and non-significant ($D = 0.465$; $P > 0.10$) and the more sensitive Fu's F_S -test of neutrality for the entire set of *C. minutus* populations demonstrated a negative non-significant value ($F_S = -1.676$; $P = 0.36$).

If a recent population expansion has occurred, the haplotype tree topology is star-like, with one haplotype at high frequency connected to a low-frequency haplotypes, by a few changes. However, the MST topology for *C. minutus* presents balanced frequencies of haplotypes, connected, in general, for two or more mutations by difference (Figure 3).

A scenario of recent population expansion is also not compatible with the results obtained in the Mantel's test and in the global mismatch distribution. The first, suggest that *C. minutus* populations are differentiating under a model of isolation by distance, possibly

evidencing an equilibrium between gene flow and local genetic drift. The second, a multi-modal mismatch distribution (Figure 5), suggest a constant population size and/or sustained subdivision for a long time.

The Bayesian phylogenetic tree showed some polytomies. Polytoamy was also observed by Lara et al. (1996) in Echimyidae rodents. This was confirmed for *Ctenomys* by Lessa and Cook (1998), Mascheretti et al. (2000), Slamovits et al. (2001), Mora et al. (2006), and Tomasco and Lessa (2007), who observed that several basic relationships between species of the genera are poorly understood and suggested that the polytoamy is due to simultaneous radiation events.

Freygang et al. (2004) constructed a consensus tree obtained from the chromosome banding data for the distribution of parental karyotypes ($2n = 42, 46a, 46b, 48a, 48b, 50a,$ and $50b$) of *C. minutus*, using *C. lami* as the outgroup. This cladogram also demonstrates a polytoamy giving rise to four branches, one originating the karyotypes $46a$ and 42 , and the other three branches originating the karyotypes $48a, 46b,$ and $48b$. They inferred that, initially, the entire coastal plain was colonized by the $2n = 50a$ karyotype. The Araranguá River may have divided the distribution of the $2n = 50a$ karyotype to form the $2n = 50b$ on the southern side, and then the other karyotypes were formed, directly or indirectly, by rearrangements from $2n = 50b$. The $50a$ and $50b$ karyotypes were outside of the polytoamy, and $50a$ was the outermost karyotype in the cladogram.

In the phylogenetic tree (Figure 2), haplotype H34 appears near the outgroups, occupying a basal position, suggesting an earlier cladogenesis condition. H34 corresponds to the Jaguaruna and Jaguaruna Beach localities, having $2n = 49a$ and $50a$, which corroborates the hypothesis suggested by Freygang et al. (2004) that the entire coastal plain was possibly colonized by the $2n=50a$ karyotype.

The Mampituba and Araranguá rivers do not seem to be effective geographical barriers to gene flow among *C. minutus* populations. In the case of the Mampituba River, populations were sampled on the left bank, PsT, and the right bank, Gua. When the Bayesian tree is observed, we can see that the haplotypes from these populations (PsT: H28, H29, and H30; Gua: H26 and H27) remain together in the same cluster. In the MST topology, H28 and H29 are linked in H26, separated by 3 mutations.

Considering the Araranguá River, gene flow was observed between the populations from both banks, MC on the right and Jg on the left. Although the Jaguaruna locality is far

from the left bank, the H32 from MC and H33 from Jg remained together in the Bayesian tree, with a posterior probability equal to 1.00 and in MST with two mutations by difference.

These results, allied with the results from AMOVA tests, confirmed that these two rivers, up to the present, could not act as an effective geographical barrier. One possible cause to explain this pattern is the low discharge and the transient status of the mouths of these rivers (Tomazelli and Villwock, 2000; S. Dillenburg, personal communication). The low discharge results in shifting of the river mouths, which sometimes allows contact between the populations from opposite banks. Recently the banks of both rivers were fixed (S. Dillenburg, personal communication), and the time since this was done apparently was not sufficient to isolate the populations on the different sides.

The AMOVA results showed that genetic variation was evenly distributed among hierarchical levels, and corresponded with geographical distances. However, the first test, considering characteristics such as karyotypes and geographical barriers, did not provide the best explanation for the subdivisions of groups, suggesting that the Araranguá and Mampituba rivers could not act as effective geographical barriers to gene flow among the *C. minutus* populations. The second test, structured to consider the results of the Bayesian tree, MST and the proximity of the populations, could explain better the hierarchical genetic variation subdivision and is discussed above.

The highly significant fixation indices indicated that genetic structuring is as strong among populations within the groups as among all populations. The first group was formed by the Jg and MC populations, located at the extreme northern limit of the *C. minutus* distribution. The second group was formed by populations from Gai to Bar with only individuals that live in the first dune line, all of them with the 46a karyotype. The third included the populations from CT to Pal with individuals that show karyotypes 46a, 47a and 48a, and live in the second dunes line located near the intra-specific hybrid zone between $2n = 46a$ and $2n = 48a$. The probable geographic separation between the second and third groups is the environmental discontinuity between the second and first dunes lines. Environmental characteristics such as soil hardness influence morphological differences in the specimens, principally in the anterior and posterior limbs and in the cranium, because they are burrowers. Differences in skull morphology in this same region, within individuals with $2n = 46a$, were observed by Freitas (2005).

The fourth group was formed by populations from IR, MR, and FR with $2n = 42$ and 48a, living near the intra-specific hybrid zone between karyotypes 42 x 48a. Finally, the last group included only the “b” karyotypes (46b, 47b, 48b, 49b, 40b), with populations from TvC to SJN. One possible reason for the separation between this and the fourth group may be the incompatibility between karyotypic forms. In all the “a” system karyotypes ($2n = 46a, 47a, 48a, 49a, \text{ and } 50a$) and in $2n = 42$, chromosome pair 2 was found entire; whereas in all of the “b” karyotypic system ($2n = 46b, 47b, 48b, 49b \text{ and } 50b$) the same chromosome pair was found fissioned, originating two chromosomes, corresponding to the 2p and 2q arms; and the chromosome corresponding to the 2p arm underwent a pericentric inversion, forming a metacentric chromosome (Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006). Probably this inversion makes it difficult to recognize homologue pairs and can act as a postzygotic isolation mechanism to avoid the occurrence of hybrid zones and gene flow among carriers of the different karyotype systems.

Within each karyotype system, “a” plus $2n = 42$ or “b”, the different diploid numbers cannot act as effective barriers to avoid gene flow among *C. minutus* populations. The same population sometimes contains individuals with different diploid numbers, as in the case of East Barros Lake (see Table 1). Alternately, in some cases the same haplotype is shared between two different karyotypes, such as H9, which is shared between $2n = 42$ and $2n = 48a$ (see Table 1). This demonstrates that different karyotypes do not seem to represent effective barriers to reproduction, with the exception of the two karyotype systems, since no hybrid zones were recorded between carriers of the neighboring $2n = 42$ x $2n = 46b$, as mentioned above.

References

- Alvarez-Castañeda S T, Patton J L (2004) Geographic genetic architecture of pocket gopher (*Thomomys bottae*) populations in Baja California, Mexico. *Mol Ecol* 13:2287–2301
- Castillo H A, Cortinas M N, Lessa E P (2005) Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *J Mammal* 86:170–179
- Contreras, J R, Reig O A (1965) Datos sobre la distribución del género *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) en la zona costera de la Provincia de Buenos Aires comprendida entre Necochea y Bahía Blanca. *Physis* 25:169–186
- Cook J A, Lessa E P (1998) Are rates of diversification in subterranean South American Tuco-Tucos (Genus *Ctenomys* Rodentia: Octodontidae) unusually high? *Evolution* 52:1521-1527
- El Jundi T A R, Freitas T R O (2004) Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia: Ctenomyidae). *Hereditas* 140:18-23
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491
- Excoffier L, Smouse P E (1994) Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics* 136:343–359.
- Excoffier L G L, Schneider S (2005) ARLEQUIN version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50
- Fernández-Stolz G P, Stolz J F B, Freitas T R O (2007) Bottlenecks and dispersal in the tuco-tucos-dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *J Mammal* 88:935-945
- Freitas T R O (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 T R O (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil (Rodentia: Octodontidae). *Stud Neotrop Fauna* 30:53-59
- Freitas T R O (1997) Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). *Genet Mol Biol* 20:1-7
- Freitas T R O (2005) Analysis of skull morphology in 15 species of the genus *Ctenomys*, including seven karyologically distinct forms of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). University of California Publications in Zoology 243-267
- Freitas T R O (2006) Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. *Genetica* 126:227-235

- Freitas T R O (2007) *Ctenomys lami*: the highest chromosomal variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system. *Acta Theriol* 52:(2)171-180
- Freygang C C, Marinho J R, Freitas T R O (2004) New karyotypes and some considerations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the coastal plain of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. *Genetica* 121:125-132
- Fu Y X (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925
- Gava A, Freitas T R O (2002) Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia; Ctenomyidae). *J Mammal* 83:843-851
- Gava A, Freitas T R O (2003). Inter and intra-specific hybridization in tuco-tuco (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica* 119: 11-17
- Gava A, Freitas T R O (2004) Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southeastern Brazil (Rodentia; Ctenomyidae) *J Mammal* 85(6):1201-1206
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22:160-174
- Hudson R R, Slatkin M, Maddison W P (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583–589
- Huelsenbeck J P, Ronquist F (2001) Mrbayes: bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755
- Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, Edwards S V, Paabo S, Villablanca F, Wilson A C (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6196-6200
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163
- Lacey E A (2000) Spatial and social systems of subterranean rodents. In *Life underground: the biology of subterranean rodents* (E. Lacey, J. Patton, and G. Cameron, eds.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois 257–293
- Lara M C, Patton J P M, Silva N F (1996) The simultaneous diversification of South American Echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome *b* sequences. *Mol Phylogenet Evol* 5: 403–413
- Lessa E P, Cook J A (1998) The Molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Mol Phylogenet Evol* 9:88-99
- Lessa E P (2000) The evolution of subterranean rodents: a synthesis. In: Lacey E, Patton J, Cameron G (eds) *Life underground: the biology of subterranean rodents*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. pp 389–420.

- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220
- Marinho J R, Freitas T R O (2000) Intraspecific craniometric variation in a chromosome hybrid zone of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi). *Int J Mammal Biol* 65: 226–231
- Mascheretti S, Mirol P M, Giménez M D, Bidau C J, Contreras J R, Searle J B (2000) Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae: Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Biol J Linn Soc* 70: 361–376
- Medrano J F, Aesen E, Sharrow L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43
- Mora M S, Lessa E P, Kittlein M J, Vassallo A I (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Rodentia: Ctenomyidae) in sand - dune habitats: Evidence of recent population expansion. *J Mammal* 87:1192-1203
- Mora M S, Lessa E P, Cutrera A P, Kittlein M J and Vassalo A I (2007) Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Mol Ecol* 16(16):3453-3465.
- Moreira D M, Franco M H L P, Freitas T R O and Weimer T A (1991) Biochemical polymorphism and phenetic relationships in rodents of the genus *Ctenomys* from Brazil. *Biochem Genet* 29:601-615
- Nehring A (1887) Über die *Ctenomys*-Art aus Rio Grande do Sul (Süd Brasilien). *Sitzungsber Ges Naturf Fr*, vol4, 45-57
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York
- Nowak R M (1999) *Walker's mammals of the world*. Hopkins J (ed) London University Press.
- Nylander J A A (2004) MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Patton, J L (1985) Population structure and the genetics of speciation in pocket gophers, genus *Thomomys*. *Acta Zool Fennica* 170:109–114
- Patton, J L, 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 J L, da Silva M N F, Malcolm Jr (1996) Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents. *Mol Ecol* 5: 229–238
- Reig O A, Busch C, Ortells M O, Contreras J L (1990) An overview of evolution, systematics, population biology and molecular biology in *Ctenomys*. In: Nevo E and Reig O A (eds) *Biology of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels*, Allan Liss, New York. pp 422.
- Rice W W (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225
- Rogers A R, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.

- Rozas J, Sánchez-Delbarrio J C, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphisms analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497
- Slamovits C H, Cook J A, Lessa E P, Rossi M S (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* 18:1708–1719
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47:264-279
- Smith M F, Patton J L (1984) Dynamics of morphological differentiation: temporal impact of gene flow in pocket gopher populations. *Evolution* 38:1079–1087
- Smith M F (1998) Phylogenetic relationships and geographic structure in pocket gophers in the genus *Thomomys*. *Mol Phylogenet Evol* 9:1–14
- Tajima F (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595
- Tomasco I, Lessa E P (2007) Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. In: Kelt D A, Lessa E P, Salazar-Bravo J, Patton J L (eds) *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*. University of California Press, USA, pp 859 – 882
- Tomazelli L J, Villwock J A (2000) O Cenozóico no Rio Grande do Sul Geologia da Planície Costeira. In: Holz M, De Ros L F (eds) *Geologia do Rio Grande do Sul*. CIGOUFRGS, Porto Alegre, pp 375-406
- Vassalo A I, Kittlein M J, Busch C (1994) Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae). *J Mammal* 75:725–732
- Villwock J A, Tomazelli L J, Los E L, Dehnhardt E A, Horn F N O, Bachi F A, Deunhardt B A (1986) Geology of the Rio Grande do Sul coastal province. In: Rabassa J, Balkema A A (eds) *Quaternary of South America and Antarctic peninsula*. Rotterdam
- Weir B S, Cockerham C C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370
- Wlasiuk G J, Garza C, Lessa E P (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



Figure 1. Distribution of *Ctenomys minutus* on the coastal plain of the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul in Brazil, showing the distribution of the karyotypes. Asterisks indicate intra-specific hybrid zones. Sample localities: **Jg**: Jaguaruna; **Jgb**: Jaguaruna Beach; **MC**: Morro dos Conventos Beach; **Gai**: Gaiotas Beach; **PsT**: Passo de Torres; **Gua**: Guarita Beach; **Bar**: Barco Beach; **Cai**: Caieira Lake; **Traí**: Traíras Lake; **Osó**: Parque Marechal Osório; **Emb**: Emboaba Lake; **For**: Fortaleza Lake; **Suz**: Suzana Lake; **Barr**: Barros Lake; **Pass**: Passinhos; **Pit**: Pitangueira; **PalS**: Palmares do Sul; **km53**: Capivari-Tavares road km 53; **km64**: Capivari-Tavares road km 64; **km96**: Capivari-Tavares road km 96; **km101**: Capivari-Tavares road km 101; **km108**: Capivari-Tavares road km 108; **km115**: Capivari-Tavares road km 115; **km125**: Capivari-Tavares road km 125; **km final**: Capivari-Tavares road km final; **Cem**: Cemitério road; **Tv**: Tavares; **Bj1**: Bujuru 1; **Bj2**: Bujuru 2; and **SJN**: São José do Norte.

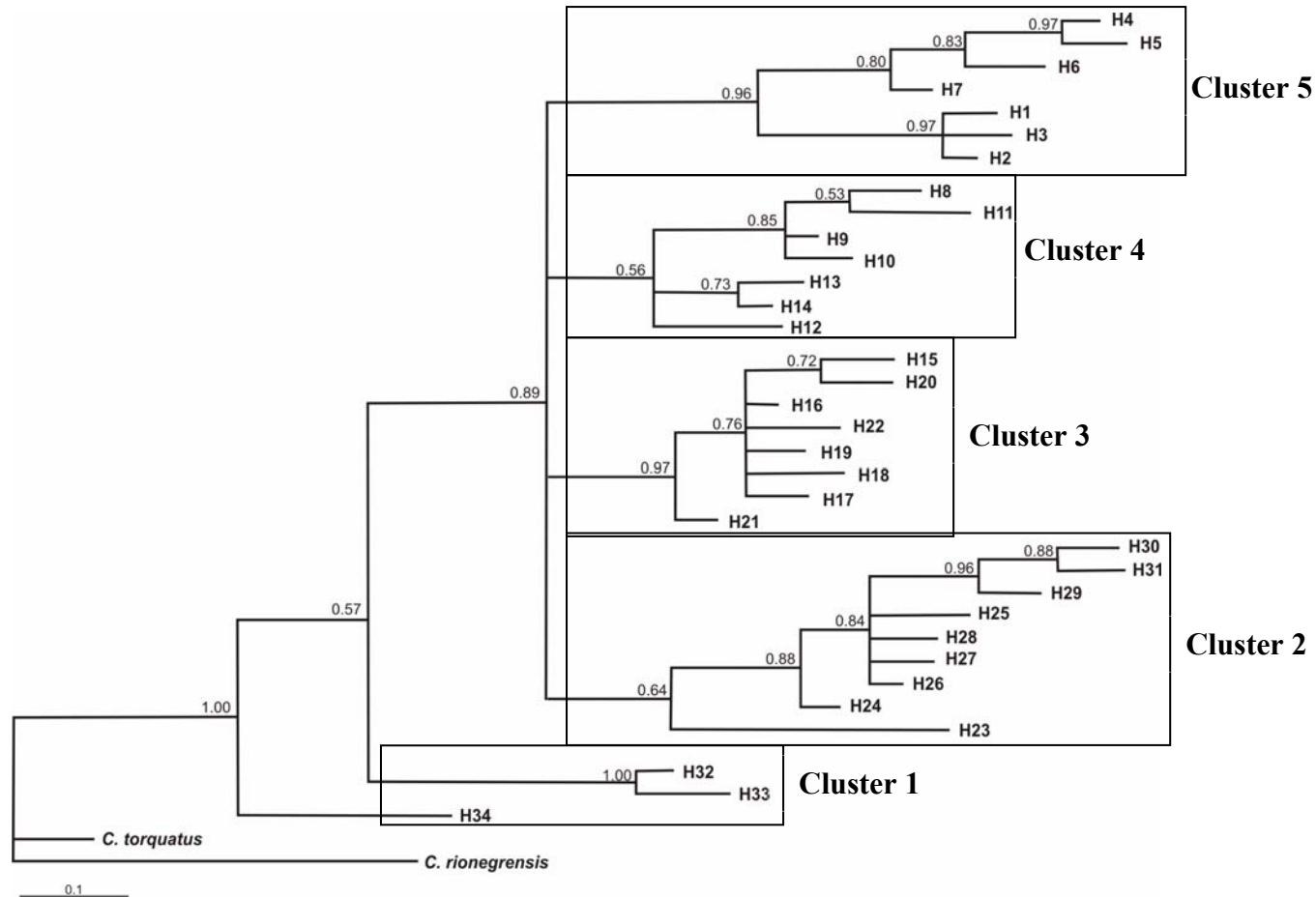


Figure 2. Bayesian tree of 34 mitochondrial DNA haplotypes for *Ctenomys minutus*. Accession numbers for the outgroups: *C. torquatus* (F. A. Fernandes, personal communication) and *C. rionegrensis* (AY755461). The posterior probabilities are given on the branches. Correspondence among haplotypes and populations (see Table 1 and Figure 1): **cluster 1** - formed by individuals from MC and Jg populations in the northernmost part of the *C. minutus* distribution; **cluster 2** - formed by individuals that inhabit dunes from Gai to Bar, with 2n = 46a and H23 correspond to specimens from populations CT and EB; **cluster 3** - formed by individuals involved in the contact zone between 2n = 46a and 2n = 48a, for populations from CT to Pal; **cluster 4** - individuals involved in the contact zone between 2n = 48a and 2n = 42, for populations from IR to FR; and **cluster 5** - individuals with “b” karyotypes.

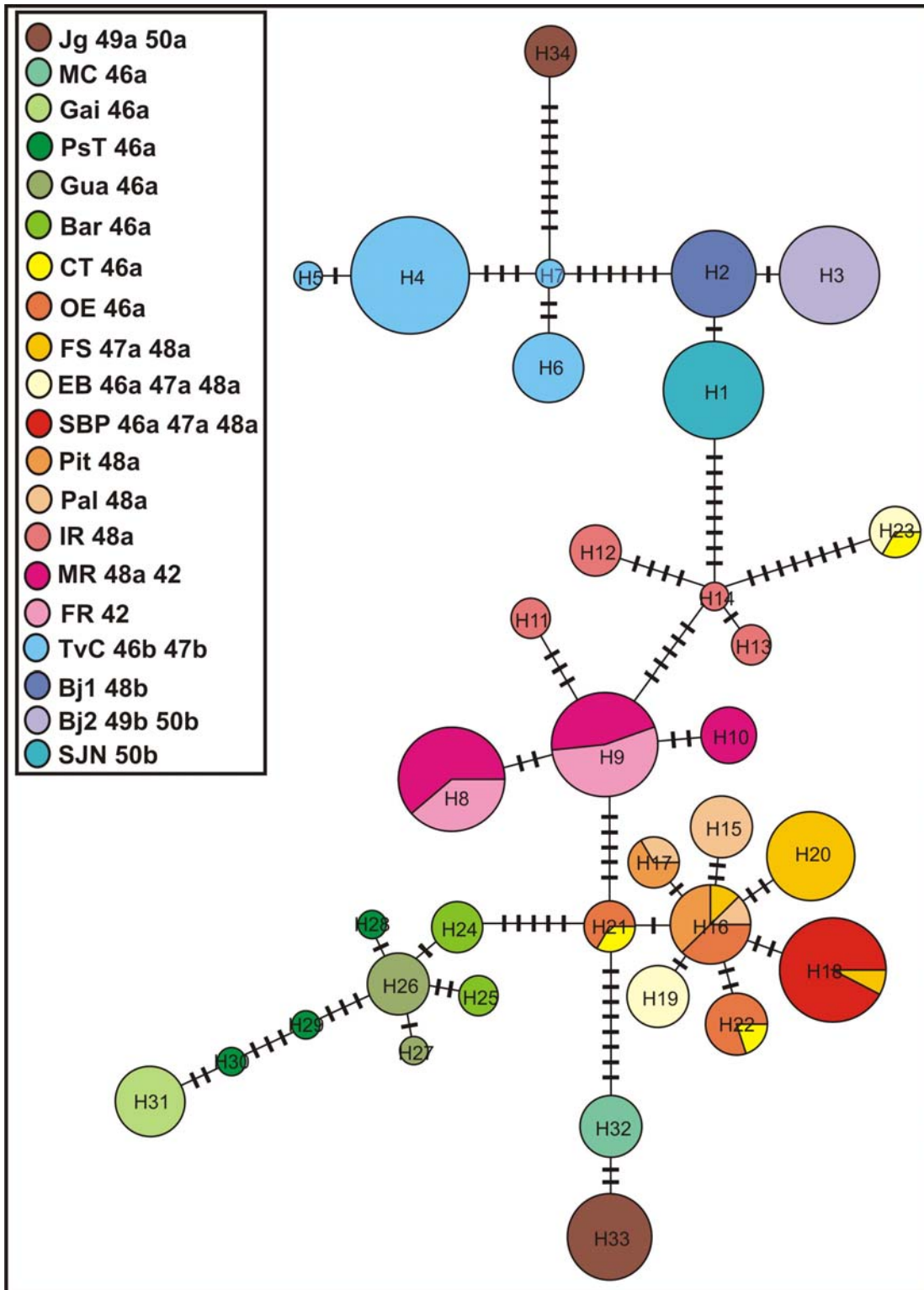


Figure 3. Minimum spanning tree topology for 34 mitochondrial control region haplotypes of *Ctenomys minutus*. Circle areas are proportional to haplotype frequencies. Haplotype numbers and population abbreviations correspond to those of Table 1. The colors represent different populations, as indicated on the upper left side of the figure. Population abbreviations correspond to those of Table 1.

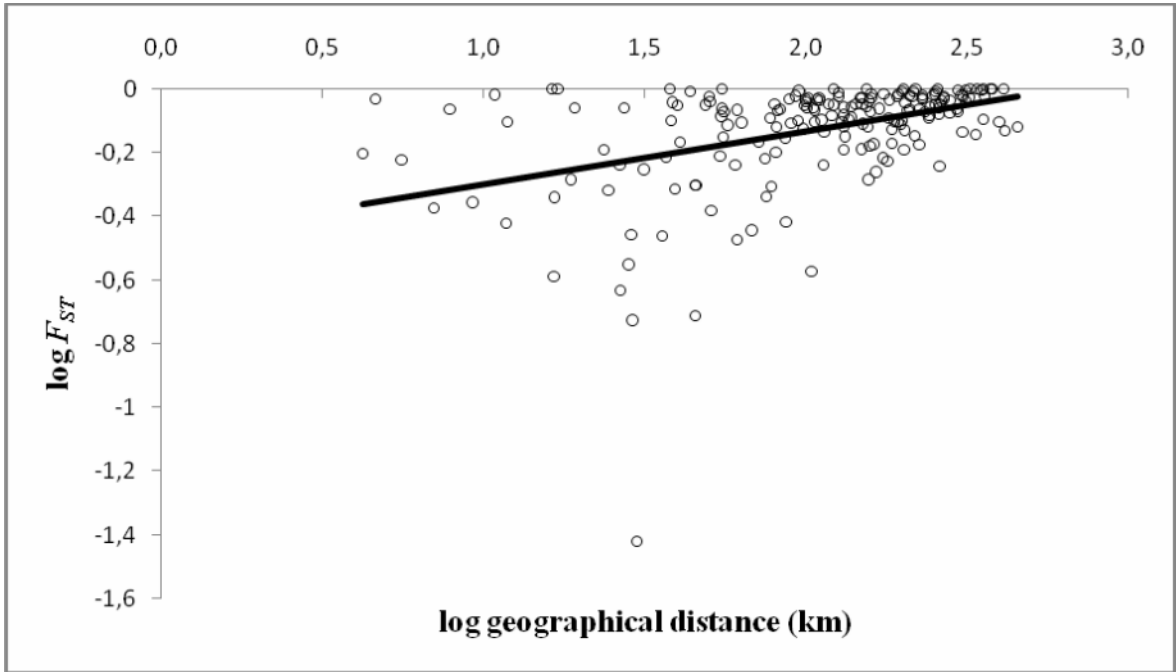


Figure 4. Relationships among pairwise geographical distances and estimates of F_{ST} based on mitochondrial control region sets of sequences.

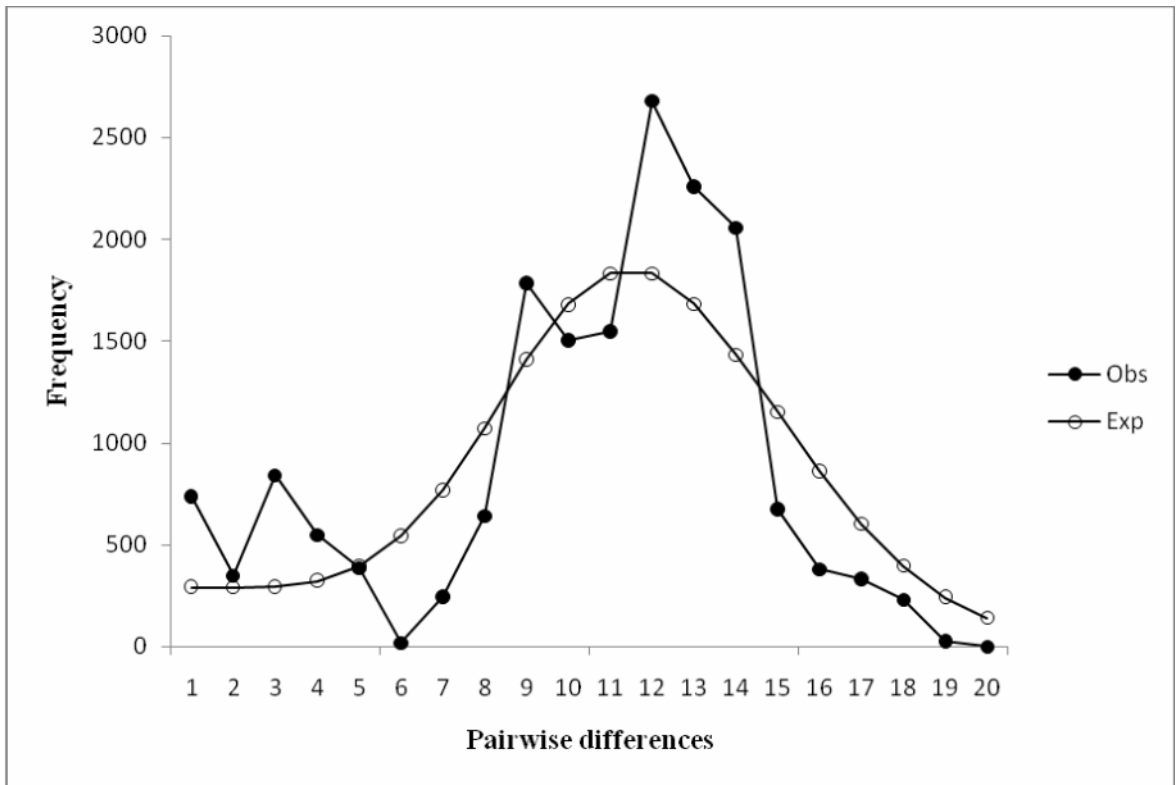


Figure 5. Observed and expected mismatch distributions for *Ctenomys minutus*. Open circles: expected distributions; solid circles: observed distributions.

Table 1. Localities (with abbreviations) where samples of *Ctenomys minutus* were obtained, number of sequences per locality (N°S), number of individuals per karyotype (N°K), number of specimens per haplotype (N°H) and population abbreviation (P).

Locality	N°S	N°K	N°H	P
Jaguaruna (Jg)	4	50a = 4	H33 = 3 / H34 = 1	Jg
Jaguaruna Beach (Jgb)	8	50a = 3 / 49a = 5	H33 = 6 / H34 = 2	MC
Morro dos Conventos Beach (MC)	5	46a = 5	H32 = 5	Gai
Gaivota Beach (Gai)	6	46a = 6	H31 = 6	PsT
Passo de Torres (PsT)	3	46a = 3	H28=1/ H29=1/H30=1	Gua
Guarita Beach (Gua)	6	46a = 6	H26 = 5 / H27 = 1	Bar
Barco Beach (Bar)	5	46a = 5	H24 = 3 / H25 = 2	Cai
Caieira Lake (Cai)	1	46a = 1	H22 = 1	CT
Traíras Lake (Traí)	2	46a = 2	H21 = 1 / H23 = 1	OE
Parque Marechal Osório (Osó)	5	46a = 5	H21 = 2 / H22 = 3	FS
Emboaba Lake (Emb)	4	46a = 4	H16 = 3 / H22 = 1	EB
Fortaleza Lake (For)	9	47a = 4 / 48a = 5	H18 = 1 / H20 = 8	SBP
Suzana Lake (Suz)	3	47a = 1 / 48a = 2	H16 = 1 / H20 = 2	Pit
East Barros Lake (Barr)	7	46a=3 / 47a=1 / 48a=3	H19 = 5 / H23 = 2	Pal
South Barros Lake (Barr)	8	47a = 1 / 48a = 7	H18 = 8	IR
Passinhos (Pass)	4	48a = 4	H18 = 4	MR
Pitangueira (Pit)	5	48a = 5	H16 = 3 / H17 = 2	FR
Palmares do Sul (PalS)	7	48a = 7	H15=5 / H16=1 / H17=1	TvC
Capivari-Tavares road km 53 (km53)	5	48a = 5	H12=2 / H13=2 / H14=1	Bj1
Capivari-Tavares road km 64 (km64)	3	48a = 3	H11 = 2 / H12 = 1	Bj2
Capivari-Tavares road km 96 (km96)	4	48a = 4	H9 = 4	SJN
Capivari-Tavares road km 101 (km101)	2	48a = 2	H9 = 2	
Capivari-Tavares road km 108 (km108)	5	42x48a = 5	H8 = 5	
Capivari-Tavares road km 115 (km115)	3	42 = 3	H8 = 2 / H9 = 1	
Capivari-Tavares road km 125 (km125)	2	42 = 2	H10 = 2	
Capivari-Tavares road km final (km final)	14	42 = 14	H8 = 6 / H9 = 6 / H10 = 2	
Cemitério road (Cem)	4	46b = 4	H4 = 4	
Tavares (Tv)	20	46b = 17 / 47b = 3	H4=12/H5=1/H6=6/H7=1	
Bujuru 1 (Bj1)	12	48b = 12	H3 = 12	
Bujuru 2 (Bj2)	9	49b = 7 / 50b = 2	H2 = 9	
São José do Norte (SJN)	12	50b = 12	H1 = 12	
Total	187		34 haplotypes	20

Table 2. Number of sequences (N°S), haplotype diversity (*Hd*), nucleotide diversity (π), and Tajima's *D*-test and Fu's *F_S*-test values for populations of *Ctenomys minutus*. Abbreviations for the populations are given in Table 1. Asterisk indicates populations for which Tajima's *D* and Fu's *F_S* tests were not calculated because they have only one haplotype.

Population	N°S	<i>Hd</i>	π	Tajima's <i>D</i>		Fu's <i>F_S</i>	
				<i>D</i>	<i>p</i>	<i>F_S</i>	<i>p</i>
Jg	12	0.4091	0.1301	1.0043	0.8570	9.1498	0.9990
MC	5	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	*	*
Gai	6	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	*	*
PsT	3	1.0000	0.0909	0.0000	0.7780	0.1335	0.2810
Gua	6	0.3333	0.0075	-0.9330	0.2510	-0.0027	0.2320
Bar	5	0.6000	0.0409	1.5727	0.9770	2.4285	0.8720
CT	3	1.0000	0.1969	0.0000	0.6650	0.9568	0.4350
OE	9	0.7222	0.0341	1.3712	0.9230	1.1520	0.7600
FS	12	0.3182	0.0213	-1.0227	0.1820	0.5598	0.5840
EB	7	0.4762	0.1082	0.8943	0.8340	5.9549	0.9900
SBP	12	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	*	*
Pit	5	0.6000	0.0136	1.2247	0.9360	0.6261	0.5140
Pal	7	0.5238	0.0281	0.0503	0.5960	0.4064	0.5340
IR	8	0.8214	0.1169	1.0599	0.8600	2.2705	0.8330
MR	14	0.5385	0.0244	1.93304	0.9820	2.7485	0.8860
FR	16	0.7000	0.0400	1.5901	0.9540	2.4966	0.8980
TvC	24	0.5109	0.0323	0.1761	0.6440	1.0694	0.7390
Bj1	12	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	*	*
Bj2	9	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	*	*
SJN	12	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	*	*

Table 3. Hierarchical analysis of molecular variance considering the phylogenetic tree, minimum spanning tree and the proximity of the populations. The fixation indices (F -statistics) and their respective variance components are shown. Asterisks indicate statistical significance, $P = 0.00$.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation indices
Among groups	4	535.468	3.3106	59.44	$F_{CT} = 0.5944^*$
Among populations	15	205.154	1.4577	26.17	$F_{SC} = 0.6453^*$
Within populations	167	133.800	0.8012	14.39	$F_{ST} = 0.8562^*$

6. CAPÍTULO II

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF THE SUBTERRANEAN RODENT

Ctenomys minutus (RODENTIA: CTENOMYIDAE)

Carla Martins Lopes^{1,2} & Thales R. O. de Freitas^{1,3,4}

1 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Prédio 43323, P. O. BOX 15053, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Phone: +55-51-3308-6733; E-mail: cmlopes82@hotmail.com

3 Departamento de Genética, Prédio 43323, P. O. BOX 15053, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil

4 (Phone: +55-51-3308-6733; E-mail: thales.freitas@ufrgs.br)

Artigo em preparação

Abstract

This paper characterizes the variation at five microsatellite loci among populations of *Ctenomys minutus* with variable degrees of chromosomal divergence distributed parapatrically along the coastal plain of southeastern Brazil. A molecular survey of 202 specimens was carried out to assess the genetic relationships among populations and chromosomal polymorphisms ($2n = 42, 46a, 47a, 48a, 49a$ and $50a$). Most of the pairwise population comparisons were significantly divergent, with 56.36% and 72.72% of the F_{ST} and R_{ST} values greater than 0.15. These results concord with the pairwise estimates of migrant numbers showing high structure. The specimens studied cannot be regarded as belonging to a panmictic population. Mantel's test indicated the hypothesis that geographical distances are responsible for the genetic differentiation ($r = 34.86\%$; $P = 0.039$). The molecular analysis of variance demonstrated that the main percentage of variation is explained at the individual level (61.82%). Our data confirmed some predictions for subterranean rodents, such as small and fragmented populations associated with low levels of dispersal and typically solitary habits.

Key words: *Ctenomys minutus*, subterranean rodent, microsatellites, chromosomal polymorphism, population differentiation

Introduction

Ctenomys minutus, Nehring, 1887, occurs in southern Brazil, along a 500 km stretch of the coastal plain from Jaguaruna Beach in the state of Santa Catarina to the city of São José do Norte in Rio Grande do Sul (Figure 1; Freygang et al., 2004). In general, this region has a landscape characterized by lakes, lagoons, rivers, and dunes that can sometimes form natural geographical barriers to gene flow among different local populations of *Ctenomys* (Moreira et al, 1991; Freitas, 2007; Fernández-Stolz, in prep.).

Ctenomys minutus posses a striking chromosomal variation, with eleven different karyotypes ($2n = 42, 46a, 46b, 47a, 47b, 48a, 48b, 49a, 49b, 50a$ and $50b$) distributed among polymorphic populations (see Figure 1; Freitas, 1997; Gava and Freitas, 2003;

Freygang et al., 2004). The chromosomal polymorphisms found are due to Robertsonian rearrangements and tandem fusions, and in the case of the same diploid number with karyotypes described as “a” or “b”, the difference is based on rearrangements in different chromosomes and a pericentric inversion in the 2p arm chromosome for the “b” system (Freitas, 1997; Freygang et al., 2004).

Among these eleven karyotypes, four intra-specific hybrid zones have been described. The two best characterized are $2n = 46a \times 2n = 48a$ forming $2n = 47a$, occurring from Barros Lake to Suzana Lake (Gava and Freitas, 2002, 2003, 2004), and the other between karyotypes $42 \times 48a$ near the town of Mostardas, showing intermediate karyotypic forms with 25 different fundamental numbers (Castilho et al., in prep). Two more karyotype intra-specific hybrid zones have been described: $46b \times 48b = 47b$ and $48b \times 50b = 49b$ (see Figure 1; Freitas, 1997; Marinho and Freitas, 2000; Gava and Freitas, 2002, 2003, 2004; Freygang et al., 2004; Freitas, 2006).

The species of tuco-tuco (Ctenomyidae) commonly occur in small genetic units where genetic variation is low and interpopulation divergence is high. Some species can show extensive karyotypic variation. The probable causes are related to common characteristics such as their occurrence in relatively small and fragmented populations, associated with low levels of dispersal, and typically solitary habits (Patton and Smith, 1990; Reig et al., 1990; Smith, 1998; Nowak, 1999; Wlasiuk et al., 2003; Mora et al., 2006). An assessment of population structure and processes, especially estimation of critical population parameters, such as gene flow, could be the key to understanding the evolutionary dynamics of the group (Wlasiuk et al., 2003).

Microsatellites are a class of genetic markers that are propitious for the analysis of intra-specific populations because they exhibit high levels of polymorphisms. They have been used in a diverse array of applications in tuco-tucos, including: estimates of gene flow among populations, inferences about genetic drift and migration, genetic differentiation among species and populations, population structure, paternity, and kinship relationships (Lacey, 2001; Gava and Freitas, 2002, 2003; Wlasiuk et al., 2003; El Jundi and Freitas, 2004; Gava and Freitas, 2004; Fernández-Stolz et al., 2007).

Here, we describe microsatellite analysis among and within populations that are fixed or polymorphic for different chromosomal rearrangements of the “a” system ($2n = 46a, 47a, 48a, 49a$ and $50a$) plus $2n = 42$, in order to assess their genetic variation.

Material and Methods

Sample collection

The tissue samples (organs or a biopsy of ear and tail, preserved in 95% ethanol and stored at -20°C) were obtained from 202 individuals of *C. minutus*, located between the towns of Mostardas and Jaguaruna on the coastal plain of the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Tissue samples were deposited in the collection of the Cytogenetics and Molecular Evolution Laboratory, Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

All individuals were collected and karyotyped previously for other studies (Freitas, 1997; Freygang et al., 2004). The samples comprised of from 2 to 21 individuals from each of 27 localities (see Table 1 and Figure 1).

Laboratory techniques

DNA extraction followed the protocol of Medrano et al. (1990). Molecular genetic analysis was performed with 5 polymorphic microsatellite loci, isolated from the Argentinean species *C. haigi*, with two (Hai2, Hai 3, Hai 4, and Hai 6) and three (Hai 12) base-pair motifs (Lacey et al., 1999).

PCR amplifications were carried out in a reaction volume of 20 μ L containing the following components: 2.0 μ L of DNA (10 – 50 ng/ μ L); 0.2 μ M of each primer, 0.2 μ M dNTP; 1x PCR buffer; 1.5 mM MgCl₂ and 1.0 unit of Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL Life Sciences/ Invitrogen, Carlsbad, California). Polymerase chain reaction amplifications were performed with an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, annealing at 52-60°C (according to the primer, see Lacey et al. 1999) for 30 s, extension at 72°C for 45 s, and a final extension at 72°C for 1 min. The products were run in non-denaturing 8% polyacrylamide gels, and the products were visualized with silver-nitrate stain. Differences of 1 base-pair motif could be resolved, and alleles were scored from heteroduplex patterns using a 25 base-pair ladder as reference. Allele sizes were tentatively scored in the first samples analyzed and compared with those obtained by Lacey et al. (1999). The remaining samples were scored using an allelic ladder constructed with the previously obtained alleles.

Statistical analysis

Analysis of linkage disequilibrium and deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were performed with the exact test based on the Guo and Thompson (1992) method, using ARLEQUIN 3.11 (Excoffier and Schneider, 2005) and GENEPOP 3.4 (Raymond and Rousset, 1995). Sequential Bonferroni corrections were applied to correct for multiple simultaneous comparisons (Rice, 1989), with $\alpha = 0.05$ to adjust the statistical significance levels.

The gene diversity within each population was quantified through the number of alleles at each locus (N), per locus per population (N_i), the mean number of alleles per locus (allele richness, A), percentage of polymorphic loci (%P), and the observed and expected heterozygosity (H_o and H_e) from Hardy-Weinberg (HW) proportions (H_e – Nei, 1978). These tests were implemented in ARLEQUIN 3.11. Differences among populations in the number of alleles per locus and expected heterozygosity were assessed using Wilcoxon's signed ranks test.

Wright's F -statistics, based on the variance in the allele frequencies, were used to analyze within (F_{IS}) and between (F_{ST}) population structure, according to Weir and Cockerham (1984), using ARLEQUIN 3.11. Sequential Bonferroni corrections were applied, with $\alpha = 0.05$, to adjust the statistical significance levels. As an alternative measure of population differentiation based on the variance in allele size under the stepwise mutation model, an R_{ST} estimator was used (Michalakis and Excoffier, 1996), using GENEPOP 3.4. Estimates of migrant numbers (Nm) were calculated as $Nm = (1 - F_{ST}) / (2/F_{ST})$ using ARLEQUIN 3.11.

An analysis of molecular variance (AMOVA – Excoffier et al., 1992) was designed to test the partitioning of genetic variation. The population groups were: i) specimens from Mostardas to km 35 on the Capivari-Tavares road; ii) populations from Palmares do Sul to Marechal Osório Park; iv) populations from Barco Beach to Gaivotas Beach; and v) specimens from Jaguaruna and Jaguaruna Beach. This subdivision was made by considering results for the mitochondrial DNA control region from the entire distribution of *C. minutus* populations (unpublished data). All calculations were performed using ARLEQUIN 3.11.

To test positive correlations between gene flow estimates and geographical distances (Slatkin, 1993), a Mantel nonparametric test (Mantel, 1967), implemented in

ARLEQUIN 3.11, was used to examine patterns of isolation by distance, and the logarithmic values of pairwise F_{ST} and geographical distances were plotted on a graph. Statistical significance was tested using 1000 random permutations.

In spite of the current geographical separation among the nearest populations, a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) approach was used in order to examine the distinctiveness of populations and the clustering of individual genotypes, using the program STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al., 2000). This test was processed considering each individual associated with one of the 11 populations assumed here. For the MCMC approach, 1.000.000 repetitions were utilized. The highest likelihood log were considered the indicator of the number of genetically distinct populations in the data.

Results

Statistical analysis

Seven populations showed significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), at least in 1 and at most in 4 loci, after the Bonferroni correction for multiple tests (Table 2). The expected values (H_e) for each locus ranged from 0.10 for Hai 4 (FS) to 0.90 for Hai 4 (Jg). Likewise, the observed values (H_o) ranged from 0.07 for Hai 4 to 0.81 for Hai6 at Gua. The H_e and H_o values per population per locus and per population for all loci are given in Table 2. The population abbreviations correspond to those in Table 1.

The test for heterozygosity deficit produced non-significant P -values ($P < 0.05$) in four populations (Jg, SWBP, PP, MR), and all loci showed significant P -values = 0.00. Pairwise comparisons of allele frequencies revealed non-significant linkage disequilibrium among any pair of loci at any population, after α -levels were corrected for multiple tests.

All loci in the data were polymorphic. The total number of alleles per population were: Jg, $n = 27$; GaiP, $n = 32$; Gua, $n = 22$; OEW, $n = 29$; EB, $n = 28$; SWBP, $n = 25$; FS, $n = 24$; PP, $n = 20$; IR, $n = 39$; MR, $n = 38$ and FR, $n = 37$, whereas the allelic richness (A), calculated as the mean number of alleles across populations, showed the lowest value for PP (4.00) and the highest for IR (7.80) (see Table 2; the population abbreviations correspond to those in Table 1). The number of alleles detected per locus ranged from 9 in Hai 2 to 19 in Hai 6 (Table 2).

Population structure

Estimates of intra-population structure calculated using the inbreeding coefficient (F_{IS}) indicated positive and significant values for eight populations (Table 2).

From analysis of molecular variance (AMOVA), the highest proportion of the genetic variation apportioned was within individuals (61.82%). Variation among groups explained only a small part of the genetic variation (6.28%). Overall, the F -statistic values were moderately to highly significant: ($F_{CT} = 0.0628$ to $F_{IT} = 0.3818$) (see Table 3).

The F_{ST} and R_{ST} values revealed high levels of genetic differentiation among almost all populations, and the F_{ST} significance was detected in most of the pairwise combinations. The pairwise F_{ST} between FS and IR was lowest and non-significant, and the highest significance was between Gua x SWBP; 56.36% of the values were > 0.15 , considered high or very high. The R_{ST} pairwise values were lowest in IR x SWBP and highest in EB x Gua, with 72.72% of the values > 0.15 (Table 4). These results for F_{ST} are in concordance with the numbers of migrants per generation calculated using Slatkin's private alleles method for pairwise populations (Table 5).

The Mantel's test detected significant correlation between gene flow and geographical distance, revealing a pattern of isolation by distance ($r = 34.86\%$; $P = 0.039$). This pattern of isolation by distance was also detected in a plot of pairwise geographical distances and estimates of R_{ST} (Figure 2).

The Bayesian analysis considering the range of 10 to 14 potential populations, after five independent simulations, recovered 13 groups (\ln likelihood = - 2753.8), two more than the number of populations considered in this study. The IR population was divided in three groups, according to the results. As shown in Figure 3, there was relatively high concordance between the population of origin and the group from which the largest proportion of individuals was estimated to be derived.

Discussion

The hypothesis of chromosomal speciation was based on the principle that different rearrangements present distinctive biologic units, considering that new rearrangements act as postzygotic reproductive barriers (Lande, 1984). The situation in *C. minutus* seems to be incompatible with this prediction. This species shows intra-specific hybrid zones among

different diploid numbers, producing intermediate forms, present in the same population. Gava and Freitas (2003) suggested that the chromosomal polymorphisms present in *C. minutus* can be neutral and can act as a transitory polymorphism, and the role of the chromosome variability as a reproductive barrier and thus as the main causative factor in speciation of the genus is still controversial.

Despite the significantly high values of pairwise F_{ST} and R_{ST} , some comparisons of populations demonstrated the presence of gene flow, such as between neighbor populations FS x IR, which have different diploid numbers ($2n = 47a$, $48a$ and $48a$, respectively) or between PP x IR, which have the same diploid number ($2n = 48a$; see Table 3).

The exact test of the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) under the assumption of heterozygosity deficit revealed significant values in seven populations. This deficit of heterozygotes was suggested by the significant positive values of F_{IS} obtained in some populations (Table 2). Several possibilities may account for the observed deviation from the HWE and positive significant values of F_{IS} , such as nonrandom mating, inbreeding, null alleles, and population structure (e.g., the Wahlund effect).

Levels of microsatellite variability in populations of *C. minutus* were high compared with other species of *Ctenomys*. In *C. minutus* we detected 70 alleles for the 5 polymorphic loci analyzed, with a mean of 14 (ranging from 9 to 19) per locus (Table 2). Mean numbers of alleles per locus reported for other species are: 2.5 (range 2 to 3) for *C. lami* (El Jundi and Freitas, 2004), 8.3 (range 6 to 14) for *C. rionegrensis* (Wlasiuk et al., 2003), 7.5 (range 3 to 13) for *C. haigi* (Lacey, 2001), 4.2 (range 3 to 6) for *C. flamarioni* (Fernández-Stolz et al., 2007), 2.3 (range 1 to 3) for *C. sociabilis* (Lacey, 2001), and 2.3 in *C. talarum* (range from 2 to 9; Cutrera et al., 2006).

The pattern of isolation by distance, suggested by the significant Mantel's test ($r = 34.86\%$; $P = 0.039$) and by the plot (Figure 2) can probably be explained by several characteristics of *C. minutus*. This species has a linear-like geographical distribution along the coastal plain of southern Brazil. When species have a linear distribution, dispersal and gene flow will be restricted or limited to a single direction. This feature, when associated with low vagility such as in subterranean rodents, as is the case for tuco-tucos (Smith and Patton, 1984; Lacey, 2000), can promote the pattern of isolation by distance found here.

The hierarchical analysis of the microsatellite variation suggested that 61.82% of variation should be attributed to differences among individuals, whereas 6.28% of

variation occurs among groups. This may suggest shared ancestral polymorphisms due to relatively recent isolation. Alternatively, some shared allele states may be homoplastic.

The results obtained in the present study must be considered with caution because of the small local sample sizes, such as from the PP population. Nevertheless, the overall results may truly reflect some characteristics of tuco-tucos, such as the propensity to be distributed into many, relatively small populations, the use of exclusive territories at the individual or colony level, limited dispersal, and patchy occupation of the habitat that may lead to strong geographical structure with variation being partitioned among, rather than within, populations (Lacey, 2000; Patton and Smith, 1990; Reig et al., 1990; Smith, 1998; Nowak, 1999; Wlasiuk et al., 2003; Mora et al., 2006).

References

- Cutrera A P, Lacey E A, Busch C (2006) Intraspecific variation in effective population size in talar tuco-tucos (*Ctenomys talarum*): the role of demography. *J Mammal* 87:108-116
- El Jundi T A R J, Freitas T R O (2004) Genetic and demographic structure in population of *Ctenomys lami* (Rodentia – Ctenomyidae). *Hereditas* 140:18-23
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 474-491
- Excoffier L G L, Schneider S (2005) Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50
- Fernández-Stolz G P, Stolz J F B, Freitas T R O (2007) Bottlenecks and dispersal in the tuco-tucos-dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *J Mammal* 88:935-945
- Freitas T R O (1997) Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). *Revista Brasileira de Genética*, 20:1-7
- Freitas T R O (2006) Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. *Genetica* 126:227-235
- Freitas T R O (2007) *Ctenomys lami*: the highest chromosomal variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system. *Acta Theriol* 52:(2)171-180
- Freygang C C, Marinho J R, Freitas T R O (2004) New karyotypes and some considerations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the coastal plain of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. *Genetica* 121:125-132
- Gava A, Freitas T R O (2002) Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia; Ctenomyidae). *J Mammal* 83:843-851
- Gava A, Freitas T R O (2003). Inter and intra-specific hybridization in tuco-tuco (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica* 119: 11-17
- Gava A, Freitas T R O (2004) Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southeastern Brazil (Rodentia; Ctenomyidae) *J Mammal* 85(6):1201-1206
- Goudet J, Perrin N, Waser P (2002) Test for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology* 11:1103-1114
- Guo S, Thompson E (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372
- Lacey E A, Maldonado J E, Clabaugh J P, Matocq M D (1999) Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Mol Ecol* 8:1753-1768

- Lacey E A (2000) Spatial and social systems of subterranean rodents. In: Lacey E A, Patton J L, Cameron G N (eds) Life Underground, the Biology of Subterranean Rodents. University of Chicago Press, Chicago
- Lacey E A (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
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27:209-220
- Marinho J R, Freitas T R O (2000) Intraspecific craniometric variation in a chromosome hybrid zone of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi). *Int J Mammal Biol* 65:226-231
- Medrano J F, Aesen E, Sharrow L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8:43
- Michalakis, Y., and L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci. *Genetics*, 142:1061-1064
- Mora M S, Lessa E P, Kittlein M J, Vassallo A I (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Rodentia: Ctenomyidae) in sand-dune habitats: Evidence of recent population expansion. *J Mammal* 87:1192-1203
- Moreira D M, Franco M H L P, Freitas T R O, Weimer T A (1991) Biochemical polymorphism and phenetic relationships in rodents of the genus *Ctenomys* from Brazil. *Biochem Genet* 29:601-615
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Nowak R M (1999) Walker's mammals of the world. Hopkins J (ed) London University Press
- Patton J L, 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
- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop: population genetics software for exact test ecumenism. *J Hered* 86:248-249
- Reig O A, Busch C, Ortells M O, Contreras J L (1990) An overview of evolution, systematics, population biology and molecular biology in *Ctenomys*. In: Nevo E, Reig O A (eds) *Biology of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels*. Allan Liss, New York, pp 422
- Rice W W (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47:264-279

Smith M F, Patton J L (1984) Dynamics of morphological differentiation: temporal impact of gene flow in pocket gopher populations. *Evolution* 38:1079–1087

Smith M F (1998) Phylogenetic relationships and geographic structure in pocket gophers in the genus *Thomomys*. *Mol Phylogenet Evol* 9:1–14

Weir B S, Cockerham C C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370

Wlasiuk G J, Garza C, Lessa E P (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

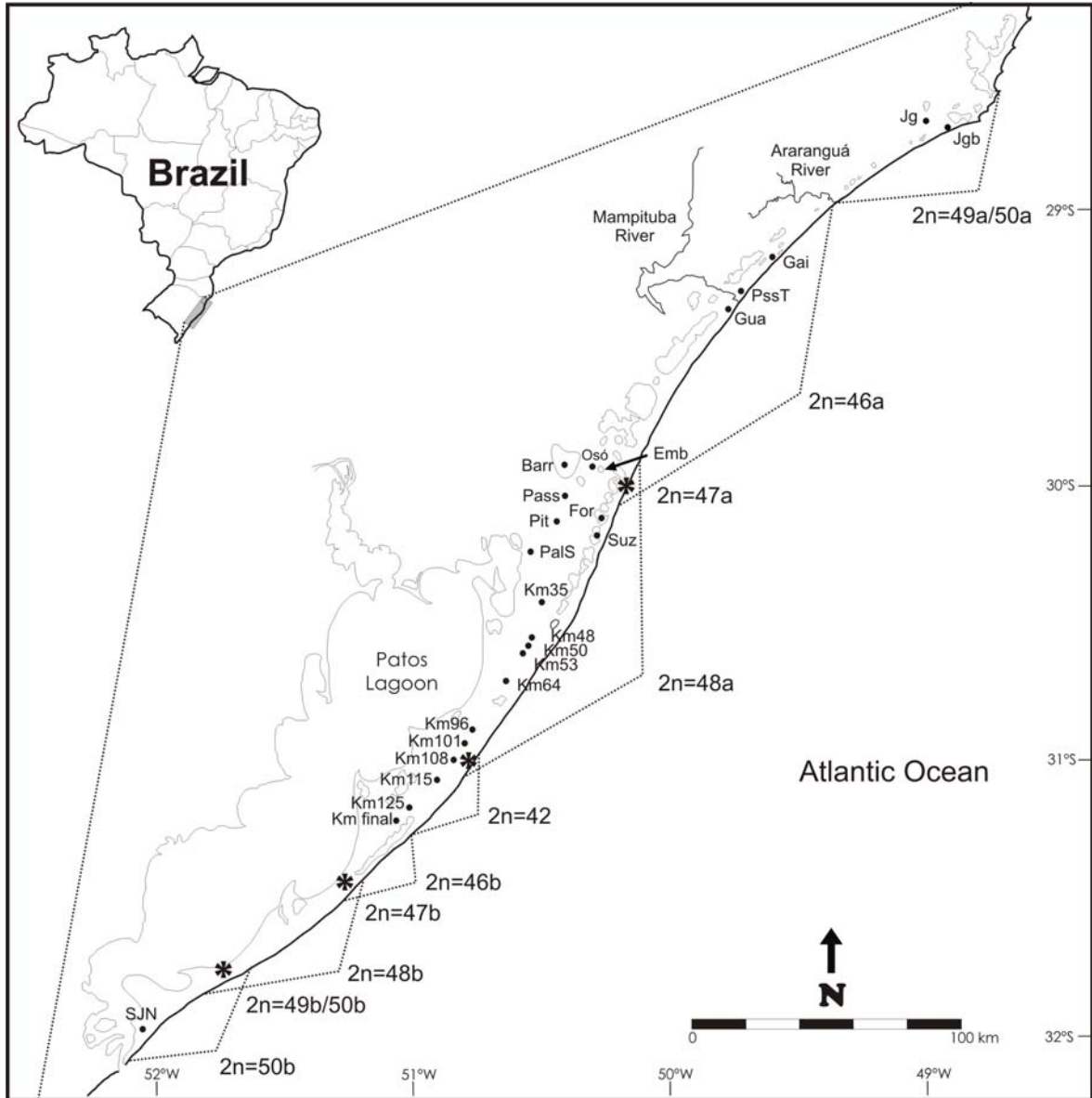


Figure 1. Distribution of *Ctenomys minutus* on the coastal plain of the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. The distribution of the karyotypes is given. Asterisks indicate the intra-specific hybrid zones. SJN is the city of São José do Norte. Sample localities: **Jg**: Jaguaruna; **Jgb**: Jaguaruna Beach; **Gai**: Gaivotas Beach; **PssT**: Passo de Torres; **Gua**: Guarita Beach; **Osó**: Marechal Osório Park and Weber Ranch; **Emb**: Emboaba Lake; **For**: Fortaleza Lake; **Suz**: Suzana Lake; **Barr**: Barros Lake; **Pass**: Passinhos; **Pit**: Pitangueira; **PalS**: Palmares do Sul; **km35**: Capivari-Tavares road km 35; **km48**: Capivari-Tavares road km 48; **km50**: Capivari-Tavares road km 50; **km53**: Capivari-Tavares road km 53; **km64**: Capivari-Tavares road km 64; **km96**: Capivari-Tavares road km 96; **km101**: Capivari-Tavares road km 101; **km108**: Capivari-Tavares road km 108; **km115**: Capivari-Tavares road km 115; **km125**: Capivari-Tavares road km 125 and **km final**: Capivari-Tavares road km final.

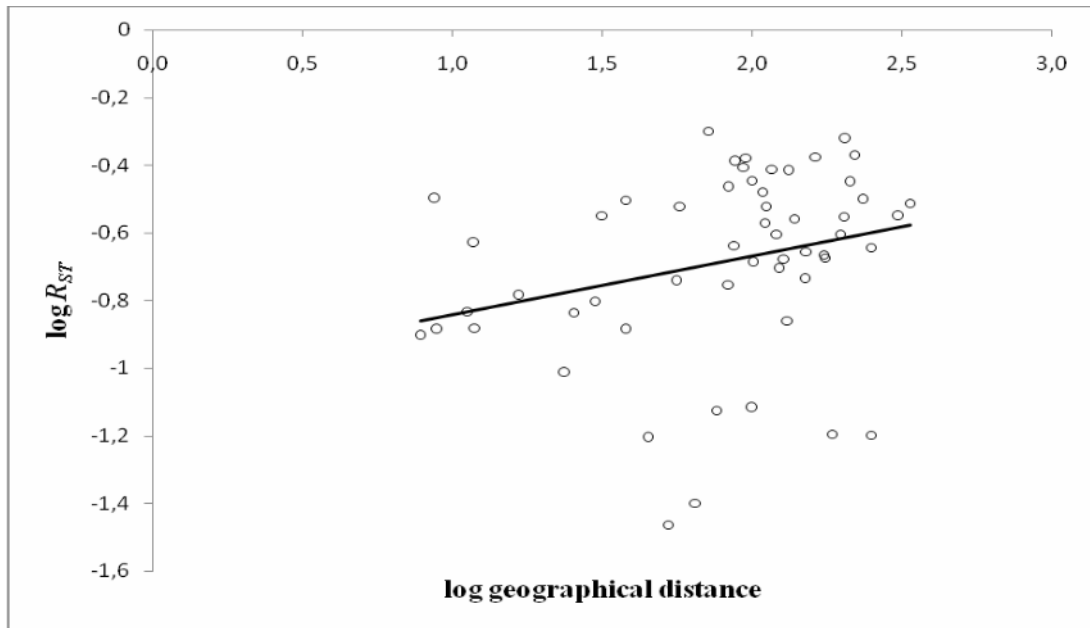


Figure 2. Relationships among pairwise geographical distances and estimates of R_{ST} based on the analysis of five microsatellite loci from *C. minutus* populations.

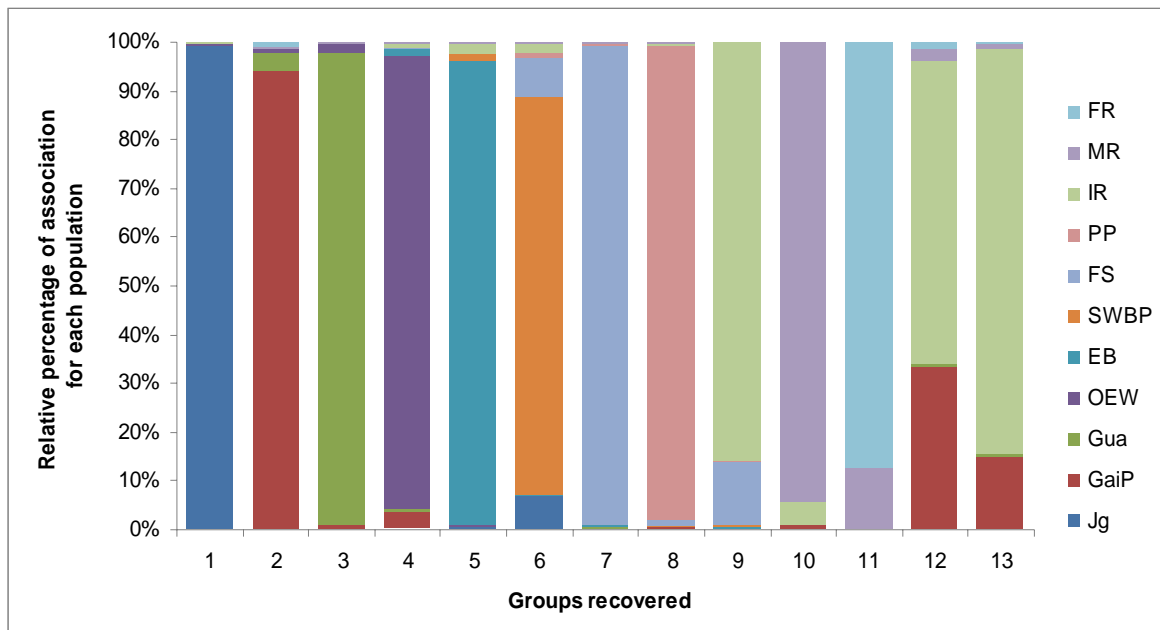


Figure 3. Results of the structure of groups recovered for the analyses performed in STRUCTURE 2.2, according to the eleven populations considered in this study. Most of each group corresponds to a single population. Population abbreviations correspond to those in Table 1.

Table 1. Localities (with abbreviations) where samples of *Ctenomys minutus* were obtained, number of specimens genotyped per locality (N°S), number of individuals per karyotype (N°K) and population considered abbreviation (P).

Locality	N°S	N°K	P
Jaguaruna (Jg)	4	50a = 4	Jg
Jaguaruna Beach (Jgb)	8	50a = 3 / 49a = 5	
Gaiyota Beach (Gai)	19	46a = 19	GaiP
Passo de Torres (PsT)	3	46a = 3	
Guarita Beach (Gua)	17	46a = 17	Gua
Marechal Osório Park (Osó)	4	46a = 4	
Weber Ranch (Osó)	16	46a = 16	OEW
Emboaba Lake (Emb)	3	46a = 3	
East Barros Lake (Barr)	19	46a = 10 / 47a = 3 / 48a = 6	EB
South Barros Lake (Barr)	17	46a = 3 / 47a = 1 / 48a = 13	
West Barros Lake (Barr)	4	48a = 4	SWBP
Passinhos (Pass)	4	48a = 4	
Fortaleza Lake (For)	8	47a = 3 / 48a = 3	FS
Suzana Lake (Suz)	2	47a = 1 / 48a = 1	
Pitangueira (Pit)	5	48a = 5	PP
Palmares do Sul (PalS)	6	48a = 6	
Capivari-Tavares road km 35 (km35)	4	48a = 4	
Capivari-Tavares road km 48 (km48)	4	48a = 4	
Capivari-Tavares road km 50 (km50)	7	48a = 7	IR
Capivari-Tavares road km 53 (km53)	5	48a = 5	
Capivari-Tavares road km 64 (km64)	3	48a = 3	
Capivari-Tavares road km 96 (km96)	4	48a = 4	
Capivari-Tavares road km 101 (km101)	3	48a = 3	
Capivari-Tavares road km 108 (km108)	7	42 x 48a = 7	MR
Capivari-Tavares road km 115 (km115)	3	42 = 3	
Capivari-Tavares road km 125 (km125)	2	42 = 2	
Capivari-Tavares road km final (km final)	21	42 = 21	FR
Total	202		11

Table 2. Microsatellite genetic variation in *C. minutus*. Populations (Pop); population sample size (n); mean number of alleles per locus (A); percentage of polymorphic loci (%P); mean observed heterozygosity per population (H_o) and mean expected heterozygosity per population (H_e). Values per locus for each population: number of alleles per population (N_i), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e). Asterisks indicate statistical significance ($P < 0.05$). The abbreviations for populations are given in Table 1.

Pop	n	A	%P	F_{IS}	H_o	H_e	Hai 2 ($N=9$)			Hai3 ($N=14$)			Hai 4 ($N=17$)			Hai 6 ($N=19$)			Hai 12 ($N=11$)		
							N_i	H_o	H_e	N_i	H_o	H_e	N_i	H_o	H_e	N_i	H_o	H_e	N_i	H_o	H_e
Jg	12	5.40	100	0.19	0.53	0.67	4	0.50	0.70	4	0.33	0.48	9	0.75	0.90	5	0.58	0.58	5	0.50	0.70
GaiP	22	6.40	100	0.20*	0.51*	0.74	5	0.70	0.70	6	0.40*	0.78	7	0.25*	0.76	7	0.75*	0.64	7	0.45*	0.81
Gua	17	4.40	100	0.36*	0.30*	0.67	5	0.23*	0.78	5	0.27*	0.79	4	0.07*	0.47	4	0.81	0.61	4	0.14	0.71
OEW	23	5.80	100	0.30*	0.45*	0.74	3	0.43	0.52	6	0.32*	0.76	5	0.52	0.78	10	0.70*	0.87	5	0.30*	0.79
EB	19	5.60	100	0.30*	0.50*	0.67	3	0.31	0.48	4	0.63	0.68	6	0.42	0.73	8	0.42	0.64	7	0.73*	0.80
SWBP	25	5.0	100	0.07	0.54	0.59	3	0.44	0.49	4	0.28	0.32	7	0.48*	0.70	4	0.78	0.73	7	0.72	0.72
FS	10	4.80	100	0.37*	0.40*	0.68	2	0.10	0.52	4	0.70	0.74	8	0.50	0.86	7	0.60	0.84	3	0.10	0.43
PP	11	4.00	100	0.15	0.53	0.66	3	0.54	0.51	3	0.45	0.61	6	0.63	0.83	6	0.73	0.81	2	0.30	0.52
IR	23	7.80	100	0.35*	0.56*	0.82	4	0.17*	0.67	8	0.68	0.83	10	0.50*	0.88	10	0.73*	0.89	7	0.74	0.80
MR	17	7.60	100	0.16*	0.68	0.69	6	0.53	0.77	7	0.70	0.86	10	0.75	0.83	8	0.65	0.70	7	0.76	0.85
FR	23	7.40	100	0.20*	0.54*	0.67	4	0.22	0.34	4	0.39	0.46	10	0.74	0.83	12	0.65*	0.87	7	0.69	0.85

Table 3. Hierarchical analysis of molecular variance for the microsatellite data, for the *C. minutus* populations sampled, considering the results for the mitochondrial DNA control region. The fixation indices (F-statistics) and their respective variance components are shown. Asterisks indicate statistical significance, $P < 0.05$.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation indices
Among groups	3	51.974	0.09915	6.28	$F_{CT} = 0.0628^*$
Among populations within groups	7	60.400	0.19058	12.08	$F_{SC} = 0.1289^*$
Among individuals within populations	191	305.717	0.31268	19.82	$F_{IT} = 0.3818^*$
Within individuals	202	190.000	0.97525	61.82	$F_{IS} = 0.2428^*$

Table 4. Gene flow pair estimates based on F_{ST} (lower component) and R_{ST} (upper component) based on five microsatellite loci for the *C. minutus* populations analyzed. Population abbreviations are given in Table 1. Asterisks indicate statistical significance ($\alpha < 0.05$).

Population	Jg	GaiP	Gua	OEW	EB	SWBP	FS	PP	IR	MR	FR
Jg		0.3000	0.3445	0.0638	0.2164	0.2480	0.2801	0.3566	0.0632	0.2827	0.3086
GaiP	0.21996*		0.3191	0.0767	0.4108	0.3010	0.3861	0.2103	0.2112	0.4263	0.2269
Gua	0.27075*	0.08151*		0.1760	0.5006	0.4172	0.3577	0.2683	0.2203	0.4792	0.3163
OEW	0.15934*	0.07306*	0.12610*		0.2360	0.1313	0.1648	0.1461	0.0398	0.2482	0.1845
EB	0.16287*	0.21354*	0.25760*	0.11468*		0.0975	0.2813	0.3135	0.0750	0.3851	0.4215
SWBP	0.15467*	0.29728*	0.34648*	0.22886*	0.12270*		0.1253	0.1467	0.0344	0.3315	0.2761
FS	0.08220	0.15897*	0.20878*	0.10524*	0.10983*	0.14151*		0.1307	0.0626	0.2063	0.1381
PP	0.13550*	0.16654*	0.27073*	0.10501*	0.12186*	0.16726*	0.05605		0.1307	0.3919	0.1979
IR	0.11489*	0.12290*	0.16456*	0.07032*	0.09980*	0.16143*	0.02854	0.03670		0.1819	0.2303
MR	0.20532*	0.13946*	0.17250*	0.12074*	0.23202*	0.29311*	0.13789*	0.18628*	0.08721*		0.1572
FR	0.27292*	0.14519*	0.29021*	0.18345*	0.25323*	0.34219*	0.18956*	0.21554*	0.16112*	0.17728*	

Table 5. Pairwise estimates of the mean number of migrants per generation (Nm) among eleven *Ctenomys minutus* populations based on five microsatellite loci.

Population	Jg	GaiP	Gua	OEW	EB	SWBP	FS	PP	IR	MR
GaiP	0.88659									
Gua	0.67336	2.81697								
OEW	1.31893	3.17166	1.73256							
EB	1.28498	0.92075	0.72051	1.93006						
SWBP	1.36639	0.59095	0.47154	0.84237	1.78749					
FS	2.79122	1.32261	0.94741	2.12542	2.02621	1.51664				
PP	1.59499	1.25115	0.67342	2.13079	1.80158	1.24471	4.21008			
IR	1.92607	1.78413	1.26921	3.30507	2.25506	1.29867	8.50914	6.56230		
MR	0.96758	1.54260	1.19927	1.82064	0.82749	0.60292	1.56307	1.09204	2.61654	
FR	0.66603	1.47189	0.61143	1.11279	0.73723	0.4806	1.06881	0.90986	1.30161	1.16018

7. DISCUSSÃO

Através deste estudo a variabilidade genética de *C. minutus* foi caracterizada permitindo inferências a respeito da distribuição espacial das linhagens filogenéticas encontradas, e a associação destas com fatores geográficos e polimorfismos cromossômicos que poderiam propiciar a divergência genética tanto nas populações locais quanto num contexto filogeográfico.

Ctenomys minutus apresenta uma distribuição geográfica dita como linear, ou seja, restrita a uma direção. Tal característica quando associada a baixas taxas de dispersão, como no caso da maioria dos roedores subterrâneos, impõe importantes restrições ao fluxo gênico, favorecendo a migração apenas entre populações vizinhas, promovendo assim um padrão de isolamento pela distância (Slatkin e Barton, 1989; Smith e Patton 1984; Hutchinson e Templeton, 1999; Lacey, 2000).

Para os dados de seqüências da região controladora do DNA mitocondrial (mtDNA) e para os cinco *loci* de microssatélites o teste de Mantel apresentou valor significativo corroborando com o pressuposto de isolamento das populações pela distância.

Estimativas de baixo fluxo gênico, que também apoiam este padrão, têm sido obtidas para praticamente todas as populações de *C. minutus* analisadas neste trabalho, tanto em estimativas utilizando mtDNA quanto para microssatélites.

Levando-se em consideração os valores significativos das estimativas pareadas de F_{ST} para as populações avaliadas, percebe-se que os valores encontrados para os dados gerados com as seqüências de mtDNA são, em média, maiores quando comparados com aqueles dos *loci* de microssatélites, sendo que para mtDNA a maioria se encontra acima de 0.70 e para microssatélites grande parte dos valores ficam entre 0.10 e 0.34. Este fator pode revelar uma maior taxa de dispersão dos machos em relação às fêmeas, uma vez que o mtDNA é sabidamente de herança materna e os *loci* de microssatélites por serem nucleares possuem um padrão de herança biparental.

Fernández-Stolz *et al.* (2007) considerando 3 populações de *C. flamarioni* provenientes de toda sua distribuição geográfica encontrou, a partir de estimativas de divergência entre populações por sexo, valores de F_{ST} não significativos para os machos (entre as populações de Xangri-lá e Remanso), sugerindo que apesar de ambos os sexos dispersarem, os machos o fazem em maior proporção. Isto poderia ser explicado pelo fato

que, para espécies de distribuição linear (com fluxo gênico restrito entre populações), os padrões de dispersão diferenciais entre machos e fêmeas são mais fáceis de serem identificados em populações mais próximas, onde é minimizado o efeito da distância na divergência genética (Goudet *et al.*, 2002). Na maioria dos mamíferos, os machos constituem o sexo dispersante e as fêmeas o filopátrico (Greenwood, 1980).

A árvore filogenética reconstruída através da inferência Bayesiana demonstrou alguns eventos de politomia. Politomias foram anteriormente observadas em outras árvores filogenéticas utilizando diferentes espécies de ctenomídeos por Lessa e Cook (1998), Mascheretti *et al.* (2000), Slamovits *et al.* (2001), Mora *et al.* (2006) e Tomasco e Lessa (2007). Tais autores sugeriram que politomias são devidas à maioria das linhagens terem sido formadas simultaneamente, passando por um processo de radiação adaptativa.

A observação de que as espécies de tuco-tucos possuem especificidade cariotípica inicialmente sugeriu um papel de barreira reprodutiva para a diversidade cromossômica. Contudo, as espécies de tuco-tucos possuem uma distribuição, em geral, parapátrica e, segundo Steinberg e Patton (2000), o cenário da diversificação em roedores subterrâneos é o de alopatria. Dessa forma, a evolução cromossômica não seria o fator principal de diferenciação, mas sim a vicariância. No entanto, polimorfismos cromossômicos foram descritos em populações de *C. perrensi* no noroeste da Argentina por Ortells *et al.* (1990), Ortells (1995) e Garcia *et al.* (2000), e segundo estes autores, o polimorfismo em *C. perrensi* ocorre de forma neutra e não parece estar relacionado a barreiras reprodutivas. O mesmo parece ocorrer com *C. minutus*.

Zonas híbridas intra-específicas entre diferentes cariótipos são recorrentes para a espécie, e diferentes números cariotípicos ocorrem muitas vezes dentro de uma mesma população, compartilhando haplótipos de mtDNA. As únicas formas cariotípicas que parecem atuar como barreiras ao fluxo gênico encontram-se entre os sistemas caracterizados como “a” ($2n = 42, 46a, 47a, 48a, 49a$ e $50a$) e o sistema “b” ($2n = 46b, 47b, 48b, 49b$ e $50b$), onde uma inversão pericêntrica no braço curto do cromossomo 2, encontrada em todo o sistema “b”, parece ser responsável por um possível mecanismo de isolamento pré-zigótico.

As potenciais barreiras ao fluxo gênico como os rios Araranguá e Mampituba parecem não exercer esta função, ao menos até o presente momento. A característica de baixo volume de água associada ao status transitório de suas desembocaduras pode

promover o contato entre populações de margens opostas dos rios, permitindo assim o fluxo gênico entre elas. Atualmente as desembocaduras dos dois rios encontram-se fixadas por molhes, porém o tempo transcorrido parece não ter sido suficiente para isolar as populações dos dois lados.

Os resultados globais obtidos através deste estudo parecem refletir algumas características associadas aos tuco-tucos, por exemplo, a ocorrência de populações fragmentadas de tamanho reduzido com espécimes apresentando baixa vagilidade e hábitos tipicamente solitários (Patton e Smith, 1990; Reig *et al.*, 1990; Smith, 1998; Nowak, 1999; Lacey, 2000; Wlasiuk *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2006).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson J D (2002) *Biologia molecular da célula*. 4ª edição. Artes Médicas, Porto Alegre, Brasil.
- Altuna A C, Francescoli G, Tassino B and Izquierdo G E (1999) Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida, el caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia: Octodontinae) en el Uruguay. *Etologia* 7:47-54.
- Amos B and Hoelzel A R (1992) Applications of molecular genetic techniques to the conservation of small populations. *Biol Conserv* 61:133-144.
- Arias M C e Infante-Malachias M E (2001) RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: Matioli, S.R. (ed) *Biologia molecular e evolução*. Holos, Ribeirão Preto, cap 14, p 143-152.
- Avise J C, Arnold J, Ball Jr R M, Bermingham E, Lamb T, Neigel J E, Ree C A and Saunders N C (1987) Intraespecific phylogeography the mitochondrial DNA bridge population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18:489-522.
- Avise J C (1994) *Molecular Markers Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Avise J C (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Bennett L B, Shriver M D and Bowcock A M (1998) Markers and Methods for Reconstructing Modern Human History DNA Sequence. *The Journal of Sequencing and Mapping* 8:329-341.
- Bermingham P and Moritz C (1998) Comparative phylogeography concepts and applications. *Mol Ecol* 7:367-370.
- Bonvicino C R and Moreira M A M (2001) Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 18(2): 282-292.
- Brown W M (1985) The mitochondrial genome of animals. In: Mac Intyre RJ (ed) *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York, EUA.
- Brown G G, Gadalata G, Pepe G, Saccone C and Sbisà E (1986) Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Biol* 192:503-511.
- Bruford M W and Wayne R K (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr Opin Genetics Dev* 3: 939-943.
- Busch C, Malizia A I, Scaglia O A and Reig O A (1989) Spatial distribution of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia-Octodontidae). *J Mammal* 70:204-208.

- Busch C, Antinuchi C D, del Valle J C, Kittlein M J, Malizia A I, Vassallo A I and Zenuto R R (2000) Population ecology of subterranean rodents. In: Lacey E A, Patton J L and Cameron G N (eds) *Life Underground - The Biology of Subterranean Rodents*. Chicago, The University of Chicago Press, pp 183-226.
- Castillo A H, Cortinas M N and Lessa E P (2005) Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *J Mammal* 86(1):170-179.
- Comparatore V M, Maceira N and Busch C (1995) Habitat relationship in *Ctenomys talarum* (Caviomorpha, Octodontidae) In *A Natural Grassland*. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 56: 112-28.
- Contreras J R and Reig O A (1965) Datos Sobre La Distribución Del Género *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) En La Zona Costera De La Provincia De Buenos Aires Compreendida Entre Necochea Y Bahía Blanca. *Physis* 25:169-186.
- Contreras J and Maceira A J (1970) Relaciones entre el tuco-tuco y los procesos del suelo en la region semiárida del sudoeste Bonaerense. *Agro* 12: 3-17.
- Contreras L C, Torres-Mura J C and Yáñez J L (1987) Biogeography of Octodontid Rodents an Eco-Evolutionary Hypothesis. *Fieldiana Zool* 39:401-411.
- Cook J A, Anderson S and Yates T (1990) Notes on Bolivian mammals 6. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the highlands. *American Museum Novitates*, 2980:315-320.
- Cook J A and Lessa E P (1998) Are rates of diversification in subterranean South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) unusually high? *Evolution* 52(5):1521-1527.
- Da Silva M N and Patton J L (1998) Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Mol Ecol* 7:475-486.
- El Jundi T A R J (2003) Estudo da variabilidade cromossômica em *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae) ao longo de sua distribuição geográfica através de marcadores moleculares. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS: Porto Alegre, 84 pp. (Tese de Doutorado).
- El Jundi T A R J and Freitas T R O (2004) Genetic and demographic structure in population of *Ctenomys lami* (Rodentia – Ctenomyidae). *Hereditas*, 140: 18-23.
- Ferreira M E e Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Embrapa, Brasília.
- Firestone K B, Elphinstone M S, Sherwin W B and Houlden B A (1999) Phylogenetical population structure of tiger quolls *Dasyurus maculatus* (Dasyuridae Marsupialia) an endangered carnivorous marsupial. *Mol Ecol* 8:1613-1625.
- Fernández G P (2002) Análise da estrutura populacional e da variabilidade genética em três populações de *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) através de *loci* de microssatélites. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (Dissertação de Mestrado).

- Fernández-Stolz G P (2007) Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia - Ctenomyidae), através de marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS: Porto Alegre, 193 pp. (Tese de Doutorado).
- Fernández-Stolz G P, Stolz J F B and Freitas T R O (2007) Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco-das-dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *J Mammal* 88:935-945.
- Freitas T R O (1995) Geografic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil (Rodentia: Octodontidae). *Stud Neotrop Fauna* 30:53-59.
- Freitas T R O (1997) Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). *Rev Bras Genet* 20:1-7.
- Freitas T R O (2001) Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in southern Brazil: *Ctenomys lami* spec. nov separated from *C. minutus*. *Stud Neotrop Fauna* 36:1-8
- Freitas T R O (2006) Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. *Genetica* 126:227-235.
- Freitas T R O (2007) *Ctenomys lami*: the highest chromosomal variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system. *Acta Theriol* 52:(2)171-180.
- Freygang C C, Marinho J R and Freitas T R O (2004) New karyotypes and some considerations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomidae) on the coastal plain of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. *Genetica* 121:125-132.
- Gallardo M H and Anrique J A (1991) Populational parameters and burrow systems in *Ctenomys maulinus brunneus*. *Medio Ambiente* 11:48-53.
- Garcia L, Ponsa M, Egozcue J and Garcia M (2000) Cytogenetic variation in *Ctenomys perrensi* (Rodentia, Octodontidae). *Biol J Linnean Soc* 71:615-624.
- Gastal M L (1994) Sistema de túneis e área de vida de *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae) *Inheringia*, 77:5-44.
- Gava A and Freitas T R O (2002) Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia; Ctenomyidae). *J Mammal* 83:843-851.
- Gava A and Freitas T R O (2003). Inter and intra-especific hybridization in tuco-tuco (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomidae). *Genetica* 119:11-17.
- Gava A and Freitas T R O (2004) Microssatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southeastern Brazil (Rodentia; Ctenomyidae). *J Mammal* 85(6):1201-1206.
- Greenwood PJ (1980) Mating systems philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim Behav* 28:1140-1162.

- Hansen M M, Ruzzante D E, Nielsen E E and Mensberg K D (2000) Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Mol Ecol* 9(5):383-594.
- Hare M P (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends Ecol Evol* 16(2):700-706.
- Hutchison DW and Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53:1898-1914.
- Lacey E A, Braude S H and Wiezoreck J R (1998) Solitary burrow use by adult patagonian tuco-tucos. *J Mammal* 79:986-991.
- Lacey E A (2000) Spacial and Social Systems of Subterranean Rodents. *In*: Lacey E A Patton J L and Cameron G N (eds) *Life Underground The Biology of Subterranean Rodents*. Chicago, The University of Chicago Press, pp 257-296.
- Lacey E A, Patton J L and Cameron G N (eds) (2000) *Life underground: the biology of subterranean rodents*. The University of Chicago Press, Chicago, p. 1-13.
- Lacey E A (2001) Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity*, 86:628-637.
- Lessa E P and Cook J A (1998) The Molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Mol Phylogenet Evol*, 9: 88-99.
- Li W-H and Graur D (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2a edição Sinauer Associates (ed) Sunderland Massachusetts.
- Malizia A I, Vassallo I A and Busch C (1991) Population and habitat characteristics of two sympatric species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Acta Theriol* 36:87-94.
- Malizia A I R, Zenuto R and Busch C (1995) Demographic and reproductive attributes of dispersers in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Can J Sociol* 73:732-738.
- Marinho J R and Freitas T R O (2000) Intraspecific craniometric variation in a chromosome hybrid zone of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi). *Int J Mammal Biol* 65:226–231.
- Mascheretti S, Mirol P M, Giménez M D, Bidau C J, Contreras J R and Searle J B (2000) Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae Octodontoidea) based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Biol J Linn Soc* 70:361-376.
- McNab B K (1966) The metabolism of fossorial rodents: a study of convergence. *Ecology* 45:712-733.
- Meyer A (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *In*: Hochachka and Mommsen (eds) *Biochemistry and molecular biology of fishes vol.2*. Elsevier Science Publishers.
- Mora M S, Lessa E P, Kittlein M J and Vassalo A I (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: Evidence of population expansion. *J Mammal* 87(6):1192-1203.

- Mora M S, Lessa E P, Cutrera A P, Kittlein M J and Vassalo A I (2007) Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Mol Ecol* 16(16):3453-3465.
- Moreira D M, Franco M H L P, Freitas T R O and Weimer T A (1991) Biochemical polymorphism and phenetic relationships in rodents of the genus *Ctenomys* from Brazil. *Biochem Genet* 29:601-615.
- Nevo E (1979) Adaptative convergence and divergence of subterranean mammals. *Annu Rev Ecol Syst* 10:269-308.
- Nowak R M (1999) Walker's mammals of the world. Volume 2, 6ª edição. Johns Hopkins University Press, Baltimore, p. 1243-1681.
- Ortells M O, Contreras J R and Reig O A (1990) New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia, Octodontidae) from north-eastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. *Genetica* 82:189-201.
- Ortells M O (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. *Biol J Linn Soc* 54:43-70.
- Patton, J L, 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.
- Pearson R (1959) Biology of subterranean rodents *Ctenomys* in Peru. *Memorias del Museo de Historia Natural "Javier Prado"* 9:1-56.
- Pearson O P, Binztein N, Boiry L, Busch C, Di Pace M, Gallopin G, Penchaszadeh P and Piantanida M (1968) Estrutura social, distribuição espacial y composición de edades de una población de tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *Investigaciones Zool Chilenas* 13:47-80.
- Pearson O P (1984) Taxonomy And Natural History Of Some Fossorial Rodents Of Patagonia, Southern Argentina *J Zool Lond* 202:225-237.
- Pearson O P and Christie M I (1985) Los tuco-tucos (género *Ctenomys*) de los Parques Nacionales Lanin y Nahuel Huapi, Argentina. *Historia Natural*, 5:337-343.
- Reginato P A R (1996) Geologia e Evolução Holocénica da Região Norte da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Instituto de Geociências da UFRGS; Porto Alegre. (Tese de Doutorado).
- Reig O A, Busch C, Ortells M O and Contreras J L (1990). An overview of evolution, systematic, population biology and molecular biology in *Ctenomys*. In: Nevo, E. e Reig, O.A. (eds) *Biology of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. Allan Liss, New York.
- Rojas M (1995) The species problem and conservation what are we protecting? *In: Genes population species readings from conservation biology*. Blackwell Science/ Society for Conserv Biol Cambridge, EUA.

- Rui A M and Gastal M L A (1997) Estrutura de Sistemas de Túneis e Distribuição Espacial de *Ctenomys minutus* NEHRING 1887 (Rodentia, Ctenomyidae) em Área de Restinga, Torres, RS, Brasil. *Biociências*, Porto Alegre, V5, n2, p. 33-44.
- Schlötterer C (1998) Microsatellites. In: Hoelzel, A.R. (ed.) *Molecular genetic analysis of populations. A practical approach*. Oxford: IRL Press.
- Schwarzbold A and Schäfer A (1984) Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul. Manuscrito apresentado no XV Simpósio “América do Sul”, Plön, Alemanha.
- Slamovits C H, Cook J A, Lessa E P and Rossi M S (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* 18:1708–1719.
- Slatkin M and Barton N H (1989) Comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349–1368.
- Slatkin M (1994) Gene Flow and Population Structure. In: Real, L.A.; *Ecological Genetics*. Princeton University Press. pp 238.
- Smith M F and Patton J L (1984) Dynamics of morphological differentiation: temporal impact of gene flow in pocket gopher populations. *Evolution* 38:1079–1087.
- Smith R (1993) The Natural History of Inbreeding and Outbreeding in Small Mammals. In: Thornhill, N.W. (ed.) *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*. Chicago: The University of Chicago Press pp 575.
- Smith M F (1998) Phylogenetic relationships and geographic structure in pocket gophers in the genus *Thomomys*. *Mol Phylogenet Evol* 9:1–14.
- Steinberg E K and Patton J L (2000) Genetic structure and the geography of speciation in subterranean rodents: Opportunities and constraints for evolutionary diversification. In: Lacey E A, Patton J L and Cameron GN (eds.) *Life underground. The biology of subterranean rodents*. The University of Chicago Press, Chicago, p. 301-331.
- Tautz D (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena SDJ Chakraborty R Epplen TJ and Jeffreys AJ (eds) *DNA fingerprinting State of the science*. Pp 21-28.
- Tomasco I and Lessa E P (2007) Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. In: Kelt D A, Lessa E P, Salazar-Bravo J, Patton J L (eds) *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*. University of California Press, London, pp 859 - 882.
- Tomazelli L J and Villwock J A (1992) Considerações sobre o ambiente praias e a deriva litorânea de sedimentos ao longo do Litoral Norte do Rio Grande do Sul Brasil. *Pesquisas* 19:3-12.
- Tomazelli L J (1993) O regime dos ventos e a taxa de migração das dunas eólicas costeiras do Rio Grande do Sul. *Pesquisas*, 20(1):18-26.

- Tomazelli L J and Villwock J A (2000) O Cenozóico no Rio Grande do Sul Geologia da Planície Costeira. In: M Holz and L F De Ros (eds) Geologia do Rio Grande do Sul. CIGO/UFRGS, Porto Alegre, pp 375-406.
- Tomazelli L J, Dillenburg S R and Villwock J A (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain southern Brazil. Rev Bras Geociências 30:474-476.
- Verzi D H, Montalvo C L and Vucetich M G (1999) Afinidades y significado evolutivo de *Neophanomys biplicatus* (Rodentia: Octodontidae) del Mioceno tardio-Plioceno temprano de Argentina. Ameghiniana 36:83-90.
- Verzi D H (2002) Patrones de evolución morfológica en Ctenomyinae (Rodentia: Octodontidae). Mastozoología Neotropical 9:309-328.
- Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher T D and Wilson A C (1989) Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. Proc Natl Acad Sci USA 86:9350-9354.
- Villwock J A, Tomazelli L J, Los E L, Dehnhardt E A, Horn F N O, Bachi F A and Deunhardt B A (1986) Geology of the Rio Grande do Sul coastal province. In: Rabassa J and Balkema A A (eds.) Quaternary of South America and Antarctic peninsula. Rotterdam.
- Wlasiuk G, Garza J C and Lessa E P (2003) Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): Inferring the roles of migration and drift from genetic markers. Evolution, 57(4): 913-926.