

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

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

Fabiano Araujo Fernandes

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal

Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas

Porto Alegre

Março de 2008

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

- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) que concedeu a bolsa de estudos;
- CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico);
- FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul);
- Projeto tuco-tuco;
- Mamíferos RS.

Agradecimentos:

Alcançar um objetivo é finalizar um ciclo,
e estar apto a iniciar uma nova etapa.
O que vale se não os sorrisos, os abraços,
o convívio e as experiências....
E como valeram estes anos da minha vida!

Agradeço pelo convívio e aprendizado com pessoas muito importantes, tais como:

Renata Coura - Te amo!

Thales Freitas - com todo seu conhecimento, experiência, paciência, bom-humor, financiamento e amizade;

Rodrigo Fornel - parceiro de todas as horas e de RU;

Gabriela Fernández, Gislene Gonçalves, Carla Lopes, Tati Noviski - as amigas de laboratório;

Luciano Anão - amigo e mascote;

Elise Giacomoni, Milton Engel - amigos e companheiros ao longo destes anos em POA;

Pedro Cordeiro-Estrela - pelo "up-grade" nestes últimos anos;

Minha família: minha mãe, meus avós, minhas tias, meus primos, os Couras & Família LBCE - mesmo no Rio de Janeiro estiveram sempre por perto.

... e a todos que de alguma forma nos ajudaram a concluir este trabalho.

... e cada etapa do trabalho contou com a parceria de diversas pessoas:

- Distribuição geográfica de *Ctenomys torquatus*:

Loreci - "Ci" todos fossem iguais a você...!

Rodrigo Fornel - Visitas aos Museus em Porto Alegre, Rio de Janeiro e Uruguai;

José Stolz (e a parati) - Coletas de Santo Amaro, Cachoeira do Sul e Rio Grande;

Gislene Gonçalves - excursões pelo oeste para "descobrir" quem eram os tucos do Alegrete;

Enrique González (curador do MNHINA) - pela coleta no Uruguai e por facilitar e incentivar a visita ao Museu de História Natural e Antrologia de Montevideo;

Pedro Cordeiro-Estrela, Renata Coura, Cibele R. Bonvicino & Paulo S. D'Andrea - pelos ensinamentos e exemplos de pessoas e profissionais, e pelo financiamento da coleta no Uruguai;

Thales Freitas - como foram proveitosas e divertidas as coletas por todo Rio Grande do Sul na companhia inigualável e sob o patrocínio inestimável do Prof. Thales, em busca do mais gaúcho dos tuco-tucos. Além de disponibilizar as informações e amostras de *C. torquatus* obtidas previamente em outros estudos.

- Cariótipos:

Simone Ximenes - pelo carinho, paciência, perseverança, parceria, estudos, e por dividir comigo as informações sobre cariótipo dos *C. torquatus*;

Thales Freitas - ensinou-nos as técnicas e peculiaridades dos cromossomos de tuco-tuco.

- Morfometria craniana:

Rodrigo Fornel & Pedro Cordeiro-Estrela - nunca terei como agradecer por me conduzirem e incentivarem pelos meandros da morfometria geométrica!! Com vocês tive os momentos de estudo mais instigantes e agradáveis;

Thales Freitas - por disponibilizar toda sua coleção de crânios para as medidas e fotografias, ensinar as técnicas de morfometria clássica, e sempre estar disposto a conversar com entusiasmo sobre os crânios dos tucos.

- Variabilidade genética:

Gabriela Fernández - pela introdução aos estudos moleculares com tuco-tucos, além de toda sua simpatia e carinho incomparáveis;

Renata Coura - com dicas pra PCR's, géis, análises moleculares e estatísticas, etc;

Pedro Cordeiro-Estrela, Carla Lopes e Gislene Gonçalves - essenciais discussões e explicações sobre genéticas e afins.

Este trabalho é dedicado a
Renata Coura e Thales Freitas,
Obrigado!

Sumário

pg

i.	Resumo	vi
ii.	Abstract	vii
1.	Introdução geral	1
2.	Objetivos	5
3.	O estado da arte do conhecimento sobre <i>Ctenomys torquatus</i>	7
4.	Ampliação da distribuição geográfica e conservação de <i>C. torquatus</i>	23
5.	Polimorfismo cromossômico em <i>C. torquatus</i>	34
6.	Variabilidade genética e filogenia molecular de <i>C. torquatus</i>	51
7.	Morfometria craniana de <i>C. torquatus</i>	78
8.	Variabilidade craniana de <i>C. torquatus</i> sob o ponto de vista da morfometria geométrica	104
9.	Discussão geral - Filogeografia de <i>C. torquatus</i>	142
10.	Conclusões	153
11.	Referências Bibliográficas	156

i. RESUMO

Considerando os aspectos conceituais que envolvem a filogeografia, e devido a carência de informações sobre o roedor subterrâneo *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830 (Rodentia: Ctenomyidae), foi realizado um estudo abordando o maior número de informações sobre aspectos cromossômicos, morfométricos, morfológicos, filogenéticos, biogeográficos e sobre a distribuição geográfica, incluindo as possíveis barreiras entre as populações, para possibilitar a proposição de uma história filogeográfica para esta espécie de tuco-tuco.

O gênero *Ctenomys* ocorre na porção sul da América do Sul e *C. torquatus* apresenta uma das maiores distribuições geográficas entre os tuco-tucos, ocorrendo na região dos Pampas - em todo centro, oeste e sul do Rio Grande do Sul, e nas savanas do norte e oeste do Uruguai. A espécie apresenta polimorfismo cariotípico originado a partir de rearranjos (fissões e fusões), com quatro números cromossômicos, sendo um amplamente distribuído ($2n=44$), um restrito ao extremo sul ($2n=46$) e outros dois ocorrendo a oeste do Rio Grande do Sul ($2n=40$ e $2n=42$).

Estudos craniométricos demonstram divergência entre grupos cariotípicos e populacionais, porém, análises de morfometria geométrica demonstraram que as diferenças nos crânios estão mais relacionadas ao aspecto geográfico do que ao cariótipo, e que as principais variações encontram-se nos indivíduos que ocorrem no Uruguai (embora sejam citogeneticamente semelhantes aos que ocorrem no Brasil - $2n=44$) e nos que ocorrem no extremo sul do Brasil.

As análises moleculares com região controladora de ADNmt caracterizam a espécie como tendo baixo nível de divergência haplotípica, apresentando um haplótipo em maior frequência, que ocorre ao longo de toda a distribuição, e haplótipos com pouca divergência em relação ao mais frequente, que ocorre nas áreas periféricas da distribuição da espécie.

A reunião das informações neste estudo nos remete ao seguinte cenário: as populações de *C. torquatus* expandiram a partir do centro do Rio Grande do Sul (Depressão Central), em direção ao oeste e sul do Brasil, e também em direção ao norte e noroeste do Uruguai, com uma estruturação genética típica de uma expansão populacional, sem que tenha se passado tempo suficiente para que fosse possível se caracterizar um padrão de isolamento pela distância entre as populações. E a partir desta expansão, algumas populações iniciaram um processo de diferenciação sob a influência das mutações e da deriva genética, com diferentes níveis de influência das barreiras geográficas no processo evolutivo detectados através dos marcadores utilizados.

ii. ABSTRACT

Considering the phylogeographic concept, and due to the lack of informations about the subterranean rodent *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830 (Rodentia: Ctenomyidae), a study was conducted to gather chromosome, morphometric, morphological, phylogenetic and biogeographical informations, including the geographic distribution and possibles geographical barriers between populations, addressing as much information as possible to propose a phylogeographic story for this tuco-tuco' species.

The genus *Ctenomys* occurs in the southern portion of South America and *C. torquatus* presents one of the largest geographical distributions, occurring in Pampas' region - throughout central, western and southern Rio Grande do Sul, Brazil, and in savannas of northern and western Uruguay. The species showed karyotypic polymorphism originated from rearrangements (fusions and fissions) with four chromosome numbers: one widely distributed ($2n = 44$), one restricted to southern Brazil ($2n = 46$) and two restricted to western Rio Grande do Sul ($2n = 40$ and $2n = 42$).

Studies demonstrated craniometrics divergences among chromosomal groups and populations. However, analyses of geometric morphometric showed that the differences in skull was more related to the geographical aspect than to the karyotype, and that the major changes was observed in individuals from Uruguay (although they are genetically similar to those from Brazil - $2n=44$) and in individuals from southern Brazil ($2n=46$).

The molecular analyses with mtDNA control region characterized the species as having low haplotipic divergence, with an haplotype in greater frequency occurring throughout the species distribution, and others haplotypes in the peripheral areas with little disagreement regarding the most frequent.

The informations from this study refers to the following scenario: populations of *C. torquatus* expanded from the center of Rio Grande do Sul (Depressão Central), toward the west and south of Rio Grande do Sul, and also toward the north of Uruguay, with a genetic structure typical of populations in expansion without having sufficient time to make it possible to characterize a completelly pattern of isolation by distance. Thus, some populations begin a process of differentiation under the influence of mutations and genetic drift, without the same influence of geographical barriers in the evolutionary process at the various analysis employed.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Variabilidade genotípica e fenotípica

Esta introdução geral se propõe a fazer uma breve exemplificação de alguns dos possíveis processos que proporcionam a variabilidade nos organismos, e de como é possível analisar estes processos em função das diferentes ferramentas que podem ser empregadas nestes tipos de estudos, visto que a variabilidade pode ser expressa em diferentes níveis, seja genético, morfológico, ecológico, comportamental, entre outros.

Darwin (1859) propôs, e a moderna biologia evolutiva corroborou posteriormente, que a evolução seria baseada nas variações das características dos organismos e que a seleção natural possibilitaria mudanças evolutivas e alterações adaptativas. Uma das condições para que possam ocorrer processos de seleção natural é o fenômeno da variabilidade; que pode ser definida pela variação das características dos organismos de uma população, ou de populações diferentes (Futuyma, 1998).

Durante muitos anos a genética procurou avaliar as diferenciações entre grupos de organismos em função da variabilidade citogenética. As variações nas formas, estruturas e no número de cromossomos eram a base para diferenciações interespecíficas, e até mesmo intraespecíficas, em estudos relacionados à evolução.

Da mesma forma, a genética de populações, que se ocupa principalmente da variabilidade encontrada nas populações através dos polimorfismos, foi amplamente empregada para analisar variações entre grupos de organismos (Hartl & Clark, 1997).

Outra abordagem cada vez mais utilizada é o estudo da variabilidade através de técnicas de biologia molecular. Neste caso, pode ser considerado que uma população apresenta algum grau de polimorfismo quando são encontrados indivíduos com regiões - ou seqüências - de seu ADN (ácido desoxirribonucléico) com variações em relação ao número de nucleotídeos ou pares de bases nitrogenadas (Hartl & Clark, 1997).

Além do aspecto genético, a diferenciação pode estar relacionada também com a variação na forma dos indivíduos, ou das populações. A evolução morfológica é influenciada por uma série de processos, que ocorrem em diferentes níveis, tais como a genética ou a ecologia, e a contribuição relativa de cada um destes níveis durante a evolução dos organismos consiste em uma das principais questões da biologia evolutiva (Futuyma, 1998). Os estudos de morfologia clássica foram em sua

maioria realizados em um contexto taxonômico, investigando essencialmente estruturas cranianas e/ou dentárias (Rohlf & Marcus, 1993). Recentemente, devido ao surgimento de diversas técnicas de morfometria geométrica que permitem uma refinada quantificação das variações de forma, um novo campo de aplicações deste tipo de análise se abriu para áreas como a sistemática (Dobigny *et al.*, 2002) e a evolução das formas (Monteiro *et al.*, 2003).

Porém, a variabilidade não se limita apenas a caracteres morfológicos ou genéticos. Os fenótipos (padrões morfológicos, bioquímicos, comportamentais, etc) não são determinados exclusivamente pelo perfil genético dos organismos, mas envolvem ainda as influências do meio em que vivem, tais como: as condições nutricionais, sociais, ambientais, entre outras. A expressão fenotípica de um determinado genótipo resulta do efeito conjunto do aspecto genético, do aspecto ambiental, e também da interação genótipo-ambiente (Kingsolver *et al.*, 2002).

Assim sendo, uma das questões centrais da biologia evolutiva é conseguir mensurar e comparar as variações, além de identificar suas causas dentro e entre as populações. Para tanto, o mais adequado com vistas a realizar estudos desta natureza parece ser o emprego de abordagens multidisciplinares, integrando diferentes disciplinas e técnicas com o intuito de associar caracteres morfológicos, moleculares e citogenéticos, possibilitando uma melhor compreensão das relações sistemáticas e filogenéticas entre grupos de organismos e tornando mais viável o real entendimento da história evolutiva dos táxons.

Como fazer um estudo sobre filogeografia de Ctenomys torquatus?

Considerando os aspectos conceituais que envolvem a filogeografia, foi proposta a realização de um trabalho com a espécie de tuco-tuco *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830 (Rodentia: Ctenomyidae), que considerassem o maior número de informações possíveis relacionadas a esta espécie. Desta forma, foram realizados estudos em diferentes áreas do conhecimento, tendo sempre como foco a espécie de tuco-tuco em questão.

Os objetivos deste trabalho foram respondidos e estão descritos em capítulos que procuram apresentar uma visão do assunto abordado em cada área do conhecimento envolvendo a variabilidade das populações da espécie *C. torquatus*. Cada capítulo possui uma introdução, as metodologias empregadas, assim como os resultados e discussões inerentes a cada tema abordado.

Sendo assim, inicialmente foi realizada uma descrição do histórico do conhecimento e dos aspectos evolutivos até então publicados sobre roedores subterrâneos do gênero *Ctenomys*, mais especificamente sobre *C. torquatus*, em um estudo intitulado "O estado da arte do conhecimento de *Ctenomys torquatus* (Rodentia : Ctenomyidae)".

Em seguida foi obtida toda informação possível a respeito da distribuição geográfica desta espécie. Verificou-se que pouco era conhecido sobre as localidades de ocorrência e fazia-se necessário um estudo sobre a "Ampliação da distribuição geográfica e conservação de *C. torquatus*", no qual se constatou que esta espécie apresenta uma das maiores distribuições geográficas do gênero *Ctenomys*, e está muito mais ameaçada e envolvida em problemáticas conservacionistas do que se supunha até então.

Durante este trabalho foram coletados indivíduos em localidades onde não havia registros de tuco-tucos, ou ainda não havia informações citogenéticas. Desta forma, estas caracterizações cromossômicas encontram-se em um estudo sobre "Polimorfismo cromossômico em *C. torquatus*".

Duas abordagens são essenciais para uma avaliação filogeográfica: o aspecto molecular e o morfológico. Sob o ponto de vista molecular, foi realizado um estudo sobre a variabilidade molecular e a filogenia intraespecífica (e interespecífica) intitulado: "Variabilidade genética e filogenia molecular de *C. torquatus*" reunindo informações moleculares e filogenéticas sobre as populações de *C. torquatus*, bem como as relações desta espécie com outras espécies de tuco-tuco.

Do ponto de vista morfológico, a utilização de uma abordagem clássica como a morfometria craniana para identificação de espécies e/ou linhagens é de suma importância para o entendimento da

ocorrência e distribuição de diferentes populações. No decorrer do trabalho, à morfometria clássica foi somada uma abordagem empregando morfometria geométrica, o que possibilitou um melhor entendimento dos padrões de forma e tamanho dos crânios das populações de *C. torquatus*. Estas informações sobre o crânio da espécie estão reunidas e discutidas em dois estudos, um capítulo sobre "Morfometria craniana de *C. torquatus*", e outro sobre "Variabilidade craniana de *C. torquatus* sob o ponto de vista da morfometria geométrica".

Cada um destes estudos está apresentado sob a forma de um capítulo para melhor compreensão da formação do conhecimento obtido sobre esta espécie de tuco-tuco. E por fim, após reunir todas estas informações, foi possível a realização de um trabalho sobre "Filogeografia de *C. torquatus*", que se propõe a ser a Discussão Geral desta Tese por fazer uma reunião dos resultados obtidos nos capítulos anteriores e discutí-los sob a luz do conceito de filogeografia, com vistas a compreender a história filogeográfica desta espécie ao longo de sua distribuição geográfica.

2. OBJETIVOS

Questões a serem abordadas

Dentre as espécies de roedores fossoriais do gênero *Ctenomys*, conhecidos como tuco-tuco, que ocorrem no sul do Brasil, aquela que se encontrava menos provida de informações era *Ctenomys torquatus*. Esta situação é ainda mais preocupante na medida em que estes roedores vêm sofrendo pressões antrópicas muito fortes que estão colocando em risco, não só as espécies, como os próprios processos evolutivos.

O corpo de conhecimento obtido até então a respeito da espécie *C. torquatus* era insuficiente para o esclarecimento de uma série de questões relacionadas a esta espécie, tais como: distribuição geográfica, variações cariotípicas, aspectos morfométricos e relações filogenéticas inter e intra-específicas.

Embora se acreditasse que esta espécie apresentava uma ampla distribuição ao longo do Estado do Rio Grande do Sul, a carência de registros em possíveis áreas de ocorrência e a possibilidade de novas áreas onde indivíduos desta espécie estivessem presentes fazia com que a delimitação da distribuição geográfica da espécie ainda estivesse indefinida.

Além disso, as relações filogenéticas intra-específicas careciam de maior aprofundamento, visto ser uma espécie que apresentava variação cariotípica, além de variações morfométricas.

Deve-se considerar ainda a ocorrência de barreiras geográficas que poderiam estar atuando como mecanismos geográficos de isolamento entre populações desta espécie, tais como o Canal São Gonçalo, o Rio Jacuí, o Rio Ibicuí, ou outros acidentes geográficos ou características fitofisionômicas das áreas onde estes roedores ocorrem.

Objetivo geral

Este estudo visa a ampliação do conhecimento da distribuição geográfica e de aspectos citogenéticos, moleculares e morfométricos da espécie *Ctenomys torquatus*, procurando descrever a história filogeográfica desta espécie de tuco-tuco.

Objetivos específicos

1. Estabelecer a distribuição geográfica de *C. torquatus* no Rio Grande do Sul;
2. Analisar a variabilidade citogenética das populações desta espécie;
3. Analisar a variabilidade genética e descrever filogenias interespecíficas e intraespecífica para a espécie *C. torquatus* baseando-se em seqüências DNA mitocondrial;
4. Estudar as diferenças craniométricas intraespecíficas desta espécie de tuco-tuco, através de morfometria clássica e morfometria geométrica;
5. Confrontar os padrões encontrados a partir dos dados genéticos e dos dados morfométricos com as barreiras geográficas existentes, analisando a possível influência destas barreiras na diferenciação genética das populações, estabelecendo assim um estudo sobre "Filogeografia de *Ctenomys torquatus*".

3. O ESTADO DA ARTE DO CONHECIMENTO SOBRE *Ctenomys torquatus*

(RODENTIA: CTENOMYIDAE)

Our generation is the first to fully comprehend the threat of the biodiversity crisis and the last with the opportunity to explore and document the species diversity of our planet (Wheeler *et al.*, 2004).

INTRODUÇÃO

Os mamíferos apresentam várias adaptações aos mais diversos ambientes, podendo ser encontrados no meio aquático, arbóreo, cursorial, subterrâneo e fossorial (Nevo, 1991).

Os roedores constituem a ordem de mamíferos com o maior número de espécies, visto que contemplam cerca de 42% das 5.419 espécies atuais, com aproximadamente 33 famílias, 480 gêneros e 2.277 espécies (Wilson & Reeder, 2005).

Os roedores diferem das outras ordens principalmente por apresentarem dois pares de incisivos, um superior e outro inferior, que possuem crescimento contínuo, e pela ausência de caninos, sendo característico um longo diástema (espaço) entre os incisivos e os molariformes. A parte anterior de cada incisivo possui o esmalte resistente, enquanto a parte posterior possui uma macia dentina. Esse arranjo dos dentes incisivos, somado ao seu contínuo crescimento, permite que eles assumam a forma de lâminas cortantes. Outra peculiaridade dos roedores é a grande diversidade de modos de locomoção: são encontradas adaptações para o salto, a natação, a escavação, entre outras, e estas atividades são correlacionadas com adaptações musculares e esqueléticas (Cubo *et al.*, 2006).

Na América do Sul, os representantes da ordem Rodentia possuem significativa importância nas sucessivas faunas deste continente, desde o Oligoceno até o tempo recente, e atualmente constituem-se no grupo mais abundante e variado de mamíferos (Pough *et al.*, 2003).

No Brasil, são atualmente reconhecidos 71 gêneros e 235 espécies de roedores, com quase 40% de endemismo (Oliveira & Bonvicino, 2006). Os roedores podem ser divididos em dois grupos: Sciurognathi e Hystricognathi, que são diferenciadas principalmente pela estrutura e musculatura mandibular e pela dentição (Wilson & Reeder, 2005).

Dentre os Hystricognathi, destacamos os Caviomorfos, que podem ter se originado e diversificado na América do Sul durante o Oligoceno, aproximadamente há 30 milhões de anos (Vucetich *et al.*, 1999). As possíveis rotas de migração destes roedores são discutidas em diversos

estudos, pois foram encontrados fósseis na América do Sul, na África e na Eurásia. Huchon & Douzery (2001) resumiram as diversas hipóteses propostas para a origem e migração destes roedores, podendo ter ocorrido: uma origem americana, uma origem asiática com posterior migração através da América do Norte, através da África, ou ainda através da Austrália e da Antártica, e há ainda a possibilidade de uma origem africana, a partir de um grupo de roedores Pliomorfos, com migração pelo Oceano Atlântico. Análises moleculares baseadas em um marcador nuclear (gene vWF) propuseram que os Hystricognathi teriam se originado por volta de 46.0 a 63.0 milhões de anos (Ma), enquanto os Caviomorfos teriam surgido há 43.0 a 54.0Ma, provavelmente na Ásia, seguindo a rota migratória Austrália-Antártica, e realizando um único evento de colonização na América do Sul, com sua chegada à cerca de 36.0 a 25.0Ma, num período climático frio (Huchon & Douzery, 2001).

Os Caviomorfos apresentam uma grande diversidade, representada por 12 famílias atuais, com cerca de 44 gêneros e mais de 170 espécies, dentre as quais aproximadamente 30% pertencem à família Ctenomyidae, constituída por roedores fossoriais e subterrâneos (Wilson & Reeder, 2005).

Existem fósseis de roedores fossoriais com datação estimada para o Mioceno, com origem há aproximadamente 30-35 milhões de anos atrás associada ao aumento da aridez no fim do Oligoceno (Nevo, 1999).

Roedores Subterrâneos

Três ordens de mamíferos possuem representantes com adaptações ao modo de vida subterrâneo, são elas: Marsupialia, Insectivora e Rodentia (Nevo, 1991).

A evolução do hábito fossorial em algumas espécies de mamíferos, particularmente entre os roedores, pode estar relacionada com três fatores geo-climáticos: as formações montanhosas, as regressões marinhas e as mudanças climáticas ocorridas durante o Cenozóico (Webb, 1977). Considerando estes aspectos, Nevo (1999) propôs um cenário no qual: os períodos secos, ocorridos a partir dos ciclos de aumento da aridez durante meados do Cenozóico, proporcionaram transformações das áreas de florestas, as quais teriam regredido e possibilitado a formação de ambientes como savanas, desertos, estepes e campos, viabilizando um novo espectro de condições evolutivas e oportunidades para a diversificação dos animais. Nestes ambientes, novas condições evolutivas proporcionaram oportunidades para ocorrência de processos de diversificação e desenvolvimento de uma fauna de herbívoros, tanto cursoriais como fossoriais.

Existem alguns roedores que despendem a maior parte de suas vidas dentro dos túneis que constroem, habitando tocas ou galerias sob a superfície, e saindo eventualmente para buscar alimentos. Esses indivíduos podem ser classificados como fossoriais ou subterrâneos. Fossoriais por terem o hábito de fazer escavações, e subterrâneos porque além do hábito fossorial, passam a maior parte do tempo dentro de seus sistemas de túneis e alimentam-se de material vegetal disponível nas proximidades de suas tocas (Lacey *et al.*, 2000). Desta forma, pode-se afirmar que todo roedor subterrâneo tem comportamento fossorial, mas muitos fossoriais não são incluídos entre os subterrâneos.

Apesar da grande diversidade de ambientes e áreas geográficas nas quais os roedores subterrâneos são encontrados, considera-se o ambiente subterrâneo como sendo propenso a relativamente poucas variações, o que pode ser comprovado pelas similaridades morfológicas verificadas entre estes indivíduos (Stein, 2000). Ecologicamente, as famílias de roedores subterrâneos ocupam biocenoses semelhantes, estruturalmente simples e estáveis, as quais se caracterizam por compreenderem formações abertas. Esta similaridade pode ser observada pelas peculiares condições ecofisiológicas impostas pelos sistemas de túneis nos quais estes animais se encontram, tais como: condições de armazenamento de alimentos, a despeito da baixa produtividade; ambiente estreito e com ausência de luz; estabilidade climática (permanente e previsível), e apresentando, relativamente, baixas taxas de oxigênio (6 a 21%), altas concentrações de gás carbônico (0,5 a 4,8%) e umidade alta (Nevo, 1991; Lacey *et al.*, 2000).

As condições de estabilidade no interior das tocas, a disponibilidade de alimento, e a baixa (ou nenhuma) luminosidade poderiam sugerir que estes roedores herbívoros não apresentariam atividades circadianas. De fato, alguns estudos demonstraram que *Geomys bursarius*, *Thomomys bottae* - família Geomyidae; *Heliophobius argenteocinereus*, *Cryptomys hottentotus* e *Heterocephalus glaber* - família Bathyergidae, apresentaram atividades dispersas ao longo das 24 horas do dia sem padrão ou ritmo circadiano. Porém, existem três espécies de roedores: *Nanospalax ehrenbergi* - família Spalacidae, *Georychus capensis* e *Cryptomys damarensis* - família Bathyergidae, que apresentam padrão de atividade diurno (revisado em Begall *et al.*, 2002).

Apesar destas informações sobre roedores subterrâneos africanos, pouco se conhece com relação aos padrões de atividade destes roedores na América do Sul, exceto sobre os coruros, *Spalacopus cyanus* - família Octodontidae (Begall *et al.*, 2002), e os tuco-tucos, *Ctenoys talarum* - família Ctenomyidae (Luna *et al.*, 2000).

Informações com relação às adaptações e especializações morfológicas desenvolvidas por roedores subterrâneos podem ser encontradas em Hildebrand (1985 *appud* Lessa & Thaler, 1989), Nevo (1999) e Stein (2000), e basicamente estão relacionadas com o desenvolvimento da musculatura mandibular, da crista lambdoidal e dos ossos, com arcos zigomáticos robustos e incisivos longos e procumbentes (Verzi & Olivares, 2006).

Além destas características, estes animais apresentam uma série de adaptações morfológicas ao peculiar modo de vida subterrâneo, tais como: corpo robusto e cilíndrico, relativamente pequeno e fusiforme, cabeça relativamente grande com bula auditiva ampliada, pavilhão auricular e olhos relativamente reduzidos, embora maiores do que esperado para roedores fossoriais, cauda curta com pêlos esparsos, pescoço e membros curtos e musculosos. As patas posteriores são geralmente maiores do que as anteriores, sempre com unhas cumpridas e rígidas. Os incisivos proeminentes são compridos e têm coloração laranja brilhante (Nevo, 1979; Lacey *et al.*, 2000; Wilson & Reeder, 2005).

As patas e os dentes incisivos apresentam modificações para escavação, e estas adaptações foram classificadas em diferentes tipos: escavação com a unha, escavação com os dentes, escavação com dentes levantando a cabeça, escavação com rotação do úmero, e escavação com as patas traseiras (Hildebrand, 1985 *appud* Lessa & Thaler, 1989).

Os roedores fossoriais vivem em túneis, com números variáveis de saídas, que invariavelmente possuem um tampão de areia bloqueando a entrada. Esta proteção contribui para manutenção da estabilidade microclimática no interior das tocas (Altuna, 1991). De modo geral, são especializados em alimentação herbívora, que estaria relacionada com a estratégia de guardar alimentos dentro dos túneis (Freitas, 1990), e com uma adaptação a conservação e aproveitamento de água nos rins (Lauria de Cidre, 1974).

Este modo de vida subterrâneo proporciona menor exposição a predadores (Nevo, 1979). Embora algumas espécies sejam potenciais predadores para animais subterrâneos, existem poucos registros de corujas (*Athene cunicularia*, *Asio flammeus*, *Tyto alba*), alguns pássaros - aves de rapina (*Buteo polysoma*, *Falco spaverius*, *Bubo virginianus*) e outros mamíferos (*Felis concolor* e *Pseudalopex griseus*) predando roedores subterrâneos (particularmente tuco-tucos) no Uruguai (Altuna & González, 2006), na Argentina (Pearson *et al.*, 1968; Kittlein *et al.*, 2001) e no Chile (Gallardo & Anrique, 1991).

Os roedores subterrâneos representam um clássico exemplo de convergência adaptativa (Nevo, 1999), apresentando uma série de adaptações ao modo de vida subterrâneo que surgiram independentemente em diversos grupos, e em diferentes continentes, como reflexo das restrições ambientais a eles impostas (Stein, 2000). A ampla distribuição geográfica destes roedores, que ocorrem em quase todo o mundo, com exceção da Austrália e Antártida, pode ser demonstrada pelos oito grupos apresentados a seguir (Figura 1), de acordo com Lacey *et al.* (2000), e seguindo a nomenclatura taxonômica proposta por Wilson & Reeder (2005):

- "mole-voles" (Muridae - Arvicolinae): com dois gêneros *Ellobius* e *Prometheomys* na Eurásia;
- "zokors" (Muridae - Myospalacinae): representada pelo gênero *Myospalax* que possui sete espécies e também ocorre na Eurásia;
- "mole-rats" (Muridae - Spalacinae): com três espécies do gênero *Nannospalax* e cinco do gênero *Spalax*, ocorrendo na Eurásia e norte da África;
- "bamboo and root rats" (Muridae - Rhizomyinae): dois gêneros habitando a região sudeste da Ásia (*Rhizomys* e *Cannonys*), e o gênero *Tachyoryctes*, com onze espécies, exclusivamente no leste da África;
- "blessmols" ou "african mole-rats" (Bathyergidae): estão entre os mais bem estudados roedores subterrâneos, os cinco gêneros (*Bathyergus*, *Cryptomys*, *Georchus*, *Heliophobius* e *Heterocephalus*) distribuem-se ao sul e no centro do continente Africano;
- "pocket gophers" (Geomyidae): são os mais conhecidos roedores subterrâneos, pelos inúmeros trabalhos publicados com as trinta e cinco espécies destes cinco gêneros que habitam as Américas do Norte e Central (*Geomys*, *Orthogeomys*, *Pappogeomys*, *Thomomys* e *Zygogeomys*);
- "coruro" (Octodontidae): representado por uma única espécie no Chile: *Spalacopus cyanus*, e;
- "tuco-tuco" (Ctenomyidae): um grupo singular, que utiliza tanto os dentes quanto as patas para escavar seus túneis (Vassallo, 1998; Mora *et al.*, 2003) e apresenta uma das maiores taxas de evolução cromossômica e especiação entre os mamíferos, com 56 espécies compreendidas em um único gênero: *Ctenomys* (Reig *et al.*, 1990).

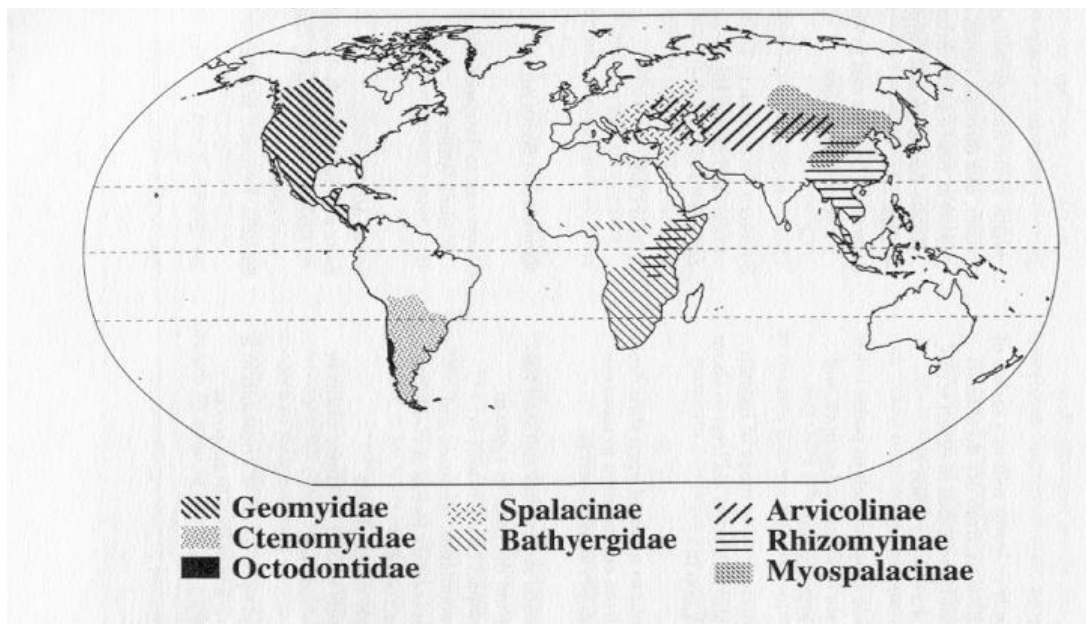


Figura 1: Distribuição geográfica dos roedores subterrâneos por família (Lacey *et al.*, 2000).

O gênero Ctenomys Blainville, 1826

Os representantes do gênero *Ctenomys* são conhecidos como tuco-tucos por uma aproximação onomatopéica com a característica de vocalização destes pequenos mamíferos.

Estes roedores foram referidos pela primeira vez por Azara em 1802. Porém, Blainville propôs o binômio *Ctenomys brasiliensis* no ano de 1826. Nos trabalhos realizados por Oldfield Thomas, entre 1896 e 1929, iniciou-se a dimensionar a grande diversidade representada pelos tuco-tucos. Na primeira revisão do gênero *Ctenomys*, Rusconi (1928) descreveu 49 espécies e nove sub-espécies. Tate (1935) referiu-se a 53 espécies, enquanto Ellerman (1940) reconheceu 51 espécies e 10 sub-espécies. Posteriormente, Cabrera (1961) reduziu para 27 o número de espécies para o gênero, mas elevou a 52 o número de sub-espécies. Esta tendência à redução do número de espécies prosseguiu com os trabalhos de Honacki *et al.*, (1982) e Woods (1984), com 33 e 32 espécies reconhecidas, respectivamente (revisado em Reig *et al.*, 1990).

Este breve histórico sobre o número de espécies reconhecidas para o gênero *Ctenomys* foi apresentado por Reig *et al.* (1990) em um trabalho que propôs uma revisão ampla dos tipos e materiais originais, assim como dos aspectos morfométrico, citogenético e de biologia de populações disponíveis àquela época. Neste estudo foi proposto que existam aproximadamente: 56 espécies e 13

sub-espécies de tuco-tuco na porção sul da região neotropical. A melhor compreensão da sistemática deste complexo gênero ainda requer muitos estudos, mas atualmente já são reconhecidas 60 espécies (Wilson & Reeder, 2005).

Este grupo pode ter sua origem associada a espécies pertencentes à fauna Chasicuana, representada pelos gêneros *Palaeoctodon* e *Xenodontomys*, com registros na região central da Argentina, desde o fim do Mioceno (5.3 Ma). Também existem fósseis relacionadas ao gênero *Ctenomys* que foram encontradas na fauna Huayqueriana (Vucetich *et al.*, 1999).

Cook *et al.* (2000) propõem que a família Ctenomyidae teria surgido no fim do Mioceno, com seis gêneros já extintos. Este período foi representado por uma grande diversidade que em seguida foi limitada por processos de extinções, após os quais apenas um gênero sobreviveu: *Ctenomys*. Este gênero, por sua vez, apresentou uma extraordinária diversificação, com a primeira forma registrada durante o fim do Plioceno, e dezenas de espécies registradas desde então (Reig & Kiblicky, 1969; Vucetich *et al.*, 1999).

A adaptação ao ambiente subterrâneo possibilitou a irradiação do gênero e a conseqüente ocupação de diversos ambientes. O resultado deste processo é a grande distribuição geográfica deste grupo, sendo amplamente distribuído em toda região sul do continente Americano. As espécies que representam este grupo ocorrem desde o altiplano andino até o nível do mar, em todos os países do sul da América do Sul: Peru, Bolívia, Chile, Paraguai, Uruguai, sul do Brasil e em toda a Argentina, até o extremo sul da região neotropical, sendo seu representante mais austral a espécie *Ctenomys maggelanicus*, na Terra do Fogo (Reig *et al.*, 1990; Lizzaralde *et al.*, 2003).

Os ambientes onde estes roedores vivem geralmente estão associados a áreas abertas. Eles são considerados solitários, com praticamente um indivíduo por toca, apesar de algumas espécies terem sido consideradas sociais, tais como *Ctenomys sociabilis* (Lacey *et al.*, 2000). Utilizam os incisivos bem protuberantes em combinação com as patas dianteiras que apresentam unhas bem desenvolvidas, para escavação e construção de suas tocas e túneis, podendo ainda auxiliar as patas traseiras na retirada da areia acumulada durante a abertura dos túneis.

Os roedores subterrâneos apresentam uma das maiores variações cromossômicas entre os mamíferos (Mascharetti *et al.*, 2000). Dentre estes, os representantes do gênero *Ctenomys* possuem a maior diversidade cariotípica, variando desde espécies com $2n=10$ (*C. steinbach*) até espécies com $2n=70$ (*C. pearsoni* e *C. dorbignyi*), com rearranjos Robertsonianos e inversões pericêntricas sendo considerados os principais mecanismos responsáveis por esta heterogeneidade cariotípica (Freitas,

2006). Além disso, variações intraespecíficas também são encontradas nestas espécies (Freitas & Lessa, 1984; Novello & Lessa, 1986; Ortells *et al.*, 1990; Gallardo, 1991; Ortells, 1995; Freitas, 1997; Gimenez *et al.*, 1997; Massarini *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2000a; Garcia *et al.*, 2000b; Freygang *et al.*, 2004).

Os tuco-tucos apresentam uma série de características associadas ao modo de vida subterrâneo, e que possibilitam um melhor entendimento do extraordinário processo de especiação cromossômica verificado neste gênero, dentre eles: distribuição geográfica em manchas (ou tuqueiras), baixa mobilidade entre as populações (ou pouca vagilidade), territorialismo, número efetivo populacional pequeno e sistema de acasalamento estruturado socialmente. Apresentam relativa longevidade (2 a 3 anos), maturidade sexual tardia (com 6 a 8 meses), período de gestação longo (cerca de 100 dias), e poucos filhotes (1 a 4 fetos) em ninhadas precoces (Reig *et al.*, 1990).

Morfologicamente, todas as espécies de tuco-tucos apresentam, de maneira bastante semelhante, as adaptações morfológicas propícias ao ambiente subterrâneo. Por outro lado, são encontradas variações com relação à coloração da pelagem, ao tamanho do crânio e ao comprimento e peso do corpo (desde 80g em *C. pundti*, até 1000g em *C. conoveri*).

Estudos filogenéticos suportam o processo de rápida diversificação deste gênero, sendo considerado o grupo de roedores subterrâneos com o maior número de espécies originadas no menor intervalo de tempo (Cook & Lessa, 1998; Castilho *et al.*, 2005).

No Brasil, existem registros isolados de ocorrência de tuco-tucos no Estado de Mato Grosso: *Ctenomys rondoni* Miranda Ribeiro, 1914, *C. bicolor* Miranda Ribeiro, 1914, *C. nattereri* Wagner, 1848 (Miranda Ribeiro, 1914; Moojen, 1952). Porém, as espécies atualmente reconhecidas, e mais amplamente estudadas sob o ponto de vista genético (Moreira *et al.*, 1991; Gava & Freitas, 2002; Gava & Freitas, 2003; Gava & Freitas, 2004; El Jundi & Freitas, 2004; Fernández-Stolz *et al.*, 2007; Lopes, 2007), citogenético (Freitas, 1990; Freitas, 1994; Freitas, 1997; Freitas, 2001; Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006; Freitas, 2007), conservacionista (Freitas, 1995a; Fernandes *et al.*, 2007), parasitológico (Linardi *et al.*, 2005), ecológico (Gastal, 1994; Marinho & Freitas, 2006; Stolz, 2006), de morfologia do crânio (Freitas, 2005; Marinho & Freitas, 2000; Massarini & Freitas, 2005) e do espermatozóide (Freitas, 1995b), e são aquelas que ocorrem no Rio Grande do Sul e no litoral sul de Santa Catarina (Figura 2).

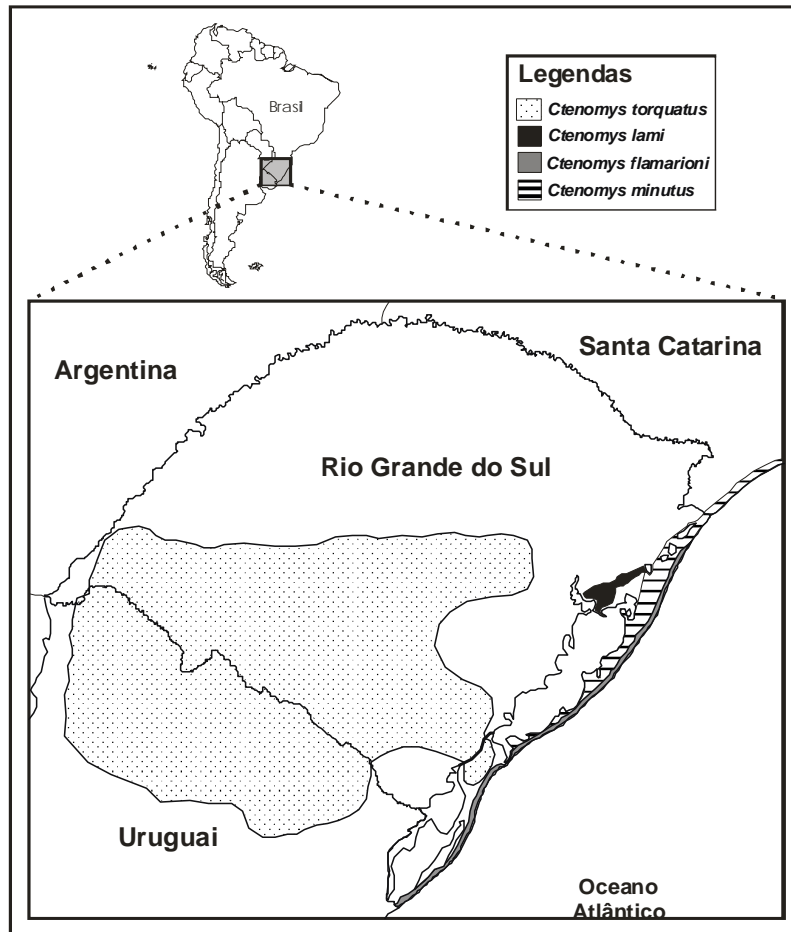


Figura 2: Distribuição geográfica das espécies do gênero *Ctenomys* no sul do Brasil.

As espécies de tuco-tuco no Rio Grande do Sul

A espécie que apresenta a distribuição geográfica mais restrita é *Ctenomys lami* Freitas, 2001, ocupando uma área denominada Coxilha das Lombas, próximo à região metropolitana de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul.

Estudos abordando aspectos moleculares (El Jundi, 2003; El Jundi & Freitas, 2004; Matte, 2006) e de morfometria geométrica craniana (Fornel, 2005) foram realizados com esta espécie. Porém, o maior enfoque reside na abordagem citogenético, visto que esta espécie apresenta a maior variabilidade cromossômica entre os tuco-tucos (Freitas, 2007). A combinação do número diplóide ($2n$) com o número fundamental (FN) forma 26 diferentes cariótipos para esta espécie, fato que, associado a sua restrita e vulnerável área de ocorrência, projeta sérios riscos à conservação das populações desta espécie, principalmente por se tratar de uma localização geográfica com forte

influência antrópica (Freitas, 2001; Freitas, 2007; Fernandes *et al.*, 2007) e pela existência de zonas híbridas com outra espécie de tuco-tuco: *C. minutus* (Gava & Freitas, 2003).

Outra espécie de tuco-tuco que ocorre no sul Brasil é *Ctenomys minutus* Nehring, 1887. Esta espécie ocorre na segunda faixa de dunas da Planície Costeira, desde São José do Norte, no sul do Rio Grande do Sul, até o farol de Santa Marta, no sul de Santa Catarina, sendo que a partir do norte do litoral gaúcho esta espécie passa a ocupar a primeira linha de dunas. Apresenta um extraordinário polimorfismo cromossômico, com 11 formas cariotípicas distintas descritas em estudos que investigaram os polimorfismos cromossômicos intraespecíficos (Freitas, 1990; Freitas, 1997; Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006), além de trabalhos que estudaram aspectos moleculares em relação ao fluxo gênico (Tchaicka; 2002), a genotoxicidade (Heuser, 2001; Heuser *et al.*, 2002), filogeografia (Lopes, 2007) e também com relação às zonas híbridas que ocorrem entre populações desta espécie (Gava & Freitas, 2002; Gava & Freitas, 2004; Castilho, 2004), e entre populações desta espécie e aquelas de *C. lami* (Gava & Freitas, 2003). Alguns estudos de ecologia e biologia populacional foram realizados com populações de *C. minutus* (Gastal, 1994; Fonseca, 2003; Marinho & Freitas, 2006), além de um trabalho com variação craniométrica em uma zona de hibridação (Marinho & Freitas, 2000).

A única espécie de tuco-tuco reconhecidamente ameaçada de extinção e endêmica do Rio Grande do Sul é *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981. Além de apresentar distribuição geográfica restrita a primeira linha de dunas do litoral gaúcho, o tuco-tuco das dunas encontra-se na lista vermelha de espécies ameaçadas do Rio Grande do Sul (Fontana *et al.*, 2003) e do Brasil (IBAMA, 2007), principalmente devido à ocupação de seu habitat pela exploração imobiliária do litoral (Fernández-Stolz *et al.*, 2007). É a única espécie de tuco-tuco no Brasil que possui coloração clara, tem o corpo robusto, apresenta um único número diplóide: $2n=48$ (Freitas, 1994), e o crânio diferenciado com relação às outras espécies de tuco-tuco do Rio Grande do Sul (Fornel & Freitas, 2005). Esta espécie foi associada ao grupo "mendocinus" por suas semelhanças com as espécies deste grupo, particularmente por sua similaridade com *C. australis* (que ocorre na Argentina) sob o ponto de vista citogenético (Freitas, 1994), craniométrico (Massarini & Freitas, 2005), e de morfologia do espermatozóide (Freitas, 1995b). Aspectos ecológicos foram abordados em estudos com populações localizadas no litoral sul do Rio Grande do Sul (Bretschneider, 1987; Stolz, 2006) e no litoral norte (Fernández, 2002; Fernández-Stolz *et al.*, 2007), e o status filogeográfico desta espécie foi recentemente proposto (Fernández-Stolz, 2007).

A espécie conhecida como tuco-tuco de colar, *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830, é a única espécie que ocorre também fora do Brasil, sendo encontrada no Rio Grande do Sul e em toda a região norte do Uruguai (Freitas & Lessa, 1984).

Ctenomys torquatus Lichtenstein, 1830

Desde 1802, quando Azara faz referências aos tuco-tucos do Paraguai e comenta sobre os sons emitidos por estes pequenos mamíferos, os roedores do gênero *Ctenomys* são popularmente conhecidos como tuco-tucos. Somente em 1826, Blainville descreve o gênero *Ctenomys*, tendo como tipo *Ctenomys brasiliensis* e a localidade-tipo "Minas Gerais" - Brasil. Apesar desta descrição original, não se tem conhecimento da ocorrência de tuco-tucos em Minas Gerais e a espécie *C. brasiliensis*, embora seja uma espécie válida, não é atualmente conhecida nem apresenta qualquer registro desde sua descrição. Uma hipótese levantada por Contreras (citada em Cicchino *et al.*, 2000) seria da descrição do gênero ter sido realizada com um exemplar oriundo de Minas, localizada no Departamento de Lavalleja, no Uruguai. Portanto, este exemplar seria provavelmente um *Ctenomys pearsoni*, ou até mesmo um *C. torquatus*. Uma revisão do tipo do gênero, e das espécies em questão, seria necessária para esclarecimento desta questão taxonômica.

Esta dificuldade com relação à localização da descrição original da espécie também acompanha a espécie *Ctenomys torquatus*, que em 1830 foi descrita por Lichtenstein tendo como sua localidade tipo "as margens do rio Uruguai e Estados do sul do Brasil", gerando, com esta definição pouco precisa, incerteza sobre a localidade do tipo da espécie. Em uma revisão sobre os espécimens de tuco-tuco no Uruguai, Langguth & Abella (1970a) citam que Nehring (1900) considerou Maldonado, no Uruguai, como a localidade tipo para a espécie *C. torquatus* e esta informação foi reproduzida por diversos outros autores. Porém, Langguth & Abella (1970a) afirmaram que Sellow, o botânico que coletou os exemplares de tuco-tuco e encaminhou a Lichtenstein para análise e descrição, não esteve em Maldonado durante o período em que os roedores haviam sido capturados. Portanto, Maldonado não seria localidade tipo da espécie e a origem exata dos primeiros roedores descritos como *C. torquatus* permanece incerta.

Muitos autores acreditavam que a localidade tipo de algumas espécies de mamíferos, incluindo roedores sigmodontíneos, seria Maldonado, no Uruguai. Porém, este fato parece estar relacionado apenas com os relatos de Darwin (1833) quando esteve visitando o Uruguai. Durante sua estada neste

país, Darwin descreveu sucintamente algumas características relacionadas aos hábitos dos tuco-tucos, particularmente em relação aos seus hábitos de "toupeira". Devido à localização geográfica destes tuco-tucos visualizados por Darwin, ele provavelmente estaria se referindo a indivíduos representantes da espécie *C. pearsoni*.

A espécie *Ctenomys torquatus* é descrita originalmente como tendo coloração dorsal bruno-amarelo brilhante, mais escuro ao longo da linha mediana dorsal, com superfície ventral e lados do corpo branco sujo, e duas faixas brancas estendendo-se das regiões pós-auriculares até a garganta formando um colar (Lichtenstein, 1830).

Estes roedores adultos pesam em torno de 200 gramas e possuem aproximadamente 250mm de comprimento do corpo e 75mm de comprimento de cauda. Apesar do padrão de coloração e do colar característico da espécie (Figura 3), variações de coloração da pelagem não são raras em *C. torquatus*, tendo sido encontrados desde indivíduos completamente melânicos (Langguth & Abella, 1970b; Fernandes *et al.*, 2005 - Figura 3) até populações com manchas brancas no dorso com diferentes padrões e formas (Gonçalves, 2007 - Figura 3). O padrão de coloração em mamíferos geralmente está associado à comunicação intraespecífica, a termorregulação ou para evitar predação (Endler, 1977), porém, entre os roedores desta espécie, nenhum destes padrões pode ser diretamente relacionado ao polimorfismo cromático (Gonçalves, 2007), e, portanto, outros processos, tais como deriva, podem ser propostos como responsáveis por este padrão.

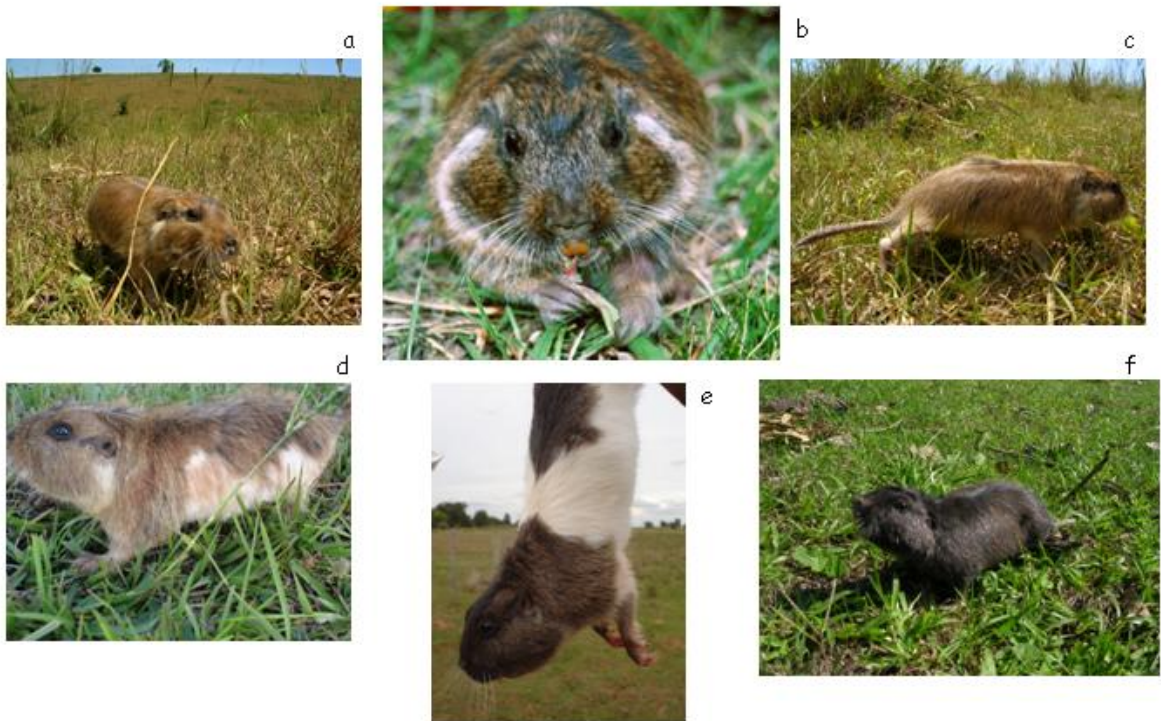


Figura 3: *Ctenomys torquatus* com coloração padrão (centro e inferior), com manchas brancas (alto à esquerda) e melânico (alto à direita). Fotos: Jorge Marinho (b), José Stolz (a,c,f), Gislene Gonçalves (d,e).

Cariótipos atribuídos a *C. torquatus* foram descritos pela primeira vez por Reig *et al.* (1966), que encontrou populações com $2n=68$ em Maldonado e Carrasco, no Uruguai, e em Médanos, na Argentina. Em 1969, Reig & Kiblicky, nas mesmas localidades, encontraram novamente o mesmo cariótipo, incluindo a informação relativa ao número de braços autossômico, ou número fundamental (NF=96). Kiblicky *et al.* (1977) analisaram algumas populações no Uruguai e descreveu quatro diferentes cariótipos para *C. torquatus*: $2n=44$ - NF=76 (em El Aguila, Salto Nuevo e Guabiyú), $2n=56$ - NF=82 (em Carrasco), $2n=64$ - NF=82 (em Maldonado) e $2n=70$ - NF=82 (em Barra de Santa Lucia, Playa Pascual e Limetas). Diante desta variabilidade cromossômica, Kiblicky *et al.* (1977) propuseram a divisão em dois grupos baseados no número fundamental (NF): o primeiro composto pelas populações com NF = 82 e 84, ao sul do Uruguai, e outro grupo incluindo as populações com NF = 76.

Posteriormente a estes estudos, Lessa & Langguth (1983) separam as populações de *Ctenomys torquatus*, localizadas ao norte do Uruguai, daquelas populações localizadas ao sul deste país, nomeando estas de "*Ctenomys pearsoni*". Estas espécies foram separadas em função de diferenças relacionadas à morfologia e morfometria craniana. Além das diferenças cranianas e dos números cariotípicos ($2n=56$, 64 e 70), a morfologia peniana também foi identificada como um diferencial entre as duas espécies (Altuna & Lessa, 1985; Lessa & Cook, 1989). O nome *Ctenomys torquatus* foi mantido para as populações com $2n=44$ no norte do Uruguai devido à semelhança das características cranianas destes indivíduos com o exemplar tipo da espécie depositado no Museum für Naturkunde, em Berlim (Freitas & Lessa, 1984).

Em função desta questão taxonômica, alguns trabalhos foram realizados supostamente, com *C. torquatus*, no Uruguai, quando na verdade estavam tratando de exemplares de *C. pearsoni*, dentre eles destacam-se estudos sobre: captura e distribuição geográfica (Tálice *et al.*, 1954; Tálice *et al.*, 1973), biologia reprodutiva (Barlow, 1969; Tálice & Mosera, 1958), etologia (Tálice *et al.*, 1974) e fisiologia (Lauria de Cidre, 1974).

Um exemplo da importância de esclarecer devidamente esta questão taxonômica pode ser verificado em um estudo realizado por Altuna *et al.* (1998). Neste trabalho foi registrado coprofagia em *C. pearsoni* no Uruguai, e discute-se o fato de Tálice *et al.* (1959) ter relatado ausência deste processo de reingestão de fezes em *C. torquatus* no Uruguai. Quando os trabalhos foram realizados, em condições de laboratório, por Tálice e seus colaboradores, provavelmente foram utilizados exemplares de *C. pearsoni*, porém, naquele momento estes indivíduos eram considerados *C. torquatus*. Ou seja, o que podemos afirmar é que existem registros recentes de coprofagia para *C. pearsoni*, embora não tenha sido detectado tal comportamento anteriormente. E não existem registros publicados sobre coprofagia em *C. torquatus*, embora seja um comportamento normalmente observado em tuco-tucos, incluindo *C. torquatus* (Freitas, comunicação pessoal).

Alguns estudos envolvendo exemplares corretamente classificados como *C. torquatus* provenientes do Uruguai foram realizados com abordagens filogenéticas (D'Elia *et al.*, 1999; Cook & Lessa, 1998; Castillo *et al.*, 2005; Tomasso & Lessa, 2006), cromossômicas (Kiblicky *et al.*, 1977; Villar *et al.*, 2005; Novello & Villar, 2006; Slamovits *et al.*, 2000) e de morfologia peniana (Altuna & Lessa, 1985; Lessa & Cook, 1989), invariavelmente relacionando esta espécie com aquela que é considerada filogeneticamente mais próxima: *C. pearsoni*.

No Brasil, poucos estudos foram realizados com *C. torquatus*, incluindo trabalhos sobre polimorfismo cariotípico (Freitas & Lessa, 1984; Freitas, 2006), sobre o tipo de espermatozóide simétrico destes roedores (Freitas, 1995b), com relação à distribuição geográfica e sua situação do ponto de vista da conservação (Freitas, 1995a; Fernandes *et al.*, 2007), abordando alguns aspectos ecológicos (Travi, 1983), moleculares e morfológicos (Gonçalves, 2007), e estudos genotóxicos em áreas de mineração de carvão (Silva *et al.*, 2000a; Silva *et al.*, 2000b).

Freitas & Lessa (1984) descreveram duas formas cromossômicas para *Ctenomys torquatus* no sul do Brasil. Os cariótipos dos espécimens de *C. torquatus* apresentaram dois números diplóides diferentes: $2n=44$ (NF=72), em Laranjal, município de Pelotas, e $2n=46$ (NF=72) em Barra Falsa, Pelotas (localizada a 11 Km de Laranjal), e na Estação Ecológica do Taim (localizada a 82 Km de Barra Falsa). Este trabalho caracterizou pela primeira vez para roedores do gênero *Ctenomys* os padrões de banda C e G, e também as regiões organizadoras nucleares.

A forma cromossômica $2n=44$, tendo sido também descrita por Kiblicky *et al.* (1977) no Uruguai, sugeria uma uniformidade cariotípica ao longo de 540Km entre Brasil e Uruguai. Enquanto a forma cromossômica $2n=46$ ficava restrita a uma área entre a Lagoa Mirim e o Oceano Atlântico (Freitas & Lessa, 1984).

A forma $2n=44$ parece ser mais antiga devido à sua maior distribuição geográfica. Acredita-se que o evento responsável pela origem da forma $2n=46$, seja uma fissão centromérica no par cromossômico número 7 da forma $2n=44$, originando os pares 14 e 16 na forma $2n=46$ (Freitas & Lessa, 1984). Estas informações cariológicas, associado ao hábito subterrâneo e a baixa vagilidade apresentada pelos tuco-tucos levaram os autores a propor que estas formas cromossômicas constituíam duas raças cromossômicas (Freitas & Lessa, 1984).

Neste mesmo estudo, Freitas & Lessa (1984) detectaram diferenças nos padrões de coloração inter e intrapopulações, sem associação com a variação cromossômica. Além disso, medições craniométricas tomadas de fêmeas adultas de *C. torquatus* apresentaram diferença significativa ($P<0,05$) entre as espécimens de Laranjal ($2n=44$) e aqueles de Barra Falsa-Taim ($2n=46$), embora este resultado se referisse apenas ao tamanho total da cabeça.

A distribuição geográfica de *C. torquatus* no Brasil, descrita por Freitas (1995), estava restrita a pontos isolados na depressão central do Rio Grande do Sul (Minas do Leão, Butiá e Rio Pardo), na região da Campanha (Candiota) e porção sudoeste do Estado (Pelotas, Rio Grande e Taim) (Figura 4).

Em algumas destas localidades onde ocorriam áreas de extração de carvão (Candiota e Butiá) foi realizado um estudo de biomonitoramento que demonstrou que *C. torquatus* é um excelente organismo como bioindicador exatamente por ser sensível a danos biológicos causados pela extração de carvão e seus derivados (Silva *et al.*, 2000a, Silva *et al.*, 2000b). Esta informação possibilitaria classificar esta espécie de tuco-tuco como potencial biomonitor ambiental e possivelmente ameaçada pela atividade extrativista e todos os danos advindos desta (Freitas, 1995).



Figura 4: Mapa do Rio Grande do Sul com as localidades de ocorrência de *Ctenomys torquatus*, com seus respectivos números cromossômicos, proposta por Freitas (1995). Em vermelho está representada a localização da capital do Estado, Porto Alegre.

4. AMPLIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E CONSERVAÇÃO DE

Ctenomys torquatus (RODENTIA : CTENOMYIDAE)

INTRODUÇÃO

O conhecimento da história evolutiva dos pequenos mamíferos pode fornecer informações úteis em relação às modificações ambientais ocorridas no passado, e essas modificações podem ser importantes para entender o processo evolutivo da distribuição geográfica e divergência genética entre as populações. A análise dos processos evolutivos e biogeográficos que caracterizam um grupo de organismos é possível apenas a partir de uma amostragem ampla e que compreenda a maior diversidade possível (Almeida *et al.*, 2007).

Além disso, a distribuição geográfica de uma espécie representa a informação básica para subseqüentes estudos biogeográficos ou filogeográficos. Estas informações sobre as áreas de ocorrência das espécies são ainda mais críticas se considerarmos que estas se constituem nas bases para avaliações conservacionistas. Entretanto, a distribuição geográfica de diversos *taxa* ainda encontra-se extremamente pouco estudada, principalmente em regiões tropicais. É esta carência de informações geralmente dificulta ações mais diretas e eficazes com vistas à conservação das espécies (Anderson & Martínez-Meyer, 2004).

Diversos fatores estão relacionados aos padrões de distribuição geográfica das espécies. Inicialmente, os aspectos ecológicos tais como: temperatura, precipitação, tipo de solo, refúgios e as interações com os diversos fatores ambientais formam o que podem ser consideradas como as condições fundamentais para ocorrência de um grupo de organismos em uma determinada área. Além destes, fatores biológicos e históricos interferem, e são co-responsáveis, pela viabilização da existência das espécies ao longo de suas potenciais áreas de distribuição geográfica. Por exemplo, o potencial ecológico de uma espécie pode ser alterado em função de interações bióticas com outras espécies, através de eventos de competição, predação ou parasitismo, reduzindo sua real área de ocorrência a uma fração da área em potencial para a espécie. Ou ainda, fatores históricos, pressões antrópicas ou barreiras geográficas podem também restringir as áreas de distribuição das espécies (revisado em Anderson *et al.*, 2002).

Fatores como a estrutura vegetacional e as condições do solo (textura, microtopografia e umidade, entre outras) podem ter contribuído ao longo do tempo, para a descontinuidade e fragmentação das populações animais, particularmente de tuco-tucos (Lizarralde *et al.*, 2001).

Registros históricos indicam que em áreas onde as populações de tuco-tuco eram abundantes, tal como na Terra do Fogo - extremo sul do continente sul-americano, a ação antrópica pode ter sido um fator importante na redução das áreas de ocorrência destes roedores, visto que até o período em que houve a introdução do gado na região, os tuco-tucos constituíam um dos principais alimentos dos nativos que habitavam aquela região (Gusinde, 1982 *appud* Lizarralde *et al.*, 2001).

Outro fator importante na formação dos atuais padrões de distribuição e áreas de ocorrência dos tuco-tucos é o impacto da predação em virtude do crescimento do setor agrário, uma vez que estes roedores são historicamente considerados como pragas agrícolas em toda sua distribuição devido aos seus hábitos herbívoros (Pearson *et al.*, 1968; Massoia, 1970; Malizia & Busch, 1997).

O gênero *Ctenomys* apresenta sua distribuição por toda a região sul da América do Sul, sendo que as espécies distribuem-se em manchas e ocupam áreas desde o nível do mar até mais de 4000 metros nos Andes Peruanos (Pearson *et al.*, 1968; Reig *et al.*, 1990). No entanto, dentre as mais de 60 espécies descritas poucas têm sua real distribuição geográfica conhecida, sendo algumas relatadas apenas em suas localidades tipo (Pearson & Christie, 1985), e outras com distribuição extremamente pequena, como por exemplo: *C. lami* (Freitas, 2001) e *C. rionegrensis* (D'Elia *et al.*, 1998). Assim, é importante que se descreva a distribuição destas espécies, pois isto trará aporte aos trabalhos de conservação, sistemática, citogenética, morfologia, marcadores moleculares e filogenias, entre outros.

No Rio Grande do Sul, duas espécies de tuco-tuco ocorrem ao longo da primeira e da segunda linha de dunas do litoral: *C. flamarioni* Travi, 1981 e *C. minutus* Nehring, 1887, respectivamente. A primeira delas é considerada ameaçada de extinção na lista de animais ameaçados do Rio Grande do Sul e do Brasil, enquanto a segunda foi considerada até poucos anos atrás como a espécie com a maior distribuição geográfica no Estado (Freygang *et al.*, 2004). A terceira espécie que ocorre no sul do Brasil é *C. lami* Freitas, 2001, que apresenta distribuição geográfica extremamente restrita e pode ser considerada potencialmente ameaçada de extinção. Além destas, ocorre ainda a espécie alvo deste estudo: *C. torquatus* Lichteinstein, 1830 (Freitas, 2006).

A espécie *Ctenomys torquatus* tem registros de ocorrência para as localidades de Rio Grande, Taim e Pelotas, no Rio Grande do Sul, e em Ansina, Cuñapiru, Salto, Paysandu e El Aguila, no Uruguai

(Freitas & Lessa, 1984); além de populações em Candiota e Butiá (Silva *et al.*, 2000a). A população descrita para Médanos, na Argentina, não tem nenhum tipo de relação com *Ctenomys torquatus*. Freitas (1995a) reuniu as localidades de ocorrência para a espécie e acrescentou Minas do Leão e Rio Pardo, no entanto, apesar destes esforços, o conhecimento a respeito da distribuição geográfica desta espécie de tuco-tuco era o menos compreendido até o fim do século passado considerando as espécies do gênero que ocorrem no Rio Grande do Sul.

Freitas (1995a) sugeriu a possibilidade de esta espécie estar ameaçada, uma vez que os poucos registros de ocorrência desta espécie no Rio Grande do Sul coincidiam com áreas de usinas de extração de carvão mineral. Este fator, associado à comprovada susceptibilidade destes roedores aos danos genotóxicos oriundos da atividade mineradora (Silva *et al.*, 2000a) e da crescente expansão das áreas de agricultura mecanizada no Estado (Bertê, 2004), particularmente ao longo da distribuição destes roedores, torna esta espécie cada vez mais susceptível a extinções locais devido à alteração das suas prováveis áreas de ocorrência.

Apesar de alguns estudos citogenéticos (Kiblisky *et al.*, 1977; Freitas & Lessa, 1984; Villar *et al.*, 2005; Freitas, 2006; Novello & Villar, 2006), aloenzimáticos (Moreira *et al.*, 1991), moleculares (D'Elia *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2005), de morfologia craniana (Freitas & Lessa, 1984; Freitas, 2005), morfologia do espermatozóide (Freitas, 1995b; Lessa & Cook, 1989) e genotoxicidade (Silva *et al.*, 2000a; Silva *et al.*, 2000b) terem sido realizados com *C. torquatus* até o momento, as áreas de ocorrência e os limites geográficos desta espécie ainda não haviam sido devidamente investigados no Rio Grande do Sul.

Neste trabalho são apresentados novos registros de ocorrência para *C. torquatus*, ampliando sua distribuição geográfica no Rio Grande do Sul, Brasil, e delimitando as localidades de ocorrência no Uruguai. Além disso, são discutidos alguns aspectos relativos à conservação desta espécie, a despeito de sua distribuição relativamente ampla.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas excursões de coleta no Rio Grande do Sul entre Janeiro de 2005 e Julho de 2007, percorrendo possíveis áreas de ocorrência de *C. torquatus* nas regiões central, meio-oeste, extremo-oeste, sul e sudeste do Rio Grande do Sul. Os animais foram coletados vivos com armadilhas especiais para roedores fossoriais do tipo Oneida Victor nº0, coberta com borracha.

Todos os tuco-tucos coletados foram cariotipados, obtidos tecidos para análises moleculares e anotadas suas características bionômicas. Parte da amostra foi "taxidermizada" (preparado pele e crânio) e depositada na coleção de mamíferos do Departamento de Genética na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As coletas foram conduzidas com permissão do IBAMA, através de licença de coleta Nº 017/2005 e 064/2006.

Foram realizadas visitas a Museus e coleções mastozoológicas, dentre elas: Fundação Zôobotânica, Rio Grande do Sul; Museu Nacional, Rio de Janeiro; e Museu Nacional de História Natural e Antropologia, de Montevideo, além de consultas a coleções disponíveis na internet que dispunham de informações sobre registros e áreas de ocorrência desta espécie, a partir das quais foi possível investigar as áreas de ocorrência de *Ctenomys torquatus* no Brasil e no Uruguai.

RESULTADOS & DISCUSSÃO

Distribuição Geográfica

Foram coletados exemplares de *Ctenomys torquatus* em dez localidades até então sem registro desta espécie no Rio Grande do Sul, Brasil. As novas áreas de ocorrência para a espécie *C. torquatus* ampliam sua distribuição geográfica pelas regiões sul e central, e se estende até o extremo oeste do Rio Grande do Sul (Figura 1).

A distribuição geográfica dos organismos é determinada por uma combinação de fatores ecológicos, históricos e evolutivos (Anderson *et al.*, 2002). Desta forma, a atual distribuição de *Ctenomys torquatus* no Rio Grande do Sul e no Uruguai deve-se à história geomorfológica, ecológica e evolutiva da região dos Pampas, ou Campos Sulinos, em associação com os processos de regressão e transgressão da Planície Costeira.

As populações encontradas no município de Rio Grande (incluindo aqueles indivíduos da Estação ecológica do Taim) estão restritas a uma faixa de aproximadamente 100Km de extensão limitada pelo Canal de São Gonçalo, pelo Oceano Atlântico, pela Lagoa Mirim e pelos Banhados do Taim (Figura 1). Estas populações representam o limite sul da distribuição geográfica de *C. torquatus* no Rio Grande do Sul, pois não foram encontrados exemplares desta espécie mais ao sul do Brasil, em coletas realizadas a partir do Taim até o Chuí.

A ocorrência de *C. torquatus* no norte do Uruguai (Kiblicky *et al.*, 1977; Freitas & Lessa, 1984; Langguth & Abella, 1970a; Langguth & Abella, 1970b; Novello *et al.*, 1990; Novello *et al.*, 1996; Villar, *et al.* 2005; Novello & Villar, 2006), já indicava a possível ocorrência desta espécie no sul do Brasil, porém não havia registros na literatura que corroborassem esta possibilidade, com exceção de populações em Pelotas, Candiota e Rio Grande (Freitas & Lessa, 1984; Freitas, 1995a; Silva *et al.*, 2000a; Silva *et al.*, 2000b). Os novos registros apresentados neste trabalho demonstram a distribuição deste tuco-tuco por toda a porção sul do Rio Grande do Sul, numa extensão de aproximadamente 520Km na direção sudeste-oeste, desde Taim até Itaqui, e de aproximadamente 460Km, direção leste-oeste, desde General Câmara até Itaqui, extremo oeste do Estado; e de aproximadamente 320Km na direção norte-sul, a partir de Candelária até o Taim. Considerando ainda a distribuição desta espécie de tuco-tuco no Uruguai, cerca de 650Km separam as populações de Rio Negro, Uruguai, do registro mais ao norte para *Ctenomys torquatus* em Candelária, Brasil. Estes registros comprovam ser esta uma das espécies com maior distribuição geográfica na família Ctenomyidae.

A ocorrência de tuco-tucos está associada a áreas de campos de areia (Radam Brasil, 1985; Lacey *et al.*, 2000) e a alturas médias inferiores a 200 metros de altitude (Figura 2), desta forma, a presença do Planalto Meridional no norte e nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, provavelmente sejam limitadores para a expansão destes roedores ao norte. Este fato é corroborado pelas novas localidades de ocorrência de *C. torquatus* em Passo Verde (município de Santa Maria), na região central, e nos municípios de Cachoeira do Sul e General Câmara (Figura 1). Estas populações representam o norte da distribuição geográfica desta espécie, sendo o limite norte da distribuição no Brasil registrado em Candelária, a partir de dois crânios (MNHNA 1885 e M 235986) depositados em Museus no Uruguai (Museu Nacional de História Natural e Antropologia, de Montevidéo) e nos Estados Unidos da América (American Museum), ambos coletados em 1969, por A. Ximenez.

Foram inventariadas localidades nos municípios de Tupanciretã e Santiago, na região do Planalto Meridional, além de São Borja, na região da Campanha (Pampa), no extremo oeste do Rio Grande do Sul, e não foram encontrados registros de tuco-tucos em nenhuma destas áreas, seja através de observação direta ou por entrevistas com habitantes destas regiões.

Da mesma forma que a distribuição norte está limitada pelo Planalto Meridional, as formações da Serra do Sudeste parecem ser um limitador para a ocorrência de tuco-tucos, visto que, exatamente nesta região, ao longo de toda a porção centro-sul e sudeste do Rio Grande do Sul, não foram encontrados exemplares destes roedores (Figura 2). Esta ausência pode estar associada à natureza geológica desta região, sendo 40.000 Km² dos 44.000 Km² cobertos predominância de granito (Rambo, 2000).

No município de Alegrete foram encontradas populações de tuco-tucos que apresentaram diferenças com relação à coloração da pelagem e ao cariótipo padrão para *C. torquatus* (2n=44). Estas populações encontram-se distante cerca de 30Km, na direção oeste, de uma população de *C. torquatus* padrão, e apresentam variações de pelagem, podendo apresentar ou não manchas brancas nos flancos. Além deste polimorfismo cromático, estes indivíduos possuem variação cromossômica, com números diplóides 2n=40 e 2n=42 (Gonçalves, 2007). Estes polimorfismos cromossômicos e os aspectos craniométricos destas populações serão analisados em outros capítulos.

Foram realizadas coletas na região do litoral leste do Uruguai, em Santa Tereza, a aproximadamente 30Km da fronteira com o Brasil. Nesta região do Uruguai os tuco-tucos coletados foram identificados através de cariótipo e de morfometria craniana como pertencentes à espécie *C. pearsoni*, o que nos permite afirmar que a distribuição de *C. torquatus* não se estende pela região leste do Uruguai, sendo a região da Estação ecológica do Taim (município de Rio Grande), o limite desta espécie na porção sudeste do Rio Grande do Sul. Embora ainda haja ausência de informações sobre as localidades de ocorrência de *C. torquatus* no Uruguai, pode-se considerar os registros do Museu de História Natural e Antropologia de Montevideo para afirmar que esta espécie ocorre em toda a região norte do Uruguai, nos departamentos de Cerro Largo, Rivera, Tacuarembó, Rio Negro, Paysandú e Salto. Desta forma, a espécie *C. torquatus* apresenta não somente a maior distribuição geográfica entre as espécies de tuco-tuco estudadas, como uma das maiores distribuições geográficas de toda família Ctenomyidae, além de uma peculiar uniformidade cariotípica (2n=44) bastante ampla e incomum nesse gênero.



Figura 1. Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com os municípios onde estão as novas localidades de ocorrência (círculos) de *Ctenomys torquatus*: Dom Pedrito, Santana do Livramento, Quaraí, Uruguaiana, Itaquí, Alegrete, Rosário do Sul, Santa Maria, Cachoeira do Sul e General Câmara, incluindo um único crânio coletado em 1969 em Candelária (*). Além das localidades onde já havia registro de ocorrência desta espécie no Brasil: Estação Ecológica do Taim, Rio Grande, Pelotas, Candiota, Butiá e Rio Pardo, e no Uruguai: Cerro Largo, Rivera, Paysandu, Salto e Tacuarembó. São demonstradas ainda as localidades visitadas onde não foram encontrados registros de populações de tuco-tucos: São Borja (A), Santiago (B), Tupanciretã (C), São Gabriel (D) e Caçapava do Sul (E).

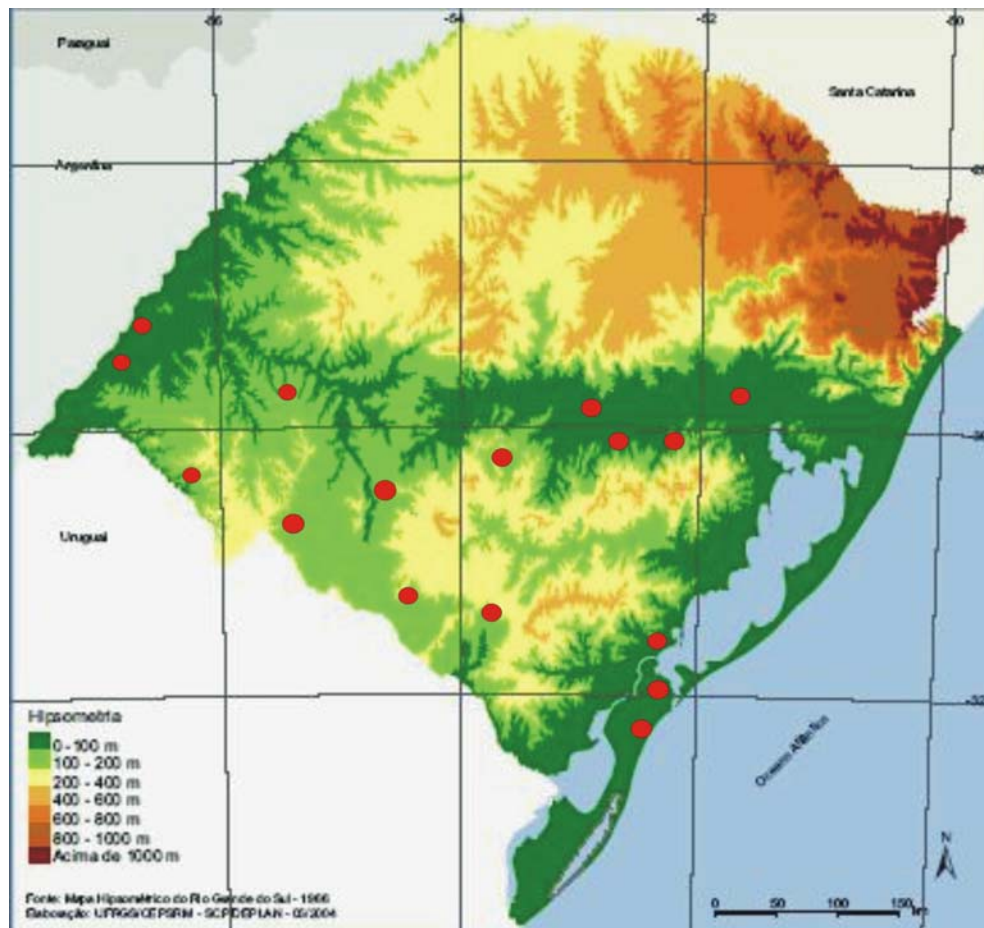


Figura 2: Mapa hipsométrico (altitudes) do Estado do Rio Grande do Sul (www.scp.rs.gov.br) com os pontos das localidades de coleta em vermelho.

Ecologia

A ampla distribuição geográfica desta espécie pode estar relacionada com aspectos de adaptação ecológica destes roedores aos ambientes relativamente distintos em que habitam, particularmente no que diz respeito ao tipo de solo, pois, embora não tenha sido devidamente mensurado até então, as populações de *C. torquatus* podem ser encontradas habitando diversos tipos

de solos formados por campos de areia menos densa (Pelotas) ou mais rígidas - próximos a regiões de reservas de carvão (Candiota e Butiá) ou não (General Câmara).

Silva (1999) investigou mais de duzentos indivíduos, de três populações de *C. torquatus*, em localidades com diferentes tipos de solos. Embora o objetivo deste trabalho tenha sido comparar as populações em relação aos níveis de genotoxicidade, os dados biométricos foram tomados e foram analisadas as diferenças morfológicas externas (tamanho do corpo, tamanho da cauda, tamanho da pata com unha, tamanho da pata sem unha, e peso) dos indivíduos destas populações (dados não publicados).

Em função do dimorfismo sexual, com machos sendo maiores do que as fêmeas, os machos e as fêmeas foram analisados separadamente com relação às diferenças biométricas entre as três populações. O resultado mais significativo foi a diferença entre as populações de fêmeas com relação à medida do pé com unha ($p < 0,001$). O teste de Tukey realizado identificou que a população da localidade que apresenta o tipo de solo mais rígido (Candiota) foi a mais diferente entre as três analisadas. Esta diferença no tamanho da pata com unha pode estar relacionada com o tipo de solo mais rígido no qual a população de Candiota habita. Estes indivíduos fazem suas tocas em solos muito rígidos e isto pode ser um fator que possibilite a diferenciação com relação ao tamanho da unha quando comparados com os indivíduos de outras populações desta espécie. Esta adaptabilidade aos diferentes tipos de solo pode ser uma importante habilidade que potencializou aos roedores desta espécie de conseguir habitar diversos lugares em uma grande distribuição geográfica no sul do Brasil e norte do Uruguai.

Conservação

Apesar da sua larga distribuição geográfica, muitas perguntas ambientais podem ser dirigidas a populações de *C. torquatus* (Fernandes *et al.*, 2007). A distribuição geográfica no Rio Grande do Sul coincide com a distribuição de reservas de carvão (Freitas, 1995a) para o qual esses roedores são sensíveis (Silva *et al.*, 2000b). Outros fatores importantes que põem as suas populações em perigo são modificações ambientais como inundações e secas (Bertê, 2004). Além disso, ambos os biomas onde *C. torquatus* ocorre no Brasil (Campos Sulinos e Planície Costeira) são considerados como áreas de prioridade da conservação (Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2000).

Os Campos Sulinos, também chamados de Campanha Gaúcha nas regiões centro e sul do Rio Grande do Sul, caracterizam-se pela grande diversidade de habitat (banhados, várzeas, matas

ripárias e areais), uma flora peculiar e elementos faunísticos provenientes do Uruguai e Argentina. Esta área apresenta como principais ameaças: o aumento das criações de gado ovino, de lavoura de arroz com drenagens dos banhados, construção de termelétrica e gasoduto, além do processo de urbanização. Esta região apresenta uma enorme lacuna sobre o conhecimento a respeito de seu estado de conservação, visto que a avaliação da cobertura dos remanescentes de vegetação deste bioma permanece incipiente. O Rio Grande do Sul, onde está concentrada a maior extensão de campos, possui mais de 13.000.000ha de área, em diferentes estágios de conservação e antropização (Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2000).

Outro fator relevante é a pouca representatividade da Campanha Gaúcha no sistema de unidades de conservação. Ainda de acordo com informações do Ministério do Meio Ambiente, Brasil (2000), a forte pressão sobre as comunidades vegetais, em particular a incidência do fogo, introdução de espécies forrageiras, o plantio de soja e a atividade da pecuária, têm levado algumas áreas ao processo de desertificação.

A Planície costeira, por sua vez, ocupa extensa área de vegetação de restinga, com a ocorrência de banhados salinos no estuário da laguna dos Patos, ambientes únicos no Brasil, com grande número de espécies endêmicas (por exemplo: *C. flamarioni*) e ameaçadas de extinção. A área vem sofrendo acentuada pressão antrópica, especialmente pela especulação imobiliária no litoral, e pela cultura extensiva de arroz irrigado, que ameaça diversas áreas de banhado e campos de várzea.

Alguns dos problemas ambientais mais graves pelos quais o Rio Grande do Sul têm passado nos últimos anos estão estritamente relacionados com as áreas de ocorrência das populações de *C. torquatus*. Nas áreas de campos arenosos, particularmente nas regiões da Campanha e da Planície Costeira, desenvolveu-se a partir da década de 60, intensa atividade de cultivo de soja e arroz irrigado e outras monoculturas, com a introdução da mecanização da agricultura e insumos químicos. As enchentes e estiagens periódicas também se apresentam como problemas ambientais crescentes na região da Campanha, além do processo de arenização na região centro-oeste (Bertê, 2004). Além disso, a atividade mineradora, comprovadamente responsável por elevada degradação ambiental, se distribui por praticamente todos os municípios do Rio Grande do Sul (Bertê, 2004). Fato este particularmente agravado pela ocorrência de populações de tuco-tucos em algumas áreas de exploração de carvão mineral, associado à susceptibilidade destes organismos às ações genotóxicas oriundas desta atividade mineradora (Silva *et al.* 2000a; Silva *et al.* 2000b; Bertê, 2004). Silva *et al.* (2000a; 2000b) demonstraram através de testes de micronúcleo e teste de cometa que estes

roedores apresentam danos em seu ADN em função dos resíduos ambientais oriundos do processo de extração do carvão.

A ausência de informações sobre o impacto destas atividades nas populações animais torna imprescindível estudos não apenas com relação à biologia geral da espécie, mas também das interações destas com suas áreas de ocorrências e as conseqüências para as populações, e em última escala para a espécie.

Em ambos os países, reflorestamentos com espécies de árvores introduzidas (tais como eucaliptos e pinheiros) também provocaram danos e alterações na biodiversidade das paisagens dominantes. O impacto de todas essas questões permanece desconhecido e os esforços de ações conservacionistas podem ajudar a clarificar o verdadeiro *status* de conservação de *C. torquatus*. Além disso, programas de conservação devem ser propostos visto que não há qualquer unidade de conservação habitada por populações de tuco-tucos-de-colar no Brasil.

Conclusões

Desde Freitas (1995a), existia uma carência de informações com vistas à conservação das populações de *C. torquatus*. Desta forma, este trabalho traz uma importante contribuição à ampliação do conhecimento sobre a distribuição geográfica desta espécie, indicando que a sua ampla área de ocorrência, aliada à complexidade de fatores que influenciam estas populações, pode ser um complicador para que medidas conservacionistas adequadas possam ser tomadas, o que nos obriga a estar atentos com relação à sobrevivência das populações de *C. torquatus*.

Foi possível corroborar a ocorrência desta espécie de tuco-tuco em áreas abertas de campos de areia nos Pampas e no sul da Planície Costeira do Rio Grande do Sul, embora todos os indivíduos coletados ocorressem neste tipo de formação, nem todos os campos registraram a presença destes roedores em função de suas características biológicas e das relações históricas e geográficas que proporcionaram a distribuição geográfica atual desta espécie.

Estudos com maior número de indivíduos das populações já descritas e novas áreas de coleta, para investigar possíveis lacunas na distribuição geográfica, podem ser de grande valia para acrescentar informações que possam ajudar a evitar ou minimizar a ameaça que paira sobre esta espécie de tuco-tuco.

5. POLIMORFISMO CROMOSSÔMICO EM *Ctenomys torquatus* (RODENTIA: CTENOMYIDAE)

INTRODUÇÃO

Cromossomos são as unidades de herança genética contidas nos núcleos das células dos eucariotos. Estes cromossomos podem diferir em tamanho e forma, e também em relação ao seu número. Todas estas alternativas estão sujeitas a alterações evolutivas, podendo variar entre (e até mesmo dentro de) indivíduos e/ou organismos, como por exemplo: diferenças no número cromossômico de diferentes espécies (Schubert, 2007).

Variações cariotípicas, seja em relação ao número diplóide, à morfologia cromossômica, ou ambos, não são consideradas exceções em diversas espécies de mamíferos. Embora as taxas de ocorrência de rearranjos cromossômicos sejam similares entre diversas espécies, e alguns autores acreditem que esses rearranjos normalmente não produzem efeitos fenotípicos significativos, em algumas ocasiões os rearranjos podem reduzir a fertilidade dos heterozigotos ou facilitar a fixação dos homozigotos, e se tornar uma barreira reprodutiva, isolando diferentes raças cromossômicas e podendo conduzir, em alguns casos, à especiação (White, 1978; Lande, 1984).

A fixação de rearranjos cromossômicos geralmente está relacionada a pequenos tamanhos populacionais, podendo estes rearranjos ser selecionados negativamente quando em minoria, ou positivamente quando em maioria, ou ainda podem ser fixados por efeito de deriva genética, especificamente em populações fortemente subdivididas com pequenos demes (Lande, 1979).

Os tipos de rearranjos estruturais mais recorrentes em populações naturais de roedores são: fusões ou fissões Robertsonianas, geralmente com a translocação de um braço cromossômico, e inversões pericêntricas. Outros processos, tais como: fusões em tandem, translocações recíprocas e inversões paracêntricas também ocorrem, porém em menores frequências (Patton & Sherwood, 1983).

Particularmente, alguns rearranjos que possuam heterose negativa podem ter um papel preponderante em processos de cladogênese: principalmente aqueles que causam (ou têm potencial para causar) segregação errada durante a meiose dos híbridos. Entre eles estão: fusões ou fissões Robertsonianas, inversões paracêntricas e pericêntricas, fusões com homologia monobraquial, fusões *in tandem*, e translocações recíprocas. Outros rearranjos podem ser considerados neutros ou adaptativos, ou seja, aqueles rearranjos estruturais que, possivelmente, não estão envolvidos na

especiação, tais como adição de heterocromatina e rearranjos neutros ou com heterose positiva, que ocorrem como polimorfismos balanceados (King, 1993).

Com relação à heterocromatina constitutiva, apesar de algumas hipóteses sugerirem que ela pode ter um papel indireto na especiação do gênero, possibilitando a ocorrência de rearranjos cromossômicos (Freitas, 2007), esta se mantém como um elemento não diretamente envolvido na especiação e sua participação neste processo ainda suscita muitas questões a serem esclarecidas (King, 1993).

Um dos mais representativos exemplos naturais de ocorrência de rearranjos cromossômicos é verificado entre os roedores subterrâneos do gênero *Ctenomys*, conhecidos como tuco-tucos, que apresentam uma das maiores variações cariotípicas entre os mamíferos, com números cromossômicos variando desde $2n=10$, em *C. steinbachi*, até $2n=70$, em *C. pearsoni* e *C. dorbignyi*, e com números fundamentais variando desde $NF=16$ até $NF=84$ (Reig *et al.*, 1992; Mascheretti *et al.*, 2000; Villar *et al.*, 2005).

Este grupo constitui um exemplo típico de cladogênese explosiva intragenérica, compreendendo mais de 60 espécies atualmente descritas e originadas em um curto intervalo de tempo, a partir do Plioceno (Verzi, 2002), com características ecológicas e comportamentais peculiares, tais como: baixa mobilidade, distribuição em manchas e número populacional efetivo pequeno (Reig *et al.*, 1990; Villar *et al.*, 2005). Somado a estas características, a ocorrência de barreiras ecológicas e geográficas ao fluxo gênico vêm sendo consideradas responsáveis pelas divergências entre as populações e as espécies (Patton & Smith, 1990).

Estes aspectos proporcionam condições para que os rearranjos cromossômicos desempenhem importante papel no processo de diferenciação populacional, tendo sido relatado como o principal fator na especiação deste gênero de roedores fossoriais, sendo as fusões ou fissões Robertsonianas apontadas por serem o mecanismo ativo operando neste processo de evolução cromossômica dos tuco-tucos (Reig & Kiblicky, 1969; Reig *et al.*, 1990; Freitas, 1997).

Uma análise filogenética baseada em cariótipos com bandas G sugeriu que os números diplóides e números fundamentais baixos seriam caracteres plesiomórficos dentro do gênero *Ctenomys*, inferindo a partir destas análises que o ancestral hipotético deste gênero deveria apresentar número diplóide entre $2n=18$ e $2n=36$, e número fundamental entre $NF=30$ e $NF=48$ (Ortells, 1995). A partir desta hipótese pode-se dimensionar a importância dos rearranjos na variabilidade cromossômica atual deste gênero.

Existem várias espécies de tuco-tuco que apresentam um único (exclusivo) número cromossômico, porém, um caso peculiar dentro do gênero é o chamado grupo *mendocinus*. Este grupo compreende sete espécies (*Ctenomys mendocinus*, *C. azarae*, *C. australis*, *C. chasiquensis*, *C. porteusi*, *C. rionegrensis* e *C. flamarioni*) que compartilham o mesmo número diplóide $2n=47/48$. Além desta uniformidade cariotípica, estas espécies apresentam outras similaridades, tais como: espermatozóide assimétrico e padrões similares de bandas G e C, com grandes blocos de heterocromatina (Massarini *et al.*, 1991; Freitas, 1994; D'Elia *et al.*, 1999; Massarini & Freitas, 2005). Este padrão evolutivo encontrado neste grupo sugere um modelo diferente da rápida cladogênese associado a alterações cromossômicas proposto de modo geral para o gênero.

Apesar deste exemplo, a heterogeneidade cariotípica é considerada por Reig *et al.* (1992) como o padrão entre as espécies de tuco-tuco, e não apenas interespecificamente, como também intraespecificamente, e mesmo intraindividualmente.

Entre os polimorfismos descritos encontramos, por exemplo, rearranjos em *C. pearsoni* ($2n=56$, 66 e 70, Kiblisky *et al.*, 1977; Novello *et al.*, 1990; Novello & Altuna, 2002), *C. perrensi* ($2n=54-58$, Garcia *et al.*, 2000a), *C. magellanicus* ($2n=34$ e 36, Lizarralde *et al.*, 2001), *C. boliviensis* ($2n=42-46$, Anderson *et al.*, 1987), *C. latro* ($2n=40-42$, Reig *et al.*, 1992), *C. porteusi* ($2n=46-48$, Reig *et al.*, 1990) e *C. rionegrensis* ($2n=48-56$, Ortells, 1990).

Os polimorfismos cromossômicos que caracterizam algumas espécies de tuco-tucos estão presentes em três das quatro espécies que ocorrem no Rio Grande do Sul, com exceção de *C. flamarioni*, que apesar de possuir apenas um único número diplóide ($2n=48$), caracteriza-se por uma grande variabilidade de heterocromatina constitutiva, principalmente no par 1, e também por variação nos blocos de heterocromatina ao longo de sua distribuição geográfica na direção norte-sul, desde Arroio do Sal até o Chuí (Freitas, 1994; Fernández-Stolz *et al.*, 2007).

As espécies *Ctenomys lami* e *C. minutus* apresentam grande variabilidade cromossômica (Freitas, 2006), incluindo zonas de hibridação intraespecífica (Gava & Freitas, 2002; Gava & Freitas, 2004) e interespecífica (Gava & Freitas, 2003).

A espécie mais recentemente descrita no Brasil, e endêmica do Rio Grande do Sul, é *C. lami* (Freitas, 2001). Esta apresenta a maior variabilidade entre as espécies de *Ctenomys*, com sete diferentes rearranjos de seu número diplóide ($2n=54$, 55a, 55b, 56a, 56b, 57 e 58), e dez diferentes números fundamentais (desde 74 até 84). Os rearranjos Robertsonianos que caracterizam esta diversidade cariotípica ocorrem principalmente nos pares 1 e 2, enquanto a variação no número

fundamental deve-se a inversões pericêntricas, perfazendo um total de 26 diferentes formas cariotípicas numa estreita área de distribuição geográfica (78Km x 12Km) numa região chamada de Coxilha das Lombas (Freitas, 2007).

A espécie *C. minutus* é morfologicamente parecida com *C. lami*, porém a distribuição geográfica, morfometria craniana e padrão cariotípico diferem indubitavelmente estas espécies (Freitas, 2001). A distribuição geográfica de *C. minutus* tem início no sul de Santa Catarina e se estende até São José do Norte, Rio Grande do Sul. Esta espécie apresenta 11 formas cariotípicas diferentes (2n=42, 46a e 46b, 47a e 47b, 48a e 48b, 49a e 49b e 50a e 50b) em função de rearranjos Robertsonianos e fusões em tandem (Freitas, 1997; Freygang *et al.*, 2004).

A espécie *Ctenomys torquatus* (Lichtenstein, 1830) também apresenta polimorfismo cromossômico, porém, até então, restrita a duas formas cromossômicas: uma com grande distribuição geográfica, 2n=44, e outra com distribuição restrita, 2n=46, ambas com o mesmo número fundamental, NF=72 (Freitas & Lessa, 1984).

Populações de indivíduos desta espécie são encontradas em áreas de campos e florestas de galerias, nos campos sulinos da região sul do Brasil e norte do Uruguai (Freitas & Lessa, 1984; Freitas, 2006). Apesar de alguns estudos citogenéticos terem sido realizados (Freitas & Lessa, 1984), particularmente no Uruguai (Kiblicky *et al.*, 1977; Villar, *et al.*, 2005; Novello & Villar, 2006), pouco conhecimento sobre a distribuição geográfica desta espécie havia sido obtido no Brasil, e conseqüentemente, os aspectos cromossômicos destas populações não haviam sido amplamente estudados.

Desta forma, em associação às coletas para delimitação das áreas de ocorrência de *C. torquatus*, foram realizadas análises citogenéticas de alguns indivíduos coletados em localidades onde foram obtidos novos registros para a espécie no Rio Grande do Sul. Estes novos registros possibilitaram aprofundar o conhecimento cariológico e discutir aspectos relacionados ao polimorfismo cromossômico de *C. torquatus*.

MATERIAIS & MÉTODOS

Foram analisados os cariótipos de 71 espécimens de *Ctenomys torquatus* (20 machos e 51 fêmeas) coletados no Rio Grande do Sul, Brasil (Tabela 1). Todos os animais coletados e cariotipados tiveram suas peles e crânios preparados, e foram depositados na coleção de mamíferos do Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As preparações cromossômicas foram realizadas seguindo os protocolos propostos por Ford & Hamerton (1956), com adaptações. Cada animal foi pesado e, para cada 100g de peso, foi injetado 1ml de uma solução de colchicina a 0,1%. Após uma hora da injeção, cada roedor foi sacrificado e em seguida os dois fêmures foram retirados, as epífises cortadas e, com auxílio de uma seringa, a medula óssea foi transferida para um tubo falcon (de centrífuga) contendo uma solução hipotônica (KCl:0,075M). Nas ocasiões em que o processo foi realizado em laboratório, após 30 minutos da obtenção da medula óssea, o material foi centrifugado por 5 minutos a 800r.p.m., ou alternativamente, em condições de campo, o material obtido foi deixado em decantação, e posteriormente a fixação foi realizada em solução composta por três partes de metanol para cada parte de ácido acético. Após o mínimo de 24 horas, o fixador era trocado pelo menos três vezes antes da fixação de células em suspensão em lâminas resfriadas em álcool e coradas com Giemsa 4%, tamponado (tampão fosfato, pH=6,8), durante 10 minutos.

Para cada animal foi realizada a análise de no mínimo 20 células metafásicas para o estabelecimento do número diplóide, e posterior fotografia das melhores células e montagem dos cariótipos. Os pareamentos foram feitos segundo a classificação dos cromossomos quanto à forma, sendo posteriormente colocados em ordem decrescente de tamanho. Para o estabelecimento do número de braços autossômico (NA), foi considerado apenas o número de braços autossômicos, e para obtenção do número fundamental (NF) foram adicionados os cromossomos sexuais ao número autossômico.

Foram realizadas as técnicas de banda C, segundo Sumner (1971), e banda NOR segundo Howell & Black (1980), com modificações.

RESULTADOS

A espécie *Ctenomys torquatus* apresentou quatro números cromossômicos distintos: $2n=46$, 44, 42 e 40, sendo que os dois menores números diplóides correspondem aos mais recentes cariótipos descritos para esta espécie.

O cariótipo com $2n=42$ apresenta $NF=76$, é formado por 16 pares autossômicos metacêntricos/sub-metacêntricos e 4 pares autossômicos acrocêntricos. O par sexual possui um cromossomo X longo metacêntrico e um cromossomo Y médio metacêntrico (Figura 1).

Indivíduos com cariótipo $2n=42$ foram encontrados exclusivamente na localidade de Catimbau, no município de Alegrete, oeste do Rio Grande do Sul.

O cariótipo com $2n=40$ apresenta $NF=76$, é formado por 17 pares autossômicos metacêntricos/sub-metacêntricos e 2 pares autossômicos acrocêntricos (Figura 2). O par sexual possui um cromossomo X longo metacêntrico e um cromossomo Y médio metacêntrico.

Indivíduos com cariótipo $2n=40$ foram encontrados em duas localidades a oeste do Rio Grande do Sul, sendo uma delas no município de Alegrete, e outra no município de Itaqui, ao norte do rio Ibicuí.

Uma fusão entre dois pares acrocêntricos do cariótipo $2n=44$ deve ser o rearranjo responsável pela formação de um par metacêntrico nos indivíduos com $2n=42$, e o mesmo processo deve ocorrer em relação ao cariótipo $2n=42$ para originar as formas com $2n=40$ (Figura 3).

Foram realizadas análises cromossômicas em indivíduos capturados em Rio Grande e na Estação Ecológica do Taim, extremo sul do Rio Grande do Sul, que corroboraram os resultados encontrados por Freitas & Lessa (1984). Estas populações apresentaram $2n=46$ ($NF=76$), com o canal de São Gonçalo constituindo-se em uma barreira entre estas populações e àquelas com número diplóide $2n=44$ localizadas ao norte do canal de São Gonçalo. Os limites geográficos destas populações com $2n=46$ são, portanto, o próprio canal de São Gonçalo a norte, o oceano Atlântico a leste, a Lagoa Mirim a oeste, e os banhados do Taim ao sul.

O cariótipo $2n=44$ ($NF=76$) apresenta a maior distribuição geográfica e foi encontrado nos indivíduos da maioria das localidades estudadas: Alegrete, Butiá, Cachoeira do Sul, Candiota, Dom Pedrito, General Câmara, Pelotas, Santa Maria, Quaraí, Rosário do Sul, Santana do Livramento, Uruguiana (Tabela 1), comprovando a proposta de Freitas & Lessa (1984) de que este seria a forma cromossômica mais amplamente distribuída e o cariótipo ancestral para a espécie.

O município de Alegrete foi o único que apresentou populações com três formas cromossômicas distintas, porém, estas populações foram encontradas em diferentes localidades, ocorrendo em uma clina na direção leste-oeste, com as formas $2n=44$, $2n=42$ e $2n=40$ (Figura 4). Nenhuma área de contato foi verificada entre estas populações.

As técnicas de bandeamento apresentaram os resultados esperados para a espécie de acordo com Freitas & Lessa (1984). Verifica-se a ausência, ou pouca quantidade, de banda C positiva e a distribuição de heterocromatina está restrita a região centromérica de cinco pares acrocêntricos, além de estar presente em todo o cromossomo Y. Enquanto a região organizadora de nucléolo, caracterizada pela constrição secundária, pode ser detectada através da banda NOR no par 10 na forma cromossômica $2n=46$, e no par 11 na forma cromossômica $2n=44$. As formas descritas neste estudo, $2n=42$ e $2n=40$, também apresentam o padrão de pouca heterocromatina e a constrição secundária no braço longo do par 11.

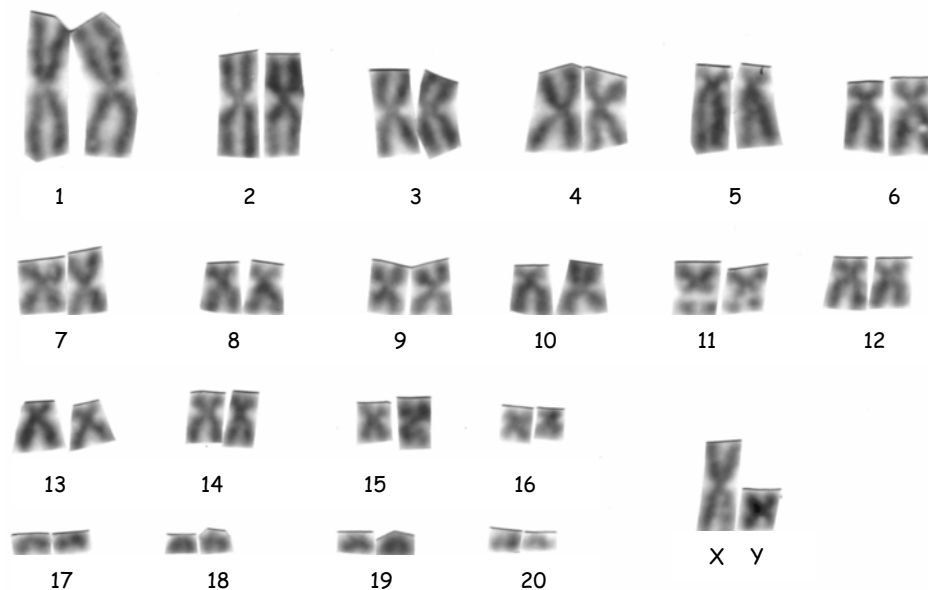


Figura 1: Cariótipo de *Ctenomys torquatus* com $2n=42$, em coloração simples com Gimsa, coletado em Alegrete, Rio Grande do Sul. Os números 17, 18, 19 e 20 representam os pares acrocêntricos. O par 11 apresenta a região organizadora de nucléolo.

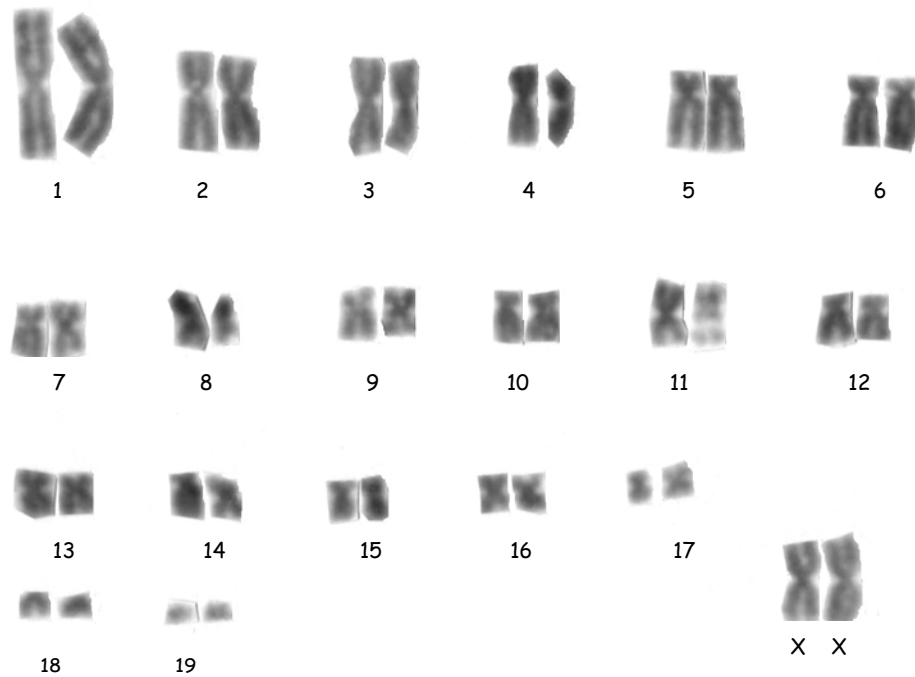


Figura 2: Cariótipo de *Ctenomys torquatus* com $2n=40$, em coloração simples com Giemsa, coletado em Itaqui, Rio Grande do Sul. Os números 18 e 19 representam os pares acrocêntricos.

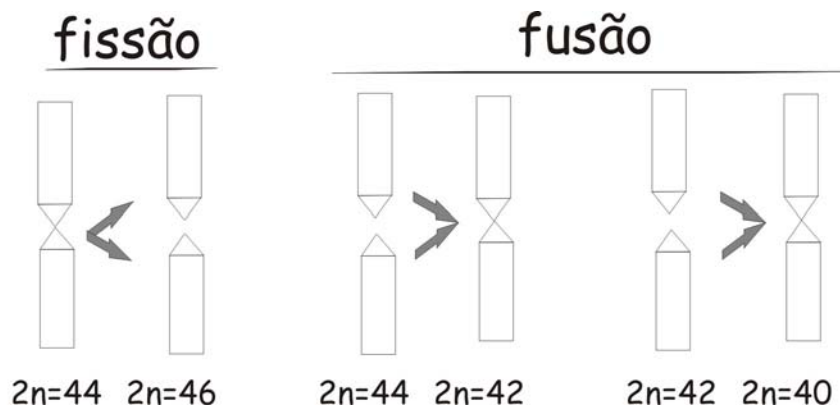


Figura 3. Polimorfismos cromossômicos em *Ctenomys torquatus*. Esquematização das diferenças entre as fissões ($2n=44$ & $2n=46$) e as fusões responsáveis pela formação dos indivíduos com $2n=42$ e $2n=40$.

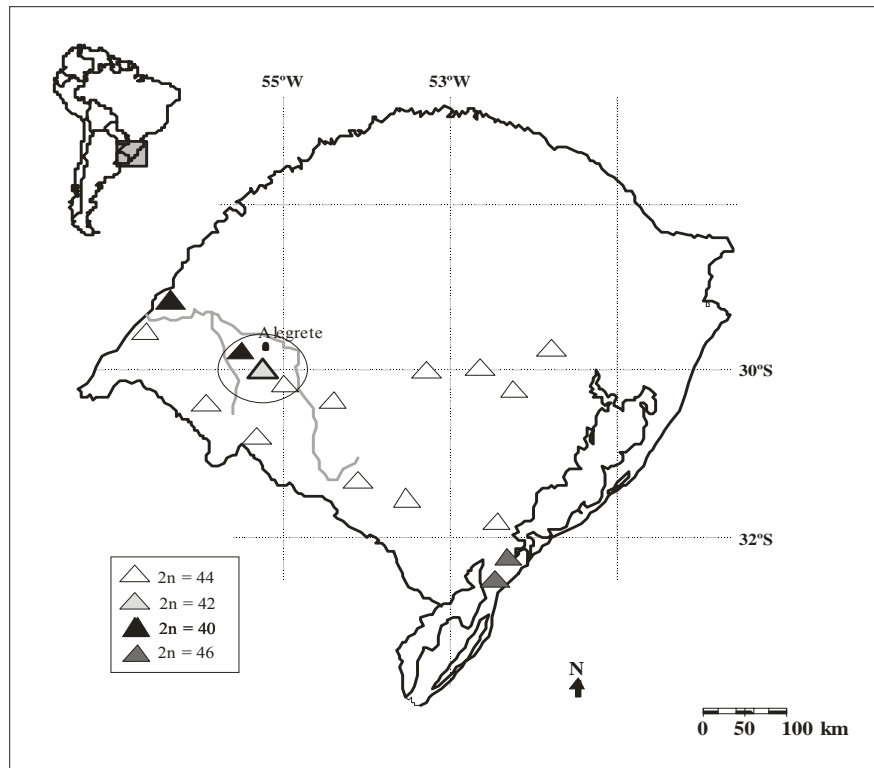


Figura 4. Mapa esquemático das áreas de ocorrência das populações com os diferentes números cariotípicos de *Ctenomys torquatus* no Rio Grande do Sul.

DISCUSSÃO

Polimorfismo cromossômico em Ctenomys

O polimorfismo cromossômico encontrado para *Ctenomys torquatus* neste trabalho confirma a grande variabilidade cariotípica descrita para o gênero *Ctenomys*, não apenas entre as espécies, mas também dentro de diversas espécies (Reig & Kiblicky, 1969; Kiblicky *et al.*, 1977; Freitas & Lessa, 1984; Novello & Lessa, 1986; Anderson *et al.*, 1987; Ortells *et al.*, 1990; Gallardo, 1991; Massarini *et al.*, 1991; Reig *et al.*, 1992; Freitas, 1997; Gimenez *et al.*, 1997; Massarini *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2000a; Garcia *et al.*, 2000b; Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006; Freitas, 2007).

A variação cromossômica têm sido considerado como o principal fator associado ao explosivo processo de especiação verificado no gênero *Ctenomys*. Esta afirmação baseia-se principalmente na morfologia dos cariótipos, o que se tornou possível a partir da utilização de técnicas de bandeamento, mas também devido à distribuição geográfica das espécies, e devido ao padrão de variação cromossômica espécie-específica geralmente apresentado pelos tuco-tucos. Ainda, a medida

em que foi aumentando o número de estudos citogenéticos com *Ctenomys*, os politipismo e os polimorfismos foram sendo demonstrados como eventos comuns em diversas populações deste gênero (Reig *et al.*, 1992).

Segundo alguns autores, os padrões de variação cromossômica em roedores subterrâneos poderia ser interpretado como proveniente de fatores demográficos, tais como estrutura populacional, associado a processos de extinção e recolonização, e adaptações ecológicas (Massarini *et al.*, 2002). As espécies do gênero *Ctenomys* parecem adequar-se ao modelo de especiação cromossômica, principalmente se levarmos em consideração que estudos sobre estrutura populacional e aspectos relativos a reprodução, em diferentes espécies do gênero, têm demonstrado indivíduos com baixa mobilidade, estratégias reprodutivas associadas a alto investimento com pequeno número de filhotes por ninhada, bem como reprodução sazonal e maturidade sexual rápida (Busch *et al.*, 2000). Associado a isso, numerosos estudos têm demonstrado variações na relação entre machos e fêmeas, principalmente durante o período reprodutivo (Gallardo & Anrique, 1991; Zenuto & Busch, 1998), com uma redução dos primeiros em relação às fêmeas, causando níveis altos de endocruzamento, bem como fenômenos de extinção e recolonização recorrentes (Zenuto & Busch, 1998).

Por outro lado, alguns autores sugerem que a estrutura populacional não se enquadra como explicação exclusiva para fixar rearranjos cromossômicos, pois não há evidências diretas de que exista relação entre os dois eventos (Villar *et al.*, 2005). A proposta de que haja ausência de relação entre fatores demográficos e polimorfismos cromossômicos procura ser justificada pela redução dos efeitos da subdivisão populacional em função das migrações entre grupos populacionais, considerando uma provável curta distância entre eles e a baixa densidade populacional (Novello & Altuna, 2002).

De toda forma, para procurar entender a evolução cromossômica entre estes roedores subterrâneos não podem ser descartadas as ocorrências de eventos tais como deriva genética e seleção natural (Villar *et al.*, 2005).

Polimorfismo em Ctenomys torquatus

Os primeiros cariótipos atribuídos a espécie *C. torquatus* foram $2n=44$, 56, 64, 68 e 70 descritos por Kiblicky *et al.* (1977), para a Argentina e o Uruguai. Porém, Freitas & Lessa (1984) analisaram os cariótipos desta espécie no Brasil e encontraram as formas cromossômicas $2n=44$ e 46, sendo a forma $2n=46$ restrita a uma área entre a laguna Mirim e o oceano Atlântico, separado da

forma $2n=44$ pelo canal de São Gonçalo. Enquanto a forma $2n=44$ foi considerada como ancestral em função de sua maior área de ocorrência no Rio Grande do Sul e também no Uruguai.

Neste mesmo trabalho, Freitas & Lessa (1984) descreveram pela primeira vez o padrão de bandas C, G e NOR para uma espécie de tuco-tuco. A técnica de coloração de banda G demonstrou que o par 7 da forma cromossômica $2n=44$ sofreu uma fissão Robertsoniana e originou a forma $2n=46$. Já a técnica de banda C demonstrou a ocorrência em muito pouca quantidade de heterocromatina constitutiva nos cromossomos desta espécie.

Os dois novos números diplóides apresentados neste estudo ($2n=40$ e $2n=42$) complementam o conhecimento sobre as formas cromossômicas de *Ctenomys* no Rio Grande do Sul, de acordo com Freitas (2006). A descrição de dois novos números cromossômicos e da ocorrência em alopatria de três formas cromossômicas em um mesmo município (Alegrete), confirmam a grande variabilidade cariotípica do gênero, particularmente da espécie *C. torquatus*.

Um padrão de polimorfismo cromossômico semelhante ao de *C. torquatus* foi encontrado em *C. magellanicus*. Esta é a espécie de tuco-tuco mais austral, localizada ao norte da Terra do Fogo, extremo sul da Argentina, e apresenta duas formas cromossômicas: $2n=34$ e $2n=36$. A diferença entre estes cariótipos está na presença de 2 pares acrocêntricos na forma cromossômica $2n=36$, e que estão fusionados na forma $2n=34$ (Lizarralde *et al.*, 2001). Portanto, os mesmos rearranjos (fusões e/ou fissões) cromossômicos que proporcionaram o polimorfismo em *C. torquatus* foram responsáveis pelo polimorfismo em *C. magellanicus*.

Dentre todas as fusões Robertsonianas, ou cromossômicas, formam o tipo mais comum de rearranjos estruturais encontrados, predominando em espécies com cariótipos constituídos principalmente por cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos formando, freqüentemente, polimorfismos cromossômicos balanceados (Lande, 1979; Lande, 1984; King, 1993).

Este parece ser o caso da espécie *C. torquatus* onde, como se pode observar, as fusões/fissões Robertsonianas em questão neste estudo envolvem cromossomos acrocêntricos/metacêntricos de tamanhos semelhantes, possivelmente possibilitando que os indivíduos heterozigotos, apesar da fertilidade reduzida, não tenham uma diminuição tão drástica da mesma, possibilitando a existência de polimorfismos cromossômicos balanceados. Além do fato de rearranjos Robertsonianos alterarem exclusivamente o número diplóide, sem alterar o número de braços cromossômicos (número fundamental) dos cariótipos nos quais eles ocorrem (Patton & Sherwood, 1983).

Barreiras geográficas

Diversas espécies animais relacionadas filogeneticamente apresentam diferenças consideráveis em seus números diplóides. Existem algumas evidências de que rearranjos cromossômicos reduzem a fertilidade de híbridos heterozigotos, sugerindo que as mudanças cromossômicas possuem um papel preponderante nos processos de especiação (White, 1978; King, 1993). Embora alguns autores considerem que o acúmulo de diferenciações cromossômicas seja incidental ao processo de especiação (Coyne & Orr, 1998), Rieseberg (2001) sugere que os rearranjos reduzem o fluxo gênico principalmente por reduzir as possibilidades de recombinação e os conseqüentes efeitos advindos deste processo.

Considera-se que processos alopátricos, caracterizados por barreiras ecológicas ou geográficas, sejam os principais mecanismos associados à especiação em roedores subterrâneos (Steinberg & Patton, 2000). Porém, o papel das variações cromossômicas como barreiras reprodutivas e, portanto, responsáveis pela especiação entre tuco-tucos é bastante controverso (Gava & Freitas, 2003).

Alguns exemplos da evolução cromossômica em presença de barreiras geográficas em roedores deste gênero foram verificados: Freitas (1994) demonstrou que populações de *C. flamarioni* localizadas ao norte e ao sul da barra do Rio Grande, no sul do Rio Grande do Sul (separadas por aproximadamente 6.000 anos), possuem variações heterocromáticas apesar de apresentarem uniformidade cromossômica ($2n=48$). Por outro lado, Novello & Altuna (2002) analisaram duas populações de *C. pearsoni* separadas pelo rio Sólis Grande, no Uruguai, que apresentam diferenças cromossômicas, sendo populações com $2n=58$ (FN=78) a oeste do rio e populações com $2n=70$ (FN=80) a leste do rio.

O mesmo evento foi verificado em *C. torquatus*: as populações com $2n=46$ estão separadas das populações com $2n=44$ a pelo menos cerca de 2.600 anos, desde a formação do canal de São Gonçalo (Freitas & Lessa, 1984).

A partir destes exemplos podemos propor que mudanças no cenário ecológico e geográfico desde o Pleistoceno até os tempos recentes parecem ter sido responsáveis por eventos de isolamento e divergência cromossômica, e uma barreira geográfica representada, por exemplo, por um curso d'água, pode ter sido responsável pela fixação da diferenciação cromossômica em diferentes níveis, seja diferenciando populações com relação ao número cromossômico, ou na quantidade de heterocromatina.

A influência das barreiras geográficas como único fator responsável por processos de diferenciação é pouco robusto quando se verifica a ocorrência de três populações cromossomicamente distintas de *C. torquatus* com diferentes números diplóides: $2n=40$, $2n=42$ e $2n=44$, sem que aparentemente nenhuma barreira física esteja presente entre estas populações cromossômicas.

Pode ser observada a existência de uma clina 'leste-oeste' representada por estas três populações cromossômicas em Alegrete, visto que do leste para o oeste verifica-se uma população com $2n=44$, seguida por uma população intermediária do ponto de vista geográfico, com $2n=42$, e por fim, as populações mais a oeste apresentam indivíduos com $2n=40$. Uma zona de hibridação representada por indivíduos com $2n=42$ poderia ser sugerida, mas não existem registros de cruzamentos entre indivíduos com $2n=44$ e $2n=40$ originando um padrão intermediário de indivíduos com $2n=42$. Da mesma forma, evidências de mecanismos de especiação (ou raciação, ou diferenciação cromossômica) simpátrica não foram detectados, visto que as três populações cromossômicas analisadas ocorrem em localidades separadas e com pouca probabilidade de contato entre elas pelas características de baixa mobilidade e filopatria (Reig *et al.*, 1990) destes roedores.

Considerando a escala em que as análises foram realizadas, apenas recorrendo a uma amostragem maior e uma análise mais refinada das áreas de ocorrência, e dos limites entre estas populações, poderá vir a ser evidenciado um processo de diferenciação com a ocorrência de uma clina cromossômica no município de Alegrete.

Seria relevante testar oportunamente o isolamento reprodutivo entre populações das quatro formas cromossômicas de *C. torquatus* através de análises de meioses e com cruzamentos em cativeiro para avaliar o estágio de separação evolutivo, ou isolamento reprodutivo no qual estas populações se encontram (Borodin *et al.*, 2006).

Como já foi visto, os rearranjos Robertsonianos são as principais alterações verificadas na evolução cromossômica dos tuco-tucos, incluindo *C. torquatus*, e a estrutura populacional é proposta por alguns autores como sendo o fator responsável pela fixação dos rearranjos cromossômicos através de mecanismos de deriva. Entretanto, como nenhuma evidência direta da ocorrência destes eventos foi demonstrada até o momento, acredita-se que os efeitos da subdivisão populacional podem ser supridos por migrações entre pequenos grupos populacionais, normalmente conhecidos como tuqueiras, ou até mesmo entre populações maiores.

A esta discussão pode ser acrescida a influência das barreiras geográficas no processo de diferenciação cromossômica. Embora seja bastante difundido o conceito de baixa mobilidade entre roedores deste gênero (Reig *et al.*, 1990), Stolz (2006) descreveu padrões de mobilidade entre os tuco-tucos-das-dunas (*C. flamarioni*) que parecem não ser tão baixos quanto se supunha. Porém, a migração eventual que poderia reduzir os efeitos da estruturação populacional é dificultada quando uma barreira impede o deslocamento dos indivíduos e potencializa o isolamento das populações.

Neste sentido, a espécie *C. torquatus* apresenta diferentes modelos de estruturação populacional e, conseqüentemente, diferentes processos de diferenciação do ponto de vista cromossômico, com populações isoladas geograficamente que apresentam diferenciações cariotípicas (tais como as populações com $2n=46$ na Estação Ecológica do Taim e em Rio Grande, e a população de Itaquí com $2n=40$ ao norte do rio Ibicuí), ou populações com números cromossômicos distintos sem presença reconhecida de barreiras geográficas que inviabilizem a migração entre elas (por exemplo, populações com $2n=40$, 42 e 44 em Alegrete), e ainda populações isoladas geograficamente porém sem diferenciação cromossômica (populações de General Câmara com $2n=44$).

Assim sendo, a evolução cromossômica em *Ctenomys* é um processo complexo, que pode ser produto da ação integrada de eventos estocásticos e/ou seleção, visto que a estrutura populacional pode apresentar ampla variação, desde pequenas tuqueiras, ou populações isoladas geograficamente, até colônias ou populações maiores, inclusive com migrações.

Heterocromatina

Variações nas quantidades de heterocromatina apresentam grande diversidade entre os mamíferos, podendo ser encontradas famílias com pouca ou nenhuma variação de heterocromatina (como em felinos; Pathak & Wuster-Hill, 1977), ou outras com grande variação (como nos roedores da família Geomyidae; Patton & Sherwood, 1983). Mesmo dentro de alguns gêneros (*Thomomys*; Patton & Sherwood, 1982) ou espécies (*Ctenomys flamarioni*; Freitas, 1994) podem ser encontrados grande variações na quantidade de heterocromatina entre populações.

A ausência (ou pouca quantidade) de banda C positiva em *C. torquatus* foi detectada por Freitas & Lessa (1984), e enquadra-se no Padrão I de distribuição de heterocromatina proposto por Reig *et al.* (1990). O fato de não apresentar bandas C, ou melhor, não ter heterocromatinas positivas, pode não ser necessariamente garantia de inexistência de heterocromatina, tal como verificado em alguns carnívoros que, apesar de terem sido caracterizados como portadores de heterocromatina em seus

cromossomos, não apresentavam bandas C positivas (Fregda & Mandahl, 1972 - *appud* Reig *et al.*, 1992). Outras espécies de tuco-tuco foram classificadas no Padrão I de ausência, ou pouca quantidade, de heterocromatina, dentre elas: *C. dorbignyi*, *C. magellanicus*, *C. tucumanus*, *C. perrensi*, *C. roigi*, *C. sociabilis*, *C. argentinus*, *C. lewisi* (Gallardo, 1991; Reig *et al.*, 1992). Algumas características, além da quantidade de heterocromatina, agrupam estas espécies, tais como espermatozoides simétricos, números diplóides e de braços autossômicos relativamente elevados, e tamanho do cromossomo Y. A reunião destes fatores possibilitou a Reig *et al.* (1992) sugerir que o Padrão I de heterocromatina é plesiomórfico para o gênero.

Numerosos estudos citogenéticos realizados com tuco-tucos têm demonstrado claramente a alta variabilidade cromossômica existente intra e interespecificamente com envolvimento de regiões de natureza heterocromática em: 1) polimorfismos em espécies com mais de um número diplóide (Vidal-Rioja, 1985; Ortells *et al.*, 1990; Freitas, 1997; Freitas, 2001); 2) variações de heterocromatina em espécies com um único número diplóide (Freitas, 1994; Massarini *et al.*, 1991; Massarini *et al.*, 1998); 3) variações de heterocromatina em espécies com grande variabilidade no número diplóide, onde indivíduos com maior número diplóide apresentaram grandes quantidades de heterocromatina nas regiões centroméricas em contraste com os números diplóides reduzidos, formados por rearranjos robertsonianos e fusões centroméricas e *in tandem* (Cook *et al.*, 1990; Gallardo, 1991; Giménez *et al.*, 1997), e 4) inversões pericêntricas (Freitas, 1997).

Associado a isso, Slamovits *et al.* (2001) demonstraram associações entre DNA satélites e alguns tipos de translocações Robertsonianas. Neste estudo, realizado com indivíduos de 23 espécies e cinco formas não descritas de *Ctenomys*, demonstrou-se que ampliações e deleções de ADN satélite estão associadas com rearranjos cromossômicos, mesmo entre espécies proximalmente relacionadas, bem como foi observada uma estabilidade no número de cópias de ADN satélite entre clados com estabilidade cromossômica (Slamovits *et al.*, 2001).

Estas variações na distribuição, quantidade e tipos de seqüências repetitivas, chamadas heterocromatina constitutiva, ou regiões com bandas C positivas, ainda não foram adequadamente explicadas com relação à sua função ou relevância. Durante muitos anos prevaleceu a idéia de que a heterocromatina seria formada por seqüências repetitivas de ADN sem qualquer função significativa e sem nenhuma importância evolutiva. Porém, alguns autores sugeriram que a heterocromatina estaria envolvida na organização e na evolução cromossômica, e que a distribuição e os padrões teriam importante papel na expressão do ADN eucromático (Reig *et al.*, 1992), ou participação nos processos

de adição ou deleção de braços cromossômicos, ou mesmo cromossomos inteiros (Patton & Sherwood, 1982; Freitas, 1994).

Evolução do cromossomo 1 e relações com outras espécies

Ortells (1995) realizou análises filogenéticas considerando aspectos cromossômicos e propôs que o cromossomo 1 metacêntrico com heterocromatina (banda C) pericêntrica, típico de *Ctenomys occultus*, seria a mais primitiva forma cromossômica para o gênero. Novello & Villar (2006) consideraram *C. torquatus* como a espécie de tuco mais primitiva entre as espécies que ocorrem no Uruguai, pois apresenta o cromossomo 1 metacêntrico e sem heterocromatina, enquanto a espécie *C. rionegrensis* apresenta cromossomo 1 subtelocêntrico com heterocromatina nos braços curtos, e as formas cromossômicas que formam o «complexo *pearsoni*» possuem padrões intermediários de cromossomo 1 (Novello & Villar, 2006). Além disso, espécies com cromossomo 1 metacêntrico apresentam espermatozóide simétrico, considerado uma característica ancestral em mamíferos, particularmente em tuco-tucos.

Desta forma, podemos considerar que a forma cromossômica $2n=44$ é o cariótipo ancestral não apenas com relação a espécie mais próxima filogeneticamente: *C. pearsoni* (D'Elia *et al.*, 1999), como também entre as formas cromossômicas de *C. torquatus*, o que já havia sido proposto por Freitas & Lessa (1984), considerando as formas cromossômicas $2n=44$ e 46, e é corroborado pela descrição de duas novas formas cromossômicas para o gênero ($2n=40$ e 42).

A afinidade cromossômica entre *C. torquatus* e *C. pearsoni* foi analisada por Villar *et al.* (2005) ao comparar o cariótipo de *C. torquatus* $2n=44$ com alguns cariótipos de populações de *C. pearsoni* através de técnicas de bandeamento G. Estes autores descreveram uma única inversão pericêntrica do cromossomo 1 metacêntrico de *C. torquatus* para o cromossomo 1 submetacêntrico encontrado nos cariótipos de *C. pearsoni*. Além disso, encontraram homologia entre os pares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 19 nas duas espécies, com exceção dos pares 2, 5, 7, e 13 nos cariótipos da população de Sólis ($2n=70$, FN=80). Embora não sejam cariotipicamente tão semelhantes quanto poderia se supor a partir das relações filogenéticas (Castillo *et al.* 2005), acredita-se que uma série de rearranjos cromossômicos possam ter originado os padrões verificados atualmente entre os cariótipos destas duas espécies (Villar *et al.* 2005).

As espécies do gênero *Ctenomys* representam um grupo valioso para os estudos dos fatores que influenciam a evolução dos cariótipos em mamíferos. A partir da integração de informações

cariotípicas, tais como: rearranjos cromossômicos estruturais, variabilidade heterocromática, evolução de seqüências de ADN repetitivo, remodelagem de cromatina, entre outros, muitas questões relativas a filogenia dos tuco-tucos poderão ser esclarecidas e a história evolutiva deste grupo poderá ser melhor compreendida (Novello & Villar, 2006).

Tabela 1. Número de machos e fêmeas de *Ctenomys torquatus* coletados com as coordenadas de suas respectivas localidades no Rio Grande do Sul, seus números diplóides e fundamentais.

Municípios	Coordenadas	Machos/Fêmeas	Número diplóide (2n) / Número Autossômico (NA)
Alegrete	S29°53'W55°43'	1 / 3	40 / 72
Alegrete (Catimbau)	S29°57'W55°39'	3 / 6	42 / 72
Alegrete (Caverá)	S30°06'W55°33'	3 / 3	44 / 72
Cachoeira do Sul	S30°02'W52°51'	0 / 4	44 / 72
Dom Pedrito	S31°08'W54°29'	1 / 2	44 / 72
General Câmara	S29°55'W51°53'	0 / 4	44 / 72
Itaqui	S29°24'W56°38'	2 / 8	40 / 72
Quarai	S30°28'W56°15'	1 / 1	44 / 72
Rosário do Sul	S30°13'W54°54'	3 / 5	44 / 72
Rio Grande	S31°54'W52°17'	3 / 3	46 / 72
Santa Maria	S29°55'W53°44'	0 / 5	44 / 72
Santana Livramento	S30°49'W55°22'	1 / 2	44 / 72
Taim	S32°32'W55°32'	1 / 3	46 / 72
Uruguaiana	S29°28'W56°38'	1 / 2	44 / 72

6. VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGENIA MOLECULAR DE

Ctenomys torquatus (RODENTIA: CTENOMYIDAE)

INTRODUÇÃO

Análises filogenéticas são consideradas importantes ferramentas para estudar a história evolutiva dos organismos, visto que as taxas de evolução das seqüências podem apresentar grande variação entre genes, ou segmentos de ADN, tornando possível estudar as relações evolutivas entre organismos em qualquer nível de classificação; desde filos ou famílias, até espécies ou populações intraespecíficas (Nei & Kumar, 2000).

Diversos estudos têm avaliado os padrões e processos relacionados à diversificação genética em roedores subterrâneos (Patton, 1990; Patton & Smith, 1990; Smith, 1998; Honeycutt *et al.*, 1991; Nevo, 1999; D'Elia *et al.*, 1999; Wlasiuk *et al.*, 2003; Cutrera *et al.*, 2005; Cutrera *et al.*, 2006; entre outros). Alguns fatores demográficos inerentes a estes animais, tais como a baixa mobilidade individual e a distribuição geográfica em manchas (Reig *et al.*, 1990; Busch *et al.*, 2000), contribuíram para aumentar o interesse pelo emprego destes animais como modelos para estudos evolutivos, procurando avaliar, entre outras coisas, o grau de variação genética inter e intrapopulacional, e as relações entre deriva genética e fluxo gênico (Steinberg & Patton, 2000).

Nos últimos anos vêm aumentando consideravelmente o número de trabalhos que se ocupam em estudar a variabilidade genética com relação ao aspecto molecular das espécies do gênero *Ctenomys*. Lacey & Cutrera (2007) resumiram alguns dos estudos realizados neste sentido, considerando as diferentes metodologias empregadas e seus objetivos primordiais (Tabela 1).

Estes estudos abordaram diversos aspectos da diferenciação genética, desde relações filogenéticas e taxas de diversificação intragenérica (Cook & Lessa, 1998; Lessa & Cook, 1998; Mascheretti *et al.*, 2000, Slamovits *et al.*, 2001; Honeycutt *et al.*, 2003; Castillo *et al.* 2005), até avaliação do impacto de eventos ambientais na variabilidade genotípica (Gallardo *et al.*, 1995; Tomasco & Lessa, 2007; Mora *et al.*, 2007; Fernández-Stolz *et al.*, 2007). Apesar destes estudos revelarem uma tendência geral para forte estruturação espacial da diversidade genética das populações destes roedores subterrâneos sul-americanos, existem evidentes peculiaridades espécie-específicas.

Inicialmente foram realizados estudos empregando aloenzimas que apresentaram padrões de variação bem distintos entre populações de tuco-tucos (Sage *et al.*, 1986), sem relação com diferenciações cromossômicas nem mesmo com distâncias geográficas (Gallardo & Kölher, 1992). Foram encontrados níveis baixos de variação genética (Gallardo & Küller, 1992; Gallardo *et al.*, 1995) e populações estruturadas geograficamente em algumas espécies (Gallardo & Palma, 1992) e não estruturadas em outras (Apfelbaum *et al.*, 1991; D'Elía *et al.*, 1998; Ortells & Barrantes, 1994).

Apesar destes estudos terem a fragilidade de envolver análises aloenzimáticas, teoricamente com baixo poder de resolução, trabalhos utilizando seqüências de ADN (citocromo *b*) também revelaram diferentes padrões entre as espécies de *Ctenomys*. Giménez *et al.* (2002) demonstraram que espécies de tuco-tuco em Corrientes, Argentina (*C. dorbignyi*, *C. roigi*, *C. perrensi* e *Ctenomys* sp.) são polifiléticas e parafiléticas, com diferenciação recente do ponto de vista molecular e uma grande diferenciação em relação aos números cromossômicos. Em *C. rionegrensis*, uma espécie com distribuição geográfica bastante restrita, endêmica do oeste do Uruguai, com polimorfismo cromático e com um único número cromossômico ($2n=48$), foi detectado um processo de expansão populacional recente através de seqüências de citocromo *b* (D'Elía *et al.*, 1999) e utilizando microssatélites (Wlasiuk *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul, também utilizando seqüências de citocromo *b*, diferenças relacionadas aos polimorfismos cromático e cromossômico de *C. torquatus* foram investigadas, porém nenhum padrão foi encontrado (Gonçalves, 2007).

Os tuco-tucos apresentam grande variação cromossômica, com seus números diplóides variando desde $2n=10$ a $2n=70$ (Freitas, 2006), sendo um dos melhores exemplos de rápido processo de especiação devido a variações cromossômicas dentro da classe dos mamíferos (Massarini *et al.*, 1991). De fato, esta grande variação tem sido creditada aos rearranjos cromossômicos em associação com as características demográficas destes roedores, tais como: distribuição em manchas, baixa mobilidade e pequenos tamanhos populacionais. Desta forma, o aparecimento e fixação de novos números cromossômicos, podendo inclusive ter por conseqüência o surgimento de novas espécies, geralmente são considerados como conseqüência das características populacionais destas espécies (Reig *et al.*, 1990; Contreras & Bidau, 1999).

Tabela 1. Relação de alguns estudos de variabilidade genética com tuco-tucos (adaptado de Lacey & Cutrera, 2007).

<i>Espécie</i>	<i>Marcador genético</i>	<i>Investigação</i>	<i>Referência</i>
várias	aloenzimas	comparar níveis de variabilidade inter e intraespecífico	Sage <i>et al.</i> , 1986 Moreira <i>et al.</i> , 1991
várias	aloenzimas	comparar níveis de variabilidade e padrões de estrutura genética	Gallardo & Palma, 1992
várias	ADNmt	processos evolutivos envolvidos em diferenciações cromossômicas	Giménez <i>et al.</i> , 2002
várias	ADNmt e íntrons nucleares	história evolutiva do gênero <i>Ctenomys</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2005
<i>C. australis</i>	aloenzimas	comparar níveis de variabilidade e estrutura genética local	Apfelbaum <i>et al.</i> , 1991
<i>C. australis</i>	ADNmt	filogeografia e impacto de eventos históricos	Mora <i>et al.</i> , 2006
<i>C. flamarioni</i>	microssatélites e ADNmt	estrutura populacional e processos geográficos de diferenciação genética	Fernández-Stolz., 2007 Fernández-Stolz <i>et al.</i> , 2007
<i>C. haigi</i>	microssatélites	estrutura populacional e impacto do comportamento e demografia na variação genética	Lacey, 2001
<i>C. lami</i>	microssatélites	estrutura populacional e impacto da demografia na variação genética	El Jundi & Freitas, 2004
<i>C. maulinus</i>	aloenzimas	estrutura populacional, efeitos de "bottleneck" e impacto de eventos ambientais	Gallardo & Köhler, 1992, Gallardo & Köhler, 1994, Gallardo <i>et al.</i> , 1995
<i>C. minutus</i>	microssatélites	estrutura genética de zonas híbridadas	Gava & Freitas, 2004
<i>C. minutus</i>	microssatélites e ADNmt	filogeografia	Lopes, 2007
<i>C. pearsoni</i>	ADNmt	filogeografia	Tomasco & Lessa, 2007
<i>C. rionegrensis</i>	aloenzimas / microssatélites e ADNmt	estrutura populacional e relação entre variação morfológica e molecular	D'Elia <i>et al.</i> , 1998 / Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
<i>C. sociabilis</i>	ADNmt	diversidade genética e relação com mudanças climáticas	Hadly <i>et al.</i> , 2003, Chan <i>et al.</i> , 2005
<i>C. talarum</i>	microssatélites e MHC	estrutura genética em relação a variação demográfica intraespecífica	Cutrera <i>et al.</i> , 2005 e 2006, Cutrera & Lacey, 2006
<i>C. torquatus</i>	microssatélites e ADNmt	relação entre variação cariotípica, morfológica e molecular	Gonçalves, 2007

O gênero *Ctenomys* tem a peculiaridade de apresentar grande variabilidade cromossômica e populações relativamente isoladas (Reig *et al.*, 1990). O fluxo gênico tende a não ocorrer entre grupos populacionais com cariótipos diferentes, e os rearranjos cromossômicos podem, de modo geral, estar associados com processos de diferenciação genética e eventualmente até mesmo envolvidos com eventos de especiação. Apesar do fluxo gênico poder ocorrer entre grupos cariotípicos distintos, isto pode ser considerado mais como uma exceção do que como uma regra. Porém, a forma como a variação cariotípica está relacionada com diferenciações moleculares ainda carecem de maiores explicações e permanecem como um tema a ser investigado mais detalhadamente (Polly, 2006). Apesar do avançado estado de conhecimento sobre a variação cariotípica, poucos estudos tiveram sucesso em esclarecer os mecanismos de diferenciação que ocorrem nos roedores do gênero *Ctenomys* (Lessa, 2000).

Dentre as diversas ferramentas moleculares empregadas em estudos desta natureza, uma das mais adequadas quando se tem por objetivo investigar o grau de variabilidade genética entre espécies relacionadas e, principalmente, no âmbito intraespecífico é o ADN mitocondrial (Avice, 2000).

Ferramenta molecular - ADN mitocondrial

O genoma mitocondrial dos animais é haplóide e formado por uma dupla fita circular que varia entre 15.000 e 17.000 pares de bases de comprimento, estando presente em centenas até milhares de cópias por célula (Li & Graur, 2000).

O ADN mitocondrial, ou ADNmt (figura 1), é simples em estrutura e econômico em tamanho. É um marcador aplicado em estudos de diferenciações genéticas recentes, uma vez que acumula substituições de base, inserções e deleções de cinco a dez vezes mais rápido do que o DNA nuclear cópia simples (Brown *et al.*, 1979). Várias hipóteses têm sido consideradas sobre a rápida evolução deste: o relaxamento das limitações funcionais, a alta taxa de mutação devido à ineficiência dos mecanismos de reparo de DNA e o fato de não possuir histonas (Avice, 2000).

Diferentes regiões do genoma mitocondrial evoluem a diferentes taxas permitindo a escolha de regiões específicas, conforme a questão a ser abordada. Duas das principais regiões do ADNmt mais utilizadas em estudos de variabilidade genética e filogenia molecular são o citocromo *b* e a região controladora (Avice, 2000).

O citocromo *b* é uma das proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons. Embora evolua lentamente em termos de substituição não-sinônimas, a taxa de evolução em posições silenciosas é relativamente rápida (Irwin *et al.*, 1991). O amplo uso do citocromo *b* gerou o *status* de molécula universal, possibilitando que os estudos possam ser facilmente comparados.

Já a região controladora (*control region*, ou *d-loop* em mamíferos) tem função regulatória na dinâmica da molécula e é predominantemente rica em bases AT (Brown, 1985), sendo o único grande fragmento do ADNmt não codificante (de aproximadamente 1.000 pares de bases). Esta região é de grande utilidade para análises filogenéticas, pois as taxas de substituição de bases encontram-se acentuadas em dois fragmentos da região controladora chamadas de segmentos hipervariáveis (Hiper-Variable Segment): HVS1 e HVS2, com extensões aproximadas de 350 pares de bases e separadas por uma região mais conservada com cerca de 200 pares de bases (Vigilant *et al.*, 1989).

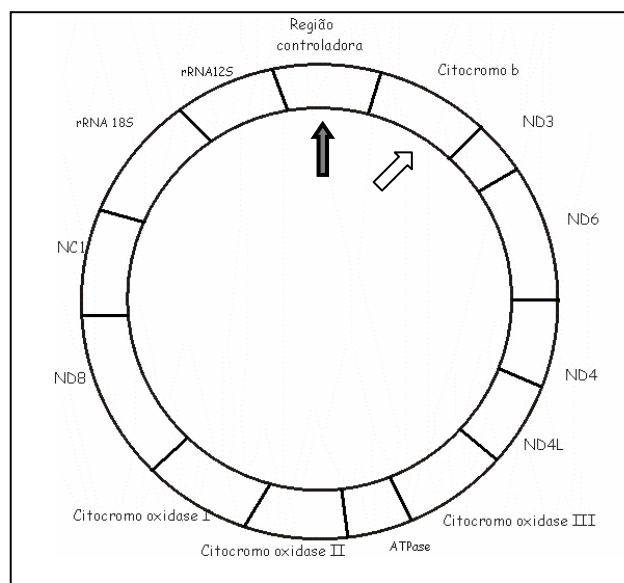


Figura 1. Esquema de uma molécula de ADN mitocondrial, as setas indicam a região controladora - seta escura, e citocromo *b* - seta clara (adaptado de Avise, 2000).

A região mais variável entre os dois segmentos hipervariáveis é HVS2, representada na figura 2 entre os *primers*: TDKD e TucoPro, desenvolvidos especificamente para roedores do gênero *Ctenomys* (Kocher *et al.*, 1989; Tomasco & Lessa, 2007).

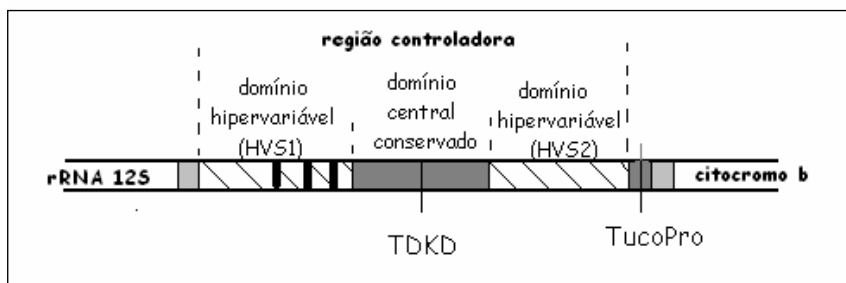


Figura 2. Esquema da região controladora localizada em uma molécula de ADN mitocondrial, com indicação dos domínios que compõem esta seqüência e onde se inserem os dois iniciadores: TDKD e TucoPro (*primers*), com objetivo de isolar a região de domínio mais variável (adaptado de Avise, 2000)

Devido à sua rápida taxa de evolução, o ADNmt é um bom marcador para o estudo de diferenciações genéticas recentes por acumular substituições de base, inserções e deleções com uma taxa média de 5 a 10 vezes mais rápida que o ADN nuclear cópia simples (Brown *et al.*, 1979). Outra vantagem do ADNmt, como marcador para o estudo de diferenciações genéticas recentes, é a frequência extremamente baixa de transposições, inversões, rearranjos e recombinações (Brown, 1985). Isto permite a caracterização de linhagens filogenéticas maternas sem a ambigüidade causada pela recombinação meiótica que ocorre nos genes nucleares.

Portanto, devido às rápidas taxas de substituições de seus nucleotídeos, o ADNmt é adequado para estudos intra e intergenéricos (Bonvicino & Moreira, 2001). A taxa relativamente alta da evolução dos genes mitocondriais torna as comparações das seqüências de ADNmt úteis para estimar as datas de eventos evolutivos relativamente recentes, tendo sido amplamente utilizado em estudos de caracterização de populações, subespécies e espécies, e em estudos de caráter evolutivo e filogenético (Avise, 2000).

Variabilidade genética em Ctenomys torquatus

A despeito de apresentar uma das maiores distribuições geográficas entre as espécies de tuco-tuco descritas, poucos estudos genéticos envolveram a espécie *C. torquatus*. Dentre os trabalhos realizados podemos citar Moreira *et al.* (1991), que empregou aloenzimas para comparar o nível de diferenciação genética entre as espécies de tuco-tuco que ocorrem no Brasil, mais especificamente no Rio Grande do Sul, e encontrou um nível relativamente alto de diferenciação entre populações de *C. torquatus* do Taim e de Pelotas, porém, este resultado foi associado ao pequeno número amostral

(particularmente em Pelotas) e/ou à heterogeneidade ecológica em relação ao tipo de solo no qual estas populações habitam. Além deste, estudos filogenéticos procurando relacionar o nível de diferenciação genético entre espécies de tuco-tucos, incluindo amostras de *C. torquatus*, foram realizados por Lessa & Cook (1998), Cook & Lessa (1998), D'Elia *et al.* (1999) e Castillo *et al.* (2005) utilizando diferentes marcadores moleculares. Entretanto, até então, nenhum estudo foi realizado visando analisar a variabilidade intraespecífica considerando toda a distribuição geográfica desta espécie.

Considerando a pouca quantidade de informações genéticas sobre esta espécie, três abordagens foram empregadas para melhor compreender a relação filogenética desta espécie com as demais espécies de tuco-tuco, além de avaliar o grau de variabilidade interpopulacional, e ainda resolver uma questão taxonômica envolvendo a espécie *C. torquatus*.

Desta forma, este estudo encontra-se dividido em três partes:

1a) Análise interespecífica: investigando a relação filogenética entre *C. torquatus* e outras quinze espécies do gênero *Ctenomys* (que ocorrem no Brasil, Uruguai, Argentina e Bolívia), utilizando como ferramenta molecular uma região do citocromo *b* do ADN mitocondrial;

1b) A partir das análises filogenéticas interespecíficas, avaliar o nível de similaridade genética entre duas populações citogeneticamente semelhantes ($2n=42$), sendo uma em Alegrete, Rio Grande do Sul - Brasil, reconhecidamente classificada como *C. torquatus*, e outra ocorrendo em Curuzú Laurel, Corrientes, Argentina, denominada *Ctenomys sp.*

2) Análise intraespecífica: avaliação das diferenças intraespecíficas e do grau de variabilidade genética entre populações de *C. torquatus* ao longo de sua distribuição geográfica, utilizando a região controladora do ADN mitocondrial.

METODOLOGIA

Obtenção das amostras

Os espécimens foram coletados em toda região central, oeste e sul do Rio Grande do Sul, Brasil (Apêndice 1). Todos os roedores foram coletados vivos com armadilhas do tipo Oneida Victor nº O, recobertas por borracha para minimizar os danos aos animais no momento da captura. Os exemplares analisados oriundos do Uruguai foram gentilmente cedidos pelo Prof. Enrique Lessa.

Os esqueletos, peles e tecidos dos animais coletados no Rio Grande do Sul estão depositados no Laboratório de Citogenética e Evolução, do Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. As coletas foram realizadas com permissão do IBAMA (licenças Nº 017/2005 e 064/2006).

Obtenção das seqüências

As amostras de tecidos foram preservadas em etanol 95% e armazenadas a -20°C. O ADN foi extraído seguindo o protocolo proposto por Medrano *et al.* (1990). No apêndice 1 encontra-se o tamanho da amostra obtida para cada uma das 19 diferentes populações (localidades) que variou de um a dez indivíduos (em média, seis indivíduos por população), sendo 17 populações do Estado do Rio Grande do Sul e duas do Uruguai.

As análises intraespecíficas foram realizadas comparando fragmentos de 387 pares de base do segmento hipervariável (HSV2) da região controladora do ADNmt provenientes de 115 espécimens de *C. torquatus*. Estes fragmentos de ADN foram amplificados através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os *primers* (iniciadores): TucoPro (5' - ACT TTC GTT TAT TGC TTA ATT - 3'; Tomasco & Lessa, 2007) e TDKD (5'- CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG - 3'; Kocher *et al.*, 1989).

Para as análises interespecíficas foi caracterizado um fragmento de citocromo *b* (*cyt b*). A amplificação deste fragmento foi realizada utilizando os *primers* MVZ 05 (5'- CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT - 3'; Smith & Patton, 1993) e Tuco 06 (5'- GTG AAA TGG AAT TTT GTC TGA - 3'; Wlasiuk *et al.*, 2003).

Para investigar a relação filogenética entre *C. torquatus* e outras espécies do gênero *Ctenomys* foram obtidas onze seqüências de citocromo *b* de *C. torquatus* com 478 pares de bases, oriundas de diferentes localidades do Rio Grande do Sul. Adicionalmente, foram utilizadas seqüências obtidas no

Genebank de quinze espécies do gênero *Ctenomys* (apêndice 2, com números de acesso das seqüências no genbank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), além de uma seqüência de *C. minutus* gentilmente cedida por Carla Lopes.

As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 20 μ l contendo de 20-80 ng de ADN, 0.2 μ M de cada *primer*, 0.2 μ M dNTP, 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ e 1.0 unidade de Taq ADN polimerase (GIBCO-BRL Life Sciences/Invitrogen, Carlsbad, California). O padrão de termociclagem incluía uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 30-34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 45°C durante 30 segundos, e extensão a 72°C por 45 segundos, e por fim, uma extensão a 72°C por 5 minutos (de acordo com protocolo adaptado de Tomasco & Lessa, 2007). Os produtos de PCR foram purificados com as enzimas *Exonuclease I* e *SAP - Shrimp Alkaline Phosphatase* (GIBCO-BRL Life Sciences/Invitrogen, Carlsbad, California), de acordo com o protocolo do fabricante. Por fim, foram obtidas seqüências utilizando o seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystem), fazendo uso sempre do mesmo iniciador (*primer forward*) utilizado na reação de PCR.

Análise dos dados

As seqüências foram visualizadas através de eletroferogramas utilizando o programa Chromas 2.31, e foram alinhadas com o programa Clustal W, implementado no programa Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Os alinhamentos foram checados e editados manualmente e os segmentos que apresentavam informações ambíguas ou duvidosas foram retirados das análises.

A filogenia intraespecífica foi construída com os haplótipos da região controladora do ADNmt de *C. torquatus*. Como grupos externos foram utilizadas seqüências homólogas de outras três espécies de tuco-tuco: *C. flamarioni*, *C. pearsoni* e *C. minutus*.

A filogenia interespecífica foi construída com onze seqüências de *C. torquatus* oriundas de diferentes localidades, e quinze seqüências de outras espécies de tuco-tuco obtidas do GenBank.

As relações filogenéticas interespecíficas (citocromo *b*) e intraespecíficas (região controladora) foram obtidas no programa Mega 3.1, empregando o critério de *neighbor-joining*, com os modelos evolutivos Jukes-Cantor e Kimura dois-parâmetros. Em ambos os casos, foram realizados 10000 replicações (*bootstrap*) para verificar a robustez das análises.

Além destas análises, as relações filogenéticas entre seqüências de citocromo *b* de *Ctenomys sp.* e *C. torquatus* foram inferidas utilizando o programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) a partir de

dois diferentes critérios: máxima parcimônia, com a busca heurística utilizando 200 replicações de adições aleatórias de táxons; e a máxima verossimilhança, incorporando o modelo evolutivo TrN+I. Em ambos os casos, foram utilizados 100 replicações para avaliar o suporte dos nós. Uma análise filogenética separada utilizando inferência bayesiana foi empregada através do programa Mr.Bayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), incorporando o modelo evolutivo HKY. Duas corridas separadas de cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC) foram realizadas com 100.000 a 200.000 gerações, respectivamente, amostrando as árvores a cada 100 gerações, e descartando as 200 primeiras (*burn-in*).

Para determinar os modelos evolutivos das seqüências nucleotídicas apropriados em cada caso utilizou-se o critério de informação Akaike (AIC), implementado no programa MODELTEST 3.6 (Posada & Crandall, 1998).

As análises populacionais de *C. torquatus* foram realizadas com os programas DNAsp 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003) e Arlequin 3.11 (Excoffier & Schneider, 2005). Foram realizadas estimativas de diversidade genética global e estimativa de fluxo gênico entre pares de populações (Hudson *et al.*, 1992), além de obtenção dos haplótipos e da diversidade haplotípica e nucleotídica.

O método de *median-joining network* (Bandelt *et al.*, 1999) foi realizado no programa Network (www.fluxus-engineering.com) com objetivo de construir uma rede de haplótipos de *C. torquatus*.

Inferências com relação à ocorrência de eventos de expansão, ou declínio, populacional foram baseadas nas estimativas de neutralidade utilizando os testes de *D* de Tajima (Tajima, 1989), *F* e *D* de Fu & Li, e *F_s* de Fu (Fu, 1997), além da análise de *mismatch distribution* baseada no modelo de crescimento *stepwise* (Rogers & Harpending, 1992) realizadas nos programas DNAsp 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003) e Arlequin 3.11 (Excoffier & Schneider, 2005). A análise de *mismatch distribution* avalia a distribuição do número de diferenças entre os pares de populações observados entre os haplótipos.

O teste de Mantel (Mantel, 1967) foi empregado para determinar a existência de relação significativa entre as distâncias geográficas e as distâncias genéticas entre os pares de populações de *C. torquatus*. A matriz de distância das coordenadas geográficas foi obtida através do programa *how far is it?* (www.indo.com/distance). Utilizou-se o logaritmo natural das distâncias geográficas lineares (em quilômetros) entre os pares de populações para o cálculo do isolamento pela distância. Estas inferências estatísticas foram realizadas no programa Arlequin 3.11, com 1000 repetições.

Com o objetivo de detectar possíveis barreiras ao fluxo gênico foi utilizado o programa *AIS - alleles in space*, que faz uso do algoritmo de diferenciação máxima de Monmonier (Miller, 2005).

As análises de variância molecular (AMOVA - Excoffier *et al.*, 1992) foram realizadas no programa Arlequin 3.11, possibilitando com isso, a estimativa do grau de variação genética e o teste da hipótese de que as distâncias geográficas explicariam as divergências genéticas observadas em *C. torquatus*. Por esta razão, duas análises foram realizadas:

1) divisão de toda a amostra em três grupos, considerando o aspecto geográfico: Leste (incluindo as amostras de General Câmara, Butiá, Cachoeira do Sul, Santa Maria), Oeste (Rosário do Sul, Alegrete, Itaqui e Uruguaiana) e Sul (Torquato Severo, Candiota, Pelotas, Rio Grande e Taim) da distribuição da espécie no Rio Grande do Sul, Brasil;

2) divisão em dois grupos, considerando uma possível barreira entre populações do sul do Brasil (Torquato Severo, Candiota, Pelotas, Rio Grande e Taim) e as demais populações de *C. torquatus* (General Câmara, Butiá, Cachoeira do Sul, Santa Maria, Rosário do Sul, Alegrete, Itaqui e Uruguaiana) detectadas pelo algoritmo de Monmonier no programa AIS.

Estas análises foram conduzidas exclusivamente com populações que apresentavam mais de quatro indivíduos (Apêndice 1).

RESULTADOS

Análises interespecíficas

A árvore filogenética construída através de Neighbor-Joining demonstrou a existência de um clado com as seqüências de *C. torquatus* - monofiléticas entre si - e as seqüências de *C. minutus* (duas espécies que ocorrem no Brasil), além de *C. pearsoni* (que ocorre no Uruguai) e as espécies de tuco-tuco (*C. roigi*, *C. perrensi*, *C. dorbignyi* e *Ctenomys sp.*) da região de Corrientes, noroeste da Argentina (Figura 3). As espécies do grupo mendocinus formaram um grupo em separado, e aquelas oriundas da Patagônia formaram um outro agrupamento. As espécies do norte da Argentina e sul da Bolívia (*C. conoveri* e *C. frater*) constituíram o grupo mais basal dentre as espécies analisadas.

As análises por máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência Bayesiana demonstraram, de forma geral, resultados semelhantes aos obtidos pelo método de Neighbor-Joining no que diz respeito à formação de quatro clados principais agrupando as seqüências de tuco-tucos analisadas com citocromo *b*, porém, estas análises apresentaram menores resoluções entre os grupos e baixos valores de *bootstrap*.

Podemos interpretar a ocorrência de um padrão filogenético associado à distribuição geográfica destas espécies, com exceção daquelas pertencentes ao grupo mendocinus, que não apresentam proximidade geográfica apesar de serem filogeneticamente relacionadas, visto estarem incluídas no grupo espécies que ocorrem no litoral do sul do Brasil, centro da Argentina e no Uruguai.

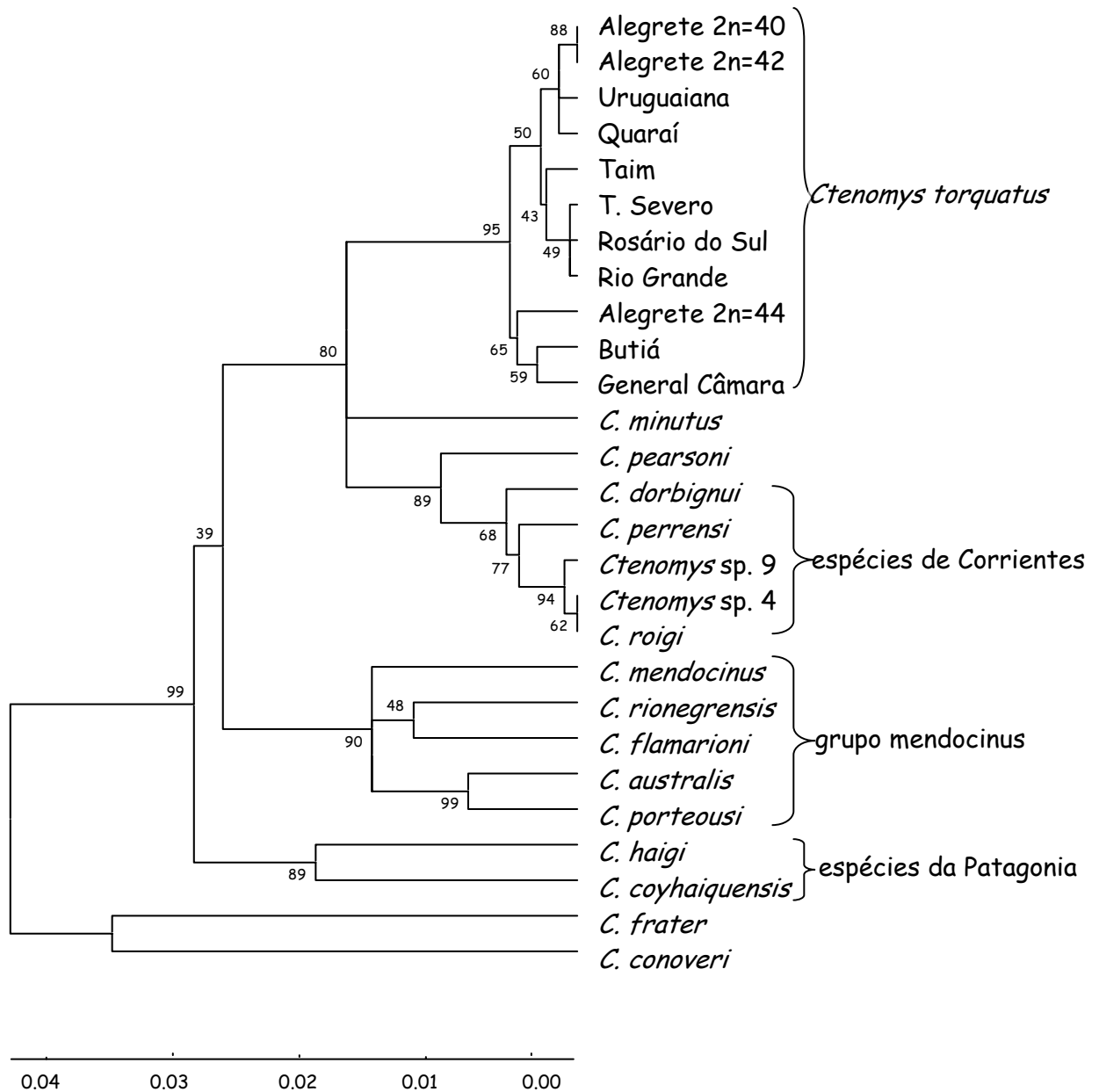


Figura 3. Árvore de neighbor-joining obtida com seqüências de citocromo *b* de *Ctenomys torquatus* (identificadas pelo nome das localidades de origem) e quinze espécies do gênero *Ctenomys* obtidas do GeneBank (números de acesso no apêndice 2). Os valores de *bootstrap* são apresentados, e os agrupamentos formados pelas espécies estão destacados na figura. A divergência nucleotídica entre as seqüências pode ser mensurada pela escala apresentada.

Análises intraespecíficas

Os fragmentos de região controladora sequenciados apresentaram um total de 10 sítios variáveis, definindo 13 haplótipos em uma amostra de 115 indivíduos da espécie *C. torquatus* (Apêndice 1). A composição de pares de base foi a seguinte: G = 14,1%, C = 24,5%, T = 27,1%, A = 34,3%. Esta distribuição dos percentuais de pares de base não diferiu do padrão normalmente encontrado para região controladora do ADNmt em espécies do gênero *Ctenomys* (Tomasco & Lessa, 2007). O valor médio de diversidade haplotípica de 0,819 pode ser considerado relativamente alto quando comparado com outros estudos para o gênero, enquanto a diversidade nucleotídica apresentou valores relativamente baixos, com média de 0,00068. Estes resultados indicam que estas populações apresentam um grande número de haplótipos altamente relacionados, ou seja, bastante semelhantes.

As análises haplotípicas demonstraram que a maioria das populações apresentou um único haplótipo, sendo que dos 13 haplótipos observados seis são compartilhados entre as populações do centro e do oeste do Rio Grande do Sul e do oeste do Uruguai, sendo o haplótipo 2 (vermelho) o mais freqüente, ocorrendo em praticamente toda a distribuição geográfica da espécie, com exceção da região do extremo sul do Rio Grande do Sul e no Uruguai (Figuras 4 e 5, e Apêndice I). O segundo haplótipo mais freqüente ocorre exatamente na região do extremo sul do Rio Grande do Sul, enquanto as localidades a oeste do Rio Grande do Sul apresentaram a maior variabilidade haplotípica, com a maioria dos haplótipos diferenciando-se apenas por um par de bases nucleotídicas em relação ao haplótipo mais freqüente (Figura 5).

A topologia da rede de haplótipos em forma de "estrela" (Figura 5) sugere um cenário de pouca diferenciação entre eles, com o mais freqüente estando representado na maioria das localidades, e alguns haplótipos únicos com uma, ou poucas, diferenciações nucleotídicas. As populações do leste, do oeste e do sul do Rio Grande do Sul, além das amostras do Uruguai, podem ser consideradas como periféricas por apresentarem haplótipos exclusivos e possivelmente diferenciados a partir do mais abundante e que ocorre em várias localidades, principalmente na região central da distribuição geográfica da espécie no Brasil.

Apenas um grupo de haplótipos apresenta-se relacionado e isolado dos demais, além de não apresentar nenhum indivíduo com o haplótipo mais freqüente e encontrado em todas as demais localidades. Estes haplótipos exclusivos da região sul do Rio Grande do Sul e oeste do Uruguai

abrange as populações de Torquato Severo, Candiota, Pelotas, Rio Grande e Taim, no Brasil, e Cerro Largo, no Uruguai (Figura 5).

Complementando as informações obtidas através da rede de haplótipos, o algoritmo de Monmonier detectou uma barreira entre todas as populações de *C. torquatus* e aquelas populações que ocorrem no extremo sul do Rio Grande do Sul e leste do Uruguai (Figura 5).

A ausência de diferenciação genética entre as populações foi representado através das árvores filogenéticas de neighbor-joining (Figura 6). Estes resultados não demonstram, portanto, a existência de subdivisões geográficas entre os haplótipos. Tal como nas análises anteriores, o único grupo que apresenta algum grau de estruturação e similaridade filogenética é o de populações do extremo sul do Rio Grande do Sul e leste do Uruguai. O padrão de filogenia encontrado para esta espécie, com ramos curtos e estruturas genéticas pouca robustas, sugerem que esta espécie esteja passando por um processo de expansão populacional (Avice, 2000). As análises por máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência Bayesiana apresentaram resultados similares (dados não apresentados) com relação à ausência de diferenciação entre as seqüências de *C. torquatus* analisadas.

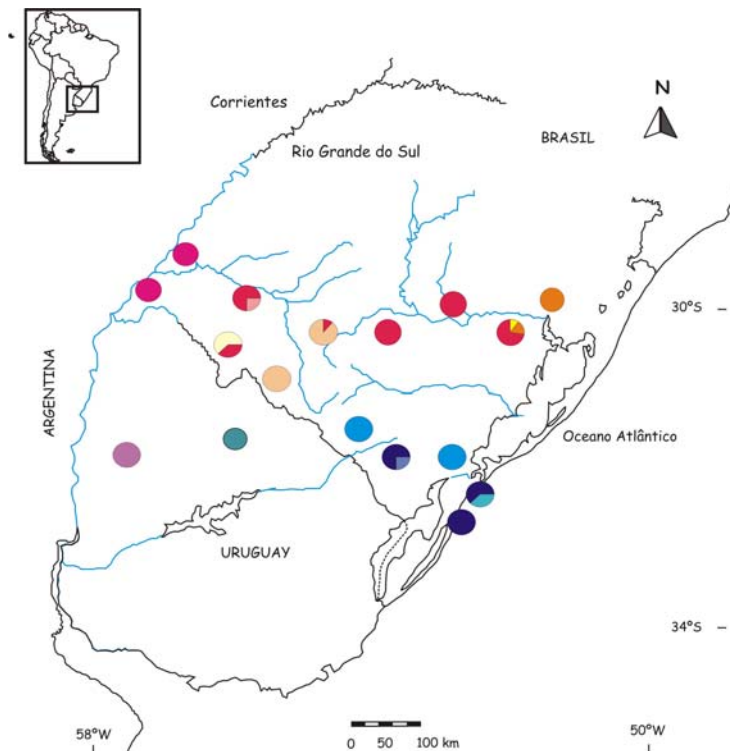


Figura 4. Distribuição das frequências haplotípicas de *Ctenomys torquatus* no Rio Grande do Sul e Uruguai, sendo o haplótipo em vermelho o mais frequente. A representação das cores de cada haplótipo está de acordo com a figura 5.

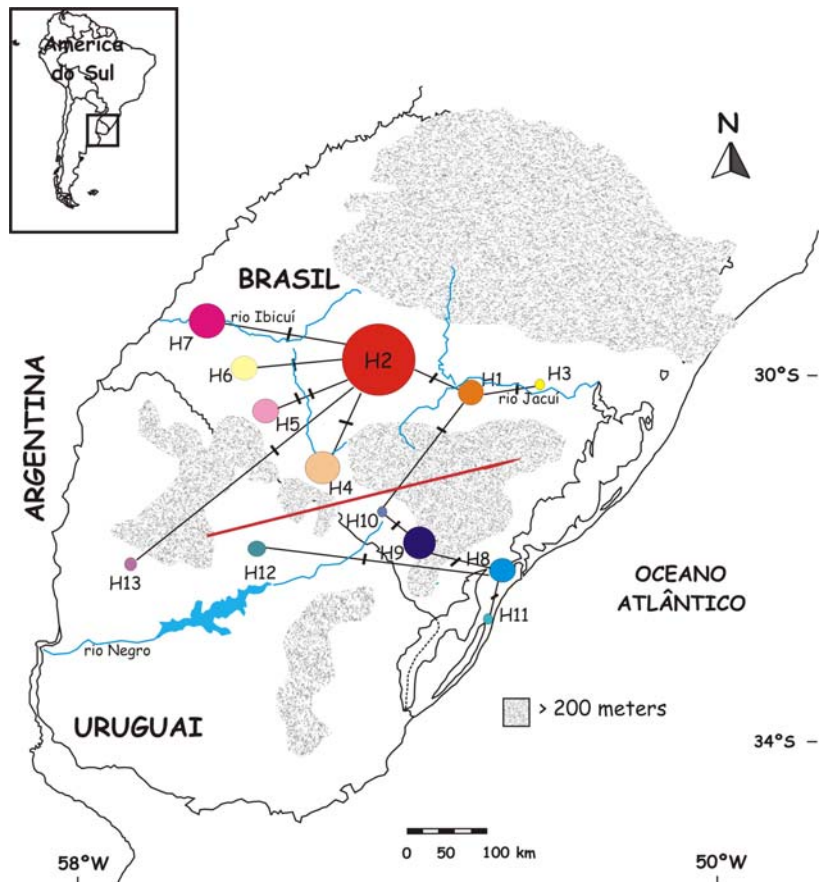


Figura 5. Rede de haplótipos e sua distribuição geográfica sobreposta ao mapa com a distribuição geográfica da espécie *Ctenomys torquatus* no sul do Brasil e norte do Uruguai. A linha vermelha representa a barreira detectada pelo algoritmo de Monmonier que separa as populações do extremo sul do Rio Grande do Sul e leste do Uruguai (clado S) das demais populações de *C. torquatus* (clado T).

Legenda dos números dos haplótipos e as localidades em que ocorrem no Rio Grande do Sul:

- H 1: General Câmara & Butiá
- H 2: Minas do Leão, Butiá, Cachoeira, Santa Maria, Rosário do Sul, Quaraí, Alegrete (2n=44, 42 & 40)
- H 3: Butiá
- H 4: Rosário do Sul & Santana do Livramento
- H 5: Quaraí
- H 6: Alegrete42
- H 7: Itaqui & Urugaiana
- H 8: Torquato Severo & Pelotas
- H 9: Candiota, Rio Grande & Taim
- H 10: Candiota
- H 11: Rio Grande
- H 12: Tacuarembó - Uruguai
- H 13: Rio Negro - Uruguai

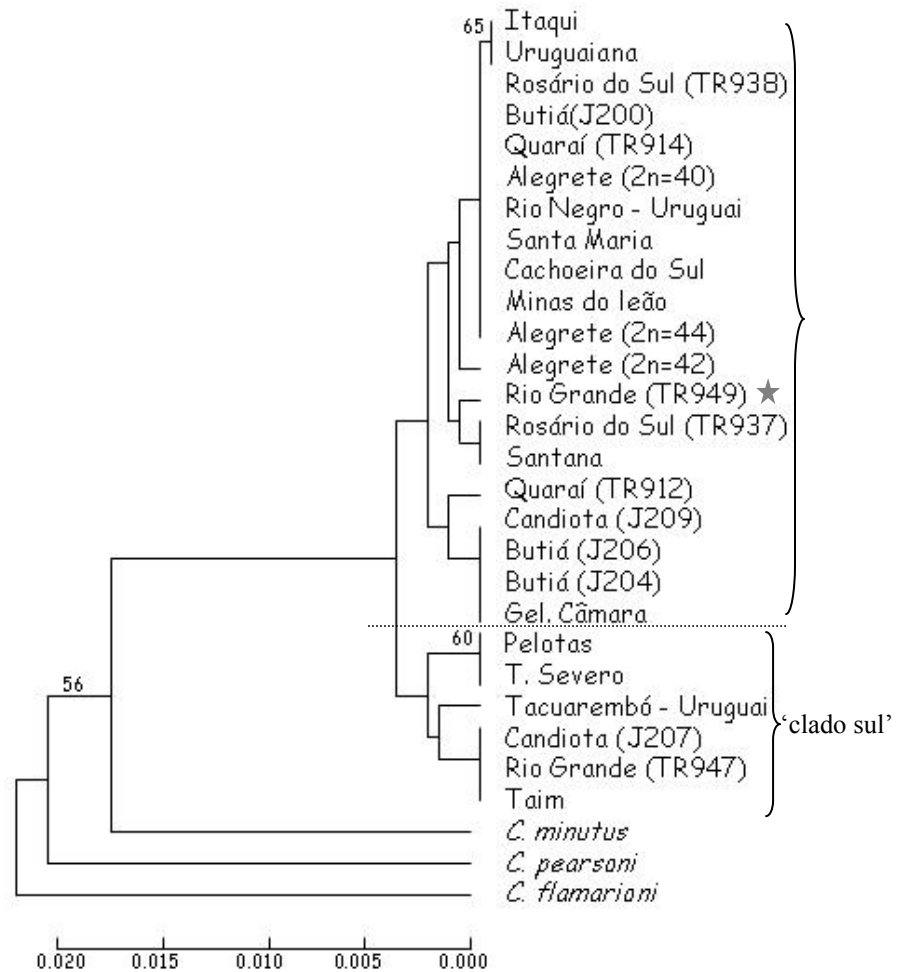


Figura 6. Árvore de neighbor-joining utilizando os haplótipos das seqüências de região controladora de ADN mitocondrial de *Ctenomys torquatus*. As espécies *C. minutus*, *C. pearsoni* e *C. flamarioni* foram incluídas como grupos-externos. Os valores de *bootstrap* acima de 50 são apresentados, e as seqüências que formam o 'clado sul' estão agrupado, com exceção do TR 949 de Rio Grande (asterisco). A divergência nucleotídica entre as seqüências pode ser mensurada pela escala apresentada.

Dinâmica populacional

A dinâmica populacional foi investigada utilizando os testes de neutralidade e análise de *mismatch distribution*. Os testes de neutralidade foram realizados considerando todos os indivíduos como pertencentes a uma única população e resultaram em valores negativos e não significativos para o teste D de Tajima ($D=-0.18$, $p>0.1$), o teste D de Fu e Li ($D=-0.07$, $p>0.1$) e também para o teste F de Fu e Li ($F=-0.13$, $p>0.1$), porém, o teste F_s de Fu apresentou resultado também negativo, mas significativo ($F_s=-3.42$, $p<0.02$). A análise de *mismatch distribution* apresentou uma distribuição unimodal, sugerindo uma história de expansão populacional para a espécie (Figura 6).

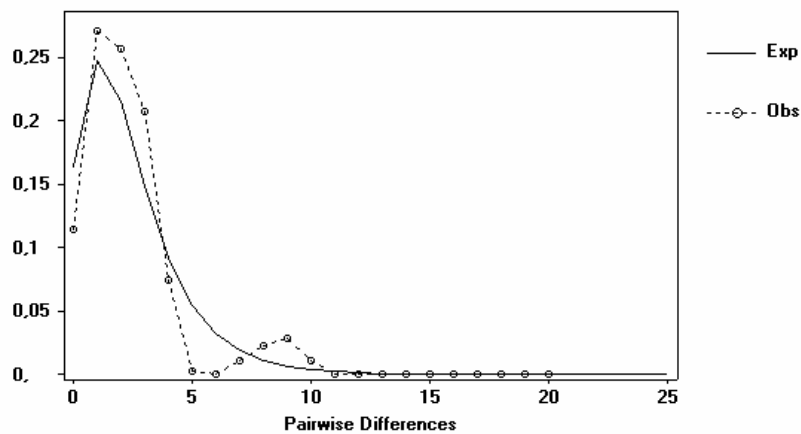


Figura 6: Mismatch distribution observado e esperado para as populações de *Ctenomys torquatus*. Os círculos abertos representam a distribuição observada e a linha representa a distribuição esperada.

O teste de Mantel teve como resultado uma correlação significativa entre as distâncias geográficas e as estimativas de fluxo gênico, revelando desta forma, um padrão de isolamento por distância ($r=0.32$, $p<0.001$).

Os elevados, e significantes, valores de F_{st} (Tabela 2) demonstraram ausência, ou limitado, fluxo gênico entre as populações analisadas. Apesar destes resultados poderem estar relacionados com o pequeno número de indivíduos em algumas populações, ou ainda devido ao número de haplótipos compartilhados, talvez estes resultados sejam interpretados de forma mais realista como uma indicação da marcante característica filopátrica das fêmeas destes roedores (Reig *et al.*, 1990) sendo representada por um marcador molecular que está intrinsecamente relacionado às fêmeas do organismo analisado.

A AMOVA (Tabela 2) demonstrou que o percentual de variação entre os grupos foi maior quando consideradas as duas populações encontradas nas análises empregando o algoritmo de Monmonier (65%) do que considerando três grandes grupos populacionais (49%), da mesma forma, os percentuais de variação entre populações foram menores quando analisados apenas dois grupos: um com as populações do sul e outro grupo com as demais populações; demonstrando que as diferenças dentro destes dois grupos são realmente menores do que na análise considerando toda a amostra dividida em três grupos, e portanto, apenas uma barreira ao fluxo gênico deve ter maior relevância na estruturação das populações desta espécie ao longo de toda sua distribuição geográfica.

Tabela 2. Análise hierárquica da variação molecular de *C. torquatus* por região, mostrando os índices de fixação (F_{st}) com os seus respectivos valores de p , e a porcentagem de variação em cada nível de subdivisão. Os níveis da subdivisão de populações são detalhados no texto e apresentados no Apêndice I. (* $p=0.00$)

Fontes de variação	3 regiões (sul/leste/oeste)		2 regiões (sul/outras)	
	Porcentagem de variação	Índices de fixação	Porcentagem de variação	Índices de fixação
- entre grupos	49,49%	$F_{ct} = 0.495^*$	65,00%	$F_{ct} = 0.650^*$
- entre populações dentro dos grupos	40,19%	$F_{sc} = 0.896^*$	27,66%	$F_{sc} = 0.790^*$
- entre populações	10,32%	$F_{st} = 0.494^*$	7,34%	$F_{st} = 0.926^*$

DISCUSSÃO

Análises filogenéticas interespecíficas com citocromo b

Os resultados deste trabalho demonstram que as análises interespecíficas utilizando citocromo *b* apresentam, relativamente, o mesmo padrão encontrado em outros estudos filogenéticos com espécies de tuco-tuco (Lessa & Cook, 1998; Cook & Lessa, 1998; D'Elia *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2005), com exceção da relação entre as espécies *C. torquatus* e *C. pearsoni*.

O grupo mendocinus formou um clado monofilético de espécies, o que é corroborado por informações cromossômicas, de morfologia do espermatozóide, e também por estudos moleculares (Freitas, 1994; D'Elia *et al.*, 1999; Massarini & Freitas, 2005), enquanto as espécies do norte da

Argentina e sul da Bolívia apresentam-se relacionadas e formando um grupo teoricamente mais próximo as espécies ancestrais de tuco-tucos (Castillo *et al.*, 2005).

A proximidade filogenética entre as espécies de *Ctenomys sp.* de Corrientes, na Argentina, e as espécies *C. pearsoni*, *C. minutus* e *C. torquatus* indica a relação filogenética entre estas espécies e sugere que a proximidade filogenética normalmente encontrada entre as espécies *C. torquatus* e *C. pearsoni* (Lessa & Cook, 1998, D'Elia *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2005) esteja mais relacionada com a ausência de estudos envolvendo estas e as demais espécies de tuco-tuco do que uma grande proximidade filogenética entre este par de espécies. Pois, ao realizar uma análise envolvendo outras espécies do gênero com ocorrência em regiões próximas àquelas, tais como *C. minutus* (Rio Grande do Sul), *C. perrensi*, *C. roigi*, *C. dorbignyi* e *Ctenomys sp.* (noroeste da Argentina), as espécies, até então consideradas "irmãs" filogeneticamente, demonstraram não serem tão próximas quanto se supunha até então.

A questão taxonômica

Indivíduos pertencentes a populações de tuco-tucos na localidade de Curuzú Laurel, Província de Corrientes, na Argentina, foram cariotipados e apresentaram $2n=42$, $FN=72$, com apenas 4 pares de cromossomos acrocêntricos e o cromossomo Y totalmente heterocromático (Ortells *et al.*, 1990, Reig *et al.*, 1992). Ortells *et al.* (1990) propuseram que esta população de Curuzú Laurel fosse relacionada com *C. torquatus* considerando os aspectos citogenéticos e de morfologia de espermatozóide, muito embora a distância geográfica entre Corrientes e Candiota (até então a população descrita de *C. torquatus* mais próximo a Corrientes) e ausência de outros aspectos que possibilitassem uma comparação mais refinada conduziram os pesquisadores a uma posição conservadora e estes não atribuíram um nome específico às populações daquela localidade, sendo denominada *Ctenomys sp.*

A partir da descrição da população de *C. torquatus* com cariótipo $2n=42$, em Alegrete, extremo oeste do Rio Grande do Sul, apresentando características citogenéticas, tais como número diplóide e número fundamental, além da morfologia cariotípica e do padrão de morfologia do esperma do tipo simétrico, muito semelhantes ao descrito para as populações de *Ctenomys sp.* de Curuzú Laurel, foi possível estabelecer uma associação entre estas duas populações.

Considerando os resultados obtidos (Figura 3), podemos afirmar apenas que a população de tuco-tucos de Curuzú Laurel apresenta o mesmo cariótipo que a população de *Ctenomys torquatus*, do

Alegrete, porém, são filogeneticamente bastante distantes. Pois, do ponto de vista molecular, as seqüências de citocromo *b* da população de Curuzú Laurel estão mais relacionadas com as seqüências de *C. perrensi*, *C. roigi* e *C. dorbignyi*, que, embora tenham números cromossômicos bem diferentes ($2n=50$, 48 e 70 , respectivamente), são as populações de tuco-tuco mais próximas geograficamente.

Esta semelhança em relação à morfologia cromossômica sem qualquer associação com a diferenciação molecular vai ao encontro do proposto por Ruedas *et al.* (1992). Nesse estudo, Ruedas *et al.* (1992) demonstraram ausência de correlação entre o tamanho do genoma e o número diplóide em espécies de *Ctenomys*. Sugerindo, portanto, que a evolução cromossômica se desenvolve de forma independente do tamanho total do ADN.

Apesar destes resultados, devem ser realizadas coletas na região oeste de Corrientes até as margens do rio Uruguai, para que maiores detalhes possam ser descritos a respeito das populações de tuco-tuco destas localidades. Com a expectativa de que novas populações portadoras de polimorfismos possam ser encontradas, tais como verificado no oeste do Rio Grande do Sul.

Além disso, seriam necessárias coletas na região norte do Uruguai, visto ser esta também uma área com escassos levantamentos e coletas de roedores, particularmente de tuco-tucos, para que as relações entre *C. torquatus* e *C. pearsoni*, bem como entre *C. pearsoni*, e *C. dorbignyi* (espécies com estreitas relações filogenéticas e cromossômicas, ambos com $2n=70$, Garcia *et al.*, 2000b) possam ser analisadas de forma mais detalhada e precisa.

Variabilidade genética interespecíficas: comparação de padrões filogeográficos

Recentemente alguns estudos vêm sendo realizados com tuco-tucos, utilizando como marcadores moleculares à região controladora do ADNmt, procurando identificar os padrões de variabilidade genética em populações de espécies destes roedores (Tabela 3). A maioria das espécies de *Ctenomys* analisadas apresentou padrões demográficos de expansão populacional recente e de isolamento pela distância. Estes padrões podem estar relacionados ao relativo curto intervalo de tempo de diversificação destes roedores, desde o Plioceno-Pleistoceno, e/ou as características demográficas destes roedores (Reig *et al.*, 1990; Verzi, 2002), porém análises filogeográficas demonstraram peculiaridades da história evolutiva de cada uma das espécies analisadas até então.

Tabela 3. Comparação dos resultados de estudos de tuco-tucos (gênero *Ctenomys*) que utilizaram região controladora do ADN mitocôndria apresentando: o número de haplótipos, o número de indivíduos analisados, diversidade haplotípica, compartilhamento de haplótipos por espécie, características de habitat, o modelo do isolamento por distância, inferência de demografia e referência bibliográfica.

espécies	Nº haplótipos	indivíduos analisados	diversidade haplotípica	haplótipos compartilhados	sítios variáveis	isolado pela distância	inferência demografia	referência bibliográfica
<i>C. torquatus</i>	13	115	0,819	40%	10	sim	expansão	Este estudo
<i>C. pearsoni</i>	21	98	-	38%	51	sim	população estável	Tomasco & Lessa, 2007
<i>C. talarum</i>	32	71	0,930	32%	47	sim	população estável	Mora <i>et al.</i> , 2007
<i>C. minutus</i>	34	187	0,958	20%	42	sim	população estável	Lopes, 2007
<i>C. australis</i>	24	70	0,833	12,5%	19	não	expansão recente	Mora <i>et al.</i> , 2006
<i>C. flamarioni</i>	7	89	0,790	40%	5	sim	expansão recente	Fernández-Stolz, 2007

As espécies de tuco-tuco que habitam solos mais arenosos, apresentam distribuição geográfica restrita e ocupam o mesmo nicho ecológico, tais como as que ocorrem na primeira linha de dunas do litoral na Argentina e no Brasil (*C. australis* e *C. flamarioni*, respectivamente), são filogeneticamente relacionados e foram classificadas como espécies que experimentam um processo de expansão populacional; a única distinção entre elas reside na caracterização de um padrão de isolamento por distância na espécie que ocorre no litoral do Brasil (*C. flamarioni*) e que não foi detectado na espécie da Argentina (*C. australis*) (Mora *et al.*, 2006; Fernández-Stolz, 2007). Por outro lado, espécies de tuco-tuco com distribuições geográficas relativamente maiores e que ocupam a primeira e a segunda linha de dunas do litoral, desde o sul do Brasil até a Argentina, compartilharam características demográficas de isolamento pela distância e de estabilidade populacional, verificado em *C. pearsoni*, *C. minutus* e *C. talarum* (Tomasco & Lessa, 2007; Lopes, 2007 e Mora *et al.*, 2007, respectivamente).

Apesar de *C. torquatus* também apresentar um padrão de isolamento pela distância, para esta espécie a explicação para este padrão difere das demais espécies e deve estar relacionada à maior

freqüência e ampla distribuição de um único haplótipo, além da presença de haplótipos pouco diferenciados em uma distribuição periférica.

Podemos propor que este padrão esteja associado com a origem da espécie em uma região relativamente estável do ponto de vista geológico a partir do Quaternário. Desta forma, variações no nível do mar (Tomazelli *et al.*, 2000) e eventuais variações no nível do rio Uruguai (Souza *et al.*, 2005) restringiram a espécie a uma região central, a partir da qual foram derivando as populações periféricas que se encontram atualmente no oeste do Rio Grande do Sul e noroeste do Uruguai, e também no sudeste do Rio Grande do Sul e norte do Uruguai.

Os níveis de diferenciação genética em relação às seqüências nucleotídicas em tuco-tucos são bem representados nestes dois exemplos: as duas populações geograficamente mais distantes de *C. minutus* que compartilham o mesmo haplótipo encontram-se a apenas 49 quilômetros de distância uma da outra (Lopes, 2007), enquanto existem duas populações de *C. torquatus*, que também compartilham o mesmo haplótipo, porém estão distantes nada menos do que 650 quilômetros uma da outra. Outro exemplo da disparidade das diferenças entre espécies do gênero *Ctenomys* pode ser demonstrada pela diferenciação haplotípica entre *C. pearsoni* e *C. torquatus*, enquanto a primeira apresenta 16 nucleotídeos de diferença entre seus haplótipos mais distintos (Tomasco & Lessa, 2007), a espécie *C. torquatus* apresenta menos da metade, apenas 7 nucleotídeos separam os haplótipos mais diferenciados.

Análises intraespecíficas

O número de haplótipos, a diversidade haplotípica, número de sítios variáveis e as inferências demográficas para *C. torquatus* e outras espécies de tuco-tuco também estudadas com região controladora do ADNmt estão descritos na Tabela 3. Estes resultados demonstram que *C. torquatus* apresentou um dos menores números de haplótipos (13) e de sítios variáveis (10), e um alto percentual de compartilhamento de haplótipos entre as populações estudadas (46%). As populações desta espécie de tuco-tuco se caracterizam por um padrão de baixa diversidade nucleotídica e haplotípica, indicando que as populações são formadas por haplótipos bastante relacionados. Tal como verificado para *C. flamarioni* e *C. australis*, as inferências demográficas sugerem que *C. torquatus* apresenta um padrão de expansão populacional.

O padrão geral de diversidade genética da região controladora de *C. torquatus* pode ser resumido como apresentando um baixo nível de diferenciação e ausência de estruturação

populacional, com grupos populacionais formados por poucos indivíduos apresentando pequenas diferenciações nas regiões periféricas da atual área de distribuição da espécie.

Evidências adicionais a este padrão de expansão populacional são verificadas através dos testes de neutralidade. Para marcadores neutros, e assumindo uma taxa de mutação constante, valores negativos e não significativos nestes testes estão relacionados com expansão populacional, pois representam um excesso de variantes em baixa frequência, tal como o esperado em eventos de expansão (Mora *et al.*, 2007).

Apesar da região controladora do ADNmt ser reconhecidamente uma sequência neutra, e ser amplamente utilizada como um marcador genético em decorrência desta característica, a seleção positiva não pode ser completamente descartada pois alguns estudos detectaram variações do modelo de seleção natural em regiões do genoma mitocondrial (Nachman *et al.*, 1996; Nachman, 1998). Alguns eventos de seleção podem produzir padrões de diversidade haplotípica semelhantes ao obtido em um processo de expansão populacional, porém estas possibilidades não são discriminadas através de testes estatísticos, tais como: D de Tajima ou F_s de Fu, mas podem ser sugeridos considerando os resultados observados no teste de *mismatch distribution* e pela observação de uma rede de haplótipos em forma de "estrela" caracterizando um processo de expansão recente (Slatkin & Hudson, 1991) que caracterizam a espécie *C. torquatus* (Figura 4, 5 e 6).

Como destacado por Rogers & Harpending (1992), as implicações de um crescimento exponencial continuado são indistinguíveis de um crescimento populacional abrupto. Além disso, um pequeno número de diferenças nucleotídicas entre pares de sequências e uma curva de crescimento unimodal podem sugerir um possível processo de expansão populacional. Outro evento populacional que pode apresentar variações na distribuição das diferenças entre os pares de populações é o chamado "gargalo de garrafa", ou *bottlenecks*, porém este, ao contrário da expansão populacional, pode apresentar uma redução populacional simulando uma seleção balanceadora, mantendo vários alelos (ou grupos de alelos) por um longo tempo. Sob este ponto de vista, a história demográfica observada para *C. torquatus* sugere a ocorrência de um processo de expansão populacional, e não um exemplo de um evento de *bottleneck* em relação às populações analisadas desta espécie de tuco-tuco.

Um cenário de expansão populacional relacionado a um severo declínio populacional, chamado *bottleneck*, também foi observado por Chan *et al.* (2006) para uma espécie colonial de tuco-tuco (*C. sociabilis*). Neste estudo, os autores analisaram ADN extraído de fósseis de *C. sociabilis* e estimaram uma variação genética ancestral de aproximadamente 10.000 a 3.000 anos atrás, porém,

analisando ADN atual desta espécie de tuco-tuco, detectaram uma baixa variabilidade nas seqüências de citocromo *b*. Estimativas de grandes tamanhos efetivos de populações ancestrais, antes de um evento de *bottleneck* seguido por um declínio em quase 100% no tamanho efetivo, podem representar que populações, mesmo sendo de roedores, estão susceptíveis a sofrer um grande declínio por ações não necessariamente antropogênicas, e que apesar disto, as populações podem persistir por milhares de anos a beira da extinção com baixa diversidade genética.

Apesar da distribuição em manchas e da baixa mobilidade dos roedores subterrâneos (Reig *et al.*, 1990), clados monofiléticos não foram observados entre as populações de *C. torquatus*. Além disso, a rede de haplótipos em forma de "estrela" (Figura 5), a árvore de neighbor-joining com ramos curtos, e um padrão polifilético (Figura 6) tornam mais propenso um cenário de expansão populacional.

De modo geral, quando um haplótipo encontra-se amplamente distribuído geograficamente ele deve ser o mais ancestral, e haplótipos restritos a uma única localidade, por sua vez, devem ser os mais recentes (Neigel *et al.*, 1991). Seguindo esta hipótese, a área que compreende o leste e o centro da distribuição de *C. torquatus* na *Depressão Central* do Rio Grande do Sul (Butiá, Cachoeira do Sul, Santa Maria, Rosário do Sul e Alegrete) deve contar com as populações mais antigas deste roedor, pois é nesta região que se encontra, disseminado em larga escala, o haplótipo mais distribuído (H2). E corroborando com esta proposta, as áreas periféricas da distribuição geográfica apresentam haplótipos exclusivos.

Foi observado apenas um grupo de haplótipos relacionados entre os indivíduos das localidades do sul do Brasil (H8, H9, H10, H11, H12 - Figura 5). Entretanto, não é possível estabelecer uma clara diferenciação filogenética deste grupo em relação aos demais indivíduos devido ao fraco suporte filogenético encontrado através das árvores filogenéticas geradas. Por outro lado, a análise realizada empregando o algoritmo de Monmonier demonstrou uma barreira separando este grupo das populações do sul do Brasil em relação às outras populações da espécie (Figura 5).

O ADN mitocondrial vem sendo utilizado como marcador molecular em diversos estudos que visam entender as relações de diferenciações genéticas, atuais ou passadas, entre populações de espécies ao longo de suas distribuições geográficas. Devido ao seu padrão de herança materna, não recombinante e de rápido tempo de evolução, este marcador molecular geralmente evidencia a existência de grande número de haplótipos que podem ser ordenados e classificados numa filogenia intraespecífica (Avice, 2000). Entretanto, a politomia encontrada nas análises de *C. torquatus*

também foi detectada em outros estudos de espécies do gênero *Ctenomys* empregando diferentes marcadores moleculares: citocromo *b* (Mascheretti *et al.*, 2000; Slamovits *et al.*, 2001; Fernández, 2007) e região controladora (Mora *et al.*, 2006; Tomasco & Lessa, 2007; Fernández, 2007; Lopes, 2007). Em todos estes casos, estes marcadores moleculares não tiveram sucesso em obter boas resoluções em filogenias inter e intraespecíficas, sugerindo que estas politomias ocorrem devido a radiação recente e simultânea, com a maioria das linhagens tendo sido formadas em períodos de tempo relativamente próximos e recentes, ou então, que estas ferramentas não são suficientemente adequadas para compreender o grau de relacionamento e diferenciação entre as espécies deste gênero.

Desta forma, podemos observar que esta espécie apresenta um padrão de diversidade genética complexa e que necessita de estudos mais aprofundados, empregando outras metodologias moleculares, ferramentas tais como marcadores de microssatélites, ou genes nucleares, para possibilitar um melhor entendimento dos padrões e da história genética da espécie *Ctenomys torquatus*.

Apêndice 1. Sítios polimorfos no fragmento de 387 pares de base de região controladora do ADN mitocondrial de *Ctenomys torquatus* (n=115); número de haplótipos, a distribuição de cada haplótipo por localidade e número total de indivíduos por localidades.

Número de haplótipos	sítios										Número de indivíduos de cada haplótipo por localidade
	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	
	0	3	7	2	3	3	3	4	3	7	
	2	9	8	2	3	5	7	0	1	3	
H1	T	Butiá (2), General Câmara (5)
H2	C	A	T	A	T	A	T	T	A	C	Butiá (7), Santa Maria (4), Cachoeira Sul (9), Rosário do Sul (1), Quaraí (2), Alegrete [2n=44] (8), Alegrete [2n=42] (1), Alegrete [2n=40] (10)
H3	G	Butiá (1)
H4	C	.	.	.	Rosário do Sul (9), Santana (2)
H5	T	C	.	.	Quaraí (4)
H6	G	.	Alegrete [2n=42] (7)
H7	C	Itaqui (8), Uruguaiana (3)
H8	T	G	C	Torquato Severo (2), Pelotas (8)
H9	.	G	C	Candiota (4), Taim (10), Rio Grande (2)
H10	.	G	Candiota (1)
H11	.	G	C	.	.	.	C	.	.	.	Rio Grande (1)
H12	.	G	C	T	Tacuarembó (3)
H13	.	.	.	G	Rio Negro (1)

Apêndice 2. Relação das seqüências de citocromo *b* de ADN mitocondrial das espécies de *Ctenomys* utilizados nas análises filogenéticas com seus respectivos números de acesso no Genbank:

- *Ctenomys perrensi* (AF500067), *C. roigi* (AF500058), *C. dorbignyi* (AF500038), *C. mendocinus* (AF007062), *C. australis* (AF370697), *C. flamarioni* (AF500070), *C. porteousi* (AF370682), *C. conoveri* (AF007054), *C. frater* (AF007045), *C. coyhaiquensis* (AF071753), *C. haigi* (AF422920), *C. pearsoni* (AF119108), *Ctenomys sp.* 9 (AF500064), *Ctenomys sp.* 14 (AF500055).

7. MORFOMETRIA CRANIANA DE *Ctenomys torquatus*
(RODENTIA: CTENOMYIDAE)

INTRODUÇÃO

A morfometria pode ser definida, de um modo geral, como os estudos da forma e do tamanho, e de como estas duas variáveis se relacionam entre si. Sendo assim uma ferramenta para entender a relação destas com diversas outras variáveis, como por exemplo: a idade, o sexo, ou as relações históricas entre os organismos estudados. O campo da morfometria é formado por métodos que visam a descrição e a análise estatística das variações de forma dentro e entre grupos de organismos (Rohlf & Marcus, 1993).

Os caracteres morfológicos contínuos têm sido considerados como importantes ferramentas para analisar as variações existentes entre diferentes populações, ou espécies, de roedores subterrâneos, seja fóssil ou atual (Patton & Smith, 1990; Cook *et al.*, 1990; Ortells, 1990; Lessa, 1990; Vassallo, 1998; Vassallo, 2000; Stein, 2000; Mora *et al.*, 2003). Mora *et al.* (2003) descreveram os principais fatores que possibilitam interpretar os mecanismos e padrões envolvidos nestas diferenciações. Considera-se que a interpretação destes eventos é complexa por refletir as ações conjuntas de parâmetros ambientais e de história filogenética das linhagens (Stein, 2000).

Considerando a resposta dos organismos ou das populações às pressões impostas pelas alterações ambientais, é possível distinguir a existência de dois tipos de variações. Por um lado observam-se modificações em características com base genética, que podem ocorrer em função de processos de seleção natural, e por outro lado, pode haver variações nas proporções relativas de diferentes caracteres em função de relações alométricas, que podem não estar associadas às pressões seletivas (Stein, 2000; Mora *et al.*, 2003).

Exemplos destas relações entre grupos de caracteres acoplados de maneira funcional são os olhos e o aparelho mastigatório dos roedores fossoriais. A redução no tamanho e função dos olhos tem relação com o hábito fossorial e depende da frequência com que os roedores saem das tocas para forragear e dispersar (Lessa, 1990). O que explica os olhos relativamente maiores dos tuco-tucos, visto que, em relação aos demais roedores subterrâneos eles passam mais tempo fora de suas tocas (Lacey *et al.*, 2000). Outros exemplos podem ser vistos na evolução do aparato mastigatório, constituído pela região anterior formada por dois pares de dentes incisivos curvos de crescimento

contínuo, e cujas relações morfológicas são restringidas pela força exercida para permitir aos animais roer os alimentos e/ou os solos durante o processo de escavação, e no aumento relativo da área de inserção da musculatura envolvida na mastigação (Lessa, 1990; Stein, 2000).

Estas modificações para ampliação da inserção muscular são as mais importantes na estrutura craniana deste grupo de roedores. Os arcos zigomáticos robustos e a mandíbula peculiar - com o processo coronóide relativamente curto e os processos condilóide e angular bem desenvolvidos - possibilitam a inserção do músculo masseter bem desenvolvido, a crista lambdoidal possibilita a inserção da rígida musculatura do pescoço, enquanto os compridos e procumbentes incisivos são características essenciais para estes indivíduos que utilizam a cabeça e os incisivos para escavação (Stein, 2000).

Entre os roedores subterrâneos, o gênero *Ctenomys* apresenta um dos mais expressivos processos de especiação, com grande variação cromossômica e relativamente pouca diferenciação morfológica em função da convergência proporcionada pelo ambiente onde vivem (Reig *et al.*, 1990).

As espécies de tuco-tucos apresentam geralmente distribuições limitadas, com algumas exceções, tais como: *C. magellanicus*, *C. mendocinus*, *C. talarum*. Dentre estas espécies com áreas de ocorrência relativamente amplas, *C. torquatus* se destaca ocorrendo nas áreas de campos abertos do Estado do Rio Grande do Sul e do Uruguai (Freitas, 2006).

Apesar da variabilidade cariotípica encontrada nesta espécie, Freitas & Lessa (1984) realizaram investigações de medições craniométricas de fêmeas adultas de *Ctenomys torquatus* que não apresentaram diferenças significativas, com exceção do tamanho total da cabeça, entre os indivíduos de Pelotas (2n=44) e aquelas de Barra Falsa e da Estação Ecológica do Taim (2n=46).

Mais de duas décadas depois das análises craniométricas realizadas por Freitas & Lessa (1984), ainda restavam algumas lacunas com relação a morfometria craniana desta espécie de tuco-tuco, principalmente após a descrição da ocorrência de novas populações desta espécie no Rio Grande do Sul, incluindo novos registros de formas cromossômicas, o que tornou relevante à investigação de possíveis diferenças morfométricas cranianas entre estas populações. Outra questão com relação a esta espécie vem a ser a investigação sobre a possível ocorrência de dimorfismo sexual, comum entre outras espécies do gênero *Ctenomys*.

Estatística multivariada

Análises quantitativas da variação morfológica são ferramentas essenciais em estudos evolutivos. Por ser a variação morfológica eminentemente quantitativa, a compreensão desta está relacionada com o emprego de metodologias estruturadas em formulações e avaliações estatísticas de hipóteses nulas. Este enfoque possibilita, de forma objetiva, o estudo da diversidade morfológica e de biologia evolutiva, particularmente no nível intraespecífico (Bookstein *et al.*, 1985).

O que se entende por morfometria tradicional é o estudo da variação e covariação de medidas de distância, sejam estas entre pares de pontos anatomicamente homólogos, ou entre pontos de tangência ou extremos de estruturas. É o estudo de como e quanto estas medidas variam, e de como e quanto estão relacionadas entre si. Inicialmente, as abordagens ao estudo da variação da forma eram feitas através de comparações de várias medidas, uma a uma. Porém, verificou-se que mesmo várias medidas que descreviam qualquer estrutura não eram suficientes para descrever a forma como um todo, já que os organismos são multidimensionais. Foi desta necessidade que surgiram os métodos de estatística multivariada usados atualmente, que levam em consideração os diferentes níveis de variação e covariação entre as medidas. Um refinamento deste enfoque morfométrico empregando análises multivariadas é a possibilidade de transformação da variação representada por medidas em um conjunto de variáveis não correlacionadas, proporcionando uma análise mais simples e concisa (Pimentel, 1979).

Desta forma, procedimentos de estatística multivariada tornaram-se metodologias tradicionais em estudos de variação entre grupos de organismos. Estes padrões são em geral evidenciados por amostras populacionais de indivíduos adultos, considerando que diferenciações entre formas correlacionadas devem ser expressas preferencialmente entre indivíduos em estágios ontogenéticos similares (Adriaens & Verraes, 2002).

Devido à crescente facilidade computacional, as técnicas multivariadas tradicionais são amplamente usadas em estudos de ecologia, sistemática e evolução, e incluem técnicas tais como: análises de componentes principais, análises de variações canônicas, coeficientes de correlação, análises discriminantes, entre outras (Adams *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a existência de dimorfismo sexual e analisar a variabilidade da morfometria craniana, ou seja, de um conjunto de medidas do crânio de indivíduos da espécie *Ctenomys torquatus*, em função das variações cromossômicas e geográficas das populações desta espécie ao longo de sua atual distribuição no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, incluindo amostras provenientes do Uruguai.

MATERIAIS E MÉTODOS

De uma amostra de 275 crânios de *Ctenomys torquatus* foram excluídos aqueles com danificações ou ausência de algumas estruturas, ou ainda exemplares jovens, e foram utilizados 201 crânios, sendo 146 de fêmeas e 55 de machos adultos, provenientes das seguintes localidades no Rio Grande do Sul (separadas por seus respectivos números cromossômicos): Rio Grande e Estação Ecológica do Taim com $2n=46$; Candiota, Butiá, Cachoeira do Sul, General Câmara, Santa Maria, Rosário do Sul, Alegrete, Uruguiana, Quarai, Santana do Livramento, Torquato Severo, Pelotas - todos com $2n=44$; Alegrete com $2n=42$; e Alegrete e Itaqui com $2n=40$. Além das seguintes localidades no Uruguai: Paysandu, Salto e Cerro Largo. Todos os crânios de *C. torquatus* do Brasil pertencem à coleção do Departamento de Genética - UFRGS, e os espécimens provenientes do Uruguai pertencem ao Museu Nacional de Historia Natural e Antropologia de Montevideo.

Todos os exemplares foram identificados em relação ao seu número diplóide e as localidades onde foram coletados (vide figura 1 do capítulo 3), bem como os números de coleção dos exemplares, estão discriminados no Apêndice I. Foram considerados como grupos cromossômicos, para as análises intraespecíficas, os indivíduos que apresentavam números cromossômicos compostos por $2n=40$, $2n=44$ e $2n=46$, do Brasil, além dos exemplares com $2n=44$, provenientes do Uruguai (44u). Além desta classificação, foram reunidos indivíduos de diferentes regiões geográficas ao longo da distribuição da espécie, desta forma os exemplares com número diplóide igual a 44 foram subdivididos em: localidades do norte da distribuição geográfica - Butiá, Cachoeira do Sul, Candelária, General Câmara e Santa Maria, no Rio Grande do Sul; localidades a oeste do RS - Alegrete, Quarai, Santana do Livramento, Rosário do Sul, Uruguiana e Itaqui (apesar destes indivíduos terem $2n=40$); localidades ao sul do RS - Candiota, Torquato Severo, Pelotas, Rio Grande e

Taim; além dos exemplares de Cerro Largo, no leste do Uruguai, e de Salto e Paysandu, reunidos como oeste do Uruguai.

Posteriormente, foram realizadas análises mais detalhadas entre as populações localizadas próximo às margens norte e sul do rio Jacuí (Butiá, Cachoeira do Sul, General Câmara e Santa Maria); entre as populações com $2n=44$ e $2n=46$ do sul do Estado (Torquato Severo, Candiota, Pelotas, Rio Grande e Taim); e também entre as populações localizadas no Alegrete com diferentes números cromossômicos: $2n=40$, $2n=42$ e $2n=44$.

Neste estudo foram utilizadas 16 medidas lineares do crânio (Figura 1) de acordo com Langutth & Abella (1970a): 1) comprimento do crânio (CC), 2) comprimento do nasal (CN), 3) largura do nasal (LN), 4) largura bimeatal (LB), 5) largura bizigomática (LBZ), 6) largura bimastóide (LBMA), 7) largura do frontal (LF), 8) largura do rosto (LR), 9) largura da caixa craniana (LCC), 10) forame pré-orbital (FPO), 11) comprimento do diástema (D), 12) comprimento da bula (CB), 13) largura da bula (LB), 14) comprimento do IV pré-molar (CIVPM), 15) comprimento da série pré-molar (CSPM) e 16) comprimento do palato (CP). Todas as medidas foram obtidas com um paquímetro digital de 0,1mm de precisão.

Inicialmente foi realizada uma análise univariada para verificar diferenças entre sexos e os grupos cromossômicos para cada medida tomada. Em seguida foi realizada uma análise dos componentes principais utilizando o conjunto das dezesseis medidas lineares dos crânios. A análise de componentes principais é uma ferramenta de estatística multivariada que visa resumir as informações referentes às variações das medidas lineares através de uma matriz de covariância com os valores originais transformados em logaritmo. Esta técnica averigua um conjunto de variáveis correlacionadas e as transforma em um outro conjunto de variáveis não correlacionadas que são os componentes principais.

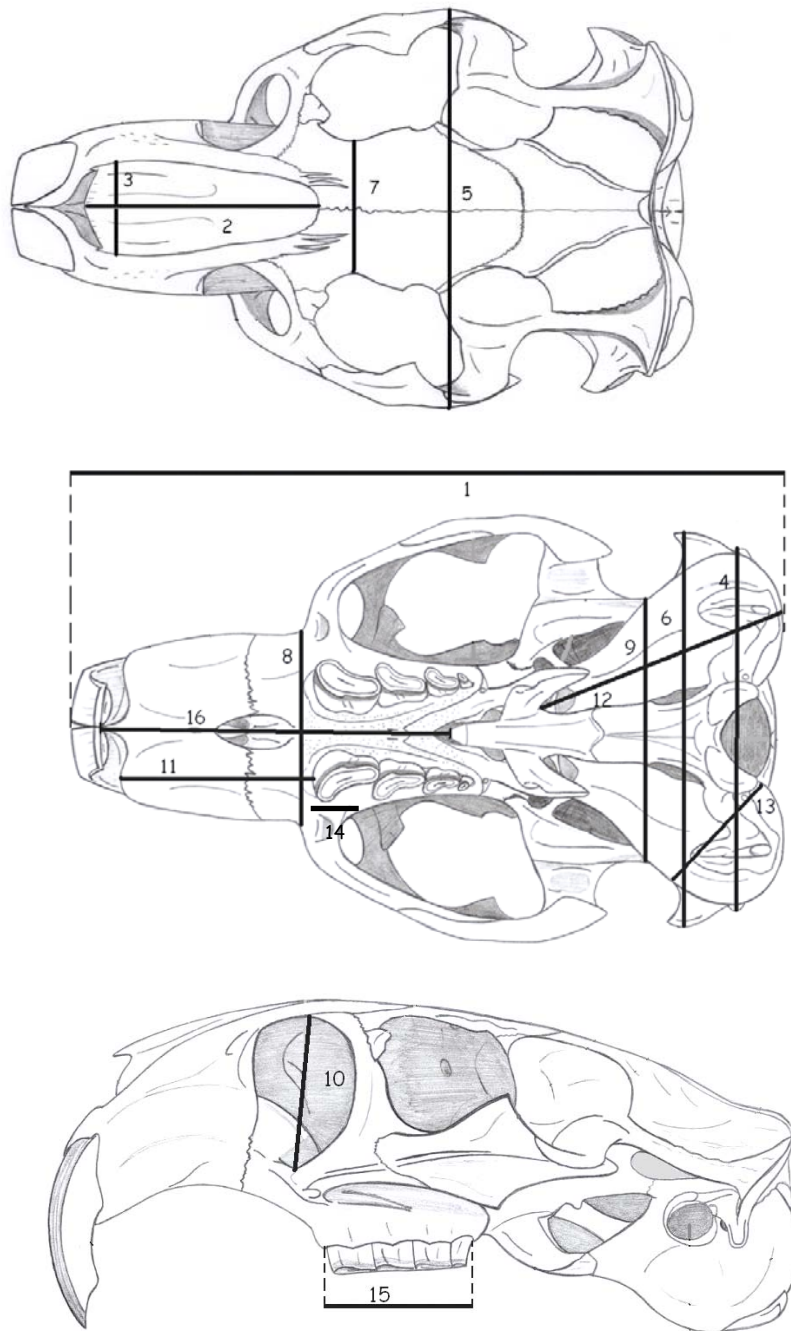


Figura 1: Esquema dos crânios de *Ctenomys torquatus* nas vistas dorsal, ventral e lateral (arte Rodrigo Fornel); com indicação das 16 medidas lineares, descritas no texto, adotadas neste estudo (de acordo com Langguth & Abella, 1970a).

Para a análise dos componentes principais foram tomadas as medidas lineares, e estas foram transformadas em logaritmos na base 10, com a finalidade de se eliminar as diferenças entre as variâncias das medidas originais.

Foi analisada a existência de dimorfismo sexual, variações das populações com relação à variabilidade cromossômica, além da variação geográfica ao longo da distribuição atual das populações de *C. torquatus*. Essas análises foram realizadas empregando-se teste-t e ANOVA, com teste de Tukey-Kramer ad-hoc, assumindo como nível de significância $p < 0,05$.

Utilizou-se também análise discriminante para investigar diferenças entre grupos cromossômicos e populacionais. Esta metodologia tem relevância preditiva e descritiva, sendo utilizada para classificar indivíduos em grupos e identificar quais variáveis são mais informativas. Na análise discriminante a separação inicial dos grupos é realizada "a priori" e a discriminação final é feita através da maximização de uma função obtida pela razão entre a matriz de covariância dentro e entre grupos. As variáveis canônicas, empregadas na técnica de análises discriminantes, são combinações lineares das variáveis eleitas para representar a máxima separação possível entre grupos, ou seja, maximiza a variação entre grupos e minimiza a variação dentro dos grupos. Todos estes dados foram analisados com o pacote estatístico NCSS (Number Cruncher Statistical System).

RESULTADOS

Análises Univariadas

Dimorfismo sexual

As análises através do teste-t entre sexos, para cada uma das 16 medidas cranianas, apresentaram dimorfismo sexual para todas as medidas avaliadas, com os machos sendo sempre maiores do que as fêmeas, com diferença significativa ($p < 0,001$) para 12 medidas, além do comprimento da série pré-molar ($p < 0,05$). A largura bimeatal, a largura da bula, e o comprimento do IV pré-molar não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,5$). A partir destes resultados, todas as análises foram feitas separadamente para machos e fêmeas.

Variabilidade cromossômica

As análises univariadas realizadas exclusivamente com os crânios de fêmeas demonstraram haver diferenças significativas em diversas medidas lineares entre os grupos cromossômicos analisados: 2n=40 (Alegrete), 2n=44 e 2n=46 do Brasil, e 2n=44 do Uruguai (Tabela 1). Os indivíduos com 2n=40 de Itaqui e 2n=42 não foram utilizados nestas análises devido ao seu pequeno número amostral.

Tabela 1: Resumo dos valores de diferença significativa ($p < 0,001$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$) entre os pares de grupos cromossômicos dos crânios das fêmeas de *Ctenomys torquatus*. Os pares com asterisco (*) indicam que não houve diferença significativa entre os grupos analisados, e as siglas se referem às medidas utilizadas de acordo com descrito no texto.

2n	CC	CN	LN	LB	LBZ	LBMA	LF	LR	LCC	FPO	D	CB	LB	CIVPM	CSPM	CP
46X40	0,001	*	0,001	0,001	0,001	0,001	*	0,01	0,001	0,01	*	0,001	0,001	*	0,05	*
46X44	0,001	*	0,01	*	0,01	0,001	0,05	*	0,001	0,01	*	0,001	0,001	*	0,05	*
46X44u	*	*	*	*	*	*	*	*	0,001	*	*	*	*	0,001	*	*
44ux40	0,001	*	0,001	0,05	0,05	0,05	*	0,05	*	0,05	*	0,05	*	0,001	*	*
44ux44	0,001	*	0,001	0,05	0,05	0,05	*	0,05	*	0,05	*	0,05	0,05	0,001	0,05	*
44x40	*	*	0,01	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,05	*	*

Entre os grupos 2n=40 e 2n=44, apenas as medidas de largura do nasal ($p < 0,01$) e comprimento do IV pré-molar ($p < 0,05$) apresentaram diferenças significativas, com 2n=44 maior do que 2n=40.

Com relação aos indivíduos com cariótipo 2n=46, foram observadas diferenças significativas em relação a todos os demais grupos cromossômicos de *C. torquatus*:

- 2n=46 e 2n=40 (Alegrete): 11 das 16 medidas analisadas apresentaram diferenças significativas: comprimento do crânio, largura do nasal, do bimeatal, do mastóide, da caixa craniana, do comprimento e da largura da bula ($p < 0,001$), da largura bizigomática, do rostro e do forâmen pré-orbital ($p < 0,01$), e do comprimento da série pré-molar ($p < 0,05$), sempre com 2n=46 maior do que 2n=40;

- 2n=46 e 2n=44 do Brasil: 10 das 16 medidas analisadas apresentaram diferenças significativas: comprimento do crânio, largura bizigomática, do mastóide, da caixa craniana, do comprimento e da

largura da bula ($p < 0,001$), da largura do nasal e do forâmen pré-orbital ($p < 0,01$), além da largura do frontal e do comprimento da série pré-molar ($p < 0,05$), sempre com $2n=46$ maior do que $2n=44$;

As comparações entre os crânios dos indivíduos do Uruguai ($2n=44$) e do Brasil ($2n=40$, $2n=44$ e $2n=46$) demonstraram diferenças significativas para todos os pares de grupos cromossômicos analisados:

- $2n=44$ do Uruguai e $2n=40$: diferenças significativas com relação ao comprimento do crânio, largura do nasal, comprimento do IV pré-molar ($p < 0,0001$), largura bimeatal, largura bizigomática, largura bimastóide, comprimento da bula, largura do rosto e forame pré-orbital ($p < 0,05$);

- $2n=44$ do Uruguai e $2n=44$ do Brasil: 11 das 16 medidas lineares apresentaram diferenças significativas: comprimento do crânio, largura do nasal, comprimento do IV pré-molar ($p < 0,0001$), largura bimeatal, largura bizigomática, largura bimastóide, comprimento da bula, largura do rosto, forame pré-orbital, largura da bula e comprimento da série pré-molar ($p < 0,05$);

- Os indivíduos do Uruguai com $2n=44$ aqueles com $2n=46$ apresentaram diferenças significativas apenas na largura da caixa craniana e no comprimento do IV pré-molar ($p < 0,0001$).

As análises univariadas realizadas exclusivamente com os machos demonstraram poucas diferenças significativas entre os grupos cromossômicos. Da mesma forma que verificado entre as fêmeas, os crânios dos indivíduos provenientes do Uruguai ($2n=44$) apresentaram as maiores diferenças, principalmente entre estes e aqueles com $2n=40$ para as seguintes medidas: comprimento do crânio, largura do nasal, largura bimeatal, comprimento do IV pré-molar ($p < 0,05$), e comprimento da bula ($p < 0,001$).

As diferenças entre os crânios do Uruguai com $2n=44$ e os indivíduos com $2n=44$ do Brasil ficaram restritas a largura do nasal e o comprimento do IV pré-molar ($p < 0,05$), e com relação aos indivíduos com $2n=46$ restringiu-se à largura da caixa craniana e o comprimento do IV pré-molar ($p < 0,05$).

Análises Multivariadas

Machos & Fêmeas

A análise dos componentes principais apresentou 57,89% da variação no primeiro componente principal, reunindo todas as 16 medidas lineares utilizadas. Com relação ao segundo componente principal, 7,40% da variação foi explicada pelo comprimento do IV pré-molar, da largura da caixa craniana e do comprimento da série pré-molar. O terceiro, o quarto e o quinto componentes principais expressaram, respectivamente, 5,74% (largura bimastróide), 4,69% (largura da bula e do frontal) e 4,11% (comprimento do IV pré-molar), e acumulam 79,84% da variação.

Este resultado demonstra a existência de dimorfismo sexual com relação ao primeiro componente principal, ou seja, em função do tamanho dos crânios, já com relação à forma, representada pelo segundo componente principal, não há diferença significativa entre machos e fêmeas. Isto fica evidenciado na figura 2, os dois gráficos representam machos e fêmeas considerando os dois primeiros componentes principais, assim como através do gráfico de dispersão (Figura 3), que possibilita a visualização de alguma diferenciação no primeiro eixo (1º CP), mas nenhuma separação em relação ao segundo eixo (2º CP).

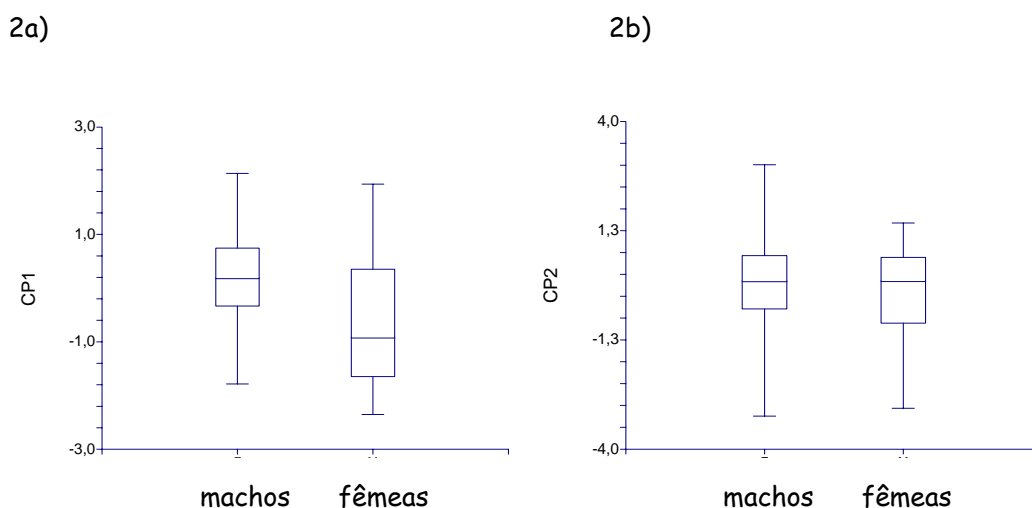


Figura 2: Box-plot demonstrando as variações dos dois primeiros componentes principais para machos e fêmeas de *Ctenomys torquatus*. Houve diferença significativa em relação ao 1º componente principal (2a), com machos maiores que fêmeas, mas não houve em relação ao 2º componente principal (2b).

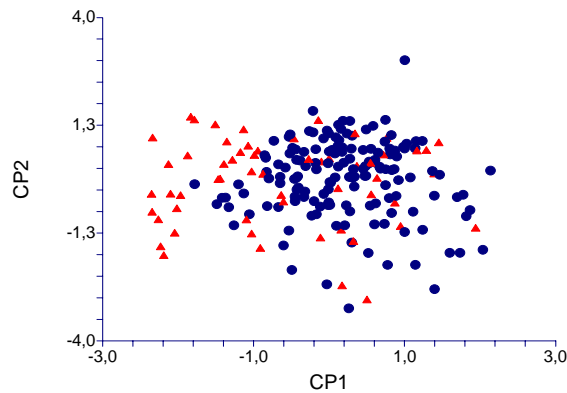


Figura 3: Gráfico de dispersão de pontos dos dois primeiros componentes principais em relação ao sexo em *C. torquatus*. Triângulos representam fêmeas e círculos representam machos.

Estas relações de dimorfismo sexual foram comprovadas através do teste-*t*. Considerando o primeiro Componente Principal (1º CP) do conjunto de toda a amostra (fêmeas + machos) houve diferença significativa entre os sexos ($F=6,36$; $p \ll 0,001$, com machos maiores do que fêmeas). Além do primeiro componente principal, o terceiro e quarto também apresentaram diferenças significativas ($F=1,99$; $p < 0,05$, e $F=2,38$; $p < 0,05$, respectivamente, sempre com machos maiores do que fêmeas), porém, com relação ao segundo e ao quinto componentes principais não houve diferença significativa ($p > 0,1$).

A análise discriminante empregada neste conjunto de dados determina que 57,5% dos crânios estão corretamente classificados com relação ao sexo, o que indica uma fraca diferenciação entre os sexos com relação ao crânio nesta espécie de tuco-tuco.

Considerando os grupos cromossômicos, 87% dos crânios estão corretamente classificados, e a figura 4 representa os dois primeiros escores da análise discriminante considerando os grupos cromossômicos analisados. O primeiro escore demonstra uma sutil diferenciação dos indivíduos com $2n=46$ em relação aos demais grupos cromossômicos, já o segundo escore demonstra clara separação entre os indivíduos com $2n=44$ oriundos do Uruguai e os demais crânios analisados. A análise de variância (ANOVA) demonstrou haver diferença significativa com relação a estes grupos para o primeiro eixo discriminante ($F=5,57$, $p \ll 0,001$), e também para o segundo ($F=16,93$, $p \ll 0,0001$).

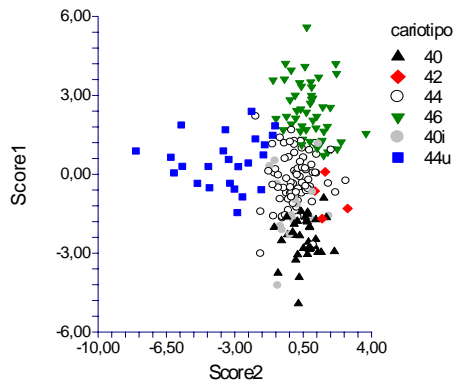


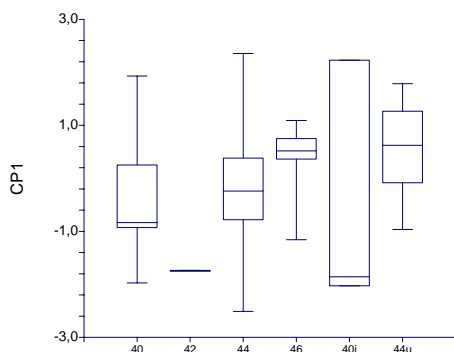
Figura 4: Análise discriminante considerando os dois primeiros escores em relação aos grupos cromossômicos com crânios de machos e fêmeas.

Fêmeas

Considerando apenas as fêmeas, a análise dos componentes principais apresentou 56,23% da variação no primeiro CP, e 7,89% com relação ao segundo CP, sendo esta variação explicada pelo comprimento do IV pré-molar, da série pré-molar e da largura da caixa craniana. O terceiro, o quarto e o quinto componentes principais expressaram, respectivamente, 6,21% (largura e comprimento da bula), 5,33% (largura do frontal e comprimento do IV pré-molar) e 4,93% (largura do rostral), e acumulam 77,62% da variação.

Com relação aos cariótipos, a variação do primeiro e do segundo componentes principais é demonstrada na figura 5. A análise de variância (ANOVA) realizada exclusivamente para o conjunto das fêmeas apresentou diferença tanto para o primeiro CP ($F=5,47$; $p<0,001$), quanto para o segundo CP ($F=11,38$; $p<<0,0001$).

5a)



5b)

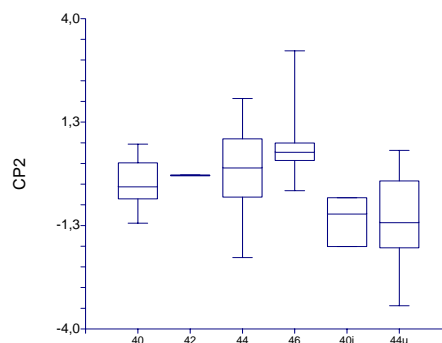


Figura 5: Box-plot com os grupos cromossômicos em relação ao primeiro (CP1) componente principal (5a) e segundo (CP2) componente principal (5b), exclusivamente para fêmeas.

Devido à diferença em relação ao número amostral, foi realizada uma ANOVA excluindo os indivíduos com $2n=40$ de Itaqui e com $2n=42$ do Alegrete. Esta nova análise dos dados apresentou diferença tanto para o primeiro CP ($F=7,1$; $p<0,001$), quanto para o segundo e para o terceiro CP ($F=15,7$ e $F=13,3$; $p<<0,0001$, respectivamente). Verifica-se que no primeiro (Figura 6) e no terceiro CP há diferenciação entre dois grupos: um formado por indivíduos com $2n=40$ junto com $2n = 44$, e outro formado pelos grupos cromossômicos $2n=46$ e $2n=44$ do Uruguai. Esta tendência foi corroborada empregando o teste de Tukey-Kramer. Com relação ao segundo CP, a mesma divisão foi detectada, mas além desta, havia também uma separação entre $2n=46$ e $2n=44u$.

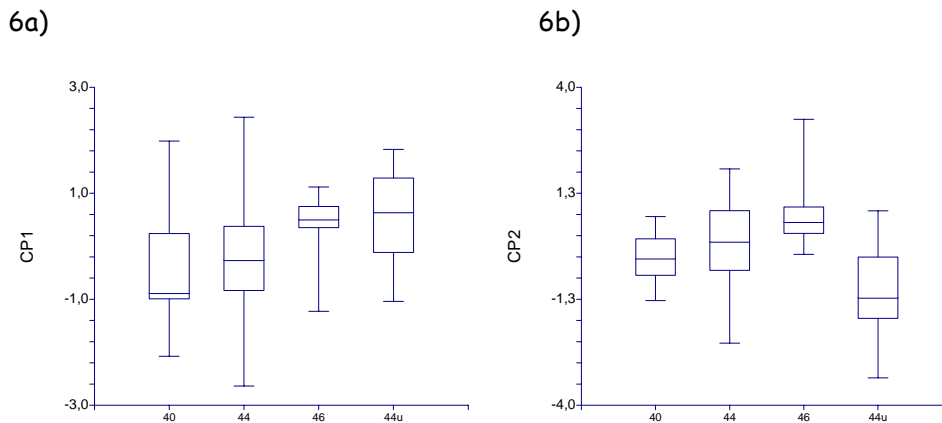


Figura 6: Box-plot com os grupos cromossômicos em relação ao primeiro (CP1) componente principal (6a) e segundo (CP2) componente principal (6b), excluindo os indivíduos com $2n=40$ de Itaqui e com $2n=42$ do Alegrete, exclusivamente para fêmeas.

O gráfico de dispersão da figura 7 representa o resultado da análise discriminante para os três primeiros escores. A análise de discriminante determinou que 61,3% dos crânios estão corretamente classificados com relação aos grupos cromossômicos, enquanto 78,9% estão corretamente classificados de acordo com as regiões geográficas onde cada grupo populacional ocorre. Na figura 7 é possível verificar, particularmente com relação ao primeiro escore, uma tendência de separação dos crânios dos indivíduos com $2n=44$ provenientes do Uruguai (valores positivos) e de indivíduos com $2n=46$ (valores negativos).

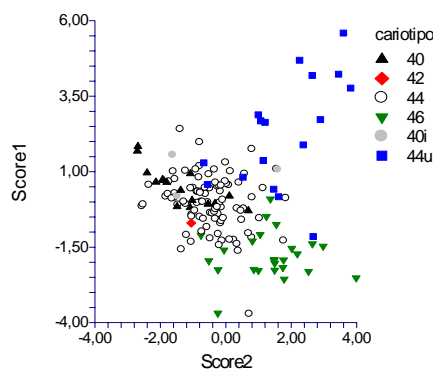


Figura 7: Análise de discriminante considerando os dois primeiros escores com relação aos grupos cromossômicos, exclusivamente para fêmeas.

A análise de variância (ANOVA) demonstrou haver diferença significativa entre os grupos cromossômicos para o primeiro CP ($F=4,88$, $p<<0,001$) e segundo CP ($F=10,88$, $p<<0,0001$), e também em relação às localidades para o primeiro CP ($F=5,57$, $p<<0,001$) segundo CP ($F=16,93$, $p<<0,0001$). A tabela 2 demonstra a classificação em relação aos grupos cromossômicos.

Tabela 2: Classificação correta dos crânios de fêmeas de *C. torquatus* em função dos cariótipos.

<i>2n</i>	40	42	44	46	40Itaqui	44Uruguai	Total
40	40%	-	5,9%	-	13%	-	16
42	-	50%	-	-	-	-	01
44	56%	50%	85,3%	28%	60%	15%	93
46	-	-	4,4%	69%	-	-	25
40Itaqui	-	-	-	-	20%	-	03
44Uruguai	4%	-	4,4%	3%	7%	85%	17
Total	25	02	68	32	15	13	155

A figura 8 representa os gráficos de dispersão considerando a análise discriminante em relação a três grandes grupos em relação a distribuições geográficas de *C. torquatus* no Brasil (norte, oeste e sul) e no Uruguai (leste e oeste). Os indivíduos do sul do Brasil demonstram um certo grau de diferenciação quando analisado o primeiro escore.

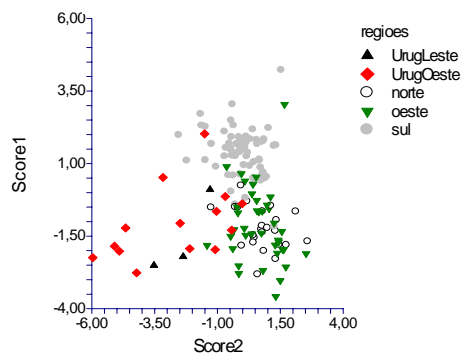


Figura 8: Análises discriminantes considerando os dois primeiros escores com relação aos grupos geográficos, exclusivamente para fêmeas.

Apenas com os crânios de indivíduos com $2n=44$, a análise de componentes principais apresentou 49,24% da variação representada pelo primeiro CP, enquanto o segundo CP teve 8,06% da variação e o terceiro CP teve 6,41%. O quarto CP e o quinto CP apresentaram 5,83% e 5,63%, respectivamente. Estes cinco primeiros CP acumularam 75,18% de toda variação.

A análise discriminante apresentou 89,0% de classificação correta considerando os exemplares de $2n=44$ no Brasil e Uruguai. Já com relação às localidades que possuem indivíduos com este número cromossômico, 80,1% dos crânios foram corretamente classificados.

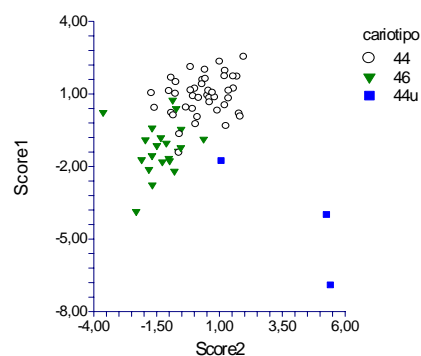
Localidades "ao sul"

Considerando apenas os crânios de indivíduos do sul da distribuição geográfica de *C. torquatus* no Brasil ($2n=44$ e $2n=46$) e no leste do Uruguai, a análise de componente principal apresentou 50,47% da variação representada pelo primeiro CP, enquanto o segundo CP teve 8,40% da variação e o terceiro CP teve 7,30%, sendo o comprimento da bula, o diástema e o comprimento do IV pré-molar responsáveis pela variação do segundo CP e a largura do rostró e o comprimento do IV pré-molar responsáveis pela variação do terceiro CP. O quarto CP e o quinto CP apresentaram 5,00% e 4,46%, e suas variações estão relacionadas com a largura do rostral, e com a largura do frontal e o comprimento do nasal, respectivamente. Estes cinco primeiros CP acumularam 75,84% de toda variação.

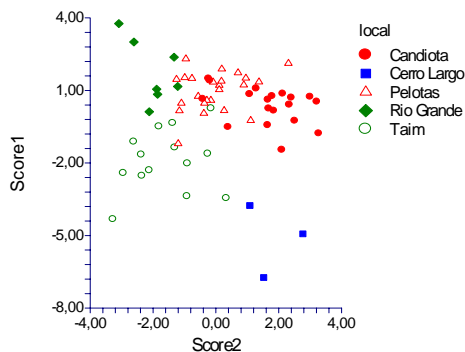
Uma análise de variância (ANOVA) entre os grupos cromossômicos do sul demonstrou haver diferença significativa entre eles para os três primeiros CP ($F=10,66$; $p<0,0001$; $F=13,12$; $p<0,0001$; $F=9,71$; $p<0,001$, respectivamente).

O percentual de classificação correta foi 86,6% com relação aos grupos cromossômicos e de 85,1% em relação às localidades. Os indivíduos com $2n=44$ separam-se dos indivíduos com $2n=46$, e os três exemplares do Uruguai estão separados dos demais. Entre as localidades, os crânios do Uruguai (44u) são sempre diferentes dos demais, e uma separação entre as amostras com $2n=44$ e $2n=46$ do Brasil pode ser verificada com relação ao segundo escore, onde também pode se verificar uma tendência à diferenciação entre os exemplares de Pelotas e Candiota, ambos com $2n = 44$ (Figura 9).

9a)



9b)



9c)

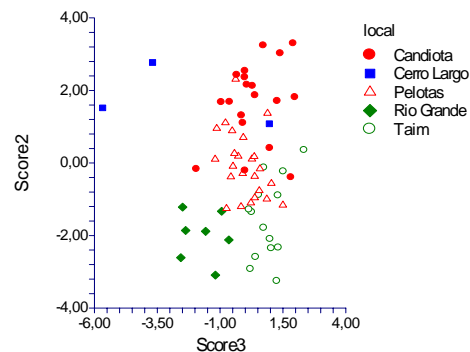


Figura 9: Análise de discriminante considerando os dois primeiros escores em relação aos grupos cromossômicos (9a), em relação aos dois primeiros escores (9b) e ao segundo e terceiro escores (9c), exclusivamente para fêmeas das localidades ao sul da distribuição geográfica de *Ctenomys torquatus*. *44u = 44 Uruguai

Localidades "ao norte"

Considerando apenas os crânios de indivíduos do norte da distribuição geográfica de *C. torquatus* no Brasil (todos com $2n=44$), a análise de componente principal apresentou 62,23% da variação representada pelo primeiro CP, enquanto o segundo CP teve 8,14% da variação e o terceiro CP teve 7,30%, sendo o comprimento da bula e o comprimento do IV pré-molar responsáveis pela variação do segundo CP, e a largura do rostral e o comprimento do IV pré-molar e da série pré-molar como os responsáveis pela variação do terceiro CP. O quarto CP e o quinto CP apresentaram 4,98% e 4,29%, e suas variações estão relacionadas com a largura da caixa craniana, e com a largura do frontal, respectivamente. Estes cinco primeiros CP acumularam 86,95% de toda variação.

Uma análise de variância (ANOVA) entre os grupos de populações do norte demonstrou haver diferença significativa entre eles para os dois primeiros CP ($F=7,32$; $p<0,01$; $F=7,45$; $p<0,001$, respectivamente). Na figura 10 verifica-se uma separação em relação ao primeiro escore entre as localidades Santa Maria/Cachoeira do Sul, relativamente à oeste, e General Câmara/Butiá, sendo estas mais a leste. Já o segundo escore parece separar as localidades ao norte do rio Jacuí (Cachoeira do Sul e General Câmara) das demais localizadas ao sul do Jacuí (Santa Maria e Butiá). O percentual de classificação correta foi de 100,00%.

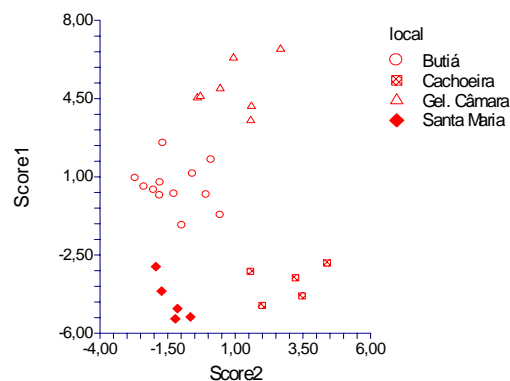


Figura 10: Análise de discriminante considerando os dois primeiros escores com relação às localidades ao norte da distribuição geográfica de *Ctenomys torquatus*, exclusivamente para fêmeas.

Localidades "à oeste"

Considerando apenas os crânios de indivíduos do oeste da distribuição geográfica de *C. torquatus* no Brasil (2n=44, 2n= 42 e 2n=40) e do leste do Uruguai (2n=44), a análise de componente principal apresentou 61,25% da variação representada pelo primeiro CP, enquanto o segundo CP teve 7,61% da variação e o terceiro CP teve 6,05%, sendo o comprimento do IV pré-molar, largura do frontal e do bimaquídeo os responsáveis pela variação do segundo CP e a largura bimaquídeo e do comprimento do IV pré-molar os responsáveis pela variação do terceiro CP. O quarto CP e o quinto CP apresentaram 5,70% e 3,99%, e suas variações estão relacionadas com a largura frontal, e largura da bula, respectivamente. Estes cinco primeiros CP acumularam 84,61% de toda variação.

A figura 11 demonstra um gradiente de diferenciação entre os grupos cromossômicos, particularmente entre os indivíduos com 2n = 44 do Uruguai e os grupos do Brasil. Já a figura 12 representa o gráfico de dispersão dos crânios, com maior diferenciação entre os indivíduos do Uruguai e do Brasil (Figura 12a), e em menor grau, entre as localidades do Brasil (Figura 12b). O percentual de classificação correta foi 77,1% em relação aos grupos cromossômicos e 85,2% em relação às localidades.

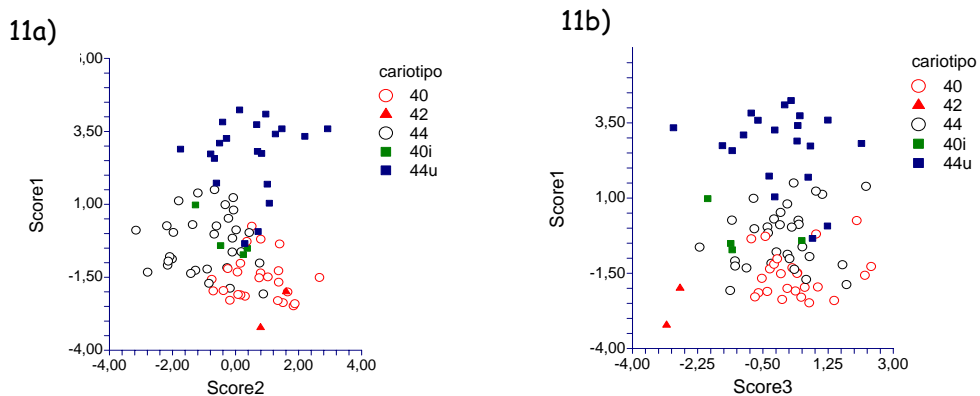


Figura 11: Análise de discriminante considerando os dois primeiros escores (11a) e o primeiro e terceiro escores (11b) em relação aos grupos cromossômicos a oeste da distribuição geográfica de *Ctenomys torquatus*, exclusivamente para fêmeas.

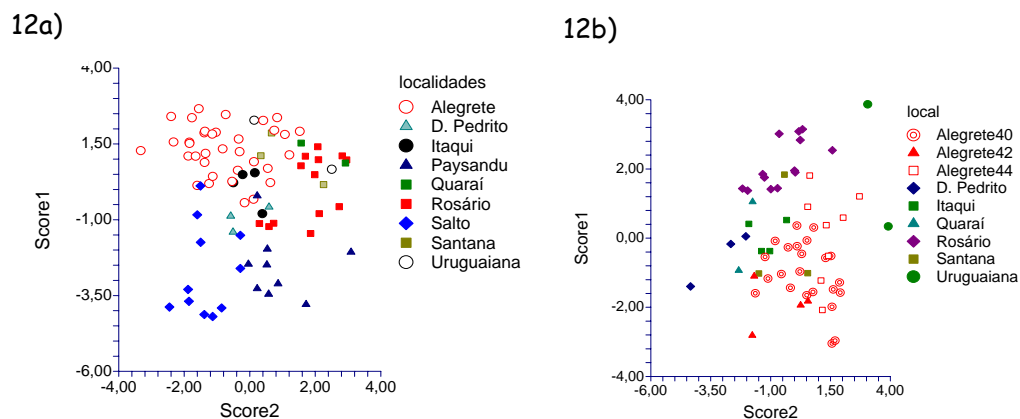


Figura 12: Análise de discriminante considerando dois escores com relação às localidades a oeste da distribuição geográfica de *Ctenomys torquatus*, exclusivamente para fêmeas. Considerando as populações a oeste do Uruguai (12a), e desconsiderando estes indivíduos com separação dos indivíduos de Alegrete em função do número cromossômico (12b).

A análise de variância (ANOVA) entre os grupos cromossômicos do oeste demonstrou haver diferença significativa entre eles com relação ao primeiro CP, ao segundo CP e ao terceiro CP ($F=3,92$; $p<0,01$; $F=13,63$; $p<0,0001$; $F=3,24$; $p<0,01$, respectivamente). No segundo CP é possível detectar, a partir do Teste de Tukey-Kramer, a diferenciação entre os indivíduos com $2n=40$, $2n=44$ do Brasil e $2n=44$ do Uruguai. Já para o terceiro CP, a diferença é restrita aos indivíduos com $2n=44$ do Uruguai em relação àqueles com $2n=40$ e $2n=44$ do Brasil.

A ANOVA em relação às localidades apresentou diferença significativa para o primeiro CP ($F=2,95$; $p<0,01$) e segundo CP ($F=6,20$; $p<0,0001$), e o grupo de indivíduos com $2n=40$ do Alegrete apresentou diferenças em relação aos indivíduos de Salto, Paysandu e Rosário.

Relação com as análises moleculares

Os resultados obtidos a partir das análises moleculares, tais como: o algoritmo de Monmonier e a rede de haplótipos, forneceram evidências de que existem dois grandes clados (grupos) de populações de *C. torquatus* que se encontram em duas regiões geográficas distintas. Um clado (S) agrupando as populações do extremo sul do Brasil e do nordeste do Uruguai, enquanto o outro clado (T) é formado por todas as demais populações desta espécie ao longo de sua área de ocorrência no Brasil e no Uruguai.

Este padrão de diferenciação genética, com dois grandes grupos haplotípicos, pode ser visualizado através de análises cranianas empregando morfometria tradicional (Figura 13). A figura

13 demonstra a separação entre as populações do sul do Rio Grande do Sul (figuras escuras) e as demais populações da espécie em relação ao segundo eixo discriminante, enquanto o primeiro eixo diferencia as populações do Brasil e do Uruguai (círculos com ponto no centro).

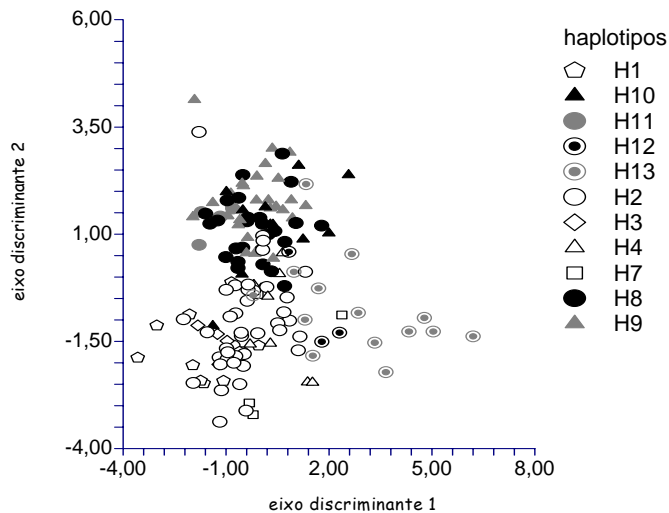


Figura 13: Análise discriminante com crânios de fêmeas de *Ctenomys torquatus*, em relação aos haplótipos, empregando morfometria tradicional. Representação dos haplótipos - "clado" (T): H2 (haplótipo mais amplamente distribuído), H1, H3, H4, H7 (centro e oeste do RS) e H13 (oeste do Uruguai); e "clado" (S): H8, H9, H10, H11 (sul do RS) e H12 (leste do Uruguai).

Machos

Considerando apenas os machos, a análise dos componentes principais apresentou 62,3% da variação no primeiro CP, e 8,5% com relação ao segundo CP, sendo a variação explicada pela largura da caixa craniana, do comprimento do IV pré-molar, da série pré-molar e a largura da bula. O terceiro, o quarto, e o quinto componentes principais expressaram, respectivamente, 6,6% (largura entre os meatos auditivos), 4,5% (largura do diástema e largura da bula) e 4,0% (comprimento do IV pré-molar e largura do frontal), e acumulam 85,9% da variação.

A ANOVA para machos apresentou ausência de diferença significativa para o primeiro CP e o terceiro CP ($p > 0,5$), porém, houve diferença significativa para o segundo CP ($F = 3,21$, $p < 0,05$), com o grupo de indivíduos com $2n = 46$ sendo diferente do grupo com $2n = 44$ e $2n = 44$.

As figuras 14 e 15 demonstram as variações entre os grupos cromossômicos com relação ao primeiro e ao segundo componentes principais. Tal como verificado entre as fêmeas, há uma tendência à separação de dois grupos: um formado por indivíduos com $2n = 40$ junto com $2n = 44$, e

outro formado pelos grupos cromossômicos 2n=46 e 2n=44 do Uruguai. Esta tendência foi corroborada empregando o teste de Tukey-Kramer. Com relação ao segundo CP, a mesma divisão foi detectada, mas além desta, havia também uma separação entre 2n=46 e 2n=44u.

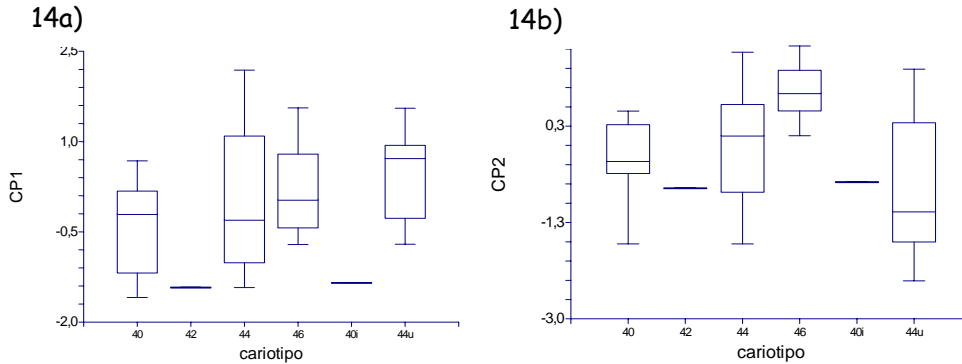


Figura 14: Box-plot com os grupos cromossômicos. Não houve diferença significativa em relação ao primeiro (CP1) componente principal (14a), mas houve no segundo (CP2) componente principal (14b), exclusivamente para machos.

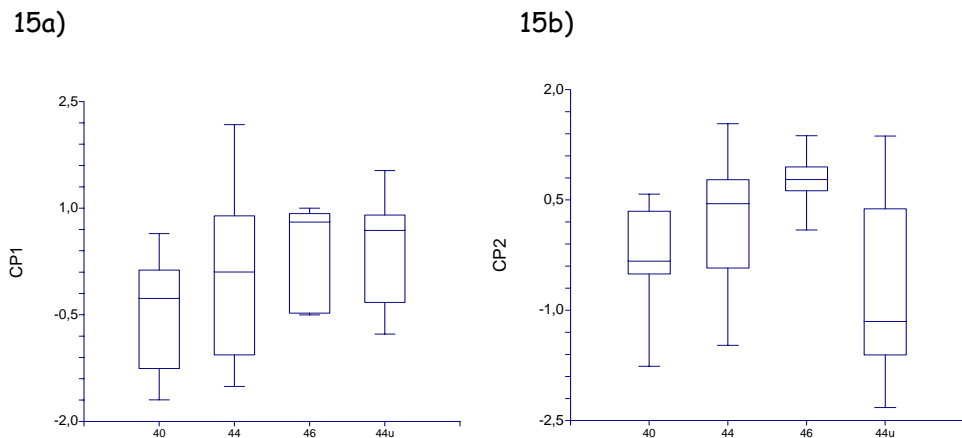


Figura 15: Box-plot com os grupos cromossômicos, excluindo os indivíduos com 2n=40 de Itaquí e com 2n=42 do Alegrete, exclusivamente para machos. Não houve diferença significativa em relação ao primeiro (CP1) componente principal (15a), mas houve no segundo (CP2) componente principal (15b).

Considerando apenas as localidades com mais de um crânio, a ANOVA demonstrou haver ausência de diferença entre os grupos cromossômicos com relação ao primeiro CP, mas houve diferença significativa em relação ao segundo e ao terceiro CP ($F=3,23$; $p<0,05$; $F=7,21$; $p<0,001$, respectivamente).

Considerando apenas as localidades com mais de um crânio, o percentual de classificação correta foi 100% com relação aos grupos cromossômicos, e de 95,6% em relação às localidades. E esta diferenciação é visualizada nos gráficos das figuras 16 e 17.

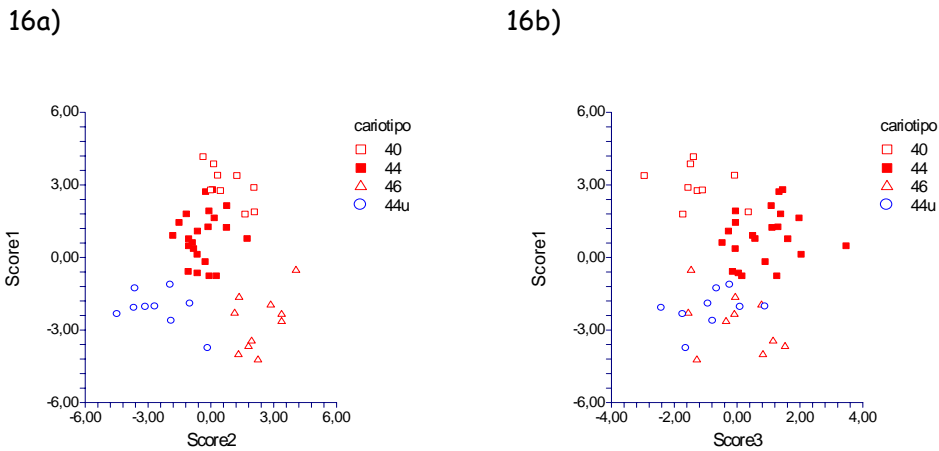


Figura 16: Análise de discriminante considerando os dois primeiros escores (16a) e os escores 1 e 3 (16b) em relação aos grupos cromossômicos, exclusivamente para machos.

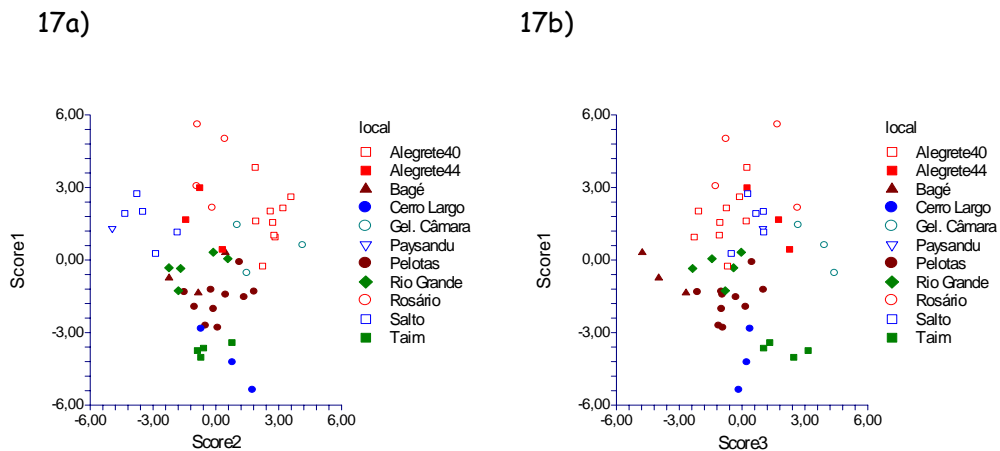


Figura 17: Análise de discriminante considerando os dois primeiros escores (17a) e os escores 1 e 3 (17b) em relação às localidades, exclusivamente para machos.

A análise de discriminante demonstra graficamente que os machos com números cromossômicos diferentes agrupam-se com relação aos três primeiros escores com relação às medidas craniométricas analisadas. A mesma abordagem considerando as localidades com mais de um crânio na amostra demonstram que o primeiro escore agrupa as localidades ao sul e leste da distribuição geográfica de um lado, e as localidades ao norte da distribuição do RS junto aos representantes do oeste do Uruguai.

DISCUSSÃO

O dimorfismo sexual encontrado nesta espécie é comum ao gênero *Ctenomys* (Lacey *et al.*, 2000) e pode estar de alguma forma associado a poliginia peculiar aos tuco-tucos (Fernández-Stolz *et al.*, 2007), visto que, particularmente para os mamíferos, a ausência de dimorfismo sexual em relação ao tamanho pode estar relacionado com o comportamento monogâmico (Eisenberg, 1981). Por outro lado, a existência de machos maiores do que fêmeas pode ter relação com padrão de seleção entre machos para acesso às fêmeas, ou por território.

Diferenças sexuais em relação a morfometria craniana também foram analisadas por Langguth & Abella (1970a) que, apesar de terem atribuído os resultados a *C. torquatus*, sabemos pertencer verdadeiramente à espécie *C. pearsoni* em função das localidades de origem dos espécimens no Uruguai: Limetas e Carrasco.

Neste mesmo estudo, Langguth & Abella (1970a) empregaram não apenas medidas lineares, como também utilizaram índices para possibilitar uma análise das proporções de tamanho. Os resultados mostraram uma frequência muito baixa de diferenças significativas entre os índices, o que levou os autores a concluir que o dimorfismo sexual ocorre somente em relação ao tamanho absoluto, e não em relação às proporções. Da mesma forma, Freitas (1990) analisou três espécies de *Ctenomys* (*C. flamarioni*, *C. minutus*, *C. lami*) que ocorrem na Planície Costeira do Rio Grande do Sul e encontrou maiores diferenças em relação à forma do que ao tamanho dos crânios entre machos e fêmeas. Por outro lado, este estudo apresentou dimorfismo sexual em relação ao tamanho e não à forma dos crânios de *C. torquatus*.

Freitas (1990) não encontrou correlação entre cariótipo e fatores ambientais, mas sugere que a morfometria craniana poderia estar relacionada a fatores ecológicos, pois foram encontradas variações morfológicas associadas à distribuição geográfica e não as formas cromossômicas das espécies de tuco-tuco analisadas.

Análises estatísticas univariadas entre os grupos cromossômicos de *C. torquatus* detectaram diferenças em relação ao tamanho do crânio separando os indivíduos com $2n=46$ dos demais, e forma do crânio separou os indivíduos com $2n=44$ que ocorrem no Uruguai quando comparado com os grupos que ocorrem no Brasil.

Freitas & Lessa (1984), utilizando exclusivamente morfometria craniana univariada para fêmeas de *C. torquatus*, encontraram diferenças significativa apenas em uma das doze medidas lineares

analisadas (tamanho total do crânio) entre populações com $2n=44$ e $2n=46$ no sul do Brasil, e não detectaram diferenças entre os indivíduos do Uruguai e do Brasil. O menor número amostral empregado por Freitas & Lessa (1984) pode explicar estas diferenças entre os resultados destes dois estudos.

Os grupos cromossômicos de *C. torquatus* também apresentaram diferenças significativas nas análises multivariadas. Entre os quatro principais grupos é possível encontrar uma diferenciação entre aqueles indivíduos com $2n=40$ e $2n=44$ em relação aos grupos com $2n=46$ e $2n=44$ do Uruguai. E estes dois últimos grupos também possuem diferenças entre eles.

Analisando mais detalhadamente cada uma das regiões dentro da área de distribuição da espécie podemos encontrar uma clara diferenciação entre grupos cromossômicos no sul do Brasil. Separadas pelo Canal de São Gonçalo estão os indivíduos com $2n=46$ e $2n=44$, e também estão separados os indivíduos com $2n=44$ de Cerro Largo, no Uruguai. Do ponto de vista das populações podem ser visualizadas diferenças entre os indivíduos de Candiota e as demais.

Já entre os indivíduos com $2n=44$ que ocorrem no norte da distribuição geográfica da espécie podemos visualizar algum grau de separação entre populações em relação à proximidade geográfica (Santa Maria e Cachoeira do Sul x General Câmara e Butiá) para o primeiro escore da análise discriminante, e também em relação ao rio Jacuí (sul - Santa Maria e Butiá x General Câmara e Cachoeira do Sul), para o segundo escore da análise discriminante. Por fim, as análises entre os grupos a oeste da distribuição geográfica demonstraram diferenciação entre as populações do Uruguai e aquelas do Brasil (ambas com $2n=44$).

Analisando detalhadamente uma zona híbrida de *C. minutus*, Marinho & Freitas (2000) encontraram diferenças entre os indivíduos com número cariotípico intermediário ($2n=47$) em relação aos dois grupos parentais ($2n=46$ e $2n=48$), e as fêmeas com $2n=48$ eram, em média, maiores do que as fêmeas com $2n=46$.

O padrão encontrado para *C. minutus* foi encontrado também em *C. torquatus*, já que em uma análise inicial os indivíduos que têm origem em Alegrete não demonstram grandes diferenciações, porém, quando analisado mais detalhadamente, no âmbito regional, pôde-se verificar uma tendência evidente à separação entre indivíduos com $2n=40$, $2n=42$ e $2n=44$ naquela localidade.

Searle & Thorpe (1987) realizaram análises multivariadas para verificar possíveis diferenças morfológicas em mandíbulas de raças cromossômicas de roedores da espécie *Sorex araeus*. A análise canônica mostrou ausência de separação entre as raças cromossômicas, mas houve uma evidente

diferenciação geográfica entre os indivíduos analisados. As populações das raças localizadas ao sul separaram-se das do norte, sugerindo que as diferenças da morfologia mandibular estão mais correlacionadas com a distribuição geográfica do que com as raças cromossômicas. Outros estudos também demonstraram maiores associações entre as variações na morfologia craniana e o aspecto geográfico do que com os polimorfismos cromossômicos, tais como Chondropoulos *et al.* (1996) com *Mus musculus domesticus*, e Burns *et al.* (1985) com *Geomys bursarius* e *Geomys lutescens*. Porém, Márquez *et al.* (2000) sugeriram estreita relação entre variações cranianas e diferenças cromossômicas em *Oryzomys albigularis*.

Neste estudo craniométrico de *C. torquatus* foram realizadas comparações entre grupos cromossômicos e populações empregando métodos de estatística univariadas e multivariadas para analisar diferenças no tamanho e na forma dos crânios. Os resultados obtidos sugerem a ocorrência de variações morfológicas associadas ao sexo, demonstrado pelo dimorfismo sexual, associado à variação cromossômica e aos extremos da variação geográfica destas populações.

As análises dos crânios considerando os grupos cromossômicos demonstraram diferenciação das populações com 2n=44 oriundas do Uruguai em relação às demais populações. Muito embora nenhuma barreira geográfica aparentemente separe as populações com 2n=44 no Brasil e no Uruguai, as características populacionais inerentes a estes roedores tais como baixa vagilidade, distribuição espacial em manchas (tuqueiras) e filopatria (Reig *et al.*, 1990) proporcionam o isolamento de populações e conseqüentemente possibilita diferenciações em diferentes níveis, sejam citogenéticos ou mesmo craniométricos.

Da mesma forma, as populações com 2n=46 isoladas das demais populações da espécie pelo Canal de São Gonçalo, no extremo sul do Rio Grande do Sul, apresentaram uma tendência à diferenciação com relação às demais populações.

As análises das variações craniométricas para cada uma das regiões geográficas onde se distribuem as populações de *C. torquatus* possibilitaram uma melhor visualização dos agrupamentos populacionais que se formam nesta espécie. Isto nos possibilita propor que realmente as características biológicas da espécie sejam responsáveis pelas diferenciações cranianas encontradas neste estudo. E que as variações morfométricas estão mais relacionadas ao aspecto geográfico do que às variações cromossômicas.

Os grupos populacionais analisados regionalmente demonstram que as populações do sul e do norte da distribuição geográfica de *C. torquatus* no Rio Grande do Sul corroboram a proposta de

diferenciação populacional devido às peculiaridades ecológicas e de estrutura populacional da espécie. Apenas as populações à oeste não estão tão diferenciadas entre si, mas talvez este fato esteja relacionado ao menor número amostral de algumas localidades desta região analisadas ou mesmo devido ao processo de diferenciação menos intenso entre estas populações.

Freitas (2005) analisou crânios de 15 espécies de tuco-tuco e concluiu que o gênero *Ctenomys* apresenta uma grande uniformidade na forma do crânio e poucas são as características que podem revelar algum grau de variabilidade entre as espécies deste gênero, dentre estas, principalmente o tamanho do crânio pode ser considerado como sendo informativo sob o ponto de vista da estrutura craniana.

Este fato sugere que a evolução cromossômica entre os tuco-tucos teria sido muito rápida, com pouco tempo para diferenciações na forma ou no tamanho do crânio. Outras características morfológicas também apresentaram pouca variação entre os membros deste gênero, tais como: morfologia do dente molar (Freitas, 2005), estrutura peniana (Balbontin *et al.*, 1996), ADN mitocondrial (Lessa & Cook, 1998; Cook & Lessa, 1998; Mascheretti *et al.*, 2000), e estrutura do espermatozóide (Feito & Gallardo, 1982; Vitulo *et al.*, 1988; Freitas, 1995b).

Paradoxalmente, as análises intraespecíficas realizadas até então possibilitaram detectar diferenciações na morfologia craniana destas espécies, não apenas do ponto de vista cromossômico como também geográfico, tal como apresentado por Freitas (2005) para *C. minutus*, e também entre os grupos cromossômicos e populações de *C. torquatus* neste estudo.

Estes resultados revelam a importância da morfometria tradicional, sendo este, portanto, um conjunto de técnicas que não deve ser substituído, mas incluído, em estudos que tenham por objetivo avaliar níveis de diferenciação populacional e de evolução craniana (dos Reis, 1990).

Apêndice I - Lista de espécimes examinados: Número no mapa da figura 1 no capítulo 3, 2n (número diplóide), localidade e número de coleção.

Nº mapa	2n	Localidade	Nº de coleção
12	40	Alegrete	f. TR917, 939, 959, 963, JR322, 323, 324, 325, 333, 334, 399, 400, 413, 416/m. TR960, 964, JR320, 321, 323, 397, 398, 401, 412
12	44	Alegrete	f. TR941, 942, 945 / m. TR940, 943, 944
12	42	Alegrete	f. TR965, 966 / m. TR964, 1038
4	44	Candiota	f. TR 177, 178, 179, 180, J180, 181, 183, 207, 208, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 218, 219, 222 / m. J209, 213, 217
6	44	Butiá	f. TR289, 594, J131, 170, 199, 201, 204, 205, JR591, 592, 593, 594, 595
*	44	Candelária	m. MNHNA1885
9	44	Cachoeira Sul	f. TR921, 922, 923, 924
5	44	Dom Pedrito	f. TR903, 904 / m. TR906
8	44	Gel. Câmara	f. TR902, J238, 239 / m. TR900, 901, J237
13	40	Itaqui	f. TR592, 593, 597 / m. TR956
3	44	Pelotas	f. TR366, 368, 371, 374, 580, 585, 586, 598, 599, 600, 610, 618, 619, 209, J228, 229, 230, 231, M1038, 1039, 1048, 1051 / m. TR367, 370, 372, 373, 590, 596, 620, J140, 141, 226
15	44	Quarai	f. TR912 / m. TR911
11	44	Rosário do Sul	f. TR931, 932, 935, 936, 938 / m. TR933, 934, 937
10	44	Sta Maria	f. TR926, 927, 928, 929, 930
16	44	S. Livramento	f. TR908, 909 / m. TR910
14	44	Uruguiana	f. TR954 / m. TR955
2	46	Rio Grande	f. TR603, 605, 609, 582, 589, 591, 593, 946, 948, 949, 212 / m. TR404, 595, 947, 950, 951
1	46	Taim	f. TR 57, 71, 72, 73, 87, 577, 578, 579, 583, 584, 587, 592, 602, 604, 608, 614 / m. TR70, 86, 575, 617
17	44	Cerro Largo	f. MNHNIA 1809, 2474 / m. MNHINA 1810, 2026, 2623
19	44	Paysandu	f. MNHINA 2256, 2266, 2291, 2309, 2310, 2318, 2327/m. MNHINA 2317
20	44	Salto	f. MNHINA 1872, 1873, 1874, 2251, 2255, 2262 / m. MNHINA 1870, 2247, 2254

*f.: fêmeas; m.: machos

*coleções de mamíferos das seguintes instituições:

- Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, Brasil: TR, J, JR.
- Museu Nacional de História Natural e Antropologia, Montevideo, Uruguai - MUNHINA.

8. VARIABILIDADE CRANIANA DE *Ctenomys torquatus* (RODENTIA: CTENOMYIDAE)
SOB O PONTO DE VISTA DA MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

INTRODUÇÃO

Os roedores subterrâneos do gênero *Ctenomys* são reconhecidamente um exemplo de um espetacular processo de especiação em função dos seus rearranjos cromossômicos. A adaptação ao hábitat fossorial, com poucas variações fisiológicas, físicas e ecológicas, está associada ao expressivo processo de radiação destes roedores com a conseqüente ocupação de diversos ambientes ao longo da porção sul da região Neotropical, ocorrendo desde o sul do Peru até o extremo sul do continente Americano, e desde o nível do mar até a região dos Andes (Reig *et al.*, 1990).

Contrastando com as grandes variações cariotípicas, ambientais e de tamanho corpóreo (podendo variar desde 100g em *C. chasiquiensis* até mais de 1000g em *C. conoveri*), os tuco-tucos apresentam a forma do crânio relativamente conservada (Vassallo, 1998). Até então, a mais relevante diferenciação entre espécies deste gênero refere-se ao ângulo de procumbência dos dentes incisivos, possivelmente uma característica relacionada ao modo de escavação com auxílio dos dentes ("chisel tooth") muitas vezes utilizados por estes roedores (Mora *et al.*, 2003).

Comparando-se com o grau de conhecimento adquirido em relação aos aspectos citogenéticos, ecológicos, fisiológicos e de biologia evolutiva de roedores subterrâneos (Lacey *et al.*, 2000), a evolução da morfologia craniana dos tuco-tucos em relação à forma e tamanho tem sido subestimada e pouco estudada. Apesar de alguns estudos empregando morfometria tradicional (Freitas & Lessa, 1984; Gardner, 1991; Marinho & Freitas, 2000; Freitas, 2005; Massarini & Freitas, 2005), apenas recentemente foram realizados alguns trabalhos investigando variações intra e interespecíficas utilizando morfometria geométrica (Fornel, 2005; D'Anatro & Lessa, 2006; Fernandes *et al.*, *no prelo*).

A descrição dos padrões de variação dos caracteres morfológicos e morfométricos entre populações é fundamental para se definir possíveis unidades evolutivas independentes. Para tal identificação é necessário investigar tais unidades evolutivas em grupos de populações que compartilhem traços morfológicos em um determinado espaço geográfico (dos Reis *et al.*, 2002) ou em função de alguma característica biológica que lhes caracterize. Informações que possibilitem o

reconhecimento de unidades evolutivas têm sido classicamente obtidas a partir de análises da variação na forma do crânio, visto ser esta uma estrutura que está relacionada com todo aparato mastigatório, assim como com o cérebro e órgãos dos sentidos (Voss *et al.*, 1990; Hanken & Thorogood, 1993). Uma questão abordada em estudos de variação geográfica baseados em morfologia craniana é a de como observar padrões de variação na forma do crânio considerando a organização e estrutura desta variação dentro e entre populações. Tradicionalmente, estas análises foram realizadas utilizando ferramentas de estatística multivariada em medidas de distâncias dos tamanhos. Porém, recentemente, uma abordagem estatística bastante robusta e útil para descrever a organização morfológica e as mudanças em estruturas morfológicas complexas, tal como um crânio, vem sendo empregada a partir do desenvolvimento de ferramentas estatísticas de morfometria geométrica (Rohlf & Marcus, 1993; Bookstein, 1996; Rohlf, 1996; Rohlf, 2000; Monteiro *et al.*, 2000; Cordeiro-Estrela *et al.*, 2006).

A morfometria geométrica se propõe a estudar as variações nas formas, e suas covariâncias com outras variáveis de interesse, para responder determinadas questões (Bookstein, 1991; Dryden & Mardia, 1998). Esta abordagem visa obter e utilizar informações das covariações espaciais entre marcos anatômicos (Rohlf & Marcus, 1993). Esta técnica não apresenta restrições em relação a variações na direção ou na localização das mudanças de forma, além de ser bastante efetiva em obter informações significativas com reação à forma dos organismos. Esta metodologia possibilita a descrição da forma de uma determinada estrutura utilizando um conjunto de variáveis que podem ser utilizados para testar hipóteses estatisticamente, e ainda gerar representações gráficas das diferenças na forma, conhecidas como deformações (Adams, 1999). Desta forma, a morfometria geométrica é considerada mais robusta do que a morfometria tradicional em estudos relacionados com a forma e o tamanho, além de possibilitar a visualização das diferenças com relação à forma.

Neste estudo, a morfometria geométrica e as técnicas para reconhecimento de padrões são utilizadas a partir de informações obtidas das vistas dorsal, ventral e lateral do crânio de *Ctenomys torquatus* com vistas a analisar possíveis variações intraespecíficas na forma e no tamanho nesta espécie. Estas variações foram analisadas em relação ao dimorfismo sexual, a variabilidade cromossômica, particularmente entre populações com $2n=44$ e $2n=46$, populações com $2n=44$ e $2n=40$, e entre populações com $2n=46$ e $2n=44$ que ocorrem no Brasil e aquelas com $2n=44$ que ocorrem no Uruguai, e ainda em relação às variações geográficas interpopulacionais, considerando aspectos ecológicos, principalmente, e possíveis barreiras geográficas entre as populações. Além disso,

procurou-se determinar se o uso integrado das três vistas do crânio é mais informativo do que a utilização de cada uma delas independentemente, e neste caso, qual das três vistas seria mais informativa.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise da variação craniana de *C. torquatus* empregando métodos de morfometria geométrica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da amostra

Foram examinados 204 espécimens adultos de *Ctenomys torquatus* que se encontram depositados na coleção de mamíferos do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, e os espécimes provenientes do Uruguai pertencem ao Museu Nacional de Historia Natural e Antropologia, de Montevideo. Os números de coleção dos indivíduos estão listados no apêndice 1. Todos os roedores foram identificados em relação ao seu número diplóide e representam as áreas de coleta discriminadas na Figura 1.

Os grupos cromossômicos utilizados nas análises intraespecíficas foram definidos pela diferença em relação aos seus números diplóides: $2n=40$, $2n=44$ e $2n=46$. A distinção entre populações com $2n=44$ com ocorrência no Rio Grande do Sul e aqueles do Uruguai ($2n=44u$) foi realizada em função de análises prévias que demonstraram variações consideráveis entre estes dois grupos.

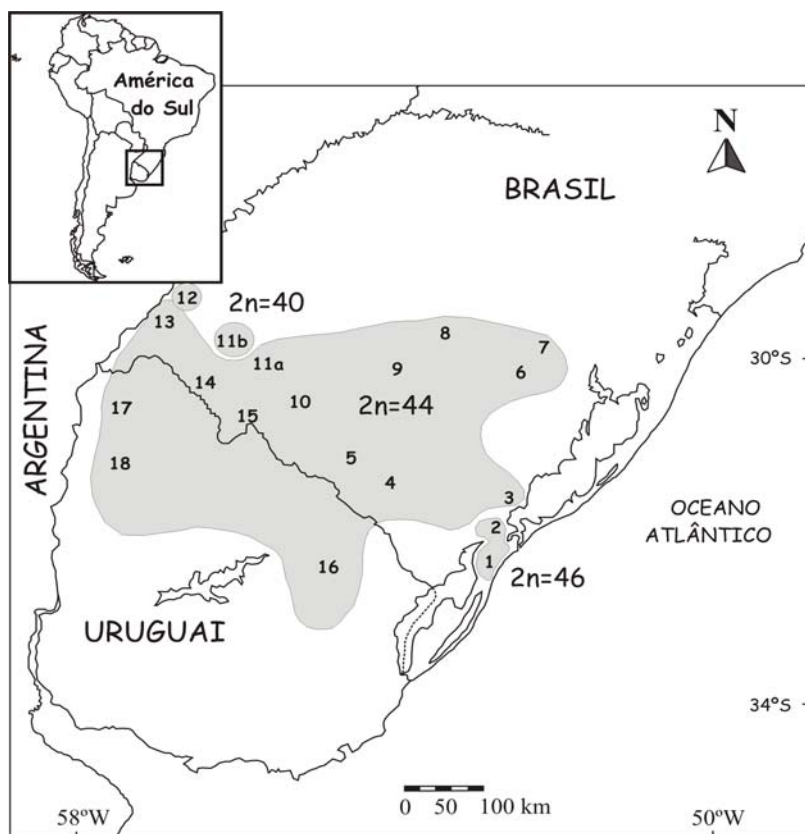


Figura 1. Mapa com as localidades de coleta de crânios de *Ctenomys torquatus* utilizados neste estudo. A numeração representa as localidades de coleta: 1-Taim (2n=46), 2-Rio Grande (2n=46), 3-Pelotas, 4-Candiota, 5-Dom Pedrito, 6-Butiá, 7-General Câmara, 8-Cachoeira do Sul, 9-Santa Maria, 10-Rosário do Sul, 11a-Alegrete, 11b-Alegrete (2n=40), 12-Itaqui (2n=40), 13-Uruguaiana, 14-Quaraí, 15-Santana do Livramento, 16-Cerro Largo, 17-Salto, 18-Paysandu. Todas as localidades apresentam indivíduos com 2n=44, exceto aquelas que tem o número diplóide entre parênteses.

Morfometria geométrica

Cada crânio foi fotografado nas vistas dorsal, ventral e lateral com uma câmera digital com 3.1 megapixels de resolução (2048 x 1536), gentilmente cedida por Rodrigo Fornel. Foram definidos 29 marcos anatômicos para a vista dorsal, 30 para a vista ventral, e 21 para a vista lateral. A Figura 2 demonstra a localização de cada um dos marcos anatômicos utilizados neste estudo, e o apêndice 2 descreve a localização destes marcos. As coordenadas para cada marco anatômico foram obtidas com o programa tpsDig 1.40 (Rohlf, 2004). Posteriormente, estas coordenadas foram sobrepostas utilizando a análise generalizada de Procrustes - GPA (Dryden & Mardia, 1998). O tamanho de cada

crânio foi estimado pelo tamanho do centróide, sendo este, a raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada marco anatômico e o centróide da forma (Bookstein, 1991).

Análises estatísticas

As análises relativas ao tamanho dos crânios foram realizadas entre os sexos e os grupos cromossômicos com análise de variância (ANOVA) com duas entradas (sexo e grupo cromossômico) e as diferenças entre os grupos foram visualizadas através de *box plots* e do Teste de Tukey. Análises de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando-se a matriz de variância-covariância da sobreposição dos resíduos dos quadrados mínimos generalizados (GLS). Os componentes principais da matriz de covariância dos resíduos foram utilizados como as novas variáveis de forma para reduzir a dimensionalidade dos dados e possibilitar a análise de variáveis independentes.

As matrizes dos escores de PCA para cada uma das vistas analisadas (dorsal, ventral e lateral) foram reunidas em uma única matriz. A análise de componentes principais foi utilizada como técnica exploratória para melhor interpretar os dados a serem analisados (Baylac *et al.*, 2003; Cordeiro-Estrela *et al.* 2006). A fim de escolher o número de componentes principais a ser utilizado na análise discriminante, foram gerados os percentuais de classificação correta para cada combinação de componentes principais (Baylac & Friess, 2005). Foram selecionados, portanto, o grupo de componentes principais com o mais alto percentual de classificação em um menor número de componentes. Empregou-se um procedimento de validação cruzada que possibilita uma estimativa não tendenciosa do percentual de classificação como proposto por Baylac & Friess (2005). A validação cruzada é no procedimento de classificação da análise de discriminante. O processo consiste na retirada de um espécime e todos os dados são utilizados para calcular a função discriminante, com exceção de um. Posteriormente, o espécime é re-inserido na análise e outro é retirado. Este procedimento é repetido diversas vezes e são computados os valores de erro médio na classificação dos indivíduos, e também a probabilidade de cada membro pertencer ao seu grupo previamente identificado (Cordeiro-Estrela *et al.*, 2006).

Diferenças na forma entre sexo e entre grupos cromossômicos, além da interação entre eles, foram testadas através de análises múltiplas de variância (MANOVA). Da mesma forma foram analisadas diferenças entre grupos de populações em função de suas localizações geográficas, considerando como um grupo as populações do centro do Rio Grande do Sul, outro grupo formado

pelas populações do oeste do Estado, e um terceiro com aquelas do extremo sul do Brasil, além de um quarto grupo com os indivíduos oriundos do Uruguai.

Foram testadas ainda as comparações entre médias dos grupos cromossômicos e dos grupos populacionais, par a par, utilizando MANOVA com correção de Bonferroni.

A visualização das diferenças entre as formas dos crânios foi analisada em relação ao sexo, e também em relação aos grupos cromossômicos, através de regressões multivariadas dos eixos discriminantes da variável da forma, para cada uma das três vistas.

As distâncias de Mahalanobis foram calculadas e através de árvores de neighbor-joining foram visualizadas as relações morfológicas entre os grupos cromossômicos e as localidades (populações). Entre os grupos cromossômicos foram calculadas também as distâncias de Procrustes.

Foi realizado o teste de Mantel para analisar a significância da correlação entre as distâncias morfológicas (Mahalanobis) e geográficas entre os pares de populações de fêmeas de *C. torquatus*.

A partir da detecção do dimorfismo sexual, todas as análises foram realizadas exclusivamente com os crânios das fêmeas.

Informações das diferentes vistas do crânio

A aquisição de marcos anatômicos para análises de morfometria geométrica craniana é geralmente realizada pelo cálculo das coordenadas cartesianas a partir de fotografias dos crânios dos espécimens analisados. A redução destas estruturas tridimensionais para planos bidimensionais faz com que sejam necessárias análises de diferentes vistas separadamente. Diversos estudos têm demonstrado que as informações obtidas a partir das diferentes vistas dos crânios dos roedores são, de modo geral, bem semelhantes, mas não na mesma magnitude (Corti & Rohlf, 2001; dos Reis *et al.*, 2002; Nicola *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, *no prelo*). A vista lateral parece ser mais informativa do que a vista dorsal e a ventral para discriminar diferenças em crânios de roedores (dos Reis, 1990; dos Reis *et al.*, 2002; Fornel, 2005; D'Anatro & Lessa, 2006). Porém, a obtenção de informações a partir da análise das três vistas de forma integrada permanece pouco investigada, e a morfometria geométrica é uma ferramenta que propicia este tipo de abordagem integrativa. Com o objetivo de comparar as diferentes informações oriundas destes três tipos de vista, foram comparados os percentuais de classificação correta para sexo e grupo cromossômico para cada uma das três vistas separadas e integradas, e também foram analisados os percentuais dos dois primeiros eixos discriminantes.

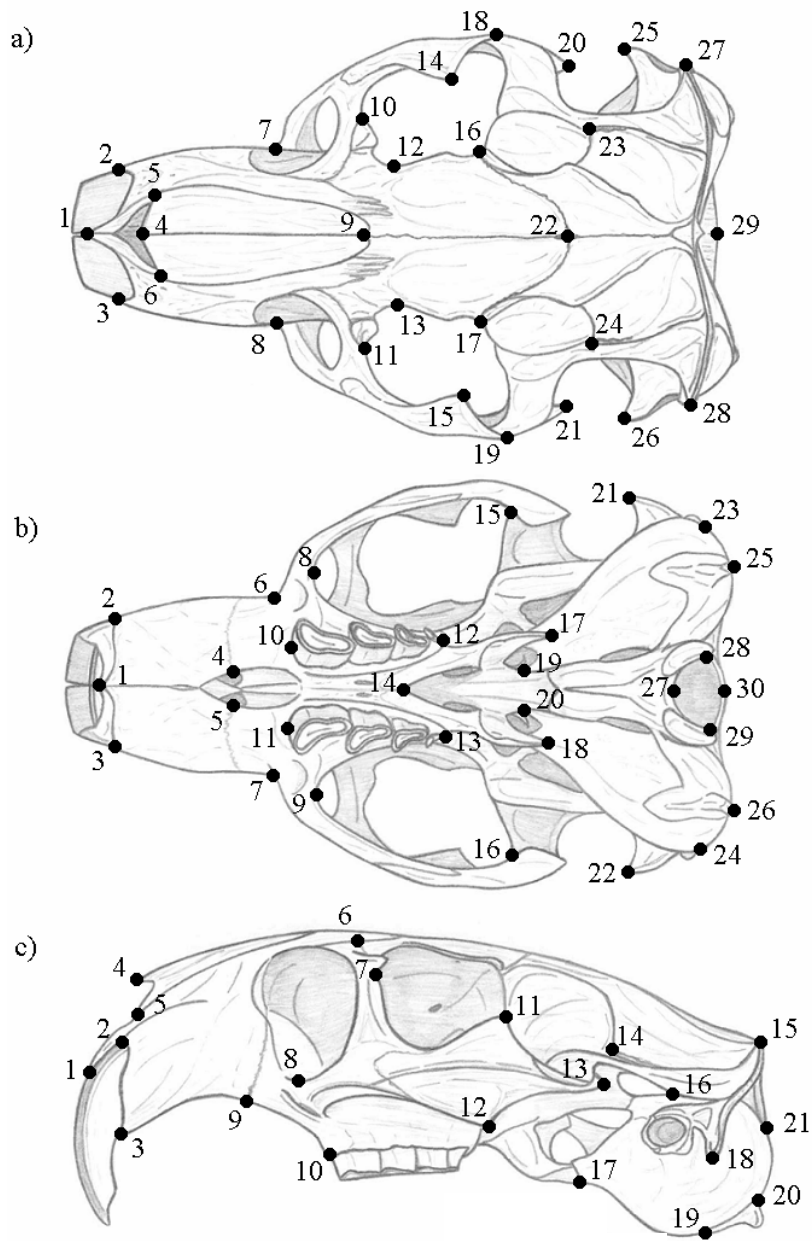


Figura 2. Configuração de marcos anatômicos no crânio de *Ctenomys torquatus* para as vistas dorsal, ventral e lateral (arte Rodrigo Fornel).

Para todas as análises estatísticas e gráficos gerados foi utilizada a linguagem "R" no ambiente Linux (R Development Core Team, <http://www.R-project.org>) e as seguintes bibliotecas: MASS (Venables & Ripley, 2002), APE versão 1.8-2 (Paradis et al., 2006), ade4 versão 1.4-5 (Chessel et al., 2007). Os procedimentos de morfometria geométrica foram realizados com a utilização do pacote Rmorph (Baylac, 2006): uma biblioteca para análises de morfometria geométrica e multivariada gentilmente cedida pelos Drs. Pedro Cordeiro-Estrela e Michel Baylac.

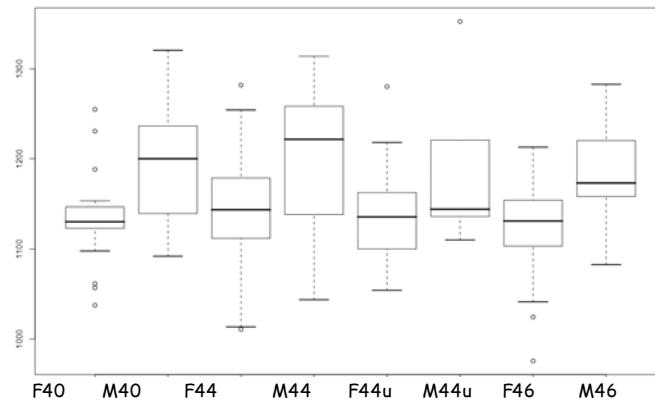
RESULTADOS

Diferenças no tamanho do centróide

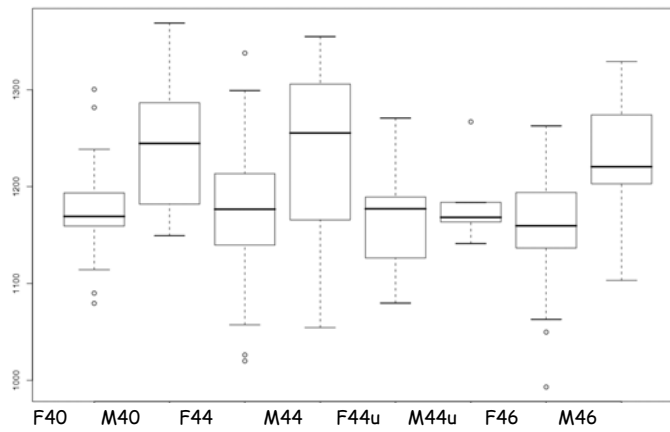
Através do teste de ANOVA foi verificada diferença significativa em relação ao tamanho do centróide entre os sexos, mas não entre os grupos cromossômicos. O dimorfismo sexual apresentou diferença significativa para as três vistas do crânio analisadas: dorsal ($F=29,3$; $p<<0,001$), ventral ($F=26,0$; $p<<0,001$) e lateral ($F=25,9$; $p<<0,001$), com os machos, em média, maiores do que as fêmeas. Porém, com relação aos grupos cromossômicos, nenhuma das vistas apresentou diferença significativa ($p>0,1$), considerando machos e fêmeas juntos. A Figura 3 apresenta a distribuição dos tamanhos do centróide para as vistas dorsal (a), ventral (b) e lateral (c), respectivamente, entre os sexos e os grupos cromossômicos.

Em função do dimorfismo sexual verificado, foram realizadas novas análises para testar diferenças entre os tamanhos dos crânios em relação aos grupos cromossômicos considerando apenas as fêmeas. Nesta análise, as vistas dorsal e ventral não apresentaram diferenças significativas ($p>0,1$), porém, para a vista lateral registrou-se diferença significativa ($p=0,03$). Em virtude desta diferença significativa foi realizado o teste de Tukey para a vista lateral. Este teste registrou diferença significativa somente entre os indivíduos com $2n=46$ e os indivíduos com $2n=40$ e $2n=44$ no Brasil.

a)



b)



c)

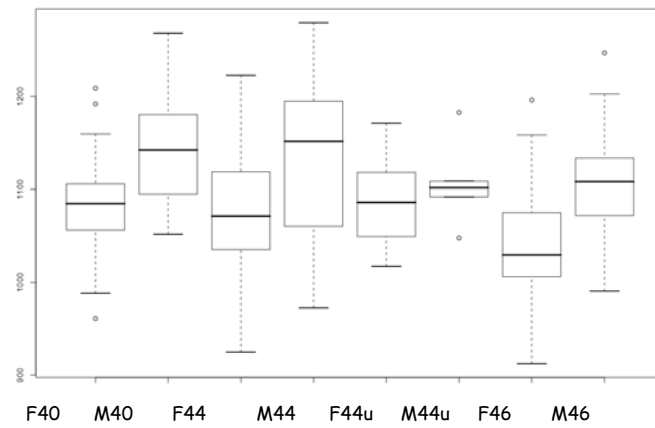


Figura 3. "Box plot" apresentando a distribuição do tamanho do centróide para a vista dorsal (a), ventral (b), e lateral (c) do crânio de *C. torquatus*, considerando os grupos cromossômicos (2n=40, 44, 46 e 44 do Uruguaí) por sexo (macho=M e fêmea=F).

Em relação aos grupos populacionais (sendo cada população representada por indivíduos de uma das localidades de coleta) também foi verificada diferença significativa através de ANOVA para as três vistas do crânio das fêmeas ($p < 0,01$), porém o teste de Tukey não determinou um padrão relativo a uma população em específico, ou seja, nenhuma população apresentou-se sistematicamente diferente das demais para as três vistas com relação ao tamanho do crânio.

Diferenças na forma dos crânios de machos e fêmeas

O teste de MANOVA indicou que a forma do crânio difere significativamente entre os sexos para as vistas dorsal (Wilks' $\lambda = 0,26$; $F = 5,6$; $p < 0,001$), ventral (Wilks' $\lambda = 0,24$; $F = 9,3$; $p < 0,001$) e lateral (Wilks' $\lambda = 0,10$; $F = 15,0$; $p < 0,001$).

Percentual de classificação & Análises discriminantes

A percentagem de classificação correta foi maior para fêmeas do que para machos. Enquanto os percentuais de classificação correta variaram entre 94,0% (vista lateral) e 96,7% (ventral) para as fêmeas, entre os machos estes valores foram sempre menores do que 55,6%. Estes resultados conduziram a utilização exclusivamente das fêmeas para as demais análises realizadas.

As três vistas analisadas de forma integrada não demonstraram melhores resultados do que as vistas analisadas separadamente para as fêmeas (94,0%), porém, para machos, houve um incremento no percentual de classificação (64,8%) em relação as análises de cada vista separadamente (Tabela 1).

Tabela 1. Percentagem de classificação para os crânios de machos e fêmeas de *Ctenomys torquatus* nas três vistas separadamente e integradas.

	Fêmeas	Machos
Dorsal	95,3	37,0
Ventral	96,7	44,4
Lateral	94,0	55,6
3 vistas	94,0	64,8

Os percentuais de classificação correta para as três vistas em relação aos grupos cromossômicos apresentaram-se sempre maiores do que 60%. A vista dorsal apresentou, em média, os melhores percentuais para todos os grupos cromossômicos, enquanto os menores percentuais foram registrados para a vista lateral. Os indivíduos com $2n=44$ apresentaram, em média, os melhores percentuais de classificação entre os grupos cromossômicos para as três vistas. As análises

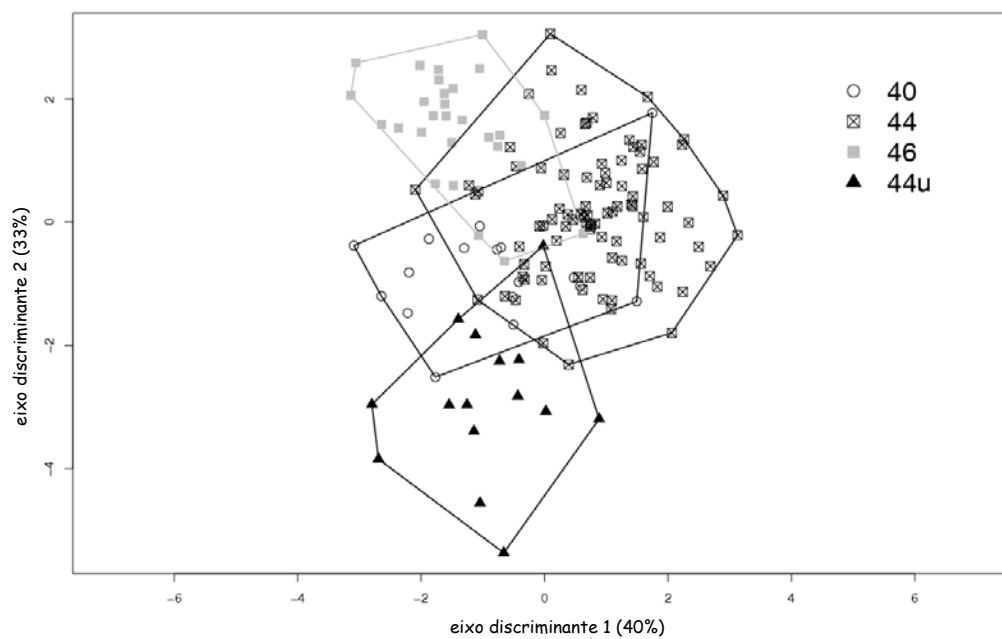
integradas das três vistas não apresentaram valores melhores do que as análises das vistas separadas (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de correta classificação dos crânios das fêmeas em relação aos grupos cromossômicos de *C. torquatus* no Brasil (2n = 40, 44, 46), e no Uruguai (2n = 44u).

	2n = 40	2n = 44	2n = 44u	2n = 46
Dorsal	70,6	90,0	93,3	78,6
Ventral	58,8	93,3	86,6	71,4
Lateral	70,6	92,2	53,3	60,7
3 vistas	64,7	87,7	93,3	67,9

A figura 4 demonstra certa sobreposição em relação aos grupos cromossômicos (2n=40, 2n=46, 2n=44 do Brasil e 2n=44u do Uruguai) nos gráficos das análises discriminantes para as três vistas separadas e integradas dos crânios de *C. torquatus*. No primeiro eixo discriminante vê-se pouca variação entre os grupos cromossômicos. Porém, em relação ao segundo eixo discriminante, os indivíduos com 2n=46 e 2n=44 do Uruguai encontram-se separados nas quatro análises, embora ambos tenham alguma sobreposição em relação aos grupos com 2n=44 e 2n=40. Estes, por sua vez, estão sobrepostos em todos os gráficos em relação ao segundo eixo discriminante (Figura 4).

a) vista dorsal



b) vista ventral

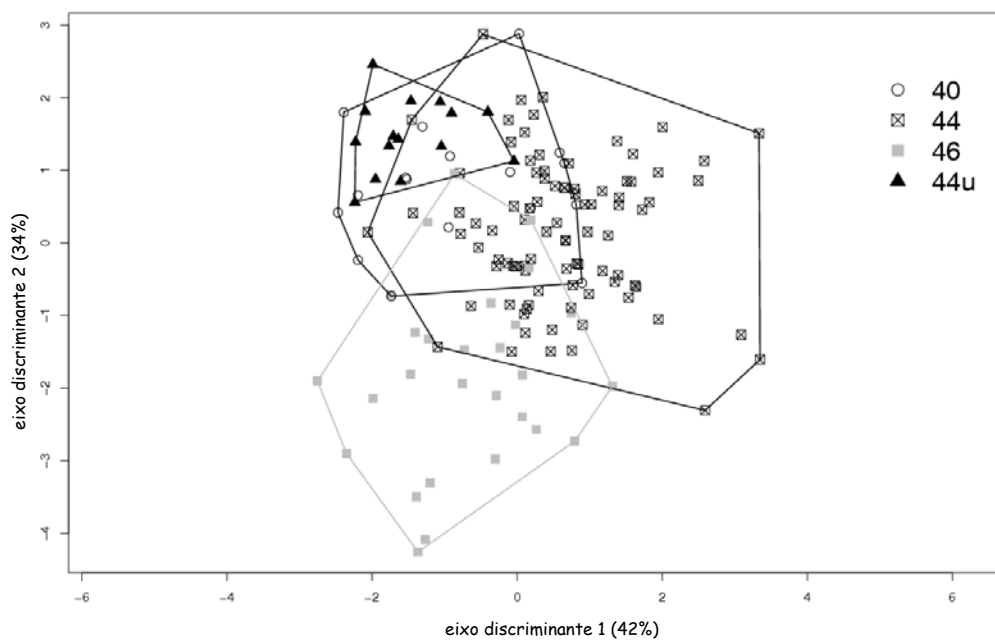
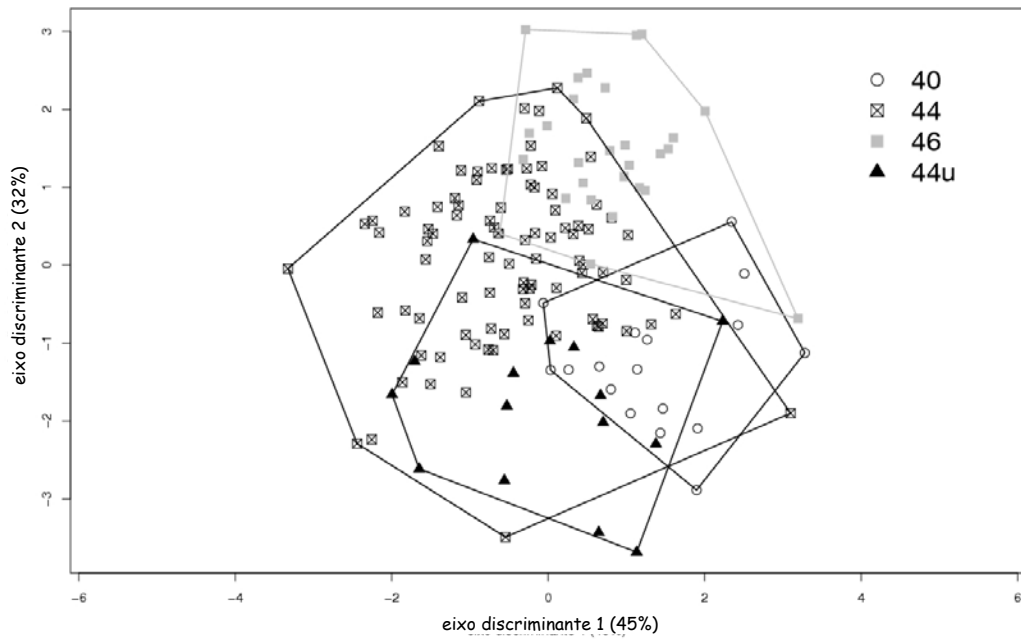
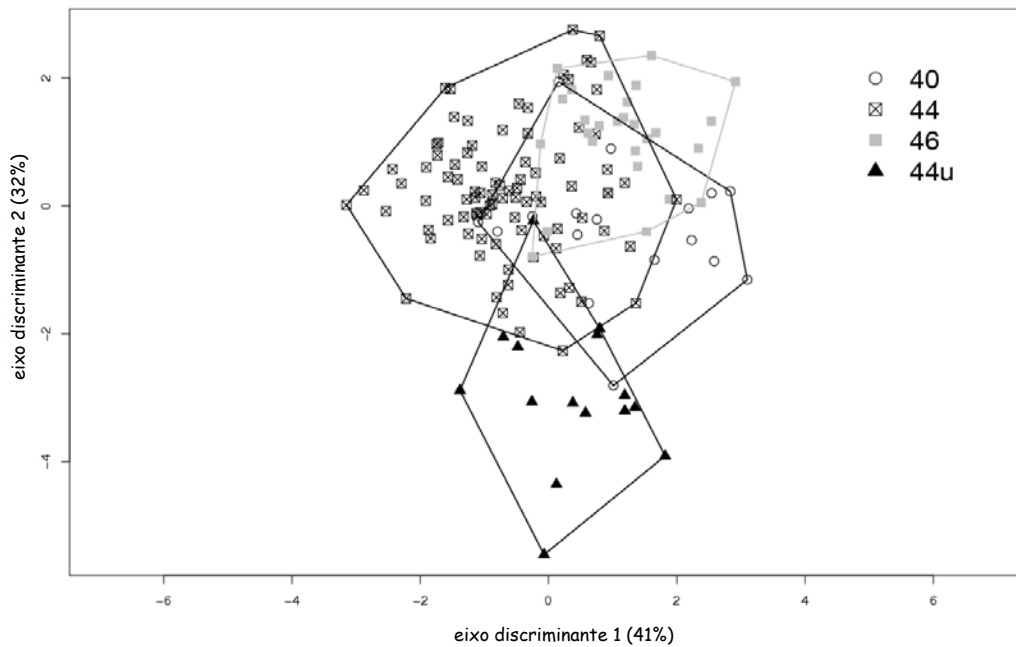


Figura 4a e 4b. Análises discriminantes entre grupos cromossômicos de fêmeas de *Ctenomys torquatus* para a vista dorsal (a) e ventral (b).

c) vista lateral



d) 3 vistas integradas



Figuras 4c e 4d. Análises discriminantes entre grupos cromossômicos de fêmeas de *Ctenomys torquatus* para a vista lateral (c) e para as três vistas integradas (d).

Considerando todas as populações analisadas e estabelecendo um agrupamento geográfico, ou seja, reunindo as populações que ocorrem no sul (Taim, Rio Grande, Pelotas, Candiota, Dom Pedrito), no oeste (Itaqui, Uruguai, Quaraí, Santana do Livramento, Alegrete e Rosário do Sul) e no centro (Santa Maria, Cachoeira do Sul, Butiá e General Câmara) do Rio Grande do Sul, e ainda as que ocorrem no Uruguai (Cerro Largo, Salto e Paysandu), foi possível encontrar um padrão de distribuição geográfico considerando os dois primeiros eixos discriminantes para as vistas dorsal e lateral (Figura 5).

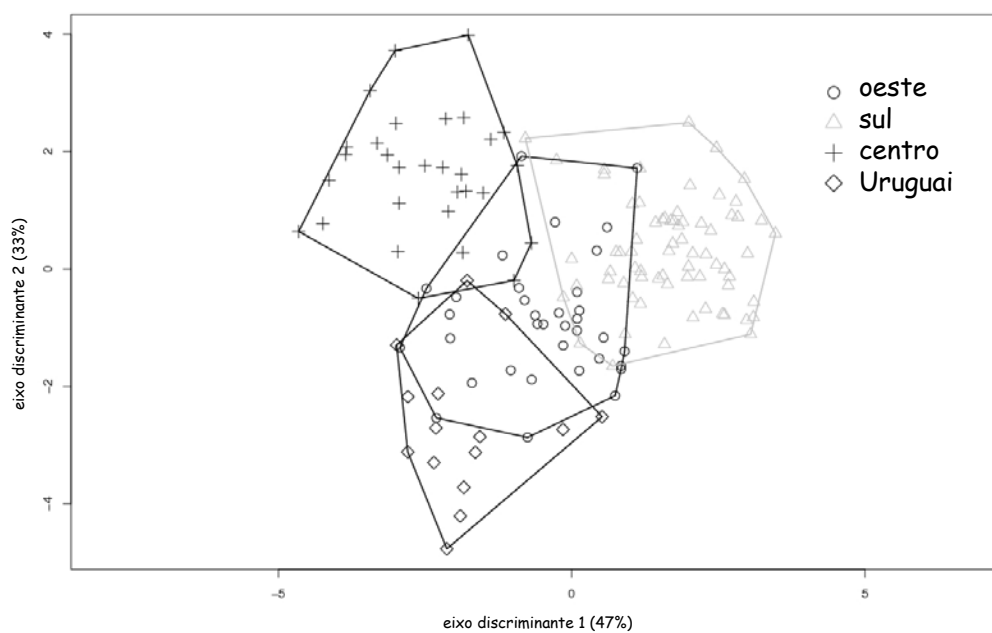
Os gráficos destas análises por agrupamentos geográficos demonstram que as populações que ocorrem abaixo do Escudo Sul-Riograndense (localidades ao sul do Rio Grande do Sul) encontram-se separadas daquelas que ocorrem no centro e no oeste, principalmente em relação ao primeiro eixo discriminante, apesar de haver alguma sobreposição. Da mesma forma, é possível verificar a separação das populações do Uruguai em relação às demais, apesar da sobreposição com alguns indivíduos do oeste do Rio Grande do Sul na vista dorsal (Figura 5).

A vista dorsal é a que demonstra de forma mais clara um padrão de separação geográfica considerando os dois primeiros eixos discriminantes. A figura 5 apresenta as populações dos três grupos: Uruguai, centro e sul da distribuição da espécie no Rio Grande do Sul, bem separadas entre si, formando três grupos sem qualquer sobreposição, enquanto os indivíduos do oeste não demonstram uma diferenciação evidente em relação a nenhum dos outros grupos (Figura 5).

A vista lateral também apresenta semelhante padrão de separação em relação aos dois primeiros eixos discriminantes, porém, demonstra sobreposição entre as populações do centro e oeste do Rio Grande do Sul (Figura 5).

Estes padrões que foram verificados para as vistas dorsal e lateral das fêmeas de *C. torquatus* não foram detectados para a vista ventral, na qual todas as populações encontram-se sobrepostas quando analisados os dois primeiros eixos discriminantes (dados não apresentados).

a) vista dorsal



b) vista lateral

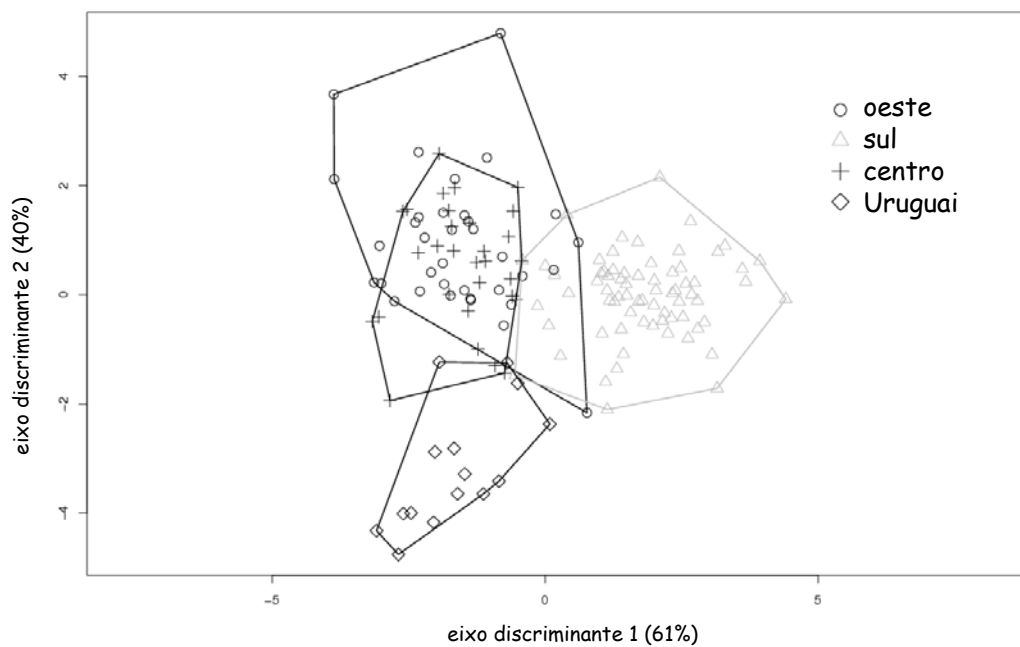


Figura 5: Análises discriminantes entre grupos populacionais de fêmeas de *Ctenomys torquatus* reunidos geograficamente para a vista dorsal (a) e lateral (b).

Diferenças na forma dos crânios entre os grupos cromossômicos

O teste de MANOVA indicou que a forma do crânio difere significativamente entre os grupos cromossômicos para as vistas dorsal (Wilks' $\lambda=0,67$; $F=4,7$; $p \ll 0,001$), ventral (Wilks' $\lambda=0,77$; $F=4,5$; $p \ll 0,001$) e lateral (Wilks' $\lambda=0,70$; $F=5,5$; $p \ll 0,001$). A interação entre sexo e grupo cromossômico não foi significativa ($p > 0,1$) para todas as vistas analisadas.

As análises de MANOVA apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$ - considerando os valores de significância ajustados pela correção de Bonferroni) para as comparações entre todos os pares de grupos cromossômicos (Tabela 3) e entre as populações agrupadas em regiões geográficas: oeste, sul e centro do Rio Grande do Sul, e Uruguai (Tabela 4) em relação às três vistas do crânio de fêmeas de *C. torquatus*.

Tabela 3. Valores de Wilks' Lambda (λ), análise de variância múltipla (F) e p (com ajuste de Bonferroni) entre os pares de grupos cromossômicos em relação a MANOVA para as vistas dorsal, ventral e lateral. Valores de significância, após ajuste de Bonferroni: * = $p < 0,001$.

		2n = 40	2n = 44	2n = 44u
2n = 44	Dorsal	$\lambda=0.6084$ F=7.8837 *	-	-
	Ventral	$\lambda=0.6914$ F=3.4961 *	-	-
	Lateral	$\lambda=0.5976$ F=11.2249 *	-	-
2n = 44u	Dorsal	$\lambda=0.2465$ F=7.4720 *	$\lambda=0.3967$ F=6.0096 *	-
	Ventral	$\lambda=0.1564$ F=9.8036 *	$\lambda=0.4277$ F=6.8491 *	-
	Lateral	$\lambda=0.1206$ F=3.4737 *	$\lambda=0.4951$ F=4.8731 *	-
2n = 46	Dorsal	$\lambda=0.2122$ F=7.9553 *	$\lambda=0.4235$ F=5.8774 *	$\lambda=0.1718$ F=17.6701 *
	Ventral	$\lambda=0.2616$ F=4.4826 *	$\lambda=0.5233$ F=10.9327 *	$\lambda=0.1765$ F=9.3342 *
	Lateral	$\lambda=0.1742$ F=7.5271 *	$\lambda=0.5038$ F=7.8791 *	$\lambda=0.1195$ F=18.4145 *

Tabela 4. Valores de Wilks' Lambda (Λ), análise de variância múltipla (F) e p (com ajuste de Bonferroni) entre os pares de grupos agrupados por regiões geográficas em relação a MANOVA para as vistas dorsal, ventral e lateral. Valores de significância (* $p < 0,001$) após ajuste de Bonferroni.

		centro	sul	oeste
sul	Dorsal	$\lambda=0.2145$ F=20.5028 *	-	-
	Ventral	$\lambda=0.2392$ F=8.4831 *	-	-
	Lateral	$\lambda=0.2490$ F=8.0431 *	-	-
oeste	Dorsal	$\lambda=0.2141$ F=7.5173 *	$\lambda=0.3332$ F=7.4594 *	-
	Ventral	$\lambda=0.3020$ F=3.8526 *	$\lambda=0.4339$ F=4.3484 *	-
	Lateral	$\lambda=0.3289$ F=2.9819 *	$\lambda=0.2530$ F=8.0121 *	-
Uruguai	Dorsal	$\lambda=0.2442$ F=13.9269 *	$\lambda=0.2237$ F=13.6808 *	$\lambda=0.3627$ F=1.8300 *
	Ventral	$\lambda=0.2359$ F=12.5955 *	$\lambda=0.2603$ F=9.0938 *	$\lambda=0.2212$ F=8.7997 *
	Lateral	$\lambda=0.2712$ F=4.7026 *	$\lambda=0.1931$ F=7.1438 *	$\lambda=0.1678$ F=3.1391 *

Diferenças na forma do crânio entre os sexos

A regressão multivariada entre os eixos discriminantes das variáveis de forma possibilitou a caracterização das principais diferenças na forma do crânio entre os sexos. Os machos apresentaram o rostro, o nasal e o frontal proporcionalmente bem maiores e mais largos do que as fêmeas, bem como os arcos zigomáticos relativamente maiores, enquanto as fêmeas apresentaram a região do neurocrânio relativamente maior (Figura 6).

Diferenças na forma do crânio entre os grupos cromossômicos

As principais diferenças em relação às formas do crânio entre os grupos cromossômicos estão representadas nas figuras 7, 8, 9 e 10. Apesar desta metodologia demonstrar apenas os extremos da variação, é possível ter uma idéia do nível de diferenciação, e onde ela ocorre, na forma dos crânios entre os grupos cromossômicos analisados.

As distinções entre indivíduos com $2n=46$ e $2n=44$ do Brasil estão relacionadas ao maior tamanho relativo da largura total do crânio e da bula timpânica do grupo com $2n=44$, e do menor pterigóide e ângulo de procumbência do grupo com $2n=46$ em relação ao grupo com $2n=44$ (Fig. 7).

Em relação aos indivíduos com $2n=40$, o grupo com $2n=46$ se diferencia principalmente pelo menor tamanho relativo do neurocrânio, pelo nasal e rostro relativamente maiores, e pelo pterigóide e ângulo de procumbência menores (Figura 8).

Os indivíduos com $2n=44$ do Uruguai apresentaram crânios com formas bastante distintas dos indivíduos dos grupos cromossômicos com $2n=46$ (Figura 9) e com $2n=44$ do Brasil (Figura 10).

Os indivíduos com $2n=46$ se caracterizam por apresentar rosto e nasal relativamente maiores, além do pterigóide mais estreito, do frontal e neurocrânio menores, e também menor ângulo de procumbência em relação ao grupo com $2n=44$ com ocorrência no Uruguai (Figura 9).

Entre as populações que ocorrem no Brasil com $2n=44$ e aquelas que ocorrem no Uruguai com $2n=44$, os indivíduos no Brasil possuem o crânio relativamente mais alto, com arcos zigomáticos, nasal e rosto maiores do que os Uruguaios. Por outro lado, os crânios da amostra do Uruguai apresentam frontal, pterigóide e neurocrânio maiores, com crânio relativamente mais comprido (Figura 10).

As diferenças entre os grupos com $2n=40$ e $2n=44$ do Brasil, e entre $2n=40$ e $2n=44$ do Uruguai, estão relacionadas ao nasal, rosto, arcos zigomáticos, frontal e pterigóide menores, além do menor ângulo de procumbência, dos indivíduos com $2n=40$ em relação aos indivíduos com $2n=44$. As visualizações não são apresentadas pois estas diferenças foram muito pequenas entre estes dois pares de grupos cromossômicos.

machos x fêmeas

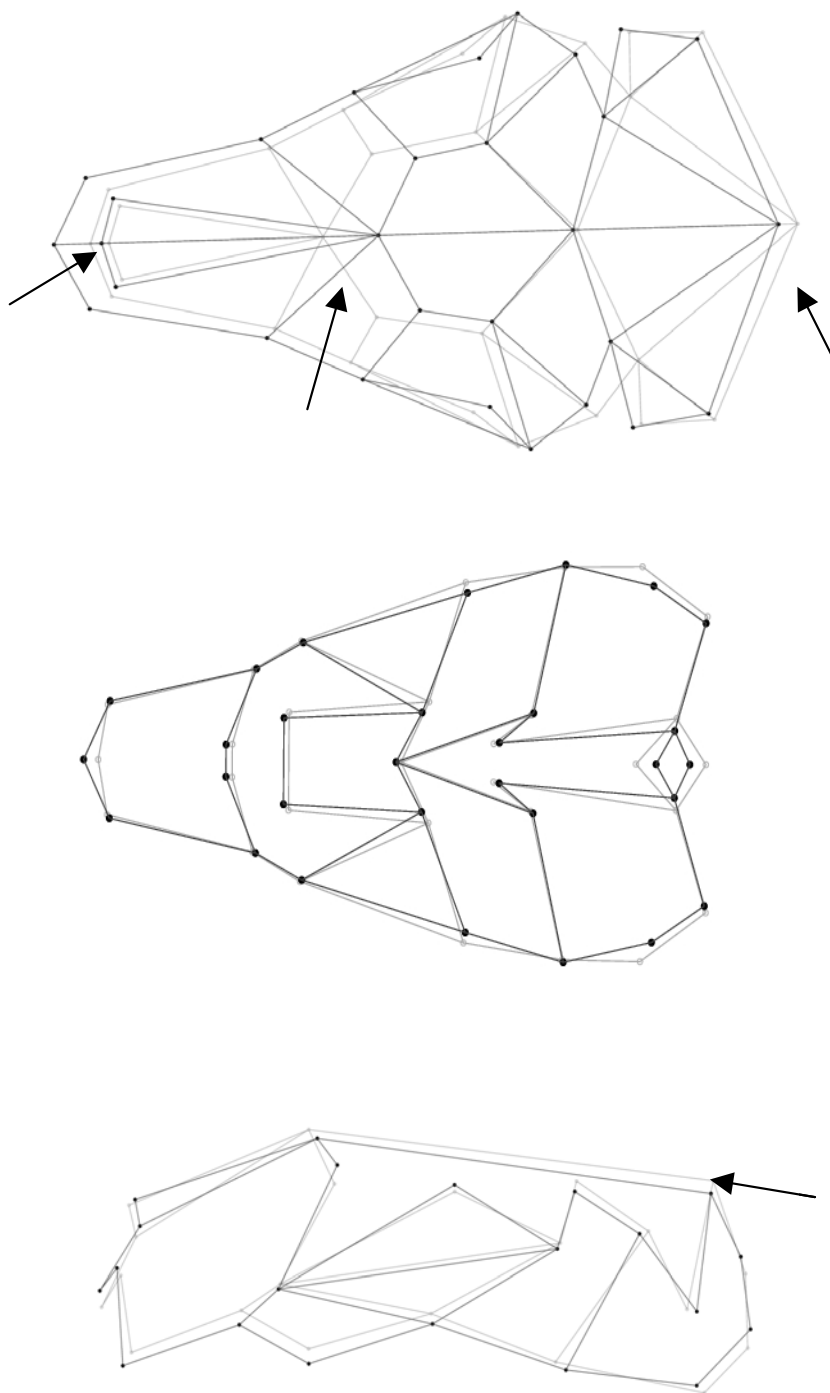


Figura 6. Diferenças na forma do crânio entre machos (preto) e fêmeas (cinza) de *Ctenomys torquatus* em relação às vistas dorsal (a), ventral (b) e lateral (c).

44 x 46

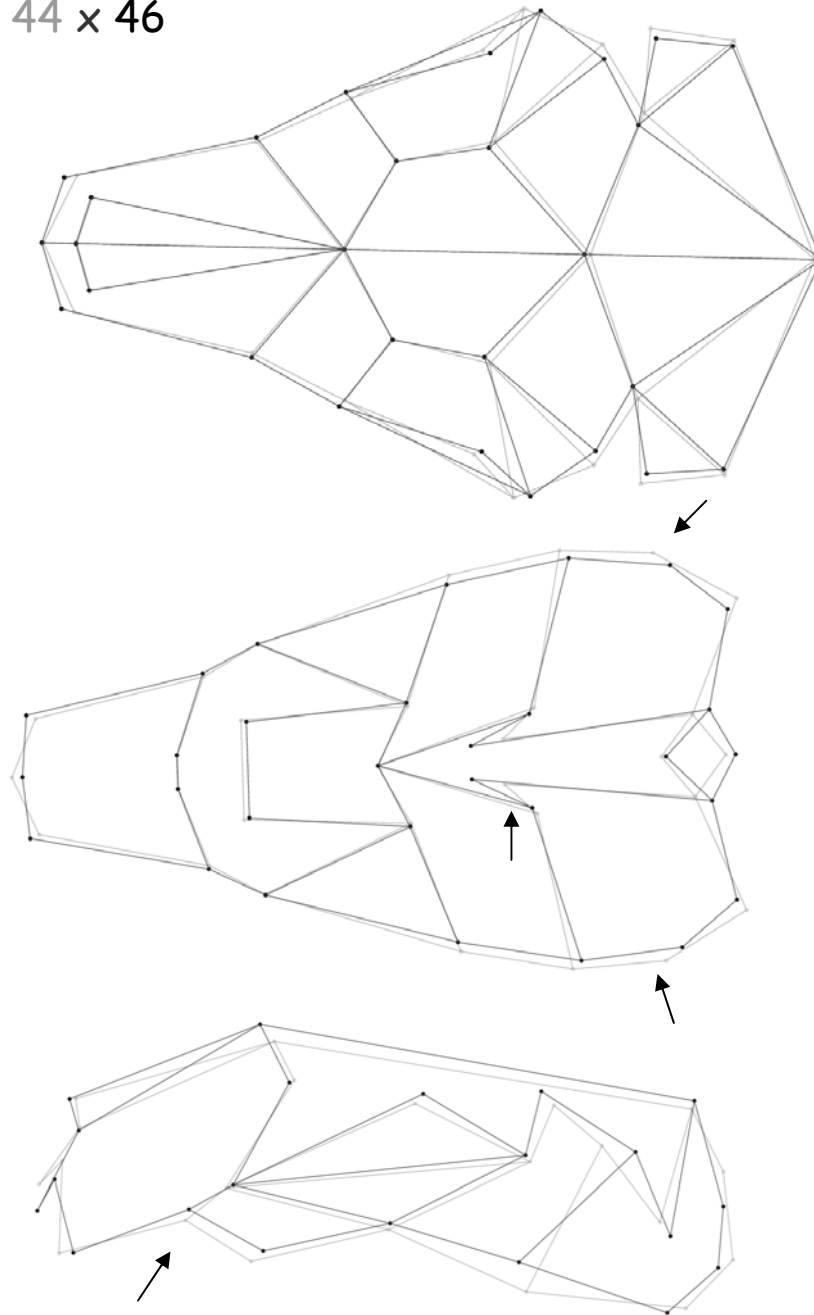


Figura 7. Diferenças entre crânios de fêmeas de *C. torquatus* com $2n=46$ (preto) e $2n=44$ (cinza) que ocorrem no Brasil em relação às vistas dorsal, ventral e lateral. As setas indicam onde estão as maiores diferenças entre os extremos dos dois grupos cromossômicos.

40 x 46

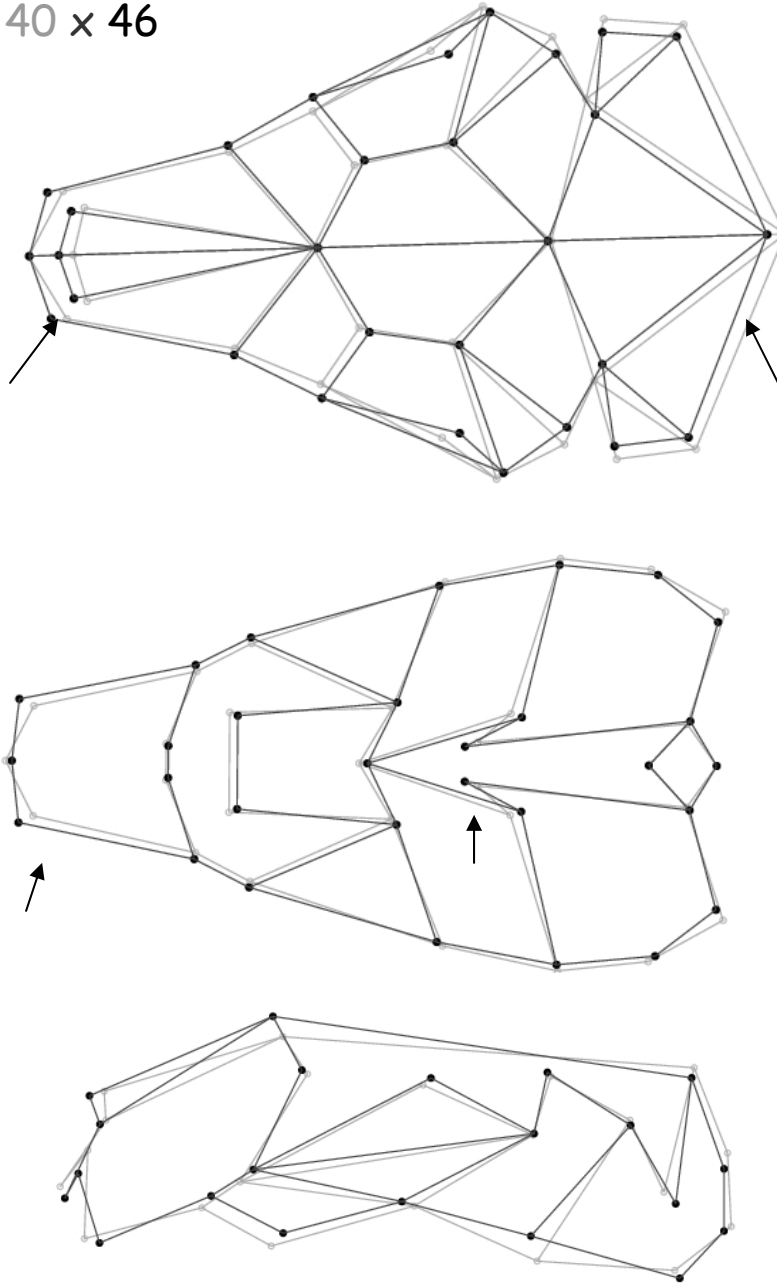


Figura 8. Diferenças entre crânios de fêmeas de *C. torquatus* com $2n=46$ (preto) e $2n=40$ (cinza) que ocorrem no Brasil em relação às vistas dorsal, ventral e lateral. As setas indicam onde estão as maiores diferenças entre os extremos dos dois grupos cromossômicos.

44u x 46

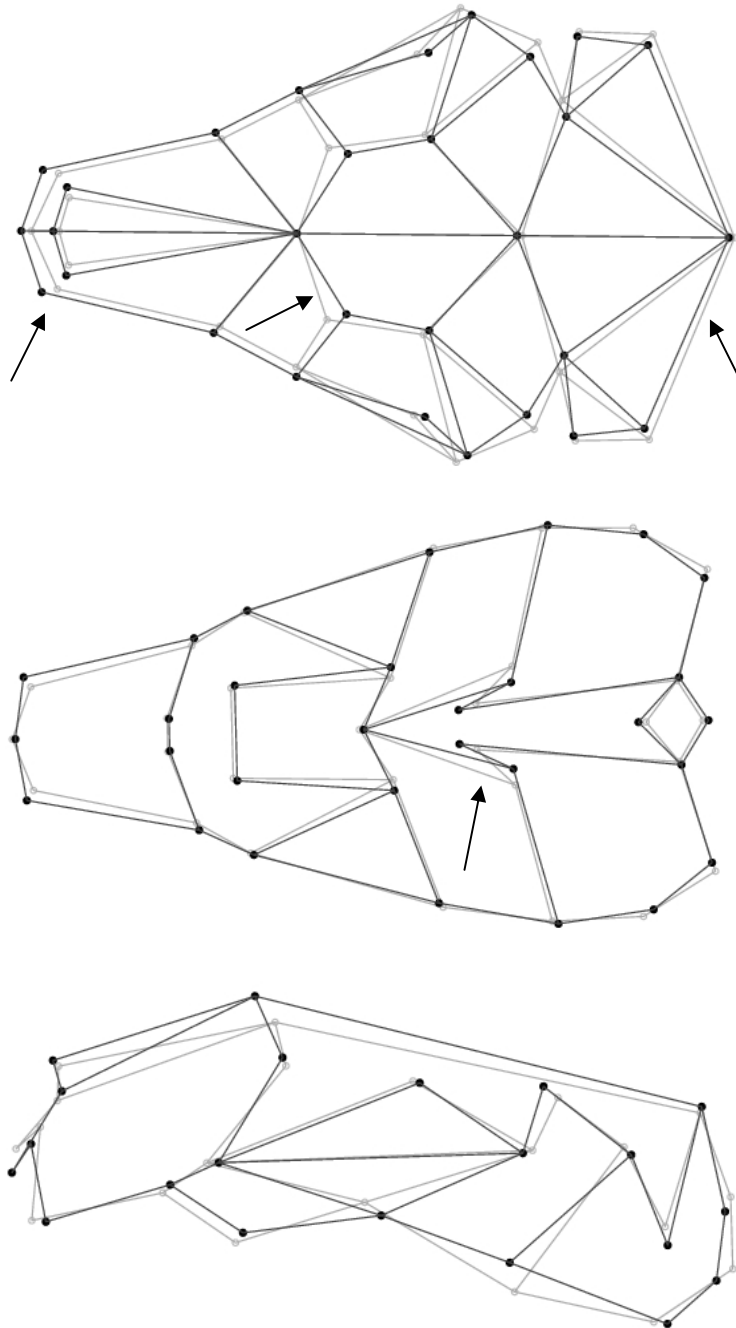


Figura 9. Diferenças entre crânios de fêmeas de *C. torquatus* com $2n=46$ (preto) e $2n=44$ que ocorrem no Uruguai (cinza) em relação às vistas dorsal, ventral e lateral. As setas indicam onde estão as maiores diferenças entre os extremos dos dois grupos cromossômicos.

44 x 44u

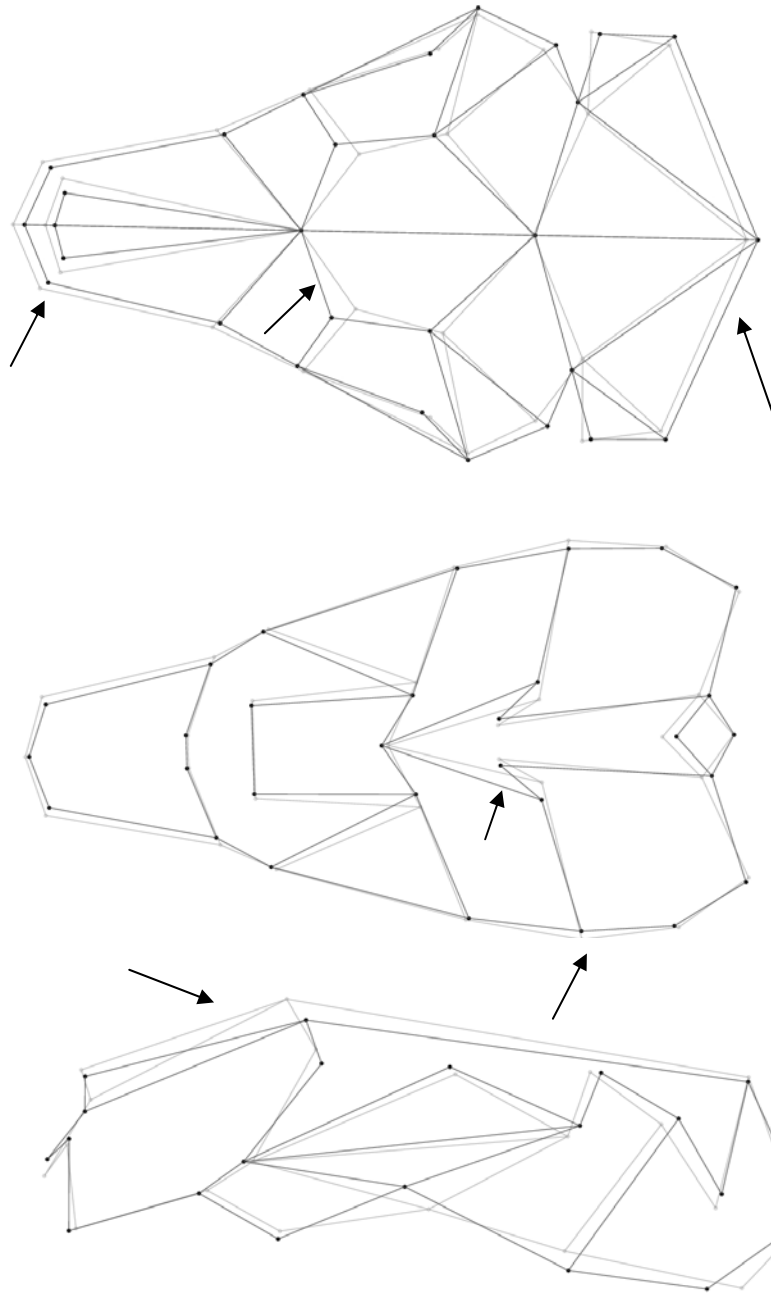


Figura 10. Diferenças entre crânios de fêmeas de *C. torquatus* com $2n=44$ (cinza) e $2n=44u$ que ocorrem no Uruguai (preto) em relação às vistas dorsal, ventral e lateral. As setas indicam onde estão as maiores diferenças entre os extremos dos dois grupos cromossômicos.

Relações entre os grupos cromossômicos

Foram calculadas as distâncias de Mahalanobis indicando as distâncias morfológicas entre os grupos cromossômicos em relação à forma dos crânios para cada vista analisada (Tabela 6). As maiores diferenças, em todas as vistas, foram verificadas entre os indivíduos com $2n=46$ e aqueles provenientes do Uruguai ($2n=44u$). Por outro lado, as menores diferenças estão entre os grupos com $2n=46$ e $2n=44$, para a vista dorsal, e entre os grupos com $2n=40$ e $2n=44$ para as vistas ventral e lateral. A análise das três vistas integradas não apresentou melhores resultados do que a análise em separado da vista dorsal que, por sua vez, apresentou os maiores valores entre as três vistas analisadas, em relação aos grupos cromossômicos (Tabela 5).

Os fenogramas de neighbor-joining foram elaborados a partir das distâncias de Mahalanobis e demonstram as relações entre os grupos cromossômicos. São apresentados os resultados para a vista dorsal (Figura 11). Os ramos das árvores são proporcionais as distâncias de Mahalanobis demonstradas na tabela 3.

O padrão de diferenciação entre os grupos cromossômicos foi também detectado com as distâncias de Procrustes (Tabela 6). Neste tipo de análise, onde a média das formas é sempre igual a zero, os maiores valores foram encontrados para a vista lateral, em todos os grupos cromossômicos. E os indivíduos do Uruguai apresentaram os maiores valores de distância de Procrustes relativo às populações que ocorrem no Brasil.

Os resultados do teste de Mantel realizados para as vistas dorsal, ventral e lateral não apresentaram correlação significativa entre as diferenças morfométricas dos crânios de fêmeas de *C. torquatus* obtidas através de distâncias de Mahalanobis e as distâncias geográficas entre as populações analisadas ($p>0,1$).

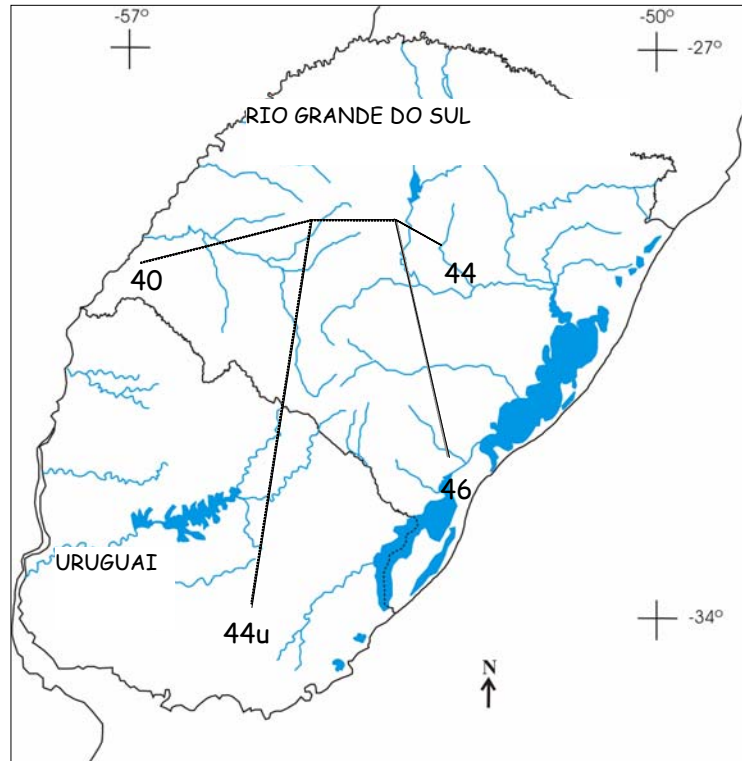


Figura 11. Fenograma obtido a partir das distâncias de Mahalanobis para a vista dorsal entre os grupos cromossômicos de *C. torquatus* utilizando como referência um mapa esquemático do Rio Grande do Sul.

Tabela 5. Matriz com as distâncias de Mahalanobis entre os grupos cromossômicos para cada uma das três vistas (dorsal / ventral / lateral / três vistas integradas) em relação aos crânios das fêmeas de *Ctenomys torquatus* que ocorrem no Brasil (2n = 40, 44, 46), e no Uruguai (2n = 44u). * Indicação do nível de significância ($p < 0,01$), com correção de Bonferroni, entre os pares de grupos cromossômicos obtido a partir da MANOVA.

	2n = 40	2n = 44	2n = 44u
2n = 44	7.9*/ 3.3*/ 5.6*/5.9	-	-
2n = 44u	14.2*/4.4*/ 5.9*/12.7	13.3*/6.7*/5.6*/11.4	-
2n = 46	12.0*/7.8*/ 9.2*/7.7	7.1*/ 5.5*/ 3.9*/ 4.5	20.4*/11.7*/12.0*/16.5

Tabela 6. Distâncias de Procrustes para os grupos cromossômicos de *Ctenomys torquatus* para cada uma das vistas cranianas analisadas.

	2n = 40	2n = 44	2n = 44u	2n = 46
Dorsal	0.03576	0.03639	0.03517	0.03552
Ventral	0.03124	0.03177	0.03059	0.03526
Lateral	0.04527	0.04228	0.04918	0.04311

Relação com as análises moleculares

Os resultados obtidos a partir das análises moleculares (algoritmo de Monmonier e rede de haplótipos) demonstraram evidências de que existem dois grandes clados (grupos) de populações de *C. torquatus* que se encontram em duas regiões geográficas distintas. Um clado (S) agrupando as populações do extremo sul do Brasil e do nordeste do Uruguai e o outro clado (T) é formado por todas as demais populações desta espécie ao longo de sua área de ocorrência no Brasil e no Uruguai.

Este padrão de diferenciação genética, com dois grandes grupos haplotípicos, pode ser visualizado através de análises cranianas empregando morfometria geométrica. A figura 12 apresenta as populações do sul do Rio Grande do Sul (figuras escuras) separadas das demais populações de *C. torquatus* no primeiro eixo discriminante. No segundo eixo discriminante é possível identificar três grupos principais: os indivíduos de General Câmara (no centro do Estado) com valores negativos, as populações do oeste do Uruguai com valores positivos, e as demais populações de *C. torquatus* com distribuição intermediária em relação aos dois grupos anteriores.

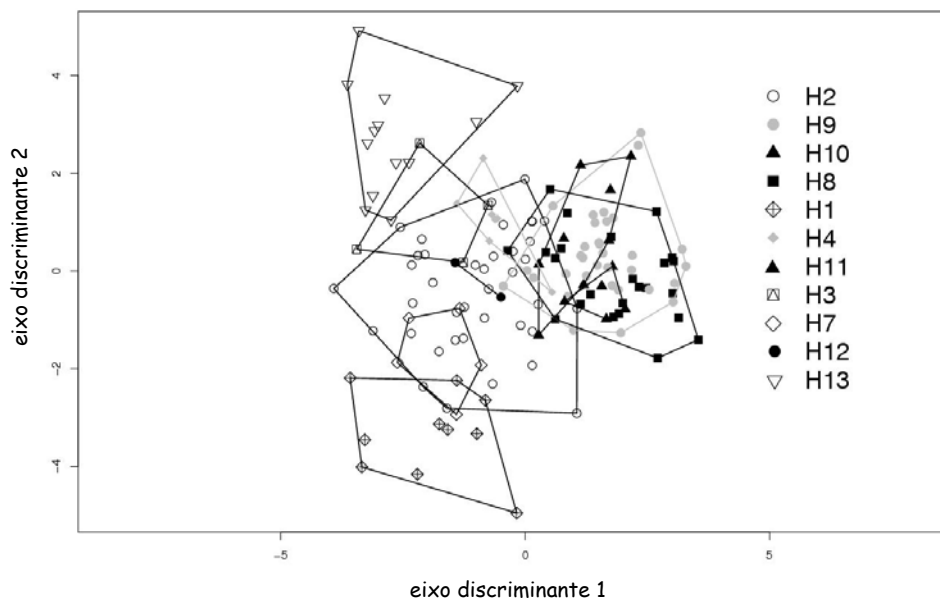


Figura 12: Análise discriminante com crânios de fêmeas de *Ctenomys torquatus* em relação aos haplótipos empregando morfometria geométrica. Representação dos haplótipos - "clado" (T): H2 (haplótipo mais amplamente distribuído), H1, H3, H4, H7 (centro e oeste do RS) e H13 (oeste do Uruguai); e "clado" (S): H8, H9, H10, H11 (sul do RS) e H12 (leste do Uruguai).

Padrões filogenéticos entre as localidades

As distâncias de Mahalanobis foram também calculadas em relação às localidades (populações), para cada vista do crânio. O resultado desta análise pode ser visualizado na Figura 13, que demonstra, em relação à vista dorsal, uma relativa proximidade entre os indivíduos geograficamente próximos a despeito de seus cariótipos diferentes, tais como: Taim e Rio Grande (ambos com $2n=46$) e Pelotas ($2n=44$). Outra associação geográfica verificada ocorreu entre os indivíduos das localidades ao norte da distribuição geográfica (Rosário do Sul, Butiá, Cachoeira do Sul e General Câmara) que se apresentaram relacionados entre si. A análise integrada das três vistas apresentou o mesmo padrão detectado para a vista dorsal (dados não apresentados).

Os fenogramas obtidos para as vistas ventral (figura 14) e lateral (figura 15) não apresentaram resultados muito divergentes do encontrado para a vista dorsal, porém nenhum padrão foi encontrado. Os grupos populacionais que se encontram relacionados em relação às vistas ventral e lateral são os representantes de Salto e Paysandu, no leste do Uruguai.

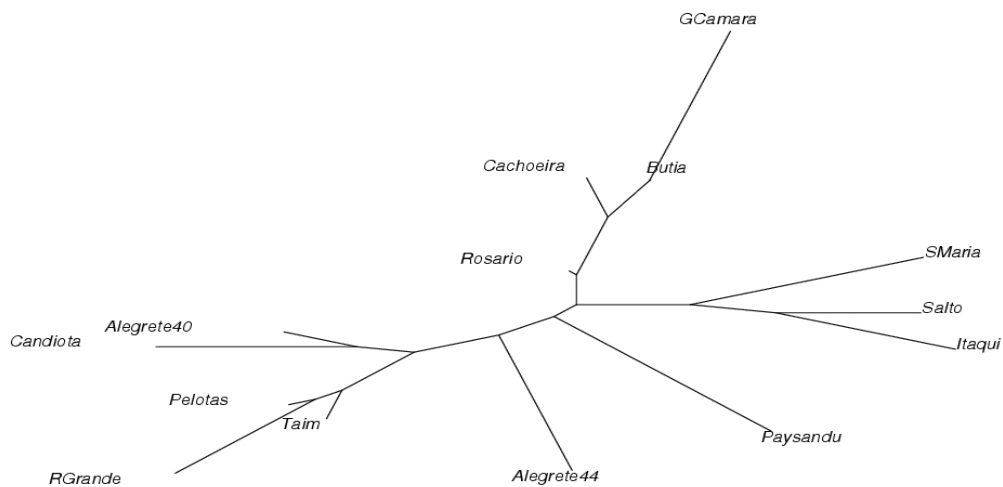


Figura 13. Fenograma representando as distâncias de Mahalanobis entre as localidades de ocorrência de *C. torquatus* construído pelo método de neighbor-joining, com o comprimento dos ramos correspondente as distâncias morfológicas em relação à vista dorsal dos crânios das fêmeas das populações com mais de 4 indivíduos.

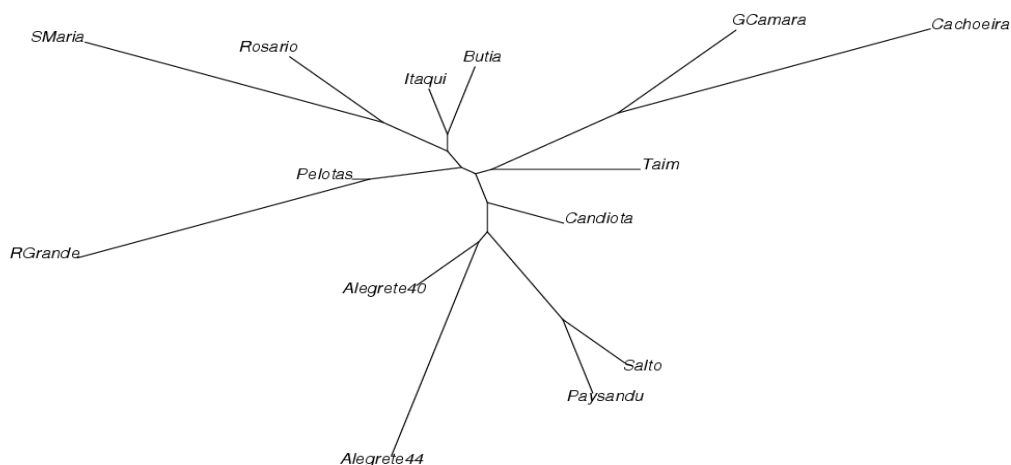


Figura 14. Fenograma representando as distâncias de Mahalanobis entre as localidades de ocorrência de *C. torquatus* construído pelo método de neighbor-joining, com o comprimento dos ramos correspondente as distâncias morfológicas em relação à vista ventral dos crânios das fêmeas das populações com mais de 4 indivíduos.

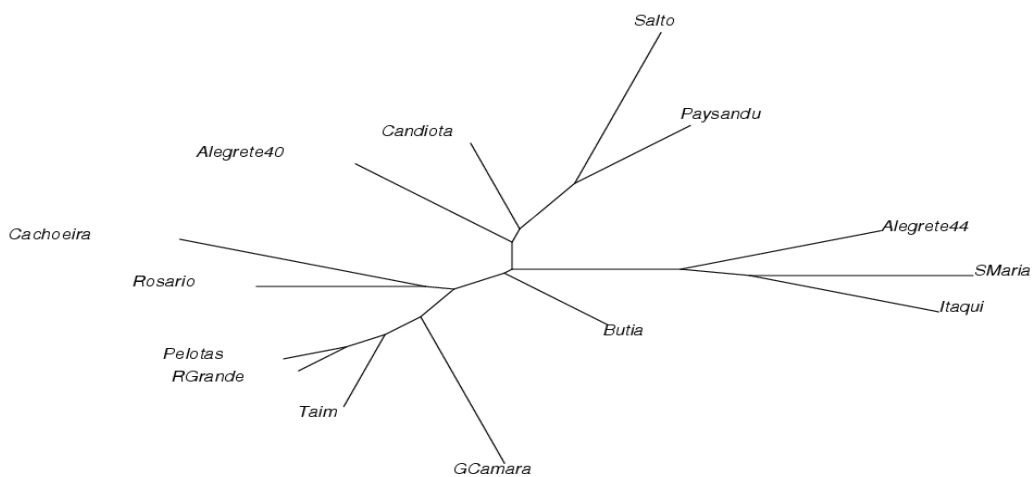


Figura 15. Fenograma representando as distâncias de Mahalanobis entre as localidades de ocorrência de *C. torquatus* construído pelo método de neighbor-joining, com o comprimento dos ramos correspondente as distâncias morfológicas em relação à vista lateral dos crânios das fêmeas das populações com mais de 4 indivíduos.

DISCUSSÃO

Entender a origem, a manutenção e as conseqüências da variação é uma abordagem fundamental em estudos de evolução dos organismos. Variações complexas associadas à forma do corpo são das mais difíceis de serem quantificadas, e os métodos utilizados para acessar estas informações estão reunidos em um campo de estudo denominado morfometria. Nesta área de estudo, os métodos têm por objetivo quantificar as variações na forma, dentro e entre amostras, associadas a questões evolutivas e de desenvolvimento dos organismos (Rohlf & Marcus, 1993).

Neste sentido, os avanços proporcionados pela morfometria geométrica possibilitaram refinamentos nas análises, pois, a morfometria geométrica apresenta uma série de vantagens em relação a morfometria tradicional no que diz respeito à análise das formas biológicas (Bookstein, 1991). Uma destas vantagens é o uso de marcos anatômicos para descrever as diferenças nas formas e a possibilidade de identificar exatamente onde estas diferenças estão localizadas no organismo. Enquanto a morfometria tradicional tende a subestimar, ou sub-representar, regiões ou dimensões que podem estar sofrendo alterações. Outra vantagem da morfometria geométrica é a possibilidade de demonstrar as diferenças relativas ao tamanho e a forma de maneira independente (Swtderskt, 2000).

Qual das três vistas é mais informativa? & Existe vantagem em analisar as três vistas combinadas?

As análises classificaram corretamente mais de 94% dos crânios das fêmeas e menos de 65% dos crânios de machos. Deve-se considerar que o número de crânios de fêmeas estudado era muito maior do que o de machos, sendo cerca de três vezes maior, e, portanto, esta pode ser uma razão para o baixo percentual de correta classificação para os machos.

O percentual de classificação correta entre os grupos cromossômicos foi sempre maior para a vista dorsal do que para as vistas ventral e lateral, e as análises realizadas com as três vistas integradas apresentaram valores intermediários entre os maiores e os menores percentuais de classificação quando analisadas cada uma das vistas separadamente.

As três vistas do crânio fornecem perspectivas distintas em relação à variação da forma do crânio, como no exemplo do estudo realizado com o roedor punaré: *Thrichomys apereoides* (dos Reis *et al.*, 2002). Neste estudo, considerando que as populações de punaré analisadas apresentavam certa similaridade na forma do crânio, e também uma continuidade ao longo do espaço geográfico em

que ocorrem, os autores detectaram que a vista lateral era a mais informativa (dos Reis *et al.* 2002). Da mesma forma, D'Anatro & Lessa (2006) consideraram que as três vistas do crânio das populações do tuco-tuco *Ctenomys rionegrensis*, que ocorre no oeste do Uruguai, apresentaram resultados similares, porém, quando considerados os dois primeiros eixos discriminantes, as diferenciações entre as populações eram particularmente melhor visualizadas quando a vista lateral era utilizada (Tabela 7).

Tabela 7: Porcentagem da variação explicada pelos eixos 1 e 2 (sendo 2 o somatório dos eixos 1 e 2) das análises discriminantes para as três vistas separadas, e integradas, calculados para as espécies *Ctenomys torquatus* (este estudo), *C. rionegrensis* (D'Anatro & Lessa, 2006) e *Thrichomys apereoides* (dos Reis *et al.*, 2002).

vistas/espécies	<i>C. torquatus</i>		<i>C. rionegrensis</i>		<i>T. apereoides</i>	
	eixo 1	eixo 2	eixo 1	eixo 2	eixo 1	eixo 2
dorsal	0.40	0.73	0.47	0.73	0.28	0.46
ventral	0.42	0.76	0.46	0.72	0.48	0.63
lateral	0.45	0.77	0.49	0.80	0.47	0.60
3 vistas	0.41	0.73	-	-	-	-

Neste estudo com *Ctenomys torquatus*, os resultados dos dois primeiros eixos discriminantes também demonstraram que a vista lateral apresentava os maiores percentuais, tal como encontrado para *C. rionegrensis*. Os percentuais observados para as três vistas do crânio de *C. torquatus* reunidas estiveram próximos aos valores mais baixos observados para a vista dorsal (Tabela 7).

Por outro lado, os mais robustos resultados em relação à correta classificação dos crânios foram encontrados, em média, para a vista dorsal, embora os resultados não tenham sido idênticos para todos os grupos (sexo e cariótipo) estudados (Tabelas 1 e 2).

Fernandes *et al.* (*no prelo*), estudando as diferenças intra e interespecíficas entre *C. torquatus* e *C. pearsoni* sugerem que cada uma das vistas sejam analisadas separadamente e, concomitantemente, seja feita uma análise integrada das três vistas. Isto porque os resultados obtidos por estes autores também não foram uniformes. Embora a análise integrada tenha apresentado um incremento nas percentagens de classificação da ordem de 10% para o caso dos grupos cariotípicos, quando analisadas as classificações em relação ao sexo e entre espécies a vista dorsal apresentou os maiores percentuais.

Dimorfismo sexual

O dimorfismo sexual se apresentou altamente significativo tanto em relação à forma quanto ao tamanho do crânio. Os machos possuem o rostro e o nasal maiores e mais largos, além de arcos zigomáticos maiores do que as fêmeas, que por sua vez apresentam neurocrânio relativamente maior do que os machos. Fornel (2005) também encontrou o rostro mais largo e mais longo dos machos como uma das principais características do dimorfismo sexual em relação à forma do crânio de *C. lami*.

As relações entre forma e tamanho do crânio em roedores caviomorfos podem afetar aspectos biomecânicos, fisiológicos, ecológicos e comportamentais (Vassallo, 2000) e, portanto, o dimorfismo em relação ao tamanho de *C. torquatus*, particularmente do rostro, podem estar associado às diferenças entre machos e fêmeas no que diz respeito aos aspectos propostos por Vassallo (2000).

Este padrão de dimorfismo sexual é geralmente encontrado em tuco-tucos: *C. minutus* (Gastal, 1994; Marinho & Freitas 2006), *C. lami* (El Jundi & Freitas 2004), *C. flamarioni* (Fernández-Stolz *et al.*, 2007), *C. mendocinus* (Rosi *et al.*, 2002), *C. opimus* (Pearson, 1959; Cook *et al.*, 1990), *C. talarum* e *C. australis* (Malizia *et al.*, 1991), *C. torquatus* e *C. pearsoni* (Fernandes *et al.*, no prelo). Na maioria destes casos os machos eram maiores, e até mais pesados, do que as fêmeas, e este maior tamanho dos machos pode estar relacionado com a seleção sexual em função dos machos estarem competindo por territórios e pelo acesso as fêmeas.

Existem pelo menos três hipóteses propostas para explicar a origem e manutenção do dimorfismo sexual entre os mamíferos, são elas: a seleção sexual, a seleção relacionada às características da história de vida reprodutiva, e ainda divergências ecológicas intersexuais (Hood, 2000). No caso dos tuco-tucos, todas estas explicações podem estar relacionadas devido às características ecológicas destes roedores, tais como: sistema de acasalamento poligínico, fêmeas com características filopátricas, além dos padrões de dispersão e do comportamento agonístico dos machos (Lacey *et al.*, 2000).

Variações intraespecíficas

Diversos estudos demonstraram que as variações morfológicas em relação ao tamanho e à forma dos crânios em roedores podem estar associadas às variações cromossômicas, e algumas vezes correlacionadas com parâmetros ecológicos (Corti *et al.*, 1990; Chatti *et al.*, 1999; Saïd *et al.*, 1999;

Corti *et al.*, 1996). Porém, existem também exemplos de variações cromossômicas com pouca, ou nenhuma, associação a diferenças morfológicas (Dobigny *et al.*, 2002).

Entre os grupos cromossômicos de *C. torquatus* não foram encontradas diferenças significativas em relação ao tamanho dos crânios, porém, em relação à forma, os testes estatísticos (MANOVA) demonstraram diferenças significativas entre todos os pares de grupos cromossômicos.

Da mesma forma, as análises entre populações agrupadas por regiões geográficas também apresentaram diferenças significativas entre todos os pares investigados. Porém, o padrão geográfico mais claramente verificado diz respeito à separação das populações do Uruguai e das populações que ocorrem no extremo sul do Brasil, parte delas com $2n=46$ (Rio Grande e Taim) e outras com $2n=44$ (Pelotas, Candiota e Dom Pedrito).

Do ponto de vista das diferenças cromossômicas, os indivíduos com $2n=46$ que ocorrem ao sul do Canal de São Gonçalo no extremo sul do Brasil apresentaram o pterigóide e o ângulo de procumbência menores do que os indivíduos com $2n=40$ e $2n=44$ do Brasil, e com $2n=44$ do Uruguai. Além disso, eles possuem neurocrânio e frontal menores, e nasal e rostro maiores do que os grupos com $2n=40$ e com $2n=44$ do Uruguai. E, em relação aos indivíduos com $2n=44$ do Brasil, a largura total do crânio e a bula timpânica são relativamente maiores.

Mora *et al.* (2003) sugerem a existência de uma relação entre o tipo de solo e a morfologia do crânio de tuco-tucos. Desta forma, as diferenças entre tamanho, particularmente do rostro e do ângulo dos incisivos superiores (procumbência) podem estar associadas com diferenciações populacionais ou cromossômicas em função do importante papel destas modificações cranianas e da dentição no modo de vida destes roedores.

Uma hipótese adaptativa poderia ser considerada para as populações de *C. torquatus* com $2n=46$ que habitam os campos arenosos da região sul a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, pois estas poderiam se diferenciar das demais populações que habitam as regiões internas do continente (Moreira *et al.*, 1991). Além dessa diferença ecológica, o canal de São Gonçalo atua como uma barreira geográfica há pelo menos 2.600 anos separando estes dois grupos de raças cromossômicas (Freitas & Lessa, 1984). Porém, a população de Pelotas ($2n=44$) esteve sempre relacionada às populações com $2n=46$ em todas as análises populacionais realizadas, demonstrando que a barreira geográfica e/ou o padrão cromossômico têm pouca relevância neste caso.

O mais provável é que a deriva genética tenha sido responsável pela diferenciação cromossômica observada nas populações com $2n=46$. E a partir do isolamento entre estas populações com grupos

cromossômicos diferentes os indivíduos tenham acumulado certa diferenciação morfológica craniana. Este mesmo processo pode ter ocorrido com as populações que possuem $2n=40$ e $2n=44$, no município de Alegrete. Embora entre estas populações as diferenças morfológicas sejam relativamente menores, ainda assim são significativas, e neste caso os padrões são ainda mais complexos pela suposta ausência de quaisquer tipos de barreiras geográficas isolando estas populações.

As espécies do gênero *Ctenomys* foram caracterizadas por Reig *et al.* (1990) por apresentarem grande variação cromossômica inter e intraespecífica associado a um rápido processo de especiação com pouca diferenciação morfológica. Apesar desta hipótese, este estudo documenta uma importante diferenciação da forma craniana entre grupos populacionais de *C. torquatus* com mesmo cariótipo ($2n=44$) no Brasil e no Uruguai. Os indivíduos com $2n=44$ no Brasil possuem o crânio relativamente mais alto, com frontal e neurocrânio menores, além do nasal, rostro e arcos zigomáticos serem relativamente maiores; enquanto os indivíduos do Uruguai possuem o crânio relativamente mais comprido e o pterigóide mais estreito e comprido.

Apesar destes dois grupos apresentarem diferenças com relação à forma e também ao tamanho do crânio, nenhuma barreira geográfica, ou ecológica, efetiva foi detectada entre os dois países. Provavelmente, as características populacionais intrínsecas a estes roedores (tais como: distribuição em mancha e baixa mobilidade) podem ser os fatores responsáveis pelo isolamento de algumas populações com a conseqüente diferenciação morfológica por deriva, sem qualquer rearranjo cromossômico envolvido no processo.

Corti & Rohlf (2001) descrevem um caso de diferenciação morfológica em ratos domésticos e atribuem tal fato a um produto da seqüência clodegenética desenvolvida a partir de fusões cromossômicas, porém, tal situação é distinta do detectado entre populações de *C. torquatus* no Brasil e no Uruguai, pois neste caso as populações não apresentam qualquer diferenciação cromossômica.

Os polimorfismos cromossômicos e os mais importantes rios do Rio Grande do Sul, com potencial para funcionarem como barreiras geográficas, demonstraram diferentes padrões de influência sobre as variações cranianas e cromossômicas em *C. torquatus*. Um exemplo de rio atuando como uma provável barreira geográfica com conseqüente diferenciação cromossômica é o rio Ibicuí, situado à oeste do Rio Grande do Sul. Embora este rio separe dois grupos cromossômicos distintos (Itaqui - $2n=40$ e Uruguiana - $2n=44$), ele parece não influenciar a diferenciação morfológica no crânio das duas populações envolvidas. Apesar deste resultado, para se afirmar a inexistência de um processo

de diferenciação morfológica será necessário maior número amostral, incluindo coletas ao longo do tempo em diferentes localidades nas duas margens do rio Ibicuí.

Considerando as populações analisadas, existe uma forte tendência a separação das populações que ocorrem no Uruguai, apesar de apresentarem o mesmo cariótipo da maioria das populações do Brasil. Já as populações do centro e do oeste do Rio Grande do Sul não apresentam um padrão claro de diferenciação entre elas apesar de apresentarem-se graficamente separadas das demais populações nas análises discriminantes para a vista dorsal, e também para esta vista o fenograma apresentar as populações do centro do Estado agrupadas e isoladas das demais. O grupo de populações do sul do Brasil é que, tal como as populações do Uruguai, estão bem discriminadas em relação às demais considerando qualquer uma das vistas do crânio analisadas nas análises discriminantes, e em menor grau este resultado pode ser visto nos fenogramas, particularmente para a vista dorsal.

A interpretação funcional dos padrões de evolução morfométrica e morfológica é intrigante no contexto microevolutivo das diferenciações cromossômicas, particularmente em espécies de tuco-tuco. Os rearranjos cromossômicos e as diferenciações cranianas das populações de *C. torquatus* não se apresentaram em consonância. É o aspecto geográfico, por sua vez, se mostrou bastante importante para a diferenciação craniana, pois as populações demonstraram uma tendência a se agruparem por semelhança morfológica em função da localização geográfica. Muito embora as diferenciações não tenham se apresentado, em nenhum momento, associada à existência de barreiras geográficas tais como os rios Jacuí, Ibicuí ou o Canal de São Gonçalo.

Apesar destes resultados, somente com estudos mais aprofundados envolvendo análises citogenéticas, de genética de populações, e outras análises moleculares, será possível investigar mais detalhadamente as similaridades e diferenças intraespecíficas em *C. torquatus* com relação a morfometria geométrica.

Morfometria craniana tradicional x morfometria geométrica

Geralmente o dimorfismo sexual não é detectado em estudos de morfometria craniana tradicional, ao menos entre roedores algumas espécies de roedores (Voss *et al.*, 1990), porém, estudos realizados com tuco-tucos (família Ctenomyidae), encontraram diferenças entre crânios de machos e fêmeas utilizando morfometria tradicional (Freitas, 1990; Freitas, 2005) e também empregando morfometria geométrica (Fornel, 2005; Fernandes *et al.*, no prelo), tal como verificado

neste estudo. Importante ressaltar que as análises com morfometria geométrica detectaram diferenças tanto em relação à forma quanto ao tamanho, já as análises com morfometria tradicional detectaram diferença significativa apenas no primeiro componente principal (geralmente como associado a diferenças no tamanho do crânio), enquanto o segundo componente principal (associado à variação na forma) não demonstrou dimorfismo significativo.

Segundo Freitas (2005), a evolução cromossômica entre roedores do gênero *Ctenomys* teria sido muito rápida e, portanto, com tempo insuficiente para proporcionar alterações morfológicas do crânio em função deste parâmetro evolutivo. Da mesma forma, outras características morfológicas não teriam sofrido alterações, tais como os dentes molares. Assim, outros aspectos deveriam ser priorizados quando se pretende investigar diferenças populacionais nestes roedores, entre eles: estrutura peniana (Balbontin *et al.*, 1996), cromossomos (Ortells, 1995), ADNmt (Lessa & Cook, 1998; Cook & Lessa, 1998), ou forma dos espermatozoides (Feito & Gallardo, 1982; Vitulo *et al.*, 1988; Freitas, 1995b). Estas observações foram realizadas a partir da análise da correlação entre as variações cromossômicas e morfométricas entre 15 espécies de tuco-tucos, a partir da qual verificou-se que não existe um padrão evolutivo interespecífico associando estes dois aspectos (Freitas, 2005). Porém, entre populações de *Ctenomys minutus* foi possível detectar uma relação evolutiva entre os cariótipos e a morfometria craniana (Freitas, 2005).

Esta sensibilidade para analisar diferenças intraespecíficas foi corroborada através da utilização de morfometria tradicional para detectar diferenças cromossômicas e geográficas entre populações de *C. torquatus*. A metodologia tradicional de análises morfométricas demonstrou, entre outros resultados, que a variabilidade entre os crânios deve estar mais relacionada com o aspecto geográfico do que com o polimorfismo cromossômico. Embora as análises de estatística multivariada possam indicar que os grupos cromossômicos com $2n=40$ e $2n=44$ sejam diferentes (em relação ao tamanho) quando comparados com aqueles grupos com $2n=46$ e $2n=44$ do Uruguai, e que a forma diferencie estes dois últimos, apenas as análises empregando as técnicas de morfometria geométrica possibilitaram a confirmação destes resultados, com a vantagem de permitir a visualização dos locais nos crânios onde estas diferenças estão ocorrendo entre os indivíduos analisados.

A morfometria geométrica tem sido amplamente utilizada de modo eficaz para analisar questões taxonômicas complexas (Dobigny *et al.*, 2002; Corti *et al.*, 1996). Da mesma forma, a utilização de técnicas de morfometria geométrica possibilitou melhor visualização das diferenças na forma dos crânios entre os grupos cromossômicos, e entre populações, de *C. torquatus*.

Apêndice 1 - Lista de espécimens examinados: número diplóide (2n), país, localidade, coordenada geográfica e número de coleção.

Nº mapa	2n	país	Localidade (fêmeas/machos)	Número de coleção
12	40	Brasil	Alegrete (15/10)	f. TR917, 939, 959, 963, 1035, JR322, 323, 324, 325, 333, 334, 399, 400, 413, 416 / m. TR960, 964, 1036, JR320, 321, 323, 397, 398, 401, 412
12	44	Brasil	Alegrete (4/3)	f. TR941, 942, 945, 1043 / m. TR940, 943, 944
4	44	Brasil	Bagé (3/18)	f. TR 177, 178, 179, 180, J180, 181, 183, 207, 208, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 218, 219, 222 / m. J209, 213, 217
6	44	Brasil	Butiá (13/0)	f. TR289,122, J131, 170, 199, 201, 204, 205, JR591, 592, 593, 594, 595 m. MNHNA1885
*	44	Brasil	Candelária	
9	44	Brasil	Cachoeira Sul (5/0)	f. TR921, 922, 923, 924, 1056
5	44	Brasil	Dom Pedrito (2/1)	f. TR903, 904 / m. TR906
8	44	Brasil	Gel. Câmara (7/3)	f. TR902, 1020, 1021, 1022, 1023, J238, 239 / m. TR900, 901, J237
13	40	Brasil	Itaqui (3/1)	f. TR592, 593, 597 / m. TR956
3	44	Brasil	Pelotas (22/10)	f. TR366, 368, 371, 374, 580, 585, 586, 598, 599, 600, 610, 618, 619, 209, J228, 229, 230, 231, M1038, 1039, 1048, 1051 / m. TR367, 370, 372, 373, 590, 596, 620, J140, 141, 226
15	44	Brasil	Quaraí (1/1)	f. TR912 / m. TR911
11	44	Brasil	Rosário do Sul (9/4)	f. TR931, 932, 935, 936, 938, 1029, 1030, 1031, 1032 / m. TR933, 934, 937, 1034
10	44	Brasil	Santa Maria (5/0)	f. TR926, 927, 928, 929, 930
16	44	Brasil	S. Livramento (2/1)	f. TR908, 909 / m. TR910
14	44	Brasil	Uruguaiana (1/1)	f. TR954 / m. TR955
2	46	Brasil	Rio Grande (11/5)	f. TR603, 605, 609, 582, 589, 591, 593, 946, 948, 949, 212 / m. TR404, 595, 947, 950, 951
1	46	Brasil	Taim (17/4)	f. TR 57, 71, 72, 73, 87, 577, 578, 579, 583, 584, 587, 592, 602, 604, 608, 614, 1025 / m. TR70, 86, 575, 617
17	44	Uruguai	Cerro Largo (2/3)	f. MNHINA 1809, 2474 / m. MNHINA 1810, 2026, 2623
20	44	Uruguai	Paysandu (7/1)	f. MNHINA 2256, 2266, 2291, 2309, 2310, 2318, 2327 / m. MNHINA2317
19	44	Uruguai	Salto (6/3)	f. MNHINA 1872, 1873, 1874, 2251, 2255, 2262 / m. MNHINA 1870, 2247, 2254

*f.: fêmeas; m.: machos

*coleções de mamíferos das quais os exemplares foram provenientes:

Dep. Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil - TR, J, JR.

Museu Nacional de História Natural e Antropologia de Montevideo, Uruguai - MNHINA.

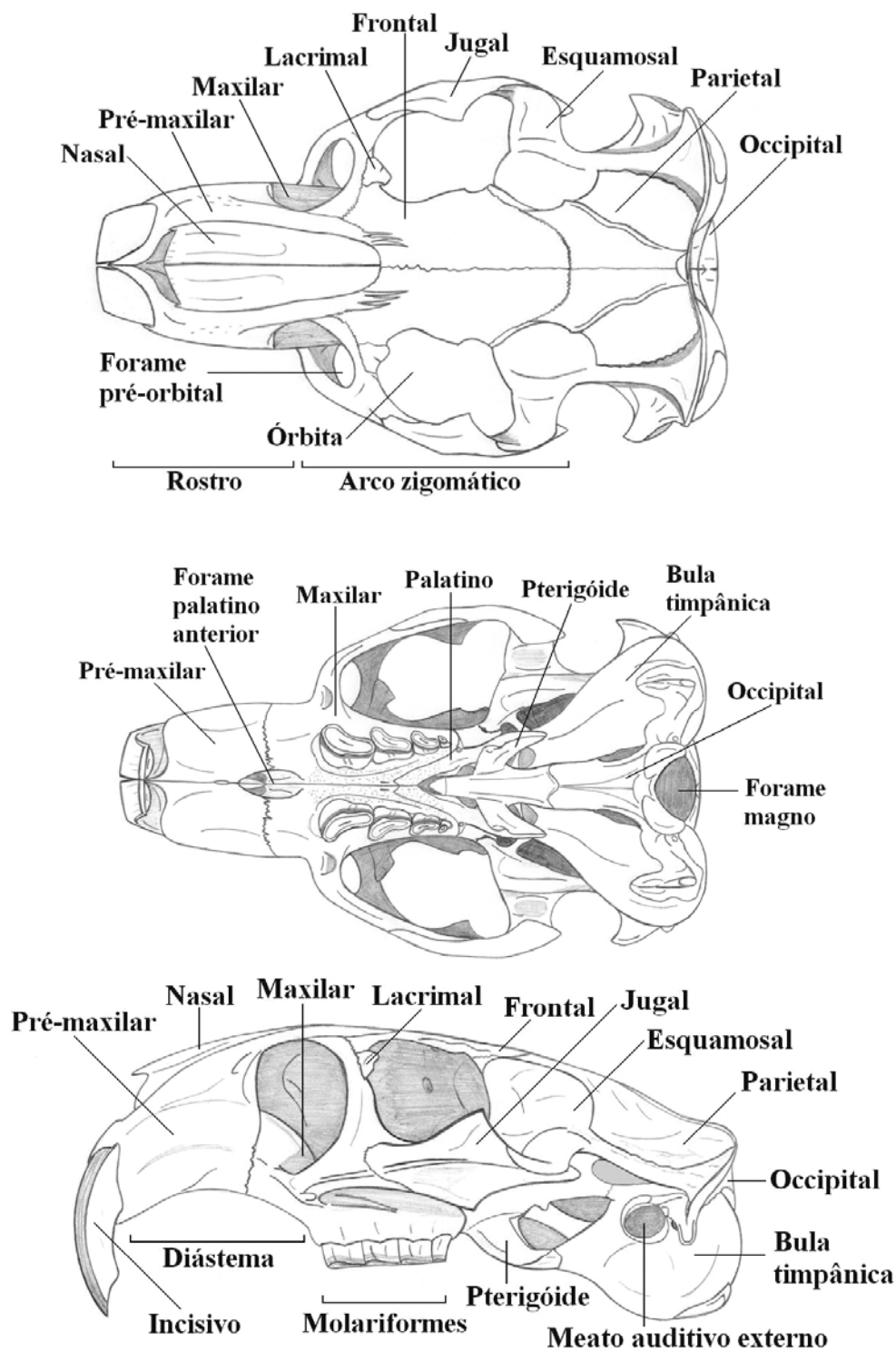
Apêndice 2- Definição dos marcos anatômicos e suas localizações no crânio de *Ctenomys* (representado na Figura 2).

Vista Dorsal do crânio: 1. extremidade anterior da sutura entre os pré-maxilares; 2-3. extremidade antero-lateral do alvéolo incisivo; 4. extremidade anterior da sutura entre os nasais; 5-6. extremidade anterior da sutura entre o nasal e o pré-maxilar; 7-8. extremidade anterior da raiz do processo zigomático; 9. extremidade anterior da sutura entre os nasais e os frontais; 10-11. extremidade antero-lateral do osso lacrimal; 12-13. menor distância entre os frontais; 14-15. extremidade terminal do processo pós-orbital; 16-17. extremidade anterior da sutura entre o frontal e o esquamosal; 18-19. extremidade posterior lateral da base do processo pós-orbital; 20-21. extremidade posterior do processo jugal no arco zigomático; 22. sutura entre os frontais e parietais; 23-24. extremidade antero-lateral da sutura entre parietal e esquamosal; 25-26. extremidade anterior do meato auditivo externo; 27-28. extremidade lateral da apófise mastóide; 29. extremidade posterior do osso occipital.

Vista ventral do crânio: 1. extremidade anterior da sutura entre os pré-maxilares; 2-3. extremidade antero-lateral do alvéolo incisivo; 4-5. sutura pré-maxilar na borda lateral do forame incisivo; 6-7. extremidade anterior da raiz do processo zigomático; 8-9. extremidade anterior da órbita; 10-11. extremidade anterior do alvéolo do pré-molar; 12-13. extremidade posterior do alvéolo do terceiro molar; 14. extremidade posterior da sutura entre os palatinos; 15-16. extremidade anterior na sutura entre o jugal e o esquamosal; 17-18. extremidade posterior do pterigóide; 19-20. extremidade anterior da bula timpânica; 21-22. extremidade anterior do meato auditivo externo; 23-24. extremidade posterior da apófise mastóide; 25-26. extremidade posterior do processo paraoccipital; 27. ponto anterior do forame magno; 28-29. extremidade posterior do côndilo occipital; 30. ponto posterior do forame magno.

Vista lateral do crânio: 1. extremidade superior do alvéolo incisivo; 2. extremidade posterior do alvéolo incisivo; 3. extremidade inferior do alvéolo incisivo; 4. extremidade antero-superior do nasal; 5. extremidade anterior da sutura nasal pré-maxilar; 6. sutura entre o pré-maxilar, maxilar e frontal; 7. extremidade inferior do lacrimal na sutura com o maxilar; 8. ponto inferior do forame pré-orbital; 9. extremidade inferior da sutura entre o pré-maxilar e o maxilar; 10. extremidade anterior do alvéolo pré-molar; 11. extremidade superior do processo pós-orbital; 12. extremidade inferior do processo jugal; 13. extremidade posterior do processo jugal; 14. extremidade antero-posterior da sutura entre o parietal e o esquamosal; 15. extremidade superior da crista lambdoidal; 16. extremidade anterior da sutura entre o esquamosal e a bula timpânica; 17. extremidade posterior do pterigóide; 18. extremidade inferior da apófise mastóide; 19. extremidade anterior do processo paraoccipital; 20. extremidade superior posterior do processo paraoccipital; 21. extremidade posterior da interseção entre o occipital e a bula timpânica.

Apêndice 3 - Vistas dorsal, ventral e lateral do crânio de *Ctenomys* com indicação de alguns ossos e características anatômicas relevantes para este estudo (gentilmente cedido por Rodrigo Fornel).



9. DISCUSSÃO GERAL
FILOGEOGRAFIA DE *Ctenomys torquatus*

"The sun and the earth describe orbital changes
which drive climate cycles and modify ranges.
The shape of the land forms a number of places
that allow the survival of different races.
When enclaves advance with the ice in retreat
some form hybrid zones where two ranges meet.
Such regions are common and not very wide
so the mixing of genes affects neither side.
They divide up the range in a patchwork of pieces
with echoes and glimpses on the nature of species..."
(Orbital Consequences, Hewitt G. M. 2001)

O QUE É FILOGEOGRAFIA?

A filogeografia é um campo de estudo baseado nos padrões e processos responsáveis pela distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas intra-específicas ou entre espécies relativamente próximas. No fim do século XX, verificou-se o crescimento desta importante ferramenta conceitual para o entendimento dos fatores históricos e filogenéticos que proporcionam a distribuição espacial contemporânea dos mais diversos grupos de seres vivos (Arbogast & Kenage, 2001). A distribuição geográfica das linhagens e o tempo necessário para que ocorram as diferenciações são considerados os eixos da filogeografia (Figura 1) através dos quais são mapeadas genealogias (Avice, 2000).

Entender os processos e padrões de fluxo gênico e de adaptações locais requer um conhecimento detalhado de como as características evolutivas das populações e das paisagens podem ter estruturado as populações (Hutchison & Templeton, 1999). Uma abordagem filogeográfica deve buscar entender os mais diversos aspectos que envolvem o grupo a ser estudado. Para que seja possível analisar e interpretar a distribuição geográfica atual das linhagens é importante reunir informações a respeito da demografia, etologia, genética molecular, genética de populações, das relações filogenéticas, das distâncias genéticas e dos tempos de divergência entre as linhagens evolutivas em questão, bem como investigar aspectos relacionados à ecologia, geologia, paleontologia, geografia histórica, entre outros, que estejam relacionados com as populações estudadas (Avice, 2000).

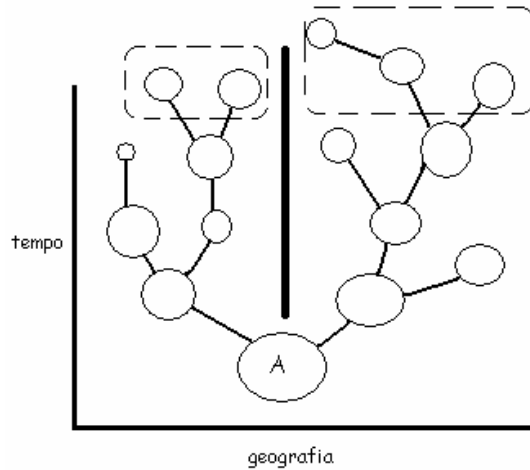


Figura 1: Genealogia hipotética de um grupo de organismos, com restrição ao fluxo gênico por uma barreira geográfica que separou as populações ao longo do tempo, inferido através de um determinado marcador genético inicial (adaptado de Avise, 2000).

* Os círculos pontilhados representam regiões de ocorrência atual das linhagens, enquanto a linha preta é a barreira que proporcionou a diferenciação a partir de uma linhagem (A).

Portanto, a filogeografia constitui-se em um esforço integrativo, entre diversas disciplinas microevolutivas e macroevolutivas (Figura 2).

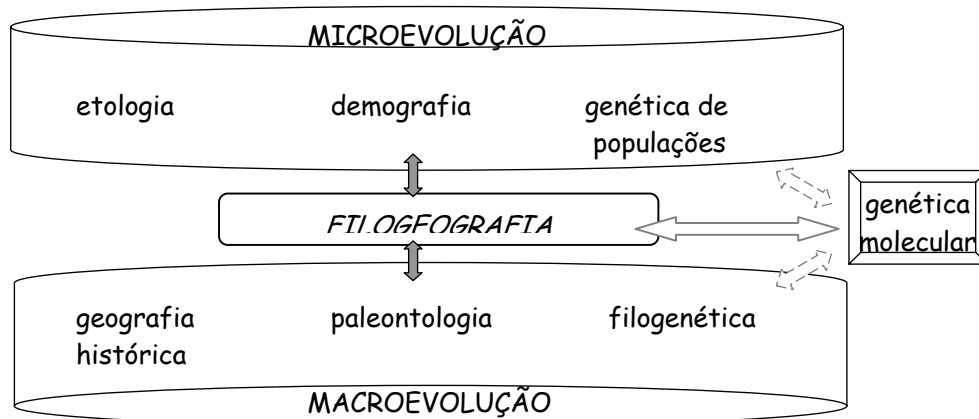


Figura 2: Filogeografia como disciplina integrativa de diversas áreas do conhecimento (Avise, 2000).

O avanço de técnicas para obtenção de seqüências de ADN (ácido desoxirribonucléico), particularmente ADN mitocondrial, é cada vez mais veloz para diversos organismos, o que proporciona a identificação e desenvolvimento de diferentes seqüências e marcadores moleculares

para estudos filogeográficos, possibilitando a descrição de padrões de relações filogenéticas e de distâncias genéticas entre linhagens (Hewitt, 2004).

Análises filogeográficas comparativas podem contribuir para compreensão da história evolutiva de determinada região, aumento o conhecimento relativo à biogeografia e às áreas de endemismo a partir de informações a respeito da dispersão de táxons através dela, ou pelos processos de especiação, radiação adaptativa, e/ou extinção, que podem interligar os eventos populacionais aos padrões de diversidade regional e à biogeografia (Bermingham & Moritz, 1998).

Desta forma, a filogeografia procura a congruência entre as histórias evolutivas, demográficas, filogenéticas e geográficas dos taxa, considerando uma série de condições geológicas e ecológicas particulares a uma determinada região, para propor uma cronologia da diversificação evolutiva. E a filogeografia comparativa possibilita a análise dos efeitos da história e da geografia na estrutura das populações de uma região.

FILOGEOGRAFIA DE *Ctenomys torquatus*

Mesmo com a grande biodiversidade encontrada em ambientes abertos na América do Sul, estes têm sido menos investigados do que as regiões de Florestas do continente (Almeida *et al.*, 2007). As conseqüências bióticas das mudanças climáticas já foram amplamente discutidas em relação à contração e a expansão da flora Andina, a contração da Floresta Amazônica em ilhas ou refúgios, a expansão de formações abertas tropicais ou subtropicais, e a expansão sazonal de algumas Florestas. Apesar destes estudos, pouco tem sido investigado sobre as regiões temperadas, ou subtropicais, do sul da América do Sul (revisado em Speranza *et al.*, 2007), muito pouco se conhece sobre os processos de biogeografia histórica desta região, particularmente na região dos Pampas no Rio Grande do Sul e na região de savana no Uruguai.

Entre os roedores subterrâneos que ocorrem no sul da América do Sul, os roedores do gênero *Ctenomys* (tuco-tucos) vêm sendo alvo de estudos que demonstram os padrões filogeográficos de algumas de suas espécies. Os estudos realizados até então identificaram diferentes padrões filogeográficos que podem ser interpretados em termos de características ecológicas intrínsecas e da história evolutiva das populações analisadas (Mora *et al.*, 2007).

Devido a carência de informações sobre a espécie *Ctenomys torquatus*, bem como sobre sua área de distribuição geográfica, este estudo reuniu informações cromossômicas, morfométricas,

morfológicas, filogenéticas e biogeográficas, incluindo as possíveis barreiras geográficas entre as populações, para discutir e propor uma história filogeográfica para esta espécie de tuco-tuco, e contribuir para o entendimento biogeográfico da região.

As localidades de amostragem deste estudo cobriram toda a distribuição geográfica de *C. torquatus* no Brasil, e boa parte da distribuição no Uruguai. A distribuição das populações deste roedor está relacionada principalmente com os Pampas Brasileiros e com a savana Uruguiaia, duas regiões caracterizadas por histórias geomorfológicas bastante intensas. Inicialmente toda a região era coberta pelo Oceano Atlântico durante o Paleozóico e posteriormente foi ocupada por um deserto durante o Triássico. Durante o Mesozóico houve uma verdadeira inundação por derrames melafíricos (lavais) seguida por uma ingressão marinha ao longo do Terciário, e finalmente passou a tomar as feições e características atuais após o início das regressões marinhas no Quaternário (Rambo, 2000). A partir do Quaternário esta região parece ter passado por um período mais estável, e os níveis de regressão e transgressão do mar podem ser considerados como os responsáveis pelas variações geográficas da biota, em particular das espécies de tuco-tuco na Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Fernandes *et al.*, 2007) que proporcionam algumas das poucas informações existentes sobre os processos biogeográficos desta região.

No Rio Grande do Sul, as populações de *C. torquatus* ocorrem na região do Pampa gaúcho e no sul da Planície Costeira, exclusivamente em campos de areia. O Pampa (Campos Sulinos), apesar de caracterizar fitofisiologicamente toda a região sul do Estado, tem maiores extensões principalmente na Argentina e no Uruguai (Behling, 2002), e se caracteriza pela ocorrência de espécies das famílias Poaceae, Asteraceae e Cyperaceae, além de diversas espécies de gramíneas (Rambo, 2000). Os espécimes de *C. torquatus* no Uruguai habitam a região denominada de savana Uruguiaia, que compreende um mosaico de florestas de galeria e savanas. Estes biomas no Brasil e Uruguai vêm sofrendo forte influência humana, principalmente em função das transformações da cobertura vegetal original da paisagem devido a atividades tais como a agricultura e o pasto (Behling, 2002).

Apesar da possibilidade de ocorrência de tuco-tucos em altitudes que podem variar desde o nível do mar até próximo a 5000 metros (Contreras & Bidau, 1999), Barlow (1969) sugeriu que *C. torquatus* deveria ocorrer exclusivamente em regiões com terrenos arenosos, não úmidos, sem pedras e em altitudes entre 0 e 200 metros. Esta hipótese foi corroborada durante este estudo com *C. torquatus*, pois nenhum indivíduo foi coletado no Brasil, nem registrado no Uruguai, em regiões com altitudes superiores a 200 metros.

Assim sendo, o Planalto Meridional constituído pelos *Campos de altitude*, com altitudes podendo atingir até 1600 metros, localizado nas regiões norte e nordeste do Rio Grande do Sul (Behling, 2002), constitui-se em uma barreira geográfica à ocorrência de *C. torquatus* não apenas pelo tipo de solo mais rígido do que nas demais regiões do Estado, mas também por sua altitude.

Distribuição à oeste do Rio Grande do Sul

A distribuição geográfica de *C. torquatus* a oeste é limitada pelo rio Uruguai, um dos mais importantes e caudalosos rios da América do Sul, tendo provavelmente se originado durante o Plioceno (Souza *et al.*, 2005). As espécies de tuco-tucos que ocorrem na margem oeste do rio Uruguai, na Província de Corrientes, nordeste da Argentina permanecem pouco investigadas, porém, as análises com citocromo *b* realizadas neste estudo demonstraram um claro padrão filogenético que diferencia as populações de *C. torquatus* que ocorrem na margem leste do rio Uruguai (no Rio Grande do Sul) e as populações de tuco-tuco (*Ctenomys* sp., *C. dorbignyi*, *C. roigi*, *C. perrensi*) da margem oeste (na Argentina). Podemos concluir, portanto, que apesar de algumas semelhanças cromossômicas (Ortells *et al.*, 1990; Reig, *et al.*, 1992), as populações denominadas *Ctenomys* sp. de Corrientes não são relacionadas filogeneticamente com *C. torquatus*.

As populações do extremo oeste da distribuição geográfica de *C. torquatus* apresentam diferenças cromossômicas (Uruguiana - $2n=44$, Itaquí - $2n=40$) e estão separadas pelo rio Ibicuí. Porém, apesar desta barreira geográfica, elas distanciam-se por apenas 9 quilômetros e compartilham o mesmo haplótipo, além de não apresentarem grandes diferenças morfológicas em seus crânios.

Outro exemplo da divergência entre padrões geográficos, citogenéticos e moleculares em *C. torquatus*, pode ser verificado em Alegrete. Neste município, não existe qualquer barreira geográfica que possa ser considerada como efetiva barreira ao fluxo gênico entre as populações de *C. torquatus* da região. Apesar disto, existem três populações com números cromossômicos divergentes ($2n=40$, 42 e 44) que compartilham o mesmo haplótipo (com exceção dos indivíduos com $2n=42$ que apresentam um segundo haplótipo, em maior frequência e com apenas um par de bases diferente).

Gonçalves (2007) utilizou microssatélites para estimar a diferenciação genética entre os grupos cromossômicos que ocorrem no Alegrete e demonstrou que a diferença genética entre os grupos com $2n=40$ e $2n=44$ é menor do que quando comparados os grupos com $2n=40$ e $2n=42$. Estes resultados,

associados aos das análises de componentes principais com dados moleculares que apresentaram os indivíduos $2n=40$ agrupados com os indivíduos com $2n=44$, possibilita a consideração de que os indivíduos com $2n=40$ são mais próximos geneticamente aos com $2n=44$ do que com $2n=42$. Tal hipótese é suportada neste estudo empregando região controladora de ADNmt pois se encontrou um haplótipo comum aos indivíduos com $2n=40$, $2n=42$ e $2n=44$, com a particularidade de a maioria dos indivíduos com $2n=42$ apresentarem um haplótipo exclusivo e diferente do encontrado nos demais indivíduos do Alegrete.

Devido à ausência de barreiras geográficas naturais influenciando a ocorrência de polimorfismos em *C. torquatus* em Alegrete, podemos supor que o padrão demográfico e de distribuição espacial destes roedores sejam as respostas para estas variações. E o isolamento de uma população com sucessivas gerações intercruzantes pode ter conduzido a uma pequena diferenciação no grupo de indivíduos com $2n=42$.

O compartilhamento de um único haplótipo entre indivíduos com diferentes números cromossômicos, ou polimorfismo cromossômico neutro, foi encontrado também em outras espécies de tuco-tucos, tais como *C. perrensi* (Ortells *et al.*, 1990; Ortells, 1995; Garcia *et al.*, 2000a) e *C. minutus* (Lopes, 2007), dentre as quais foram encontradas populações portando números cromossômicos distintos sem qualquer tipo de barreira entre elas.

Distribuição no centro do Rio Grande do Sul

Em relação às populações que ocorrem ao longo de Depressão Central do Rio Grande do Sul, nenhum padrão de estruturação filogeográfica foi detectado. Embora exista um rio bastante caudaloso (rio Jacuí) separando algumas populações, e também uma diferenciação na morfometria craniana entre as populações nesta região, nenhuma variação molecular, citogenética (todas com $2n=44$), ou morfológica foi observada. E ainda, entre os quatro haplótipos encontrados não houve qualquer influência do rio Jacuí como barreira geográfica em suas áreas distribuições na região. Este panorama indica a existência de uma barreira geográfica que aparentemente não atua plenamente como limitante ao fluxo gênico entre estas populações de *C. torquatus*, da mesma forma que observado entre populações de *C. minutus* (Lopes, 2007) e de *C. australis* (Mora *et al.*, 2006), pois podemos considerar que os rios podem ter tido seus cursos de água reduzido em períodos de tempo, possibilitando a passagem de indivíduos de um lado para outro de seus leitos.

Uma explicação possível para a falta da correlação entre a variação do ADNmt e distribuição geográfica, ou rearranjos cromossômicos, podem estar relacionados ao fato de as populações de *C. torquatus* não ocuparem suas área de distribuição geográfica por um tempo suficiente para que eventos evolutivos tenham possibilitado à diferenciação entre linhagens cromossômicas, ou mitocondriais (Thanou *et al.*, 2005). Portanto, o efeito das possíveis barreiras ainda não foi possível de ser detectado através de testes estatísticos, tais como a AMOVA, e este padrão de ausência de diferenciação por expansão populacional foi reportado também para *C. flamarioni* no litoral do Rio grande do Sul (Fernández-Stolz, 2007), e para populações de roedores que vivem em margens opostas de rios amazônicos no norte do Brasil (Gascon *et al.*, 2000).

O haplótipo que ocorre nas populações do centro e de oeste do Rio Grande do Sul é compartilhado por muitos indivíduos em diversas localidades, ocupando uma grande extensão por toda a distribuição da espécie. Os demais haplótipos ocorrem em áreas periféricas da distribuição geográfica no Rio Grande do Sul e também no oeste do Uruguai. Tal modelo de associação geográfica e haplotípica, com um haplótipo mais freqüente no centro da distribuição e os outros em áreas periféricas também foi verificado em outras espécies de pequenos roedores, como os *Clethrionomys rutilus*, na Ásia (Iwasa *et al.*, 2002), e também em um roedor subterrâneo, *Thomomys bottae* (pocket gophers), que recentemente invadiram a região sul da península da Califórnia, nos USA (Álvarez-Castañeda & Patton, 2004).

O padrão de ausência de diferenciação entre indivíduos da espécie *C. torquatus* no centro e no oeste do Rio Grande do Sul também foi verificado através da pouca diferenciação na morfologia craniana dos indivíduos destas regiões.

Distribuição ao sul do Rio Grande do Sul e no Uruguai

Na porção leste do Rio Grande do Sul, ao longo da segunda linha de dunas da Planície Costeira, os campos de areia registram a ocorrência de populações de *C. minutus* até a localidade de São José do Norte (Freygang *et al.*, 2004), próxima à passagem entre a Lagoa dos Patos e o Oceano Atlântico. Ao sul desta possível barreira geográfica interespecífica, a segunda linha de dunas é ocupada por populações de *C. torquatus* (desde o Rio Grande até as proximidades da Estação Ecológica do Taim). Estas populações encontram-se isoladas pelo Canal de São Gonçalo, Oceano Atlântico, Lagoa Mirim e pelos banhados do Taim, e compartilham uma variação cromossômica ($2n=46$) e um certo grau de diferenciação de morfometria e morfologia craniana em relação às demais populações de espécie. O

surgimento do Canal de São Gonçalo há aproximadamente 2600 anos é associado por Freitas & Lessa (1984) a diferenciação cromossômica, porém, as análises moleculares e de morfologia do crânio não identificaram um padrão de isolamento destas populações com $2n=46$ em relação às populações com $2n=44$, principalmente de Pelotas.

Embora populações de *C. torquatus* ocorram no Brasil e no Uruguai compartilhando o mesmo cariótipo ($2n=44$), foram demonstradas diferenciações a partir de técnicas de morfometria craniana tradicional e geométrica. Uma hipótese para estas diferenças pode ser a presença de uma barreira geográfica existente na região noroeste do Uruguai chamada *Cuchilla de Haedo*. Podemos propor que esta seja considerada uma barreira para estas populações de tuco-tucos, pois as altitudes da *Cuchilla de Haedo* variam entre 200 e 500 metros, e como demonstrado anteriormente, nenhum registro de indivíduos desta espécie foi feito em altitudes superiores a 200 metros. Assim sendo, devem ser realizados mais estudos, principalmente envolvendo coletas na região leste e centro do Uruguai, para procurar confirmar esta hipótese de diferenciação geográfica.

Padrão filogeográfico

Os resultados obtidos a partir das análises moleculares, tais como: o algoritmo de Monmonier, a rede de haplótipos e as análises filogenéticas; além das análises de morfometria e morfologia craniana, forneceram evidências de que existem dois grandes clados (grupos) de populações de *C. torquatus* que se encontram em duas regiões geográficas distintas. Um clado (S) agrupando as populações do extremo sul do Brasil e do nordeste do Uruguai, sendo parcialmente isoladas geograficamente pelo Escudo Sul-Riograndense e pela *Cuchilla de Haedo*, enquanto o outro clado (T) é formado por todas as demais populações desta espécie ao longo de sua área de ocorrência no Brasil e no Uruguai.

Ao longo do tempo, a manutenção do fluxo gênico entre populações de formas cromossômicas diferentes, como revelado por análises de ADNmt, e a falta de eventos geográficas que atuassem como barreiras na área, pode ter sido responsável pela ausência de isolamento genético observado, apesar dos rearranjos cromossômicos que se diferenciam localmente, particularmente nas extremidades da distribuição geográfica da espécie.

Embora este estudo não tenha demonstrado correlação entre as diferenças cranianas e as distâncias geográficas (tal como observado em *C. rionegrensis* - D'Anatro & Lessa, 2006), detectou-se uma significativa, embora fraca, correlação positiva considerando as diferenças genéticas e

geográficas (semelhante ao detectado em *C. minutus* - Lopes, 2007). Estes resultados de correlação entre distâncias geográficas e genéticas entre populações de *C. torquatus* podem estar relacionados com a ocorrência de haplótipos diferenciados nas regiões periféricas da distribuição da espécie, e pelo compartilhamento de um mesmo haplótipo em diferentes e distantes localidades.

A ausência de associação entre as variações cromossômicas e a variabilidade haplotípica detectada em *C. torquatus* também foi encontrada em outras espécies de tuco-tucos que se caracterizam por apresentar polimorfismo cromossômico e nenhum um padrão de monofilia quando analisadas através de ADNmt (Mascheretti *et al.*, 2000; Giménez *et al.*, 2002, Tomasco & Lessa, 2007). Além disso, diversos estudos com populações cromossomicamente polimórficas demonstram que a fixação de novos rearranjos cromossômica é freqüente em tuco-tucos, mas as diferenças cariotípicas não caracterizam necessariamente esterilidade aos indivíduos heterozigotos e, da mesma forma que zonas híbridas, não apresentam evidências de heterozigosidades negativas (Gava & Freitas, 2002; Gava & Freitas, 2003; Tomasco & Lessa, 2007).

A variabilidade cromossômica pode ser independente de eventos geográficos, e os aspectos biológicos que envolvem as populações destes roedores subterrâneos devem ser mais importantes na sua diferenciação cariotípica. As características de estruturação demográfica são freqüentemente citadas para explicar a fixação de rearranjos cromossômicos em roedores subterrâneos pela ação da deriva (Nevo *et al.* 1994; Novello *et al.* 1996). Entretanto, não existem evidências diretas da ocorrência destes eventos até então.

As análises filogenéticas não conseguiram revelar um padrão de variação que pudesse ser correlacionado com as formas cariotípicas ou com as variações morfológicas encontradas nas populações estudadas. Estes resultados podem sugerir que o gene de região controladora do DNAm ainda não divergiu suficientemente para ser distinto entre grupos cromossômicos ou morfológicos. Tais discordâncias entre marcadores genéticos não raramente são vistas em muitos organismos, inclusive roedores (Iwasa *et al.* 2002), e mais especificamente em tuco-tucos (Wlasiuk *et al.*, 2003; Freitas, 2007). Isto deve estar relacionado ao fato de que diferentes marcadores têm tempos de evolução distintos, e provavelmente, os padrões ecológicos e demográficos dos tuco-tucos propiciam a estes roedores uma peculiar evolução citogenética.

Todavia, um fato que pode ser considerado em relação à evolução cariotípica de *Ctenomys* é a conservação do conteúdo do ADN (Ruedas *et al.* 1992; Novello *et al.*, 1996), a despeito da grande variação nos números cromossômicos. Além disso, não se pode desconsiderar a combinação de

processos como deriva meiótica ou seleção proporcionando esta variabilidade visto que a estrutura populacional destes roedores também apresenta uma certa variação, desde pequenas tuqueiras (conjunto de tocas, ou demes) até grandes colônias (Villar *et al.*, 2005). De fato, a evolução cariotípica em *Ctenomys* pode ser associada a vários fatores, porém permanece a questão a respeito de qual seria o mais importante, e se ocorre da mesma forma nas diferentes espécies do gênero.

Do ponto de vista interespecífico, a proximidade filogenética entre *C. torquatus* e *C. pearsoni* (Lessa & Cook, 1998; D'Elia *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2005) pode ser questionada pelos resultados obtidos através das análises com citocromo *b* incluindo espécies que ocorrem no Brasil e no Uruguai e que até então não haviam sido inseridas em estudos de relações filogenéticas interespecíficas para o gênero *Ctenomys*. Apesar da proximidade geográfica entre as duas espécies em questão, nossas análises demonstraram que estas espécies não são tão relacionadas filogeneticamente quanto se supunha. A sequência de *C. pearsoni* demonstrou-se mais relacionada às espécies de tuco-tuco que ocorrem no nordeste da Argentina, particularmente *C. dorbignyi*, com a qual compartilha o mesmo cariótipo ($2n=70$, FN=88) e são consideradas como tendo uma origem comum (Garcia *et al.*, 2002a).

Além de não serem tão relacionadas filogeneticamente, Fernandes *et al.* (no prelo) demonstraram importantes diferenças entre *C. torquatus* e *C. pearsoni* com relação ao tamanho e à forma do crânio. Três prováveis barreiras geográficas no Uruguai podem ser consideradas como relacionadas ao processo de diferenciação entre estas espécies: a *Cuchilla Grande*, o rio Negro, e o arroio Chuí. Porém, devem ser realizadas mais coletas nestas regiões, bem como empregados estudos populacionais, tanto morfométricos quanto moleculares, para possibilitar uma melhor compreensão das diferenças que envolvem as populações destas espécies.

Recentemente alguns estudos foram realizados utilizando como marcadores moleculares a região controladora do ADNmt para propor padrões filogeográficos para espécies de tuco-tucos no Brasil (Fernández-Stolz, 2007; Lopes, 2007), Uruguai (Tomasco & Lessa, 2007) e Argentina (Mora *et al.*, 2006; Mora *et al.*, 2007). Apesar de algumas similaridades entre estas espécies, de modo geral foram encontrados padrões específicos para cada espécie que podem estar associados ao tipo de habitat ao qual cada uma delas está associada. Estes padrões podem estar relacionados também ao relativamente curto intervalo de tempo de diversificação e as características demográficas destes roedores (Reig *et al.*, 1990).

Peculiaridades da espécie *C. torquatus*, tais como: ampla distribuição geográfica, baixa diversidade haplotípica e polimorfismo cromossômico relativamente reduzido, associado à história

biogeográfica da região sul do Brasil e norte do Uruguai fazem com que o padrão filogeográfico desta espécie seja único entre as espécies de tuco-tuco estudadas até então.

Considerações finais

A reunião das informações neste estudo nos remete ao seguinte cenário: as populações de *Ctenomys torquatus* expandiram recentemente a partir do centro do Rio Grande do Sul (Depressão Central), em direção ao oeste e sul do Brasil, e também em direção ao norte e noroeste do Uruguai, com uma estruturação genética típica de uma expansão populacional sem que tenha se passado o tempo suficiente para que fosse possível se caracterizar um padrão de isolamento pela distância entre as populações. E a partir desta expansão, algumas populações iniciaram um processo de diferenciação sob a influência das mutações e da deriva genética.

Apesar das árvores dos genes nem sempre coincidirem com as árvores inter ou intraespecíficas, o que representa uma limitação quando se trabalha com apenas um marcador (seja mitocondrial ou nuclear) em estudos filogenéticos, realizar um estudo empregando um único locus mitocondrial representa uma abordagem inicial para a questão que deve ser retomada futuramente com utilização de outros marcadores (como microssatélites, por exemplo) para investigar os processos de variabilidade cromossômica e morfológica que caracterizam as populações de *C. torquatus*.

Os nossos resultados constituem-se em um dos raros estudos de filogeografia que tenta interpretar a influência de eventos geográficos e históricos na distribuição atual e na diversificação de mamíferos subterrâneos Sul-Americanos utilizando diversas ferramentas morfométricas e moleculares. Esperamos que com o acúmulo de conhecimentos sobre a diversidade genética, com incremento de dados morfológicos e ecológicos sobre mamíferos no Sul do Brasil e no Uruguai, associado a outros dados de fauna e flora, os testes diretos de congruência filogeográfica possam ser realizados para proporcionar o melhor entendimento da biogeografia desta região.

10. CONCLUSÕES

- A espécie *Ctenomys torquatus* apresenta uma das maiores distribuições geográficas entre as espécies de tuco-tuco na América do Sul. Todos os indivíduos foram coletados em altitudes inferiores a 200 metros e em terrenos arenosos;

- As populações desta espécie, tuco-tuco-de-colar, ocorrem em toda região central do Rio Grande do Sul, geomorfologicamente conhecida como Depressão Central; na região da Campanha (ou Campos Sulinos), no extremo oeste do Rio Grande do Sul, sendo limitadas à oeste pelo rio Uruguai. Ainda neste Estado, foram encontradas populações ao longo de toda porção sul, exceto na região do Escudo Sul-Riograndense, além de registros na parte sul da Planície Costeira do Rio Grande do Sul;

- Registros de coletas de *C. torquatus* foram encontrados também nas regiões norte do Uruguai;

- Foram descritos dois números cromossômicos para populações de *C. torquatus* no oeste do Rio Grande do Sul: $2n=42$ em Alegrete, e $2n=40$ em Alegrete e em Itaqui. O polimorfismo cromossômico encontrado nesta espécie caracteriza-se por um cariótipo mais amplamente distribuído e considerado ancestral ($2n=44$), a partir do qual derivou-se o número cromossômico $2n=46$, a partir de uma fissão, e os números cromossômicos $2n=42$ e $2n=40$, em decorrência de duas fusões cromossômicas;

- A variabilidade morfométrica, e morfológica, craniana demonstrou dimorfismo sexual, com machos maiores do que as fêmeas, além de um certo grau de diferenciação entre os grupos cariotípicos e entre os grupos populacionais no aspecto regional, particularmente populações ao sul do Rio Grande do Sul;

- Os indivíduos com $2n=44$ do Uruguai apresentaram diferenças na forma e no tamanho do crânio em relação aos indivíduos com o mesmo cariótipo que ocorrem no Brasil;

- As vistas dorsal e lateral apresentaram os melhores resultados nas análises de morfometria geométrica. Porém, recomenda-se que sejam realizadas análises com as três vistas (dorsal, ventral e

lateral), e com a integração destas, para melhor compreensão do grau de variação, e também das regiões onde ocorrem estas possíveis variações nos crânios;

- A espécie *C. torquatus* apresentou baixa variabilidade genética, e a topologia da rede de haplótipos em forma de "estrela" sugere um cenário de expansão com pouca diferenciação entre os haplótipos, com o mais freqüente dos haplótipos estando representado na maioria das localidades, e alguns haplótipos únicos com uma, ou poucas, diferenciações nucleotídicas;

- Os elevados e significantes valores de *Fst* demonstraram ausência, ou limitado, fluxo gênico entre as populações analisadas, principalmente considerando dois grandes clados: um grupo formado por haplótipos que ocorrem no extremo sul do Rio Grande do Sul e leste do Uruguai (S), e outro agrupando todas as demais populações de *C. torquatus* (T). Entre estes dois clados (S e T), o algoritmo de Monmonier detectou a principal barreira ao fluxo gênico entre as populações de *C. torquatus* analisadas;

- O teste de Mantel teve como resultado uma correlação significativa entre as distâncias geográficas e as estimativas de fluxo gênico, revelando desta forma, um certo padrão de isolamento por distância, embora não tenha sido detectada correlação entre as diferenciações morfológicas e geográficas;

- Propõe-se que as populações de *C. torquatus* tiveram uma origem na Depressão Central do Rio Grande do Sul, migrando relativamente há pouco tempo para o oeste e sul do Estado e para o norte e oeste do Uruguai;

- As possíveis barreiras geográficas que podem ter levado a algum grau de diferenciação intraespecífico são o rio Ibicuí, que separa citogeneticamente duas populações, com $2n=40$ e $2n=44$, no extremo oeste do RS; a *Cuchilla de Haedo*, que separa morfológicamente as populações do oeste do Uruguai em relação às populações do leste deste país e do sul do Brasil; e, principalmente o Escudo Sul-Riograndense, que distingue as populações do extremo sul do Brasil do ponto de vista molecular e da morfometria geométrica;

- O rio Jacuí, um dos mais caudalosos rios do Rio Grande do Sul, não apresentou nenhuma influência no que diz respeito à variação cromossômica, morfológica ou molecular, por outro lado, o canal de São Gonçalo é uma barreira entre populações com $2n=46$ e $2n=44$, ao menos do ponto de vista cromossômico e de morfometria craniana, pois filogeneticamente as populações são semelhantes;

- As espécies *C. torquatus* e *C. pearsoni* não são filogeneticamente tão próximas quanto se supunha. Nos estudos realizados até então, elas se apresentavam relacionadas pela ausência de seqüências de outras espécies que ocorrem no Rio Grande do Sul e nordeste da Argentina. A Cuchilla Grande, o rio Negro e o arroio Chuí (no Uruguai) são possíveis barreiras entre populações de *C. torquatus* e *C. pearsoni*, porém mais estudos devem ser realizados para testar esta hipótese.

11. Referências Bibliográficas

- Adams, D. C. 1999. Methods for shape analysis of landmark data from articulated structures. *Evolutionary Ecology Research*, 1: 959-970.
- Adams, D. C., Rohlf, F. J. & Slice, E. D. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *International Journal of Zoology*, 71: 5-16.
- Adriaens, D. & Verraes, W. 2002. An empirical approach to study the relation between ontogeny, size and age using geometric morphometrics. Em: *Topics in Functional and Ecological Vertebrate Morphology*. Aerts, P., D'Août, K., Herrel, A. & Van Damme, R. (eds). pp. 293-324.
- Almeida, F. C., Bonvicino, C. R. & Cordeiro-Estrela, P. 2007. Phylogeny and temporal diversification of the genus *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae): implications for the biogeography of open/dry biomes of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 449-466.
- Altuna, C. A. & Lessa, E. P. 1985. Penial morphology in Uruguayan species of *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 66: 483-488.
- Altuna, C. A. 1991. Microclima de cuevas y comportamientos de homeostasis en una población del grupo *Ctenomys pearsoni* (Rodentia: Octodontidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 2ª época, 6: 35-46.
- Altuna, C. A., Bacigalupe, L. D. & Corte, S. 1998. Food-handling and feces reingestion in *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Ctenomyidae). *Acta Theriologica*, 43(4): 433-437.
- Altuna, C. A. & González, E. M. 2006. Owl predation on the subterranean rodent *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) in Uruguay, with an assessment of relative age classes. *Comunicações Zoológicas do Museu Nacional de História Natural y Antropologia*, 203(XIII): 1-5.
- Alvarez-Castañeda, S. T. & Patton, J. L. 2004. Geographic genetic architecture of pocket gopher (*Thomomys bottae*) populations in Baja California, México. *Molecular Ecology*, 13: 2287-2301.
- Anderson, R. P., Gómez-Laverde, M. & Peterson, A. T. 2002. Geographical distributions of spiny pocket mice in South America: insights from predictive models. *Global Ecology & Biogeography*, 11: 131-141.
- Anderson, R. P. & Martínez-Meyer, E. 2004. Modeling species' geographic distributions for preliminary conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. *Biological Conservation*, 116: 167-179.
- Anderson, S., Yates, T.L. & Cook, J. A. 1987. Notes on Bolivian mammals 4: The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern lowlands. *American Museum Novitates*, 2891: 1-20.

- Apfelbaum, L. I., Massarini, A. I., Daleffe, L. E. & Reig, O. A. 1991. Genetic variability in the subterranean rodents *Ctenomys australis* and *Ctenomys porteousi* (Rodentia: Octodontidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 19:467-476.
- Arbogast, B. S., & Kenagy, G. J. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28: 819-825.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Balbontin, J., Reig, S. & Moreno, S. 1996. Evolutionary relationships in *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) from Argentina, based on penis morphology. *Acta Theriologica*, 41: 237-253.
- Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Barlow, J. C. 1969. Observations on the biology of rodents in Uruguay. *Life science contributions of Royal Ontario Museum*, 75: 1-60.
- Baylac, M., Villemant, C. & Simbolotti, G. 2003. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80: 89-98.
- Baylac, M. & Friess, M. 2005. Fourier descriptors, procrustes superimposition and data dimensionality: an example of cranial shape analysis in modern human populations. Em: *Modern morphometrics in physical anthropology*. Slice, D. E. (ed). Springer-Verlag, New York. pp 145-162.
- Baylac, M. 2006. *Rmorph: a R geometric and multivariate morphometrics library*.
- Begall, S., Daan, S., Burda, H. & Overkamp, G. J .F. 2002. Activity patterns in a subterranean social rodent, *Spalacopus cyanus* (Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 83(1): 153-158.
- Behling, H., Arz, H. W., Pätzold, J. & Wefer, G. 2000. Late Quaternary vegetational and climate dynamics in the northeastern Brazil, inferences from marine core GeoB 3104-1. *Quat. Sci. Rev.*, 19: 981-994.
- Bermingham, E. & Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7: 367-369.
- Bertê, A. M. A. 2004. Problemas ambientais no Rio Grande do Sul: uma tentativa de aproximação. Em: *Rio Grande do Sul: Paisagens e territórios em transformação*. Verdum, R., Basso, L. A. & Suertegaray, D. M. A. (eds). Ed.UFRGS. pp.71-83.

- Bonvicino, C. R. & Moreira, M. A. M. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2): 282-292.
- Bookstein, F. B., Chernoff, R., Elder, J., Humphries, G., Smith, E. & Strauss, R. 1985. *Morphometrics in evolutionary biology*. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Special publication, 15. 277 pp.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge: Cambridge University Press. New York. 435 pp.
- Bookstein, F. L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology*, 58: 313-365.
- Borodin, P. M., Barreiros-Gomez, S. C., Zhelezova, A. I., Bonvicino, C. R. & D'Andrea, P. S. 2006. Reproductive isolation due to the genetic incompatibilities between *Thrichomys pachyurus* and two subspecies of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Genome*, 49: 159-167.
- Bretschneider, D. S. 1987. *Alguns aspectos de biologia e ecologia de Ctenomys flamarioni Travi, 1981 (Rodentia: Ctenomyidae)*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Brown, W. M., George, M. J. R. & Wilson, A. C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1967-1971.
- Brown, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: *Molecular Evolutionary Genetics*. MacIntyre, R. J. (ed). Plenum Press, New York. pp. 95-130.
- Burns, J. C., Choate, J. R. & Zimmerman, E. G. 1985. Systematic relationships of pocket gophers (genus *Geomys*) on the central great plain. *Journal of Mammalogy*, 66:102-118.
- Busch, C., Antinuchi, C. D., dell Valle, J. C., Kittlein, M. J., Malizia, A. I., Vassallo, A. I. & Zenuto, R. R. 2000. Population ecology of subterranean rodents. *En: Life Underground - The Biology of Subterranean Rodents*. Lacey, E. A., Patton J. L. & Cameron, G. N. (eds.). Chicago: The University of Chicago Press. pp. 183-226.
- Castilho, C. S. 2004. *Análise cromossômica e de microssatélite em uma zona de hibridação intra-específica de Ctenomys minutus (Rodentia-Ctenomyidae)*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Castillo, A. H., Cortinas, M. N. & Lessa, E. P. 2005. Rapid diversification of south American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia; Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *Journal of Mammalogy*, 86(1): 170-179.
- Chan, Y. L., Anderson, C. N. K. & Hadly, E. A. 2006. Bayesian estimation of the timing and severity of a population bottleneck from ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 1: 423-426.
- Chatti, N., Said, K., Catalan, J., Britton-Davidian, J. & Auffray, J. C. 1999. Developmental instability in wild chromosomal hybrids of the house mouse. *Evolution*, 53: 1268-1279.
- Chessel, D., Dufour, A. B. & Dray, S. 2007. *Analysis of Ecological Data: Exploratory and Euclidean methods in Environmental sciences*. The ade4 Package. Version 1.4-5.
- Chondropoulos, B. P., Fragedakis-Tsolis, S. E., Markakis, G. & Giagia-Athanaspoulou, E. 1996. Morphometric variability in karyologically polymorphic populations of the wild *Mus musculus domesticus* in Greece. *Acta Theriologica*, 41(4): 375-382.
- Cicchino, A. C., Castro, D. C. & Baldo, J. C. 2000. Elenco de los Phthiraptera (Insecta) hallados en distintas poblaciones locales de *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) de Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia, y Brasil. *Papéis avulsos de Zoologia, São Paulo*, 41(13): 197-211.
- Contreras, L. C. & Scolara, J. A. 1986. Distribucion y relaciones taxonomicas entre los cuatro nucleos geograficos disyuntos de *Ctenomys dorbignyi* en la Provincia de Corrientes, Argentina (Rodentia-Ctenomyidae). *Historia Natural*, 3: 21-30.
- Contreras, J. R. & Bidau, C. J. 1999. Líneas generales del panorama evolutivo de los roedores excavadores sudamericanos del género *Ctenomys* (Mammalia, Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Ciencia Siglo XXI*, 1: 1-22.
- Cook, J. A., Anderson, S. & Yates, A. 1990. Notes on Bolivian mammals 6. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the highlands. *American Museum Novitates*, 2980: 1-27.
- 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.
- Cook, J. A., Lessa, E. P. & Hadley, E. A. 2000. Paleontology, phylogenetic patterns, and macroevolutionary process in subterranean rodents. Em: *Life Underground - The Biology of Subterranean Rodents*. Lacey, E.A., Patton, J. L. & Cameron, G.N. (eds). The University of Chicago Press, Chicago and London. pp. 332-388.

- Cordeiro-Estrela, P., Baylac, M., Denys, C. & Marinho-Filho, J. 2006. Interspecific patterns of skull variation between sympatric Brazilian vesper mice: geometric morphometrics assessment. *Journal of Mammalogy*, 87(6): 1270-1279.
- Corti, M., Ciabatti, C. M. & Capanna, E. 1990. Parapatric hybridization in the chromosomal speciation of the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41: 203-214.
- Corti, M., Fadda, C., Simson, S. & Nevo, E. 1996. Size and shape variation in the mandible of the fossorial rodent *Spalax ehrenbergi*: a procrustes analysis of three dimensions. Em: *Advances in morphometrics*. Marcus, L. F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. J. P. & Slice, D. E. (eds). New York, London: NATO ASI Sciences, Life Sciences, 303-320.
- Corti, M. & Rohlf, F. J. 2001. Chromosomal speciation and phenotypic evolution in the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society*, 73: 99-112.
- Coyne, J. A. & Orr, H. A. 1998. The evolutionary genetics of speciation. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, 353: 287-305.
- Cubo, J., Ventura, J. & Casinos, A. 2006. A heterochronic interpretation of the origin of digging adaptations in the northern water vole, *Arvicola terrestris* (Rodentia: Arvicolidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 87: 381-391.
- Cutrera, A. P., Lacey, E. A. & Busch, C. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology*, 14: 2511-2523.
- Cutrera, A. P. & Lacey, E. A. 2006. Major histocompatibility complex variation in talar tuco-tucos: the influence of demography on selection. *Journal of Mammalogy*, 87: 706-716.
- Cutrera, A. P., Lacey, E. A. & Busch, C. 2006. Intraspecific variation in effective population size in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*): the role of demography. *Journal of Mammalogy*, 87: 108-116
- D'Elia, G., Lessa, E. P. & Cook, J. A. 1998. Geographic structure, gene flow, and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia, Octodontidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 63:285-296.
- D'Elia, G., Lessa, E. P. & Cook, J. A. 1999. Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae): Evaluation of the mendocinus species group and the evolution of asymmetric sperm. *Journal of Mammalian Evolution*, 6: 19-38.
- D'Anatro, A. & Lessa, E. P. 2006. Geometric morphometric analysis of geographic variation in the Rio Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Ctenomyidae). *Mammalian Biology*, 71(5): 288-298.

- Dobigny, G., Baylac, M. & Denys, C. 2002. Geometric morphometrics, neural networks and diagnosis of sibling *Taterillus* species (Rodentia, Gerbillinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 77: 319-327.
- dos Reis, S. F. 1990. Mammalian cranial morphometrics: a comparative study of traditional and truss networks. *Zoologischer Anzeiger*, 224(3/4): 225-235.
- dos Reis, S. F., Duarte, L.C., Monteiro, L.R. & Von Zuben, F. J. 2002. Geographic variation in cranial morphology in *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae). Geometric descriptors and patterns of variation in shape. *Journal of Mammalogy*, 83(2): 333-344.
- Dryden, I. L. & Mardia, K.V. 1998. *Statistical shape analysis*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 347 pp.
- Eisenberg, J. F. 1981. *Mammalian Radiations*. Chicago. University Chicago Press. 610 pp.
- El Jundi, T. A. R. J. 2003. *Estudo da variabilidade cromossômica em Ctenomys lami (Rodentia-Ocotodontidae) ao longo de sua distribuição geográfica através de marcadores moleculares*. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- El Jundi, T. A. R. J. & Freitas, T. R. O. 2004. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae). *Hereditas*, 140: 18-23.
- Endler, J. A. 1977. *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton University Press, Princeton. 246 pp.
- Excoffier, L. G. 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. G. L. & Schneider, S. 2005. ARLEQUIN version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Feito, R. & Gallardo, M. 1982. Sperm morphology of the Chilean species of *Ctenomys* (Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 63: 658-661.
- Fernandes, F. A., Gonçalves, G. L. & Freitas, T. R. O. 2005. Ampliação da distribuição geográfica do tuco-tuco *Ctenomys torquatus* (Rodentia-Ctenomyidae) no Rio Grande do Sul. *Livro de Resumos do III Congresso Brasileiro de Mastozoologia*, Vitória, Espírito Santo.
- Fernandes, F. A., Fernández-Stolz, G. P., Lopes, C. M. & Freitas, T. R. O. 2007. The conservation status of the tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 4(sup): 839-847.

- Fernandes, F. A., Fornel, R., Cordeiro-Estrela, P., & Freitas, T. R. O. *no prelo*. Intra and interspecific skull variation in two sister species of the subterranean rodent genus *Ctenomys* (Rodentia-ctenomyidae): coupling geometric morphometrics and chromosomal polymorphism. *Zoological Journal of the Linnean Society*.
- 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*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 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*. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Fernández-Stolz, G. P., Stolz, J. F. B. & Freitas, T. R. O. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco-das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in south Brazil. *Journal of Mammalogy*, 88(4): 935-945.
- Fonseca, M. B. 2003. *Biologia populacional e classificação etária do roedor subterrâneo tuco-tuco, Ctenomys minutus Nhering 1887 (Rodentia-Ctenomyidae) na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Fontana, C. S., Bencke, G. A. & Reis, R. E., 2003. *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, EDIPUCRS. 632 pp.
- Ford, C. E. & Hamerton, J.L. 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain. Technol.*, 31: 247-251.
- Fornel, R. 2005. *Estudo da morfometria geométrica craniana entre quatro blocos populacionais de Ctenomys lami (Rodentia-Ctenomyidae)*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Fornel, R. & Freitas, T. R. O. 2005 Descrição osteológica do sincrânio de *Ctenomys lami* (Rodentia: Ctenomyidae) comparada a outras três espécies de *Ctenomys* do Rio Grande do Sul. *Livro de Resumos do III Congresso Brasileiro de Mastozoologia*, Vitória, Espírito Santo.

- Freitas, T. R. O. & Lessa, E. P. 1984. Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia - Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 65: 637-642.
- Freitas, T. R. O. 1990. *Estudos citogenéticos e craniométricos em três espécies do gênero Ctenomys*. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Freitas, T.R.O. 1994. Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia - Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 67: 193-198.
- Freitas, T. R. O. 1995a. Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna & Environment*, 30: 53-59.
- Freitas, T. R. O. 1995b. Geographical distribution of patterns of sperm forms in the genus *Ctenomys* (Rodentia - Octodontidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 18: 43-46.
- Freitas, T. R. O. 1997. Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae). *Revista Brasileira de Genética*, 20: 1-7.
- Freitas, T. R. O. 2001. Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in southern Brazil: *Ctenomys lami* Spec. Nov. separated from *C. minutus* Nehring, 1887. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36:1-8.
- 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). Em: *Mammalian Diversification: from chromosomes to phylogeography*. Lacey, E. & Myers, P. (eds.). Berkeley: University of California Publications in Zoology. pp. 131-154.
- Freitas, T. R. O. 2006. Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the South of Brazil. *Genetica*, 126(1): 227-235.
- Freitas, T. R. O. 2007. *Ctenomys lami*: The highest chromosome variability in *Ctenomys* due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system (Rodentia-Ctenomyidae). *Acta Theriologica*, 52: 171-180.
- Freygang, C. C., Marinho, J. R. & Freitas, T. R. O. 2004. New karyotypes and some considerations about the chromosomal diversification 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

- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd edition. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 763 pg.
- Gallardo, M. 1991. Karyotypic evolution in *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 1: 11-22.
- Gallardo, M. H. & Anrique, J. A. 1991. Population parameters and burrow systems in *Ctenomys maulinus brunneus* (Rodentia: Ctenomyidae). *Medio Ambiente*, 11(2): 48-53.
- Gallardo, M. H. & Köhler, N. 1992. Genetic divergence in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from the Andes of Chile. *Journal of Mammalogy*, 73: 99-105.
- Gallardo, M. H. & Palma, R. E. 1992. Intra- and interspecific genetic variability in *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Biochem Syst Ecol*, 20: 523-534
- Gallardo, M. H. & Köhler, N. 1994. Demographic changes and genetic losses in populations of a subterranean rodent (*Ctenomysmaulinus brunneus*) affected by a natural catastrophe. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 59:358-365.
- Gallardo, M. H., Köhler, N. & Araneda, C. 1995. Bottleneck effects in local populations of fossorial *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) affected by vulcanism. *Heredity*, 74: 638-646
- Garcia, L., Ponsa, M. M., Egozcue, J. & Garcia, M. 2000a. Cytogenetic variation in *Ctenomys perrensi* (Rodentia, Octodontidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 71: 615-624.
- Garcia, L., Ponsa, M. M., Egozcue, J. & Garcia, M. 2000b. Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 69: 103-120.
- Gardner, S. L. 1991. Phyletic coevolution between subterranean rodents of the genus *Ctenomys* and *Paraspidodera*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 102: 169-201.
- Gascon, C., Malcolm, J. R., Patton, J. L., Silva, M. N. F., Bogart, J. P., Loughheed, S. C., Peres, C. A., Neckel, S. & Boag P. T. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25): 13672-13677.
- Gastal, M. L. A. 1994. Density, sexual rate and biometrics data from one population of *C. minutus* Nehring, 1887 (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Iheringia*, 77: 25-34.
- Gava, A. & Freitas, T. R. O. 2002. Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, 83: 843-851.

- Gava, A. & Freitas, T. R. O. 2003. Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (*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). *Journal of Mammalogy*, 85: 1201-1206.
- Giménez, M. D., Contreras, J. R. & Bidau, C. J. 1997. Chromosomal variation in *Ctenomys pilarensis* a recently described species from eastern Paraguay (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammalia*, 61: 385-398.
- Giménez, M. D., Mirol, P., Bidau, C. J. & Searle, J. B. 2002. Molecular analysis of populations of *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with high karyotypic variability. *Cytogenetics and Genome Research*, 96: 130-136.
- Gonçalves, G. L. 2007. *Diferenciação genética e geográfica intra-específica em Ctenomys Blainville, 1826 (Mammalia: Rodentia) nos Campos Sulinos*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Hadly, E. A., Van Tuinen, M., Chan, Y. L. & Heiman, K. 2003. Ancient DNA evidence of prolonged population persistence with negligible genetic diversity in an endemic tuco-tuco (*Ctenomys sociabilis*). *Journal of Mammalogy*, 84: 403-417.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3rd edition. Ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland. 682 pg.
- Hanken, J. & Thorogood, P. 1993. Evolution and development of the vertebrate skull—the role of pattern formation. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 9-15.
- Heuser, V. D. 2001. *Avaliação da genotoxicidade induzida por emissões de veículos automotores - Ctenomys minutus como organismo bioindicador*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
- Heuser, V. D., Silva, J., Dias, J. F., Yoneama, M. L. & Freitas, T. R. O. 2002. Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, USA, 40(4): 227-235.
- Hewitt, G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography — or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.
- Hewitt, G. M. 2004. The structure of biodiversity - insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, 1-4: 1-16.

- Honeycutt, R. L., Allard, M. W., Edwards, S. V., Schlitter, D. A. 1991. Systematics and evolution of the Bathyergidae. *En: The biology of the naked mole-rat*. Sherman, P. W., Jarvis, J. U. M. & Alexander, R. D. (eds). Princeton Univ Press, Princeton, NJ, pp 45-65.
- Honeycutt, R. L., Rowe, D. L. & Gallardo, M. H. 2003. Molecular systematics of the South American caviomorph rodents: relationships among species and genera in the family Octodontidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 476-489
- Hood, C. S. 2000. Geometric morphometric approaches to the study of sexual size dimorphism in mammals. *Hystrix*, 11(1): 77-90.
- Howell, W. M. & Black, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Huchon, D. & Douzery, E. 2001. From the old world to the new world: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of Hystricognath rodents. *Molecular and Phylogenetics Evolution*, 20: 235-251.
- 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.
- Hutchison, D.W. & Templeton, A.R. 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.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2007. www.ibama.gov.br. (acessado em 24 de maio de 2007).
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. & Wilson, C. A. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
- Iwasa, M. A., Kartavtseva, I. V., Dobrotvorsky, A. K., Panov, V.V. & Suzuki, H. 2002. Local differentiation of *Clethrionomys rutilus* in northeastern Asia inferred from mitochondrial gene sequences. *Mammalian Biology*, 67: 157-166.
- Kiblicky, P., Brum-Zorrilla, N., Perez, G. & Saez, F. A. 1977. Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). *Mendeliana*, 2: 85-93.
- King, M. 1993. *Species evolution*. Cambridge, University Press. 336 pp.

- Kingsolver, J. G., Pfennig, D. W. & Servedio, M. R. 2002. Migration, local adaptation and the evolution of plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(12): 540-541.
- Kittlein, M. J., Vassallo, A. I. & Busch, C. 2001. Differential predation upon sex and age classes of tuco-tucos (*Ctenomys talarum*, Rodentia: Octodontidae) by owls. *Mammalian Biology*, 66: 281-289.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 6196-6200.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics*, 5: 150-163
- Lacey, E. A., Patton, J. L. & Cameron, G.N. 2000. *Life underground: the biology of subterranean rodents*. Chicago: University of Chicago Press. 449 pg.
- Lacey, E. A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity*, 86: 628-637.
- Lacey, E. A. & Cutrera, A. P. 2007. Behavior, Demography, and immunogenetic variation: new insights from subterranean rodents. Em: *Subterranean Rodents: news from underground*. Begall, S., Burda, H. & Schleich, C.E. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.341-355.
- Lande, R. 1979. Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. *Evolution*, 33: 234-251.
- Lande, R. 1984. The expected fixation rate of chromosomal inversions. *Evolution*, 38: 743-752.
- Langguth, A. & Abella, A. 1970a. Las especies uruguayas del género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 10: 1-20.
- Langguth, A. & Abella, A. 1970b. Sobre una población de tuco-tucos melánicos (Rodentia-Octodontidae). *Act. Zool. Lill.*, 28: 101-108
- Lauria de Cidre, M. S. 1974. Estudio histológico del riñon de *Ctenomys talarum* (Rodentia-Ctenomyidae). *Physis (C)* 33: 157-162.
- Lessa, E. P. & Langguth, A. 1983. *Ctenomys pearsoni*, n. sp. (Rodentia: Octodontidae), del Uruguay. *Resúm. Comunic. Jornadas de Ciencias Naturales del Uruguay*, 3: 86-88.
- Lessa, E. P. & Cook, J. A. 1989. Interspecific variation in penial characters in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 70(4): 856-860.

- Lessa, E. P. & Thaeler, C. S. 1989. A reassessment of morphological specializations for digging in pocket gophers. *Journal of Mammalogy*, 70: 689-700.
- Lessa, E. P. 1990. Morphological evolution of subterranean mammals: integrating structural, functional, and ecological perspectives. Em: *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. Nevo, E. & Reig, O. A. (eds.). Wiley-Lyss, New York. pp. 211-238.
- Lessa, E. P. & Cook, J. A. 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidea) suggests an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9: 88-99.
- Lessa, E. P. 2000. The evolution of subterranean rodents: Genetic structure of subterranean rodents. Em: *Life Underground - The Biology of Subterranean Rodents*. Lacey, E. A., Patton, J. L. & Cameron, G. N. (eds). The University of Chicago Press, Chicago and London. pp. 389-420.
- Li, W. H. & Graur, D. 2000. *Fundamentals of molecular evolution*. 2^o ed. Sinauer Associates Press. Sunderland, Massachusetts. 481 pp.
- Lichtenstein, H. 1830 (1827-31). Darstellung neuer order wenig bekannter. *Saugethiere in Abbildung und Beschreibungen*, Luderitz edit, Berlin.
- Linardi, P. M., Cardoso, V. A., Botelho, J., Lareschi, M. & Freitas, T. R. O. 2005. *Polygenis* (*Polygenis*) *platensis* (Jordan & Rothschild) (Siphonaptera:Rhopalopsyllidae, Rhopalopsyllinae), a new record in Brazil. *Neotropical Entomology*, 34 (5): 837-841.
- Lizarralde, M., Deferrari, G., Alvarez, S. & Escobar, J. 2001. Evolutionary differentiation in *Ctenomys magellanicus*: allozymic, morphological variation and biogeographic considerations of 2 chromosomal forms. *Interciencia*, 26: 13-17.
- Lizarralde, M., Bolzan, A. & Bianchi, M. 2003. Karyotype evolution in South American subterranean rodents *Ctenomys magellanicus* (Rodentia: Octodontidae): chromosome rearrangements and (TTAGGG)_n telomeric sequence localization in 2n=34 and 2n=36 chromosomal forms. *Hereditas*, 139: 13 - 17.
- Luna, F., Antinuchi, C. D. & Busch, C. 2000. Ritmos de actividad y uso de la cueva en condiciones seminaturales en *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 73(1): 39-47.
- Lopes, C. M. 2007. *Filogeografia de Ctenomys minutus*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Malizia, A. I., Vassallo, A. I. & Busch, C. 1991. Population and habitat characteristics of two sympatric species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Acta Theriologica*, 36(1-2): 87-94.
- Malizia, A. I. & Busch, C. 1997. Breeding biology of the fossorial *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Zoology, London*, 242: 463-471.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Marinho, J. R. & Freitas, T. R. O. 2000. Intraspecific craniometric variation in a chromosome hybrid zone of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 65: 226-231.
- Marinho, J. R. & Freitas, T. R. O. 2006. Population structure of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Ctenomyidae) on the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Theriologica*, 51(1): 53-59.
- Márquez, E. J., Aguilera, M. & Corti, M. 2000. Morphometric and chromosomal variation in populations of *Oryzomys albigularis* (Muridae: Sigmodontinae) from Venezuela: multivariate aspects. *Z. Säugetierkunde*, 65: 84-99.
- 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. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70: 361-376.
- Massarini, A. I., Barros, M. A., Ortells, M. O. & Reig, O. A. 1991. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica*, 83: 131-144.
- Massarini, A. I., Dyzenchouz, F. J. & Tiranti, S. I. 1998. Geographic variation of chromosomal polymorphism in nine population of *Ctenomys azarae*, tuco-tucos of the *Ctenomys mendocinus* (Rodentia-Octodontidae). *Hereditas*, 128: 207-211.
- Massarini, A. I., Mizrahi, D., Tiranti, S., Luna, F. & Schleich, C. E. 2002. Extensive chromosomal variation in *Ctenomys talarum* talarum from the Atlantic coast of Buenos Aires province, Argentina (Rodentia Octodontidae). *Journal of Neotropical Mammalogy*, 9: 199-207.
- Massarini, A. I. & Freitas, T. R. O. 2005. Morphological and cytogenetics comparison in species of the mendocinus-group (genus *Ctenomys*) with emphasis in *C. australis* and *C. flamarioni* (Rodentia-Ctenomyidae). *Caryologia*, 58(1): 21-27.
- Massoia, E. 1970. Mamíferos que contribuyen a deteriorar suelos y pasturas em la República Argetina. *IDIA, INTA*: 14-17.

- Matte, E. M. 2006. *Análise de parentesco em três sub-populações de Ctenomys lami (Rodentia-Ctenomyidae) através de microssatélites*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Medrano, J. F., Aesen, E. & Sharrow, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8: 43.
- Miller, M. P. 2005. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, 96: 722-724.
- Ministério do Meio Ambiente, Brasil. 2000. *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos*. Conservation International do Brasil, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SEMAD/Instituto Estadual de Florestas-MG. Brasília: MMA/SBF, 40 pp.
- Miranda Ribeiro, A. 1914. *História Natural. Zoologia*. Comissão de Linhas telegraphicas estratégicas de Matto-Grosso ao Amazonas.
- Monteiro, L. R., Bordin, B. & dos Reis, S. R. 2000. Shape distances, shape spaces and the comparison of morphometric methods. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(6): 217-220.
- Monteiro, L. R., Duarte, L. C. & dos Reis, S. R. 2003. Environmental correlates of geographical variation in skull and mandible shape of the punaré rat *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae). *Journal of Zoology, London*, 261: 47-57.
- Moojen, J. 1952. *Os roedores do Brasil*. Ministério da Educação e Saúde. Instituto Nacional do livro, Rio de Janeiro. 214 pp.
- Mora, M., Olivares, A. I. & Vassallo, A. I. 2003. Size, shape and structural versatility of the skull of the subterranean rodent *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha): functional and morphological analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 78: 85-96.
- Mora, M., 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. *Journal of Mammalogy*, 87:1192-1203.
- Mora, M., Lessa, E. P. Cutrera, A. P., Kittlein, M. J. & Vassallo, A. I. 2007. Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Molecular Ecology*, 16: 3453-3465.

- Moreira, D. M., Franco, M. H. L. P., Freitas, T. R. O. & Weimer, T. A. 1991. Biochemical polymorphisms and phenetic relationships in rodents of the genus *Ctenomys* from southern Brazil. *Bioch. Genetics*, 29: 601-615.
- Nachman, M. W., Brown, W. M., Stoneking, M. & Aquadro, C. F. 1996. Nonneutral Mitochondrial DNA Variation in Humans and Chimpanzees. *Genetics*, 142: 953-9153.
- Nachman, M. W. 1998. Deleterious mutations in animal mitochondrial DNA. *Genetica*, 102/103: 61-69.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford Univ. Press. 333 pp.
- Neigel, J. E., Ball, Jr., R. & Avise, J. C. 1991. Estimation of single generation migration distances from geographic variation in animal mitochondrial DNA. *Evolution*, 45(2): 423-432.
- Nevo, E. 1979. Adaptative convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 10: 269-308.
- Nevo, E. 1991. Evolutionary theory and process of active speciation and adaptative radiation in Subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies, in Israel. *Evolutionary Biology*, 25: 1-125.
- Nevo, E., Filippucci, M. G., Redi, C., Korol, A. & Beiles, A. 1994. Chromosomal speciation and adaptive radiation of mole rats in Asia Minor correlated with increased ecological stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 8160-8164.
- Nevo, E. 1999. *Mosaic evolution of subterranean mammals: regression, progression and global convergence*. Oxford Univ Press, Oxford. 413 pp.
- Nicola, P. A., Monteiro, L. R., Pessoa, L. M., Von Zuben, F. J., Rohlf, F. J. & dos Reis, S. F. 2003. Congruence of hierarchical localized variation, in cranial shape and molecular phylogenetic structure in spiny rats, genus *Trinomys* (Rodentia: Echimyidae). *Biological Journal of the Linnean Society, London*, 80: 385-396.
- Novello, A. & Lessa, E. P. 1986. G-Band homology in two karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia: Octodontidae) of Neotropical fossorial rodents. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 51: 378-380.
- Novello, A., Lessa, E. P., Sambarino, C. & Monzón, S. 1990. Chromosomal variation in two populations of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) from Uruguay. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 55:43-48.
- Novello, A., Cortinas, M. N., Suarez, M. & Musto, H. 1996. Cytogenetic and molecular analysis of the satellite DNA of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) from Uruguay. *Chromosome Research*, 4: 335-39.

- Novello, A. & Altuna, C. A. 2002. Cytogenetics and distribution of two new karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia, Octodontidae) from southern Uruguay. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 67: 188-192.
- Novelo, A. & Villar, S. 2006. Chromosome plasticity in *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae): chromosome 1 evolution and heterochromatin variation. *Genetica*, 127: 303-309.
- Oliveira, J. A. & Bonvicino, C. R. 2006. Ordem Rodentia. En: *Mamíferos do Brasil*. Reis, N., Peracchi, A. L., Pedro, W. A. & Lima, I. P. (eds). 347-399 pp.
- Ortells, M. O. 1990. *Biología evolutiva en el género Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Ortells, M. O., Contreras, J. R. & Reig, O. A. 1990. New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia, Octodontidae) from northeastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. *Genetica*, 82: 189-191.
- Ortells, M. O. & Barrantes, G. E. 1994. A study of genetics distances and variability in several species of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) with special reference to probable causal role of chromosome in speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 53: 189-208.
- 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. *Biological Journal of the Linnean Society*, 54: 43-70.
- Paradis, E., Strimmer, K., Claude, J., Jobb, G., Open-Rhein, R., Dultheil, J. & Bolker, N. B. 2006. *APE: Analyses of phylogenetic and Evolution*. R package version 1.8-2.
- Pathak, S. & Wurster-Hill, D. H. 1977. Distribution of constitutive heterochromatin in carnivores. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 18: 245-254.
- Patton, J. L. & Sherwood, S. W. 1982. Genomic evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*). Heterochromatin variation and speciation potencial. *Chromosoma*, 85: 149-162.
- Patton, J. L. & Sherwood, S. W. 1983. Chromosome evolution and speciation in rodents. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14: 139-158.
- Patton, J. L. 1990. Geomyid evolution: the historical, selective, and random basis for divergence patterns within and among species. En: *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. Nevo, E. & Reig, O. A. (eds). Wiley-Liss, New York. pp 49-69.
- Patton, J. L. & Smith, M. F. 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, O. 1959. Buiology of the subterranean rodents, *Ctenomys*, in Peru. *Memorians del Museum de História Natural "Javier Prado"*, 9: 1-56.
- Pearson, O., Binsztein, N., Boiry, L., Busch, C., Di Pace, M., Gallopin, G., Penchaszadeh, P. & Piantanida, M. J. 1968. Estructura social, distribución espacial y composición por edades de una población de tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *Investigaciones Zoológicas Chilenas*: 47-79.
- Pearson, O. & Christie, M.I. 1985. Los tuco-tucos (gênero *Ctenomys*) de los Parques Nacionales Laní y Nahuel Huapi, Argentina. *Historia Natural*, 5: 337-343.
- Pimentel, R. A. 1979. *Morphometrics - The multivariate analysis of biological data*. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iawo. 276 pp.
- Polly, P. D. 2006. Phylogeographic differentiation in *Sorex araneus*: morphology in relation to geography and karyotype. *Russian Journal of Theriology*.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Pough, F. H., Heiser, J. B. & MacFarland, W. N. 2003. *A vida dos vertebrados*. Editora Atheneu São Paulo, São Paulo. 834 pg.
- Radam Brasil, 1985. *Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra*. CD-ROM.
- Rambo, B. 2000. *A fisionomia do Rio Grande do Sul: ensaio de monografia natural*. São Leopoldo: Ed. Unisinos. 472 pp.
- Reig, O. A., J. R. Contreras & Piantanida, M. J. 1966. Contribución a la elucidación de la sistemática de las entidades del gênero *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Contribuciones Cient. Fac. C. Exatas y Nat. Univ. de Buenos Aires (Zool.)*, 6: 297-352.
- Reig, O. A. & Kiblicky, P. 1969. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Chromosoma*, 28: 211-244.
- Reig, O. A., Busch, C., Ortells, M. O. & Contreras, J. R. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. *En: Evolutions of the subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. Nevo, E. & Reig, O. A. (eds.). Alan R. Liss Inc., New York. pp. 71-96.
- Reig, O. A., Massarini, A. I., Ortells, M. O., Barros, M. A., Tiranti, S. I. & Dyzenchouz, F. J. 1992. New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia*, 56: 603-623.

- Rieseberg, L. H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(7): 351-358.
- Rogers, A. R. & Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular and Biology Evolution*, 9: 552-569.
- Rohlf, F. J. & Marcus, L. F. 1993. The revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*, 8(4): 129-132.
- Rohlf, F. J. 1996. Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. In: *Advances in morphometrics*. Marcus, L. F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. J. P. & Slice, D. E. (eds.). NATO ASI Ser., 284:117-129.
- Rohlf, F. J. 2000. On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix*, 11: 8-24.
- Rohlf, F. J. 2004. *TpsUtil, ver. 1.26 software; TpsDig, ver. 1.40 software and TpsREGR, ver. 1.29*, F. James Rohlf. Dept. Ecology and Evolution, State University of New York Stony Brook.
- Rosi, M. I., Cona, M. I. & Roig, V. G. 2002. Current knowledge of the fossorial rodent *Ctenomys mendocinus* Philippi, 1869 (Rodentia: Ctenomyidae). *Mastozoologia Neotropical*, 9(2): 277-296.
- 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.
- Ruedas, L. A., Cook, J. A. & Yates, J. W. 1992. Comparative genome size and rapid chromosomal evolution in the South American tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Genome*, 36: 449-458.
- Said, K., Auffray, J. C., Boursot, P. & Britton-Davidian, J. 1999. Is chromosomal speciation occurring in house mice in Tunisia? *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 387-399.
- Sage, R. D., Contreras, J. R., Roig, V. G. & Patton, J. L. 1986. Genetic variation in the South American burrowing rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Z. Säugetierk*, 51: 158-172.
- Schubert, I. 2007. Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 109-115.
- Searle, J. B. & Thorpe, R. S. 1987. Morphometric variation of the common shrew (*Sorex araneus*) in Britain, in relation to karyotype and geography. *Journal of Zoology, London*, 212: 373-377.
- Silva, J. 1999. *Avaliação múltipla da genotoxicidade ambiental em roedores nativos oriundos de regiões mineradoras de carvão*. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Silva, J., Freitas, T. R. O., Heuser, V., Marinho, J. R. & Erdtmann, B. 2000a. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 270-278.

- Silva, J., Freitas, T. R. O., Heuser, V., Marinho, J. R., Bittencourt, F., Cerski, C. T. S., Kliemann, L. M. & Erdtmann, B. 2000b. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods. *Mutation Research*, 470: 39-51.
- Slamovits, C. H., Cook, J. A., Lessa, E. P. & Rossi, M.S. 2001. Recurrent amplification and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): A phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1708-1719.
- Slatkin, M. & Hudson, R. R. 1991. Pairwise comparisons of Mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129(2): 555-562.
- Smith, M. F. & Patton, J. L. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50: 149-177.
- Smith, M. F. 1998. Phylogenetic relationships and geographic structure in pocket gophers in the genus *Thomomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9: 1-14
- Speranza, P. R., Seijo, J. G., Grela, I. A. & Solís Neffa, V. G. 2007. Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *Journal of Biogeography*, 34: 427-436.
- Souza, C. R. G., Suguio, K., Oliveira, A. M. S. & Oliveira, P. E. (Orgs.). 2005. *Quaternário do Brasil*. Holos Editora; ABEQUA, Ribeirão Preto, São Paulo. 382 pp.
- Stein, B. R. 2000. Morphology of subterranean rodents. Em: *Life underground: The biology of subterranean rodents*. Lacey, E. A., Patton J. L., & Cameron, G. N. (eds.), The University of Chicago Press, Chicago. pp. 19-61.
- Steinberg, E. K. & Patton, J. M. 2000. Genetic structure of subterranean rodents. Em: *Life Underground - The Biology of Subterranean Rodents*. Lacey, E.A., Patton, J.L. & Cameron, G.N. (eds). The University of Chicago Press, Chicago and London. pp. 301-331.
- Stolz, J. F. B. 2006. *Dinâmica populacional do tuco-tuco das dunas (*Ctenomys flamarioni*: Rodentia: Ctenomyidae) na Estação Ecológica do Taim, RS, Brasil*. Dissertação de Mestrado Programa de Pós Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Sumner, A. T. 1971. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.

- Swofford, D. L. 2002. *Paup*^{*}: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4.0b10. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swtderskt D., L., Zelditch, M. L. & Fink, W. L. 2000. Phylogenetic analysis of skull shape evolution in marmotine squirrels using landmarks and thin-plate spline. *Hystrix*, 11(1): 49-75.
- Tálíce, R. V., Caprio, R. & Momigliano, E. 1954. Distribución geográfica y habitat de *Ctenomys torquatus*. *Archivos de la Sociedad de Biología del Uruguay, Montevideo*, 21: 133-139.
- Tálíce, R. V., Momigliano, E., Mosera, S. L. & Lagomarsino, J. C. 1959. Investigaciones sobre *Ctenomys torquatus*, un roedor autóctono del Uruguay. *Anales de la Facultad de Medicina, Montevideo*, 44: 452-462.
- Tálíce, R. V. & Mosera, S. L. 1958. Parto, comportamiento maternal y comportamiento filial en *Ctenomys torquatus* (tuco-tuco). *Rubro Investigaciones Originales de la Facultad de Humanidades y Ciências*, 5-11.
- Tálíce, R. V., Mosera, S. L. & Sperchmann, A. M. S. 1973. Problemas de captura e sobrevivida en cautividad en *Ctenomys torquatus*. *Revista de Biología del Uruguay*, 1(2): 121-128.
- Tálíce, R. V., Mosera, S. L. & Sperchmann, A. M. S. 1974. Comportamento ludico en *Ctenomys torquatus*. *Revista de Biología del Uruguay*, 2(2): 81-88.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tchaicka, L. 2002. *Análise de duas possíveis barreiras ao fluxo gênico entre populações de Ctenomys minutus (Rodentia - Ctenomyidae) da Planície Costeira do Sul do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Thanou, E., Fraguadakis-Tsolis, S. & Chondropoulos, B. 2005. mtDNA variation and evaluation of phylogenetic relationships among karyotypically polymorphic populations of *Microtus* (Terricola) *thomasi* (Arvicolidae, Rodentia) from Greece. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84: 55-68.
- Tomasco, I. H. & Lessa, E. P. 2007. Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. Em: *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*. Kelt, D. A., Lessa, E. P., Salazar-Bravo, J. & Patton. J. L. (eds). University of California Publications in Zoology, Berkeley.
- Tomazelli, L. J., Dillenburg, S. R. & Villwock, J. A. 2000. Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul Coastal Plain, southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências*, 30: 474-476.

- Travi V. H. 1983. *Etologia de Ctenomys torquatus Lichtenstein, 1830 (Rodentia-Ctenomyidae) no Taim, Rio Grande do Sul, Brasil*. Mestrado em Ecologia. Programa de Pós Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Vassallo, A. I. 1998. Functional morphology, comparative behaviour, and adaptation in two sympatric subterranean rodents genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae). *Journal of Zoology, London*, 244: 415-427.
- Vassallo, A. I. 2000. Alometría e isometría en varias especies de roedores caviomorfos, con comentarios sobre la estructura del aparato masticatorio del orden rodentia. *Mastozoologia Neotropical*, 7(1): 37-46.
- Venables, W. N. & Ripley, B. D. 2002. *MASS: Modern applied statistics with S*. 4^{ed}. Springer, New York.
- Verzi, D. H. 2002. Patrones de evolución morfológica en *Ctenomyinae* (Rodentia, Octodontidae). *Mastozoología Neotropical*, 9(2): 309-328.
- Verzi, D. H. & Olivares, A. I. 2006. Craniomandibular joint in South American burrowing rodents (Ctenomyidae): adaptations and constraints related to a specialized mandibular position in digging. *Journal of Zoology*, 270: 488-501.
- Vidal-Rioja, L. 1985. Chromosome polymorphisms in *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae). *Caryologia*, 38: 169-178.
- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T. D. & Wilson, A. C. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9350-9354.
- Villar, S., Martínez-López, W., Folle, G. & Novello, A. 2005. Cytogenetic analysis of different *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) species from Uruguay using G-banding. *Mammalian Biology*, 70(4): 255-260.
- Vitullo, A. D., Roldan, E. R. S. & Merani, M. S. 1988. On the morphology of spermatozoa of tuco-tucos, *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae): new data and its implications for the evolution of the genus. *Journal of Zoology, London*, 215: 675-683.
- Voss, R. S., Marcus, L. F. & Escalante, P. 1990. Morphological evolution in muroid rodent. I. Conservative patterns of craniometric covariance and their ontogenetic basis in the neotropical genus *Zygodontomys*. *Evolution*, 44: 1568-1587.
- Vucetich, M. G., Verzi, D. H. & Hartenberger, J. L. 1999. Review and analysis of the radiation of the South American Hystricognathi (Mammalia, Rodentia). *Académie des Sciences*, 329: 763-769.

- Webb, J. B. 1977. A history of savanna vertebrate in the New World. Part I. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 8: 355-380.
- Wheeler, Q. D., Raven, P. H. & Wilson, E. O. 2004. Taxonomy: impediment or expedient? *Science*, 303 (5656): 285.
- White, M. J. D. 1978. *Modes of speciation*. W. H. Freeman & Company, San Francisco. 455 pp.
- Wilson, D. E., & Reeder, D. M. (eds). 2005. *Mammal Species of the World*. Johns Hopkins University Press. 2142 pg.
- Wlasiuk, G., Garza, J. 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.
- Zenuto, R. & Busch, C. 1998. Population biology of the rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a coastal dunefield in Argentina. *International Journal of Mammalian Biology*, 63: 357-367.