



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**



Luiza Flores Gasparetto

**Influência de fatores históricos na ecologia de *Ctenomys flamarioni*:  
como a paleoestabilidade climática afeta a história evolutiva da espécie**

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Busnello Kubiak

Porto Alegre

2018

**Influência de fatores históricos na ecologia de *Ctenomys flamarioni*:  
como a paleoestabilidade climática afeta a história evolutiva da espécie**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia da  
UFRGS como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Busnello Kubiak

Comissão examinadora:

Profa. Dra. Gislene Gonçalves (UFRGS)

Prof. Dr. Leandro da Silva Duarte (UFRGS)

Prof. Dr. Rodrigo Fornel (URI)

Porto Alegre

2018

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

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

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Aos meus pais, Neiva e Angelo,  
pelo apoio sempre.

## AGRADECIMENTOS

Passados dois anos, cá estou, a um passo de me tornar Mestre em Ecologia. Foi uma jornada de muito aprendizado, de muito auto-conhecimento e de muita resistência.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Thales, o chefe, tucólogo, Mestre Jedi, por ter aberto as portas do Lab para mim, pelos ensinamentos, pela confiança, pela amizade e parceria, pelas aventuras em campo e, finalmente, por te me apresentado ao fantástico mundo dos tuco-tucos.

Ao meu coorientador, Bruno, o chefinho, por toda a dedicação, pelo apoio, pela parceria e amizade, e, principalmente, pelos ensinamentos sobre técnicas de desatolamento de veículos em diferentes ambientes (e.g. dunas costeiras, valetas inundadas, etc)

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Evolução, meu querido ‘Lab Tucão’, pelos mates, pelas conversas, pela ajuda sempre, pela amizade.

Às gurias do Lab, Bruna, Thamara, May, Sandrão, Keila, e aos guris, Marcelo, Rafa e William, pelo carinho, pelos sorrisos e abraços tão necessários.

À Lucinha, Luciano e Paula, pela ajuda sempre.

Aos amigos das antigas, Jôsi, Fabi e Gui, que mesmo distantes carregou no coração.

Aos amigos da Bio UFSM, que iniciaram a vida acadêmica comigo e, se tornaram tão especiais que vou levar para vida toda. Livia, Alana, Cami, Marcos e Ana, obrigada pela nossa amizade!

Aos colegas e professores do PPG Ecologia.

Aos amigos da ‘Trip Lagoinha’, Pedro, Karolzinha, Aline maionese, Naka, Dirle, Taís, amigades que conquistei aqui e tornaram essa experiência mais leve. Obrigada pelo ombro amigo, pelo companheirismo e pela amizade!

A minha amiga Crisla xarope, que conheci no meu primeiro dia na UFRGS, mas que vou levar para vida toda. Obrigada por ter compartilhado comigo essa experiência, pelas ajudas nos mapas, por todo o carinho e amizade. Vamos dale!

À família Flores e à família Gasparetto, por todo o apoio e carinho sempre. Amo vocês!

Aos meus amados pais, Neiva e Angelo, por todo apoio e incentivo na minha formação por acreditarem e me permitirem ir atrás dos meus sonhos. Vocês são os meus exemplos de força, dedicação e de amor. A vocês, minha eterna gratidão!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUÇÃO.....	8
Biogeografia Histórica: efeitos da Paleoestabilidade climática .....	8
Filogeografia e o uso de marcadores moleculares.....	9
Genética da Conservação: Unidades Evolutivamente Significativas .....	10
Contexto histórico: evolução paleogeográfica da Planície Costeira do Rio Grande do Sul	13
Roedores subterrâneos e família Ctenomyidae .....	15
<i>Ctenomys flamarioni</i> Travi, 1981 .....	18
OBJETIVOS .....	20
CAPÍTULO 1 .....	21
Abstract.....	23
Introduction .....	23
Material and Methods .....	25
Results .....	28
Discussion.....	29
Table Legends.....	33
Figure Legends .....	37
Supplementary Information 1 .....	46
Supplementary Information 2 .....	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48
REFERÊNCIAS .....	50

## RESUMO

Clima é um fator importante na determinação da biodiversidade e da mudança evolutiva. Existem duas hipóteses que consideram o clima como o fator chave da diversidade biológica: hipótese do clima atual e hipótese da estabilidade climática histórica. Neste estudo investigamos a história evolutiva de um roedor subterrâneo, *Ctenomys flamarioni*, analisando os efeitos da variação climática atual e histórica na diversidade genética de dez populações ao longo da Planície Costeira do sul do Brasil. Baseados em dados moleculares nucleares e mitocondriais, examinamos os padrões de variação da diversidade genética a níveis populacional e filogenético. Além disso, propusemos Unidades Evolutivamente Significativas e Unidades de Manejo para a espécie usando critério molecular. Os resultados indicaram divergência genética entre as populações e um gradiente norte-sul de diversidade genética. Ademais, a diversidade genética das populações foi melhor explicada pela paleoestabilidade climática do que pelo nicho climático atual. Baseado nas informações climáticas históricas, fomos capazes de introduzimos a ‘hipótese de refúgio’ para *C. flamarioni*, na qual a porção norte da distribuição da espécie seria o reduto de paleoestabilidade e da diversidade genética da espécie. Também sugerimos duas Unidades Evolutivamente Significativas (norte e sul), separadas por uma barreira natural, indicando um processo inicial de diferenciação entre essas populações. Essas informações são importantes para futuras ações de manejo para a conservação da espécie.

## ABSTRACT

Climate is an important factor behind biodiversity and evolutionary change. There are two hypothesis considering climate as a driver of biological diversity: the contemporary and historical climate stability hypothesis. Here we investigate the evolutionary history of a subterranean rodent, *Ctenomys flamarioni*, analyzing the effects of current and past climatic variation on the genetic diversity of ten populations over the Brazilian Southern Coastal Plain. Based on nuclear and mitochondrial genetic data, we examine the patterns of genetic variation at populational and phylogeographic levels. We also proposed evolutionarily significant units to the species based on molecular criteria. Our results indicated genetic divergence among populations and a north-south gradient of genetic diversity. Moreover, genetic diversity is better explained by climate paleostability than present-day niche suitability. Based on historical climate information we were able to introduce the “refugia hypothesis” to *C. flamarioni*. This hypothesis highlights the northern portion of the distributional range as the stronghold of the historical habitat stability and of the genetic diversity of the species. We also suggest two evolutionarily significant units (north and south), separated by a natural barrier, indicating a starting process of differentiation among populations. These findings are important for future conservation management actions to the species.



## INTRODUÇÃO

### **Biogeografia Histórica: efeitos da Paleoestabilidade climática**

A biogeografia histórica se baseia na filogenia para explicar a distribuição geográfica de espécies (Wiens and Graham 2005). Um dos maiores desafios da biogeografia é explicar por que espécies dispersaram para certas regiões e não para outras (Wiens and Graham 2005). A variação climática é tida como um fator determinante na construção dos padrões atuais de biodiversidade (Erwin 2009). Existem duas hipóteses que consideram o clima como o fator chave da diversidade biológica, no entanto diferem quanto a escala temporal. A primeira hipótese afirma que as condições climáticas atuais limitam a distribuição de recursos e a densidade das populações e, portanto, limitam as espécies que podem coexistir num dado local (Hawkins et al 2003). Enquanto que a segunda, a hipótese da estabilidade climática histórica, afirma que as espécies são excluídas de regiões que sofrem com oscilações climáticas muito intensas, e que regiões mais estáveis favorecem a persistência e a especiação ao longo de escalas geológicas (Jablonski et al. 2006).

Regiões que apresentam alta paleoestabilidade climática são chamadas de ‘refúgios’. Esses locais mantiveram condições climáticas relativamente constantes ao longo do tempo e, por isso seriam o reduto da diversidade biológica, exibindo um alto número de espécies e endemismos (Graham et al. 2006), além de alta diversidade genética intraespecífica (Hewitt 2004), em relação à regiões instáveis. Carnaval et al. (2009) determinaram uma série de características que difeririam áreas estáveis de áreas instáveis:

- (1) alta diversidade genética dentro e entre populações presentes em regiões de refúgio, devido ao tempo de permanência;
- (2) regiões instáveis demonstrariam sinais de expansão populacional;
- (3) ausência de padrões de isolamento por distância em áreas instáveis, refletindo uma possível colonização recente;
- (4) alta estruturação filogenética entre refúgios, devido ao longo tempo de permanência em isolamento.

Modelos de paleodistribuição são utilizados da literatura para predizer a distribuição das espécies sob as condições climáticas atuais juntamente com as flutuações climáticas do Quaternário (Carnaval et al. 2009; Werneck et al. 2012). Através da predição de regiões que se mantiveram constantes ao longo do tempo geológico, combinado com dados filogeográficos e

moleculares, é possível avaliar como a paleoestabilidade climática e a conectividade entre essas regiões influenciaram os padrões atuais de distribuição da biodiversidade (Graham et al. 2006; Carnaval and Moritz 2008; Carnaval et al. 2009).

### **Filogeografia e o uso de marcadores moleculares**

A Filogeografia estuda os processos responsáveis pela distribuição geográfica de linhagens genealógicas, principalmente em nível intraespecífico ou entre espécies relativamente próximas (Avice 2000). A fim de compreender como as diferentes linhagens se distribuem no ambiente, estudos filogeográficos utilizam o máximo de informações possíveis, incluindo a integração entre diversas disciplinas micro (e.g. mutações, deriva genética, processos de seleção) e macroevolutivas (e.g. biogeografia histórica, demografia, paleontologia) (Avice 1987; Avice 2000). De maneira geral, a Filogeografia proporciona uma ligação empírica e conceitual entre as disciplinas filogenia e genética de populações (Avice et al. 1987).

O principal avanço da aplicação da filogeografia tem-se dado em três áreas, cada uma delas vinculada a diferentes aspectos testáveis de “concordância genealógica” (Avice and Hamrick 1996; Avice 1998): (I) concordância na partilha genealógica ao longo de vários *loci* não ligados dentro dos limites da espécie; (II) concordância na posição geográfica das partições das árvores de genes ao longo de múltiplas espécies codistribuídas, ajudando na determinação dos principais fatores biogeográficos históricos que modularam as filogenias intraespecíficas; e (III) concordância entre partições nas árvores de genes e os limites geográficos entre regiões biogeográficas conhecidas, ou separadas por barreiras históricas ao fluxo gênico. Isso levou a uma melhor compreensão de biogeografias regionais e áreas de endemismo, auxiliando na elaboração de propostas prioritárias para a conservação da biodiversidade (Da Silva and Patton 1998; Firestone et al. 1999).

A genética molecular tem proporcionado diversas técnicas para o acesso à variabilidade genética dentro e entre populações, tanto através de polimorfismos de proteínas quanto de DNA (Avice 1994). Por serem altamente polimórficos e possuírem altas taxas de mutação, os marcadores moleculares mais utilizados em estudos populacionais e filogeográficos são os genes do DNA mitocondrial e os *loci* de microssatélite do DNA nuclear.

A utilização de sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) para elucidar relações filogeográficas vem sendo amplamente empregada uma vez que apresentam certas vantagens

em relação aos marcadores moleculares de DNA nuclear (nDNA) (Avice 2000). Características como sua herança materna, ausência de recombinação e altas taxas de mutações, fazem com que o mtDNA seja uma importante ferramenta para estudos filogeográficos e de eventos evolutivos relativamente recentes, além de revelar grupos geográficos de indivíduos relacionados e relações entre linhagens dentro de uma mesma população (Hare 2001). Também pode ser utilizado para traçar eventos históricos, como gargalos-de-garrafa, ou para analisar zonas híbridas (Avice 1994). A utilização de mtDNA nos estudos filogeográficos permitiu a descrição refinada da distribuição geográfica, das relações filogenéticas, das distâncias genéticas e dos tempos de divergência entre linhagens evolutivas (Bermingham E, Moritz C 1998; Da Silva and Patton 1998).

O uso de microssatélites permite superar algumas limitações de outras técnicas (Jarne and Lagoda 1996), uma vez que apresentam caráter altamente polimórfico (Tautz, 1993) e são seletivamente neutros, possibilitando a manutenção da sua alta variabilidade e acumulando mutações a uma taxa relativamente constante. Os *loci* de microssatélite consistem em pequenas sequências de nucleotídeos repetidas *in tandem*, abundantes no genoma de eucariotos (Schlotterer, 1998). Os microssatélites têm sido utilizados em estudos sobre comparações da variabilidade genética entre espécies e populações, história evolutiva e estrutura populacional, além de estimativas de fluxo gênico entre populações, inferências sobre deriva genética e migração, e em estudos sobre paternidade e parentesco (Lacey 2001; Gava and Freitas 2003; Wlasiuk et al. 2003; Fernández-Stolz et al. 2007).

### **Genética da Conservação: Unidades Evolutivamente Significativas**

Genética da Conservação consiste no uso da teoria e técnicas da genética para elucidar aspectos da biologia da espécie, seu manejo e conservação, reduzindo o risco de extinção de espécies ameaçadas (Frankham et al. 2010). Dentre as principais questões investigadas pela genética da conservação, estão a prevenção de problemas associados ao endocruzamento e a deriva genética em pequenas populações e a descrição da estrutura populacional com a finalidade de identificar unidades de conservação (Frankham et al. 2010).

Muitos autores e.g. Moritz (1995) acreditam que populações dentro de uma mesma espécie que apresentam divergência genética e/ou adaptações ecológicas distintas (e.g. nichos ecológicos) deveriam ser manejadas de forma independente para fins de conservação. Essas populações são as chamadas Unidades Evolutivamente Independentes (*Evolutionary*

*Significant Units*; ESU). As ESUs foram desenvolvidas para promover uma abordagem objetiva na escolha de unidades prioritárias para a conservação abaixo do nível de espécie (Ryder 1986), já que a taxonomia pode não refletir a diversidade subjacente das linhagens. O conceito de ESU foi primeiramente proposto por Ryder (1986) e tem sido amplamente discutido na literatura (Tabela 1). A principal diferença entre as múltiplas definições de ESUs reside no papel dos marcadores moleculares em relação a outros critérios que poderiam ser utilizados nas decisões relativas à conservação. Além disso, deve-se levar em conta o balanço entre o custo de manter duas, ou mais, populações em vez de apenas uma, e os riscos causados pela depressão exogâmica, ou os benefícios acumulados pela hibridização das populações (Frankham et al. 2010).

Um dos conceitos mais utilizados na literatura é o proposto por Moritz (1994), que se utiliza de uma abordagem filogeográfica, e recupera ideias de Dizon et al. (1992) e (Avice 1994). Moritz define uma ESU como uma população, ou um conjunto de populações, que apresentam monofilia recíproca para as linhagens de mtDNA e divergência significativa nas frequências alélicas para *loci* nucleares. Dessa forma, uma ESU reflete uma separação histórica entre populações, que constituem fontes distintas de diversidade dentro de uma espécie (Moritz 1994). O objetivo principal em designar essas unidades reside na possibilidade de manejo independente das populações, a fim de manter a diversidade evolutiva histórica da espécie (Avice 2000). Em termos gerais, cada ESU seria uma subespécie bem definida (Frankham et al. 2010).

Moritz (1994) também definiu o conceito de Unidade de Manejo (*Management Unit*, MU), quando a condição da monofilia recíproca não é atingida entre as linhagens filogenéticas, mas ainda existe uma divergência entre as frequências alélicas de loci nucleares. Essas unidades são mais apropriadas para ações de conservação a curto prazo, como em monitoramentos populacionais (Moritz 1994).

Definir uma ESU é um processo mais difícil e controverso do que definir uma espécie (Frankham et al. 2010). O conceito de ESU vem sendo criticado por motivos semânticos e práticos, apesar de ter sido amplamente utilizado, principalmente em espécies ameaçadas (Frankham et al. 2010). Além disso, Crandall et al. (2000) afirmaram que a ESU ignora diferenças adaptativas entre as populações. E, ainda, Frankham et al. (2010) discutem que seria pouco provável detectar uma ESU em populações com alto fluxo gênico, mesmo elas apresentando adaptações distintas.

**Tabela 1:** Critérios de Unidade Evolutivamente Significativa desde Ryder (1986) (adaptado de Fraser e Bernatchez, 2001).

Autor	Critério
Ryder (1986)	Entidades mais inclusivas dentro do nível de espécie que possuem atributos genéticos significativos para as gerações presentes e futuras da espécie em questão.
Waples (1995)	População ou grupos de populações que: (1) é substancialmente isolada reprodutivamente de outras unidades populacionais coespecíficas; (2) representa um componente importante do legado evolutivo da espécie.
Dizon et al. (1992)	Populações ou grupo de populações que divergem significativamente nas frequências alélicas de marcadores genéticos moleculares.
Avise (1994)	Grupos de populações derivados de filogenias consistentes de genes.
(Moritz 1994)	Populações que: (1) apresentam monofilia recíproca para alelos do mtDNA; (2) evidenciam significativa divergência nas frequências alélicas para <i>loci</i> de microssatélite.
Vogler e Desalle (1994)	Grupos diagnosticados através de caracteres exclusivos e excludentes.
Crandall et al. (2000)	Abandona o termo ESU por um conceito mais holístico de espécie, na qual, as populações variam quanto aos níveis de fluxo gênico, evoluindo através de deriva genética e seleção.
Fraser e Bernatchez (2001)	Linhagens mostrando restrito fluxo gênico com outras linhagens coespecíficas.

## Contexto histórico: evolução paleogeográfica da Planície Costeira do Rio Grande do Sul

No início do Quaternário, há aproximadamente 2,4 milhões de anos, a camada de gelo do Ártico foi formada, transformando o clima na Terra (Hewitt 2004). Desde então, essa camada passa por eventos de expansão e retração, em ciclos de aproximadamente 40 mil e 100 mil anos, caracterizando os períodos glaciais e interglaciais (Hewitt 2004). As flutuações no nível do mar decorrentes de tal variação no Quaternário produziram grandes deslocamentos laterais da linha costeira, moldando a costa do sul de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Tomazelli et al. 2000). Esses depósitos teriam sido subsequentemente retrabalhados por no mínimo quatro ciclos de transgressão e regressão do nível do mar, sendo os três primeiros associados a eventos glaciais do Pleistoceno, e o último ao Holoceno, originando quatro sistemas deposicionais complexos denominados de “laguna-barreira” (I-IV; Fig. 1) (Tomazelli et al. 2000).

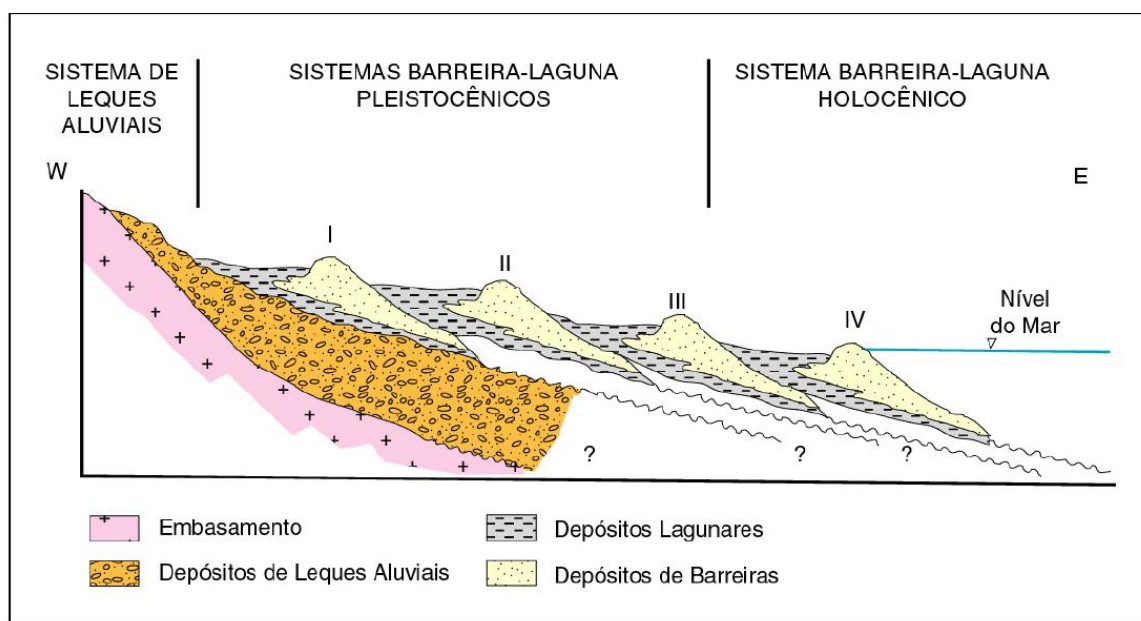


Figura 1. Perfil geológico dos sistemas laguna-barreira no Rio Grande do Sul (retirado de Tomazelli and Villwock (2005)).

A primeira, e mais antiga Barreira, foi formada durante o primeiro ciclo transgressivo-regressivo pleistocênico, há aproximadamente 400 mil anos, correspondendo à faixa mais interna da planície costeira, conhecida hoje como Coxilha das Lombas (Tomazelli et al. 2000). A cada nova ingressão marinha parte da região era submersa, retrabalhando os depósitos ali presentes (Tomazelli and Villwock 2005). O segundo e terceiro ciclos deram origem à barreira

arenosa chamada “Barreira Múltipla Complexa”, há aproximadamente 325 e 120 mil anos, respectivamente (Tomazelli et al. 2000), responsáveis pelo isolamento das lagoas dos Patos e Mirim. A fase regressiva do terceiro ciclo teria atingido o seu máximo há 17 mil anos, retraindo a linha da costa cerca de 120 metros abaixo do nível atual, originando uma ampla planície que, atualmente, forma a plataforma submarina (Tomazelli et al. 2000). O quarto, e último, ciclo se desenvolveu durante o Holoceno, há aproximadamente 5 mil anos, e elevou o nível do mar cerca de 2 a 4 metros acima do atual (Tomazelli et al. 2000). Esta última barreira, de natureza dinâmica, constitui hoje o sistema de dunas costeiras que se estende ao longo de toda a Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Tomazelli et al. 2000) (Fig. 2).

Atualmente, a região é caracterizada por um mosaico instável de lagos, lagoas, dunas e campos arenosos, cuja geomorfologia sofre influência constante das flutuações do Oceano Atlântico (Tomazelli et al. 2000). Canais provenientes de lagoas e estuários de rios podem interromper a costa em alguns pontos do litoral, servindo como barreiras ao fluxo gênico para muitas espécies que vivem na região (e.g. *Ctenomys flamarioni*).

Além disso, indicadores geológicos mostram que a maior parte da linha da costa está sofrendo erosão e retração (Esteves et al. 2002). Essa erosão vem sendo causada por fatores de longo e curto prazos. A elevação atual do nível do mar, a concentração de energia das ondas devido a topografia costeira em grande escala e a deficiência de areia são apontados como fatores atuantes a longo prazo (Tomazelli et al. 1998; Dillenburg et al. 2000), enquanto a ressaca causada por tempestades, a concentração de energia das ondas por feições morfológicas submersas em pequena escala, o transporte de sedimentos ao longo da costa e a atividade humana são fatores que atuam na erosão a curto prazo (Dillenburg et al. 2000; Esteves et al. 2002). Um terço do litoral do Rio Grande do Sul encontra-se impactado pela ação humana, seja ela manifestada através da urbanização, turismo, mineração de areia, destruição das dunas com diferentes finalidades (e.g. construção de calçadões, aterros), silvicultura, presença de gado sobre as dunas, construção de molhes nas desembocaduras de corpos d’água, alterando a paisagem e a dinâmica de transporte de sedimentos ao longo da costa (Esteves et al. 2002, 2003). Além disso, Tomazelli et al. (2000) também apontaram o aquecimento global como provável causa tanto da elevação do nível dos oceanos como do aumento da frequência e intensidade de tempestades.

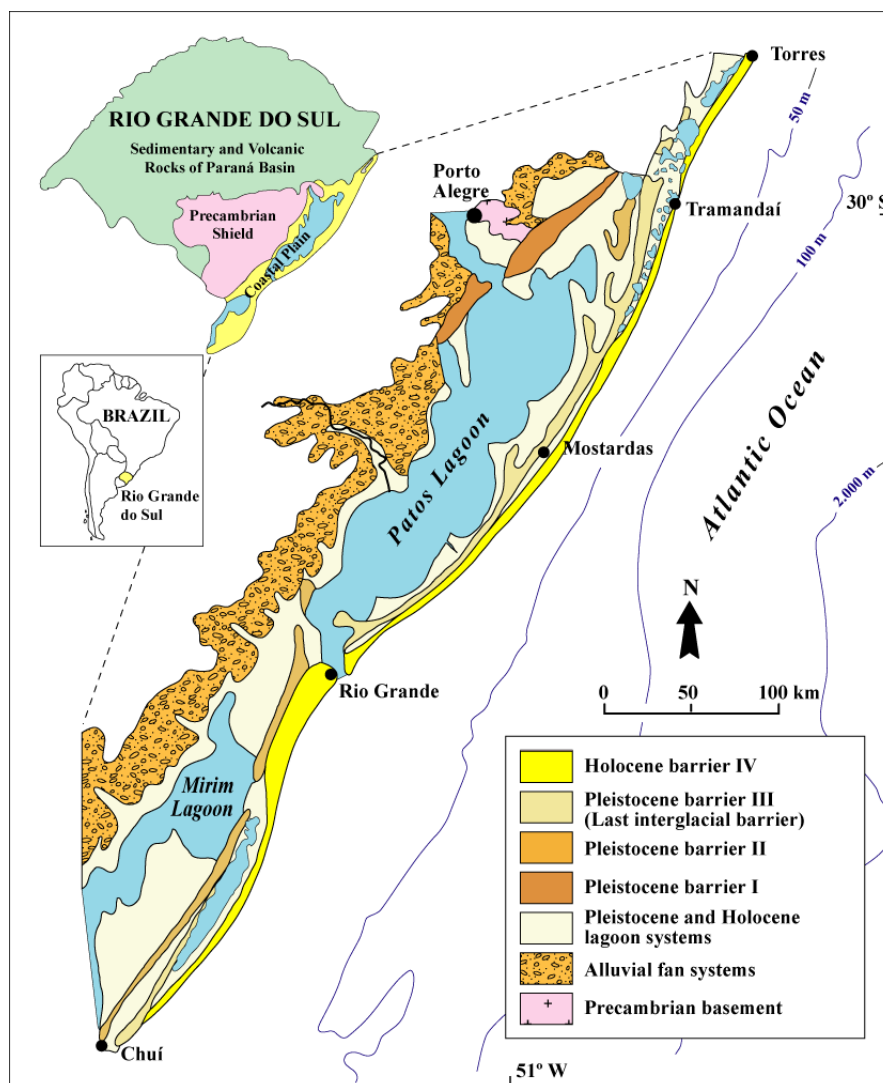


Figura 2. Mapa geológico da planície costeira do Rio Grande do Sul, com suas quatro formações de barreiras por processos regressivo-transgressivos do nível do mar (retirado de Tomazelli et al. (2000).

### Roedores subterrâneos e família Ctenomyidae

A ordem Rodentia é considerada a linhagem mais diversa entre os mamíferos, apresentando cerca de 2230 espécies, distribuídas em 34 famílias e 481 gêneros (Fabre et al. 2012). Distribuem-se por praticamente todos os continentes, com a exceção da Austrália, e apresentam uma ampla variedade de hábitos de vida, como terrestre, arborícola, e semi-aquático (Wilson e Reeder 2005). Dentre os que habitam o ambiente terrestre, aqueles que conduzem a maior parte das suas atividades vitais em galerias abaixo da superfície, são denominados subterrâneos (Lacey et al. 2000).

Os roedores subterrâneos são representados pelas famílias: Geomyidae (América do Norte); Bathyergidae (África); Muridae, dividida nas subfamílias Spalacinae, Arvicolinae,



Rhizomyinae e Myospalacinae (leste europeu, África e Ásia); e Octodontidae e Ctenomyidae (América do Sul) (Bidau 2015; Freitas 2016) (Fig. 3). Habitam, na sua maioria, regiões de solos arenosos (e.g. campos naturais, savanas, dunas costeiras ou desertos), embora, algumas espécies podem ocorrer em florestas ou mata arbustiva densa, entretanto, não são encontrados em locais com solos saturados de água ou permanentemente congelados (Lacey et al. 2000; Stolz et al. 2013). Essa versatilidade na ocupação de habitats é um reflexo da estabilidade conferida pela vida subterrânea (Reig et al. 1990), graças ao micro-clima formado no interior dos túneis, que assegura condições de temperatura e humidade independentes das condições externas (McNab 1966).

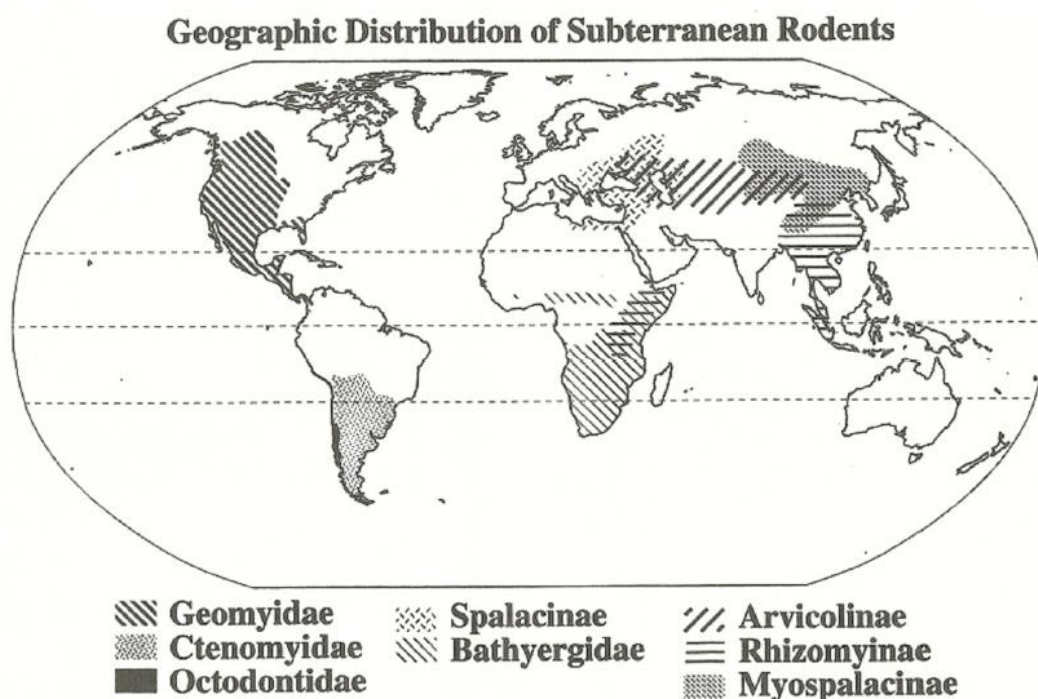


Figura 3. Distribuição geográfica das famílias e subfamílias de roedores subterrâneos (Lacey et al., 2000).

Dentre as famílias de roedores subterrâneos que se distribuem pela América do Sul, Ctenomyidae é a mais numerosa. Seus representantes são conhecidos popularmente por tucucos, e constituem cerca de 70 espécies descritas (Freitas 2016), distribuídas em um único gênero (*Ctenomys*). O surgimento do *Ctenomys* é datado há aproximadamente três milhões de anos (Verzi et al. 2010), apresentando uma das maiores taxas de especiação e evolução cromossômica entre os mamíferos (Reig et al. 1990; Lessa and Cook 1998). Distribui-se pela região Neotropical, sub-região Patagônica (Reig et al. 1990), sendo registrado desde o sul da Bolívia e Peru até a Terra do Fogo, na Argentina e, desde o nível do mar até mais de 4000

metros de altitude nos Andes peruanos (Bidau 2015; Freitas 2016). Constroem e habitam sistemas de túneis, sendo normalmente solitários, com poucos casos de espécies sociais ou semi-sociais (Lacey et al. 1998; Lacey 2000).

Espécies de tuco-tucos apresentam adaptações morfológicas relacionadas ao seu hábito de vida como: redução da cauda e pavilhões auditivos; corpo robusto e cilíndrico; um maior desenvolvimento da musculatura, principalmente dos membros anteriores; e, unhas e dentes incisivos proeminentes para escavação (Nevo 1979; Reig et al. 1990; Nowak RM 1999). São herbívoros generalistas e influenciam diretamente na comunidade de plantas da região e na modificação das condições do solo, por meio do revolvimento e aeração da terra devido a escavação de galerias (Zenuto e Busch 1995; Rosi et al. 2000; Del Valle et al. 2001). Assim como outras espécies de roedores subterrâneos, tuco-tucos apresentam distribuição em manchas, devido à alta territorialidade e a baixa capacidade de dispersão dos indivíduos (Busch et al. 2000). Além disso, apresentam distribuições principalmente alopátricas, uma vez que apresentam alta similaridade morfológica e ecológica, na qual cada espécie está intimamente ligada ao tipo de habitat que ocupa (Lacey et al. 2000).

No Brasil, existem oito espécies descritas de tuco-tucos. Três delas habitam a região norte e centro-oeste do país: *Ctenomys bicolor* Miranda Ribeiro, 1914, se distribui pelo estado de Rondônia; e *Ctenomys rondoni* Miranda Ribeiro, 1914 e *Ctenomys nattereri* Wagner, de 1848, pelo estado do Mato Grosso. Todas as outras cinco espécies se distribuem no Sul do Brasil, três delas sendo endêmicas do estado do Rio Grande do Sul (Fig. 4): *Ctenomys ibicuiensis* Freitas et al. 2012, que apresenta uma distribuição restrita a uma localidade no oeste do Estado do Rio Grande do Sul (Freitas et al. 2012); *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830, que se distribui desde a região central do Uruguai até a região central do Rio Grande do Sul, habitando os campos sulinos (Freitas, TRO 1995; Fernandes et al. 2009); *Ctenomys lami* Freitas, 2001, que habita somente a localidade de Coxilha das Lombas, região de dunas próxima a Porto Alegre (Freitas 2001, 2007); *Ctenomys minutus* Nehring, 1887, que se distribui desde Jaguaruna, no Estado de Santa Catarina, até São José do Norte, no Estado do Rio Grande do Sul (Freygang et al. 2004); e *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981, que se distribui pela região de dunas costeiras do estado do Rio Grande do Sul (Freitas 1995).

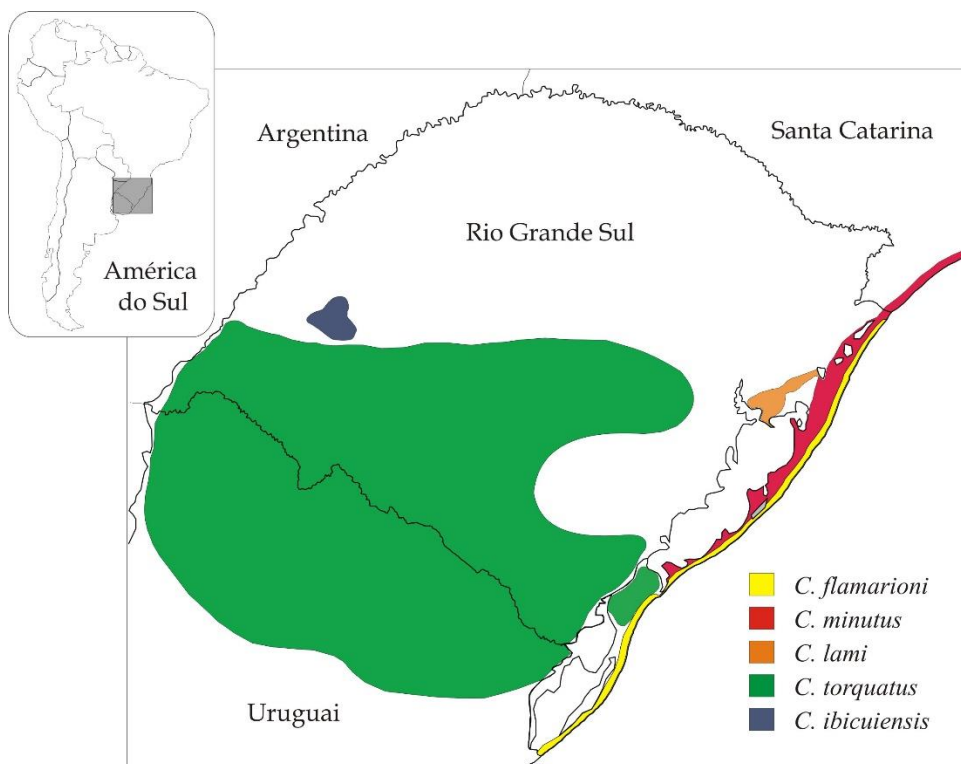


Figura 4. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Ctenomys* no estado do Rio Grande do Sul.

### ***Ctenomys flamarioni* Travi, 1981**

*Ctenomys flamarioni*, ou tuco-tuco-das-dunas como é popularmente conhecido (Fig. 5), é uma espécie endêmica do Estado do Rio Grande do Sul e é uma das espécies mais ameaçadas do gênero. Habita a primeira linha de dunas dos mais recentes depósitos eólicos e marinhos da planície costeira do estado (Freitas 1995) e sua distribuição estende-se desde Arroio Teixeira, no litoral norte, até o Arroio Chuí, na divisa com o Uruguai, no litoral sul (Freitas 1994; Fernández-Stolz et al. 2007). Existem três barreiras potenciais para a dispersão ao longo da distribuição de *Ctenomys flamarioni*: duas delas são permanentes (e.g. desembocadura do Rio Tramandaí e da Lagoa dos Patos), e uma temporária (e.g. desembocadura da Lagoa do Peixe). Graças a sua distribuição restrita ao ambiente de dunas costeiras, a espécie é listada, atualmente, como em perigo de extinção (EN) pela *IUCN Red List of Threatened Species* (IUCN 2010), uma vez que seu hábitat permanece em constante alteração, seja pela ação dos ventos e das marés, ou pelo avanço da ocupação antrópica.



Figura 5. Indivíduo adulto de *Ctenomys flamarioni* no seu hábitat natural de dunas costeiras (Foto da autora).

O tuco-tucos-das-dunas possui uma coloração clara e é morfologicamente mais robusto que as demais espécies de tuco-tucos do sul do Brasil. Isto está relacionado diretamente com o ambiente ocupado pela espécie, já que as dunas costeiras apresentam solo mais frouxo e arejado (Contreras e MacNab 1990; Rocha-Barbosa et al. 2013). São prioritariamente solitários, com o compartilhamento de túneis limitado a fêmeas e seus filhotes durante o período reprodutivo (Bretschneider 1987; Fernández 2002).

Estudos recentes utilizando tanto marcadores moleculares mitocondriais quanto nucleares demonstraram que, de um modo geral, *C. flamarioni* apresenta uma baixa variabilidade genética (Fernández-Stolz et al. 2007). Em um estudo comparativo duas populações do norte da distribuição, que se distribuem em locais com maior impacto antrópico, e para uma população do centro da distribuição, foram detectadas reduções populacionais recentes (e.g. gargalos-de-garrafa). Por outro lado, para as populações ao sul, que ocupam uma região com menor impacto da ação humana, a perda significativa da variabilidade genética foi atribuída a fatores de instabilidade ambiental (Fernández-Stolz et al. 2007).

## OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal investigar a história evolutiva de *Ctenomys flamarioni* (tuco-tuco-das-dunas), com base em dados ecológicos e moleculares.

### **Objetivos específicos:**

- Analisar a variação genética a nível populacional e filogenético, usando marcadores nucleares e mitocondriais;
  
- Verificar a influência de condições climáticas atuais e da paleoestabilidade climática nos padrões de diversidade genética das populações ao longo da distribuição geográfica da espécie;
  
- Propor Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) para a espécie;
  
- Contribuir para a conservação da espécie, com dados que possam ser usados em futuros planos de manejo.

## **CAPÍTULO 1**

### **Paleostability of Coastal Plain sheds light on the evolutionary history of subterranean rodent**

Luiza F. Gasparetto, Gabriela P. Fernández, Renan Maestri, Daniel Galiano,  
Cecilia S. Carnovale, Bruno B. Kubiak and Thales R. O. de Freitas

Manuscrito em preparação: Conservation Genetics

## CAPÍTULO 1

### **Paleostability of Coastal Plain sheds light on the evolutionary history of subterranean rodent**

Luiza F. Gasparetto<sup>a</sup>, Gabriela P. Fernández<sup>b</sup>, Renan Maestri<sup>a</sup>, Daniel Galiano<sup>c</sup>  
Cecilia S. Carnovale<sup>b</sup>, Bruno B. Kubiak<sup>d</sup> and Thales R. O. de Freitas<sup>a,d,e</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre - RS, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Bioinvestigaciones (CeBio). Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires – CICBA. Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA-CONICET). Pergamino (2700), Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza, Rua Edmundo Gaievisk, 1000, CEP 85770-000, Realeza, PR, Brazil.

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre - RS, Brazil. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Av. Assis Brasil, 98400-000, Frederico Westphalen – RS, Brazil.

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre - RS, Brazil.

Manuscrito em preparação: Conservation Genetics

## Abstract

Climate is an important factor behind biodiversity and evolutionary change. There are two hypothesis considering climate as a driver of biological diversity: the contemporary and historical climate stability hypothesis. Here we investigate the evolutionary history of a subterranean rodent, *Ctenomys flamarioni*, analyzing the effects of current and past climatic variation on the genetic diversity of ten populations over the Brazilian Southern Coastal Plain. Based on nuclear and mitochondrial genetic data, we examine the patterns of genetic variation at populational and phylogeographic levels. We also proposed evolutionarily significant units to the species based on molecular criteria. Our results indicated genetic divergence among populations and a north-south gradient of genetic diversity. Moreover, genetic diversity is better explained by climate paleostability than present-day niche suitability. Based on historical climate information we were able to introduce the ‘refugia hypothesis’ to *C. flamarioni*. This hypothesis highlights the northern portion of the distributional range as the stronghold of the historical habitat stability and of the genetic diversity of the species. We also suggest two evolutionarily significant units (north and south), separated by a natural barrier, indicating a starting process of differentiation among populations. These findings are important for future conservation management actions to the species.

**Key words:** climate stability, refugia, evolutionarily significant units, biogeography, tuco-tuco

## Introduction

Climatic variation is an important factor behind biodiversity and evolutionary patterns (Erwin 2009). Two contrasting hypotheses consider climate as a driver of biological diversity, but each in a different temporal context. The ‘contemporary climate’ hypothesis sustains that the immediate availability of resources limits population densities and, therefore, the species that can coexist in a given region (Hawkins et al 2003). In contrast, the ‘historical climate’ stability hypothesis affirms that species are distinctly excluded from areas that suffer severe climatic fluctuations, while persistence and speciation are favored by climate stability over geological time-scales (Jablonski et al. 2006). Areas with high climate paleostability are often called ‘refugia’, and these areas usually present higher species diversity and endemism (Graham et al. 2006), and higher intraspecific genetic diversity (Hewitt 2004) regarding unstable regions.



Paleodistribution modelling predicted species' distributions under current conditions and climatic extremes of the Late Quaternary (Carnaval et al. 2009). This method is used to predict specific areas that have remained relatively stable across one or a series of historic climate conditions for a single species (Moussalli et al. 2009) or habitat types (Graham et al. 2006). These models in combination with species-level or phylogeographic data can be used to evaluate how paleostability and connectivity might have influenced current patterns of biological diversity (Graham et al. 2006; Carnaval and Moritz 2008; Carnaval et al. 2009). According to Carnaval et al. (2009) under these predictions, species would present (i) higher genetic diversity within and among populations in refugia, because of long-term persistence and population structure; while (ii) unstable areas will show genetic signals of population expansion, and (iii) absence of genetic patterns of isolation-by-distance, reflecting the recent colonization after the Last Glacial Maximum (LGM, ~21 kyr); besides, refugia will also present strong phylogeographic structure between them because of the long term population persistence in isolated areas.

South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (tuco-tucos) represent an excellent model to study the phylogeographic responses of populations to Quaternary climate fluctuations (Mapelli et al. 2012). Subterranean rodents spend most of their lives underground, in burrow systems (Nowak 1999), and this unique environment presents relatively stable conditions and provides protection from predators (Nevo 1979). Tuco-tucos are usually solitary and exhibits low rates of dispersion and gene flow among populations (Wlasiuk et al. 2003; Fernández-Stolz et al. 2007; Mora et al. 2010). All these characteristics suggest that fluctuations in habitat conditions might have produced signals in the geographic distribution of the genetic variation (Mapelli et al., 2011).

*Ctenomys flamarioni* Travi, 1981 is a highly endemic species that inhabits small and linear extension of dunes in the coastal plain of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Its range, which extends for about 560 km, is limited to the first dune line of the coastal plain of Rio Grande do Sul state, in southern Brazil (Freitas 1995; Fernández-Stolz et al. 2007). Due to its restricted sandy dune environment and the progressive destruction of coast natural landscape by human activities (Tomazelli et al. 2000; Esteves et al. 2003), the species is cited as endangered by the Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN 2010).

The coastal plain of southern of Brazil presents a long history of climate instability. The sedimentary deposits and geomorphic features preserved in the coastal plain of Rio Grande do Sul represent an important record of late Quaternary climatic changes with its associated glacio-

eustatic sea-level fluctuations (Tomazelli et al. 2000). The sediments present on the coast belong to two major depositional systems: an alluvial fan system developed along the inner part of the coastal plain and a barrier-lagoon complex with four distinctive transgressive-regressive cycles seaward (Tomazelli et al. 2000). The three first barrier-lagoon system occurred on Pleistocene (Villwock et al 1986) while the fourth and most recent barrier-lagoon system has been developed during the Holocene (Tomazelli et al. 2000), each one representing a transgressive-regressive cycle. These dynamic process help to shape the current landscape of coastal plain of Rio Grande do Sul (Tomazelli et al. 2000).

The climatic fluctuations of late Quaternary period affected the occupation dynamics of tuco-tucos, as well as many other small mammals of South America, due to the reduction of the habitat availability in response to variation in temperature and humidity (Tonni et al. 1999; Mapelli et al. 2012; Mora et al. 2013). This could lead to diversification episodes (Mayr 1942), with a physical barrier preventing the gene flow between populations (e.g., Maestri et al. 2016) and ultimately driving to speciation. Populations of the same species that presents genetics divergence due its evolutionary history, should be treated as different units to conservation purposes (Moritz 1995). The concept of Evolutionarily Significant Units (ESU) was first proposed by Ryder (1986) and later by Moritz (1994) in order to preserve diversity of different lineages. Based on genetic criterion, Moritz (1994) establishes that an ESU should presents reciprocally monophyletic for mtDNA alleles and show significant divergence of allele frequencies at nuclear loci. This concept is important to preserve the genetic identity of different lineages and propose management actions taking into account these genetic divergences among populations (Ryder, 1986; Moritz 1994).

In this study, we conduct a biogeographical distribution analysis for *C. flamarioni* over its entire range. First, we investigated the evolutionary history of this species, using nuclear and mitochondrial genetic data, in order to examine the patterns of genetic variation at populational and phylogeographic levels. Second, we verify present-day climate conditions or historical climate stability predicts the current pattern of genetic diversity of *C. flamarioni* on the Coastal Plain. Finally, based on that, we propose evolutionarily significant units for *C. flamarioni*, to discuss conservation issues in the light of this integrative approach.

## **Material and Methods**

### *Study area*

The study was conducted on ten populations (Table 1; Fig. 1) over the entire distributional range of *C. flamarioni*, corresponding to the Rio Grande do Sul coast, Brazil. The region is characterized by an unstable mosaic of lakes, lagoons, beaches, sand dunes and sand fields, whose geomorphology suffers constant influence by Atlantic Ocean fluctuations (Tomazelli et al. 2000). Currently, the sandy dunes system occupies the entire 620 km length of coast with only two discontinuities: one in the south, at Cassino, where the inlet of the Patos Lagoon is located, and another in the north, at the inlet of Tramandaí Lagoon (Dillenburg 2009) (Fig. 1).

#### *Quantifying genetic diversity with microsatellite data*

We used the molecular dataset based on 154 voucher specimens of *C. flamarioni* obtained from Fernández-Stolz (2007) and housed at the collection of the Laboratório de Citogenética e Evolução of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Table 1). Molecular genetics analyses were performed from nine polymorphic microsatellite loci, isolated from the Argentinean species *C. haigi* (Hai 3, Hai 4, Hai 5, Hai 6, Hai 7, Hai 9 and Hai 12; (Lacey et al. 1999) and *C. sociabilis* (Soc 2 and Soc 3; Lacey 2001). For the microsatellite dataset, genotypes were checked for null alleles, stuttering and large allele drop out using MICRO-CHECKER v. 2.2.3 (van Oosterhout et al 2004). Then we estimated the genetic diversity by population through the mean number of alleles per locus ( $A$ ), percentage of loci that were polymorphic ( $\%P$ ), mean observed heterozygosity ( $H_o$ ), and the mean expected heterozygosity from Hardy-Weinberg proportions ( $H_e$ ). Analysis of linkage disequilibrium based on a likelihood-ratio test and deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were tested using ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005). Levels of genetic divergence among populations were analyzed by computing  $F_{ST}$  according to Weir and Cockerham (1984), implemented in FSTAT (Goudet 1995). Sequential Bonferroni corrections were applied to correct for multiple simultaneous comparisons (Rice 1989), with  $\alpha = 0.05$  to adjust the statistical significance levels. As alternative approach to infer genetic population structure, we used a Bayesian clustering method performed by STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard et al. 2000). We evaluated a minimum of three runs for  $K$  values (number of cluster) from 1 to 9 using no prior population information, admixture model, a burn-in of 100,000 followed by 1,000,000 iterations.

#### *Quantifying spatial patterns of genetic diversity with cytochrome-b*

We also examined genetic variation for the complete cytochrome-*b* gene (1,140bp) mitochondrial marker, using a subsample of 89 vouchers obtained from Fernández-Stolz (2007) and housed at the collection of the Laboratório de Citogenética e Evolução of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Table 1). In order to reconstruct the phylogenetic relationships among haplotypes for the mitochondrial dataset we applied Bayesian inference. Bayesian inference was carried out using the program BEAST 1.7.5 (Drummond et al 2012). Running parameters were defined on BEAUti 1.7.5 (Drummond et al 2012), setting a Birth-Death tree prior, the relaxed (uncorrelated lognormal) molecular clock, a mutation rate of 2.19 % per million years estimated for *Ctenomys* (Roratto et al. 2015) and the search was performed with the model chosen using jModelTest (GTR+I+G).

Three independent Markov chain Monte Carlo runs were performed with 70 million generations, sampling trees every 1,000 generations. Independent runs were combined using LogCombiner 1.7.5 (Drummond et al 2012). The effective sample sizes of parameters sampled from Markov chain Monte Carlo were verified to be higher than 200 using the software Tracer v.1.5 (Rambaut 2009). Independent runs were summarized in TreeAnnotator 1.7.5 (Drummond et al 2012); the first 10% of trees (21,000) were discarded and the remaining trees were used to infer a maximum a posteriori tree that was visualized in FigTree 1.3.1 (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Evolutionary relationships among haplotypes were inferred for the mitochondrial dataset using the statistical parsimony algorithm, and an haplotype network was built using the Median-Joining method (Bandelt et al. 1999) implemented in PopArt software (Leigh and Bryant 2015).

### *Statistical analysis*

To answer if present-day climate conditions or historical climate stability predicts the current pattern of genetic diversity of *C. flamarioni* on the Coastal Plain we generated two sets of explanatory variables: one providing estimates of Late Quaternary climatic stability and one describing contemporary niche conditions. To delimit potential areas of Late Quaternary paleostability we used Carnaval et al. (2014; available at Dryad: doi:10.5061/dryad.8kclv) map of inferred climatic stability of the Atlantic forest over the last 120 kyr. And to describe present-day climatic conditions, we extracted niche suitability data based on maps generated by Kubiak et al. (2017) (Fig. 2).

For the analyses, our response variables were the genetic diversity of each population, measured by the mean number of alleles per locus ( $A$ ) and the mean observed heterozygosity ( $H_o$ ), and our explanatory variables was the environmental suitability and paleostability vectors with values ranging from 0 (minimum suitability/stability) to 1 (maximum suitability/stability). These values were extracted with ArcGis software v. 10.4.1 from the pixel in which the population was present. The normality of our response and explanatory variables was visually checked.

First, we tested the spatial autocorrelation of our response variables by two global Moran's I indices (Sokal et al. 1998) to determine whether our variables were correlated in space, which could generate bias in our analysis by violating the principles of independence between samples (Legendre, 1993). Spatial autocorrelation test was performed in R software v. 3.4.3 (R Development Core Team 2017) with package ape (Paradis et al. 2004). We then ran four independent linear regressions, crossing our response variables against our explanatory variables to determine whether the genetic diversity of populations was influenced by the present-day or by the past climate conditions. Linear regressions were performed in R software v. 3.4.3 (R Development Core Team 2017), using the level of significance of  $\alpha < 0.05$ .

## **Results**

### *Genetic diversity and climate stability*

The results shown significant difference in genetic diversity among localities. Northern and central populations (XA, RE, PI, SS, BU and SJ) presents higher levels of genetic diversity, while southern populations (CA, TA, CH) have lower levels of genetic diversity (Table 2). Moran's I coefficient indicates no spatial autocorrelation in both response variables: mean number of alleles per locus ( $A$  – Moran's I: 0.199,  $P = 0.068$ ) and mean expected heterozygosity ( $H_e$  – Moran's I: 0.227,  $P = 0.054$ ). The regression analysis indicated that genetic diversity is better explained by climate stability under Late Quaternary conditions than present-day niche suitability: there is a positive association between genetic diversity and paleostability (Fig. 3).

### *Genetic diversity and evolutionary significant units*

At total, the cytochrome-b network resulted in ten distinct haplotypes (Supplementary Information 1), seven of them are shared only within population of north of the Patos Lagoon Barrier, and tree only in the south of the barrier (Fig. 4). The polymorphism observed was low within each population, with polymorphic populations exhibiting two to four different

haplotypes (XA, RE, PI, BU, CA, TA and CH). Three populations were completely monomorphic, each one represented by a single haplotype (IM, SS and SJ). These results demonstrated the importance of the Patos Lagoon inlet as a solid barrier, breaking the linear distribution of the species and being a strong barrier to gene flow. Besides, the Structure analysis with the microsatellite data resulted in nine ( $K=9$ ) clusters, with low levels of gene flow between them. The clusters present high structuration, each of them corresponding to a single population (XA, RE, IM, PI, SS, BU, SJ, CA, TA and CH) (Fig. 5). The  $F_{ST}$  values also shown significance divergence between populations (Table 3): the populations are more similar within regions north and south, than between them.

A Bayesian haplotype tree built from cytochrome-*b* sequences demonstrates a phylogeographic structure with good statistical support within *C. flamarioni*, with all the node values greater than 0.90. The tree highlights two haplogroups: one of the lineages includes mainly populations of the north of the Patos Lagoon Barrier (XA, RE, IM, PI, SS, BU and SJ), and the other lineage contains only populations in the south of the barrier (CA, TA, CH) (Fig. 6). Only one haplotype (Hap7) was shared between northern and southern lineages.

Based on this tendency of reciprocal monophyly of the lineages and significant genetic divergence among populations, we can suggest two Evolutionary Significant Units to *C. flamarioni*: one corresponding to the north of Patos Lagoon Barrier (regions I, II and III), and other to the south of the barrier (region IV) (Fig. 7).

## Discussion

### *Paleostability and genetic diversity*

Climatic stability is a better predictor of *C. flamarioni* genetic diversity than current climate, as predicted by the historical climate stability hypothesis (Jansson 2003; Araújo et al. 2008). Quaternary climatic fluctuations potentially affects more intensely species with narrow-range and/or low-vagility, given its limited ability to track climate change (Jansson 2003; Graham et al. 2006), than species with wide-range and/or high-vagility. Tuco-tuco-das-dunas presents narrow-range distribution and low-vagility, therefore it is more susceptible to suffers the influence of historical climatic fluctuations. Besides, its natural habitat experienced a long history of instability due to high impacts of the transgressive-regressive cycles that shaped the Coastal Plain of Rio Grande do Sul, affecting occupation dynamics of *C. flamarioni*.

According to our microsatellite analysis, a higher genetic diversity for *C. flamarioni* was detected in the north region of Coastal Plain of Rio Grande do Sul, corresponding to areas with higher paleostability. While southern populations showed low genetic diversity and signals of recent range expansion from north and central sources, corresponding to areas with lower paleostability. That provides evidence that Quaternary climatic fluctuations could have been strong enough to affect genetic diversification of the species. In contrast, if only present-day climate conditions were enough to predict geographic patterns of genetic diversity maybe we would have found a different pattern. Based on suitability map of Kubiak et al. (2017), there are two spots of high niche suitability, which could be the stronghold of genetic diversity of *C. flamarioni*. However, what we found was a linear gradient north-south of variation, corresponding to the historical factors that were strongly acting on historical occupation dynamics of the species. That fact corroborated with the paleostability hypothesis of historical climate stable areas being the stronghold of genetic diversity of the species.

#### *Refugia hypothesis*

The origin of *C. flamarioni* was suggested by Freitas (1994) and by studies based on morphological and chromosomic variation (Massarini and Freitas 2005). An ancestral form that lived originally in Argentinean coast would have differentiated in two separated species (*C. australis* and *C. flamarioni*) through migration and subsequent isolation process (Freitas 1994). During the Pleistocene period, the Coastal Plain of the Southern region of South America was larger than now (Ab'Saber 1990), and the Río de la Plata was not yet a strong geographic barrier as it is nowadays (Corrêa et al, 1992). This allowed the ancestor form to be distributed throughout this region (Massarini and Freitas 2005). Afterward, due to transgressive-regressive movements of the sea, the geographic distribution of the ancestor was divided by the rising of sea level and the increase in the flow of the Río de la Plata, hence starting the speciation process that resulted in *C. australis* and *C. flamarioni* (Massarini and Freitas 2005; Cruz 2017). The northern migration of *C. flamarioni* might also occur in Pleistocene period, when the Coastal Plain was about 100 km wider than present days (Freitas 1994) thus allowing *C. flamarioni* reach the Coastal Plain of Rio Grande do Sul.

Nowadays, the distribution of *C. flamarioni* is restricted to the Coast of Rio Grande do Sul, being absent in both Argentinean and Uruguayan coasts. Its regional extinction (e.g. Argentina and Uruguay) and subsequent distributional reduction was probably caused by the intense historical climate instability of the region. Our results suggest that the norther portion

of the current geographical range might be considered as refugia for the species. This ‘refugia hypothesis’ for *C. flamarioni* is based on different levels of climate stability and genetic diversity, revealed by microsatellite and mitochondrial data.

Our results show some evidences that could support this hypothesis: (I) higher levels of genetic diversity in the northern populations than the southern from microsatellite genetic data indicated; (II) higher haplotype diversity for the northern population than the southern ones; (III) the ancient haplotype (Hap 1) presents along the northern populations but absent to the south of the Patos Lagoon barrier. All these facts could be used as an evidence for refugia hypothesis, allowing to reconstruct a possible evolutionary scenario to the species: the species migrated from the south (Argentinean coast) to the north (Brazilian coast), and then it established and diversified. The north region might be considered the stronghold of the historical habitat stability and, therefore the stronghold of the genetic diversity of the species.

The haplotype network indicated a star-like topology among haplotypes that could be interpreted as a signal of small historical population size followed by expansion (Grant and Bowen 1998). After an event of separation of species, it is biologically expected signals of recent demographic expansion (Slatkin and Hudson 1991; Harpending et al. 1998). According to ‘refugia hypothesis’, the species might be remained in the north region and then migrated again, but this time to the south, as indicated by the signals of recent population expansion. Afterward, a new vicariance event occurred, and the populations might have been separated again by the rise of Patos Lagoon barrier, dividing its distributional range. The lower levels of genetic diversity of southern populations showed in our results could be caused by a recent founder effect, in which few individuals established in a new region. Both microsatellite and mitochondrial analyses, along with patterns of enzymatic polymorphism (Moreira et al. 1991) and the geographical distribution of the karyotype variation (Freitas 1994) supports the strength of the Patos Lagoon as a solid geographical barrier for *C. flamarioni*, preventing its dispersal and gene flow among populations of the north and the south of the barrier.

### *Conservation implications*

Our results suggest that refugia can potentially predict biodiversity patterns at small scales relevant for preservation. We reaffirmed the significance of the knowledge over historical environmental stability as a predictor of biodiversity patterns, and its relevance in conservation planning, as appointed by Werneck et al. (2012). However, the conservation of a



species requires not only knowledge of their evolutionary history, but also information of genetic structure, niche suitability and human impact.

Based on both microsatellite and mitochondrial data, we suggested two Evolutionary Significant Units (ESU's), divided by the Patos Lagoon barrier for *C. flamarioni*. Our results point some evidence that corroborate this definition. (I) The phylogenetic reconstruction indicates the presence of two groups: the group of northern and the group of southern of the Patos Lagoon barrier. (II) The haplotype network also shown this pattern, demonstrating no haplotype sharing between these groups. (III) The Structure analyses showed high structuration among populations, indicating the low gene flow among them. These evidences, along with enzymatic polymorphism (Moreira et al. 1991) and the geographical distribution of the karyotype variation (Freitas 1994), could suggest a new starting process of differentiation between regions.

The northern ESU is established in a region that presents high paleostability, high current niche suitability and high historical levels of genetic diversity. Nevertheless, this portion of the Coastal Plain is threatened by land speculation associated with urban constructions along the coast, inducing the fragmentation of the dune habitat (Esteves et al. 2003) and increasing the risk of population bottlenecks (Fernández-Stolz et al., 2007). While the southern ESU is settled in a region of low paleostability, low niche suitability and low levels of genetic diversity. Although the human impact is also lower than the north region, silviculture directly affects the species, changing its natural habitat into *Pinus sp.* cultivation (Esteves et al. 2003).

Our study brought an integrative approach about the evolutionary history of *C. flamarioni*, crossing historical climate information with population genetics. The 'refugia hypothesis' complements what was proposed by Freitas (1994) and Massarini and Freitas (2005), and add new discussions about the importance of historical climate stability in predicting the genetic diversity of species. Based on the paleostability prediction, we were able to infer some steps that were missing in the evolutionary history of *C. flamarioni*. Furthermore, our results suggest a new process of differentiation among populations, based on the genetic and environmental differences between each ESU. Future conservation studies should consider our results in order to plan better approaches to management actions.

## Table Legends

**Table 1:** Localities sampled and its respective abbreviation of the populations. Number of individuals sampled in each site for microsatellite and mitochondrial genetic data.

**Table 2:** Genetic variability in *Ctenomys flamarioni* from nine microsatellite loci dataset. Sample size ( $n$ ), mean number of alleles per population ( $A$ ), percentage of polymorphic loci ( $\%P$ ), mean observed heterozygosity ( $H_o$ ), mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) and inbreeding coefficient values ( $f$ ). Populations: Xangrilá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bujuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA), Chuí (CH).

**Table 3:** Pairwise  $F_{ST}$  among populations using microsatellite data. All values were significant after Bonferroni corrections. Population abbreviations correspond to those in Table 1.

**Table 1:** Localities sampled and its respective abbreviation of the populations. Number of individuals sampled in each site for microsatellite and mitochondrial genetic data.

Region	Population	Georref (Lat, Long)	Microsatellite	Cytochrome -b
Northern	Xangri-lá (XA)	29°47'S, 50°01'W	24	8
	Remanso (RE)	29°49'S, 50°02'W	27	9
	Imbé (IM)	29°55'S, 50°06'W	-	6
	Pinhal (PI)	30°18'S, 50°15'W	30	14
Central	São Simão (SS)	30°58'S, 50°40'W	13	10
	Bujuru (BU)	31°39'S, 51°22'W	10	8
	São José do Norte (SJ)	32°03'S, 51°59'W	12	8
Southern	Cassino (CA)	32°09'S, 52°06'W	8	7
	Taim (TA)	32°43'S, 52°26'W	22	12
	Chuí (CH)	33°44'S, 53°22'W	8	7
Total			154	89

**Table 2:** Genetic variability in *Ctenomys flamarioni* from nine microsatellite loci dataset. Sample size ( $n$ ), mean number of alleles per population ( $A$ ), percentage of polymorphic loci ( $\%P$ ), mean observed heterozygosity ( $H_o$ ), mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) and inbreeding coefficient values ( $f$ ). Populations: Xangrilá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bujuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA), Chuí (CH).

Population	$n$	$A$	$\%P$	$H_o$	$H_e$
XA	24	2.667	89	0.39053	0.42157
RE	27	2.667	89	0.42343	0.39701
PI	30	3.556	100	0.48916	0.51281
SS	13	2.556	78	0.43681	0.37063
BU	10	2.667	89	0.53571	0.49817
SJ	12	2.222	56	0.35000	0.26973
CA	8	1.444	33	0.20833	0.11204
TA	22	1.333	33	0.24242	0.08386
CH	8	1.000	11	0.25000	0.23333
Total	154	5.333	64.2	0.36959	0.57971

**Table 3:** Pairwise  $F_{ST}$  among populations using microsatellite data. All values were significant after Bonferroni corrections. Population abbreviations correspond to those in Table 1.

	XA	RE	PI	SS	BU	SJ	CA	TA	CH
XA	-								
RE	0.13531	-							
PI	0.27633	0.29959	-						
SS	0.48658	0.47977	0.29015	-					
BU	0.41120	0.41811	0.22958	0.16588	-				
SJ	0.48523	0.45904	0.29890	0.37234	0.28641	-			
CA	0.52968	0.55295	0.39152	0.49797	0.40304	0.53364	-		
TA	0.64513	0.66815	0.51257	0.65890	0.58629	0.67596	0.46552	-	
CH	0.58061	0.59916	0.44032	0.54050	0.48533	0.61948	0.17222	0.59029	-

## Figure Legends

**Figure 1:** Geographic distribution of tuco-tuco-das-dunas (*Ctenomys flamarioni*) along the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. The ten population sampled: Xangrilá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bujuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA), Chuí (CH). The four regions divided by the potential natural barriers are indicated.

**Figure 2:** Maps of ecological variables. (A) Map of inferred climatic stability of Late Quaternary (adapted from Carnaval et al. 2014). (B) Map of niche suitability of *C. flamarioni* (adapted from Kubiak et al. 2017).

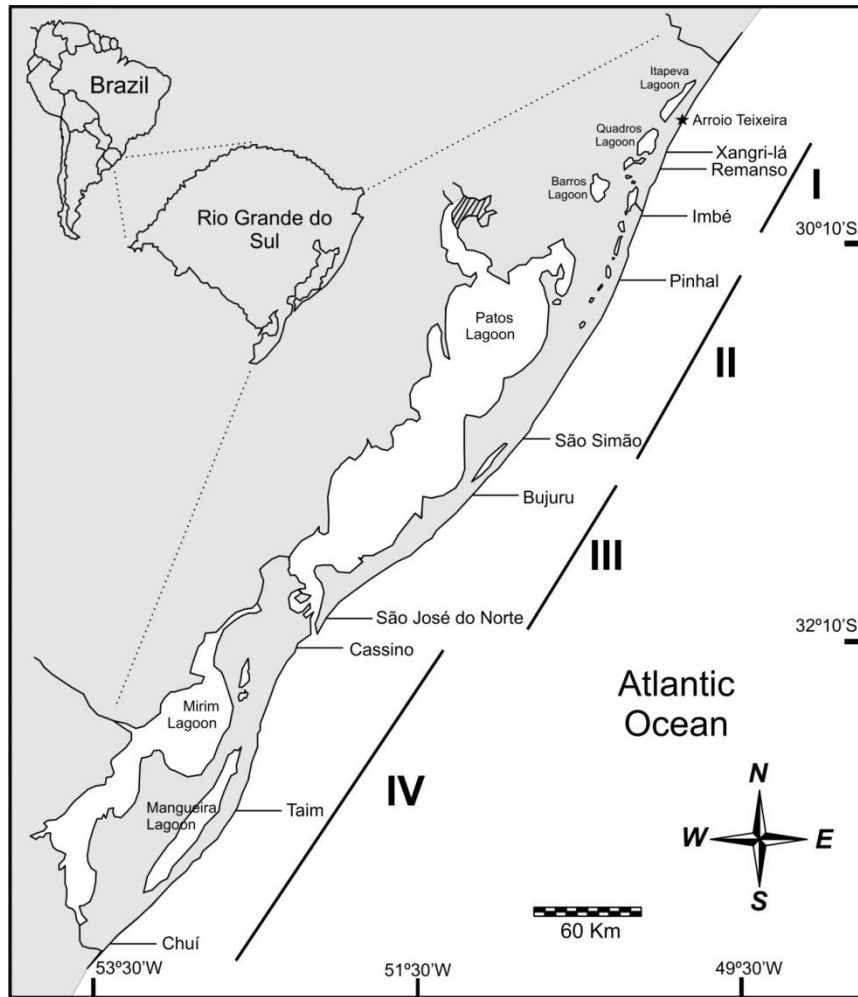
**Figure 3:** Effect of paleostability and present-day niche suitability on genetic diversity of *C. flamarioni* in the coastal plain of Rio Grande do Sul. Response variables are the mean number of alleles per population (A) and expected Heterozygosity (*He*).

**Figure 4:** Evolutionary relationship between *C. flamarioni* haplotypes (Hap 1 to Hap 10) based on 1,140 base pair of the mitochondrial Cytochrome-*b* gene sequences (n = 89). Circle areas are proportional to haplotype frequencies, and each color represents different populations. Crosshatches represent the number of nucleotide substitution between haplotypes. *C. australis* was used as an outgroup (Hap 11).

**Figure 5:** Bayesian cluster analysis of the microsatellite variation for nine *C. flamarioni* populations (n = 154 samples). The proportion of ancestry assigned to each of the 9 clusters with the highest posterior probability ( $K = 9$ ,  $\ln P(X/K) = -1670.4$ ) was plotted by individual. Each color represents each of the genetic clusters. Population abbreviations correspond to those in Table 1.

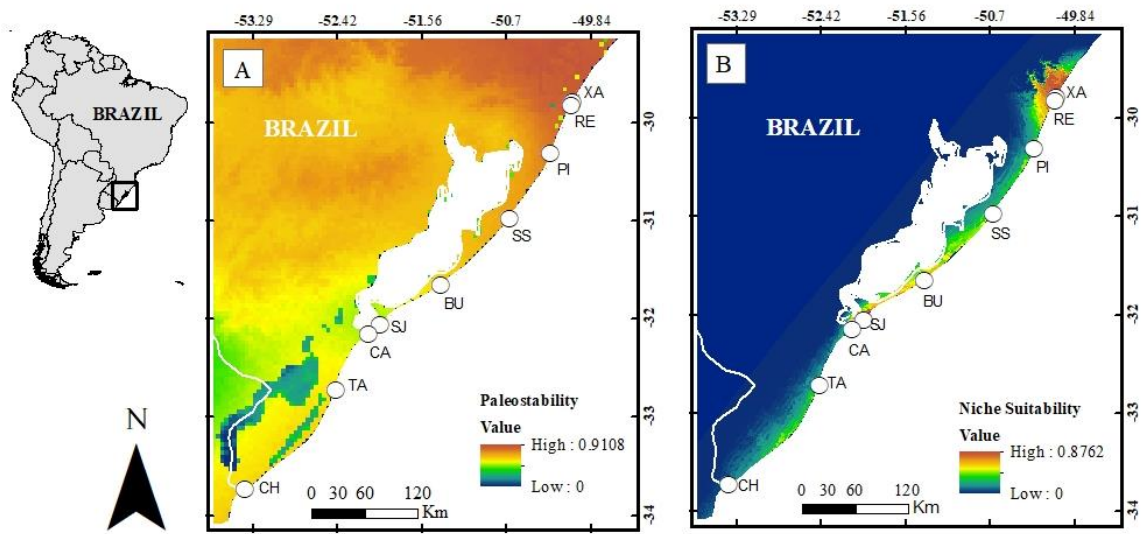
**Figure 6:** Bayesian phylogenetic tree for *Ctenomys flamarioni* obtained from 1,140 base pair of the mitochondrial Cytochrome-*b* gene sequences (n = 89). Homologous sequences from *C. australis*, *C. mendocinus* and *C. rionegransis* were used as outgroup) (GenBank accession numbers are shown in Appendix I). Population abbreviations correspond to those in Table 1.

**Figure 7:** Map of geographic distribution and phylogenetic relationship of Evolutionary Significant Units for *C. flamarioni*: Northern ESU (blue) and southern ESU (pink), separated by Patos Lagoon inlet.

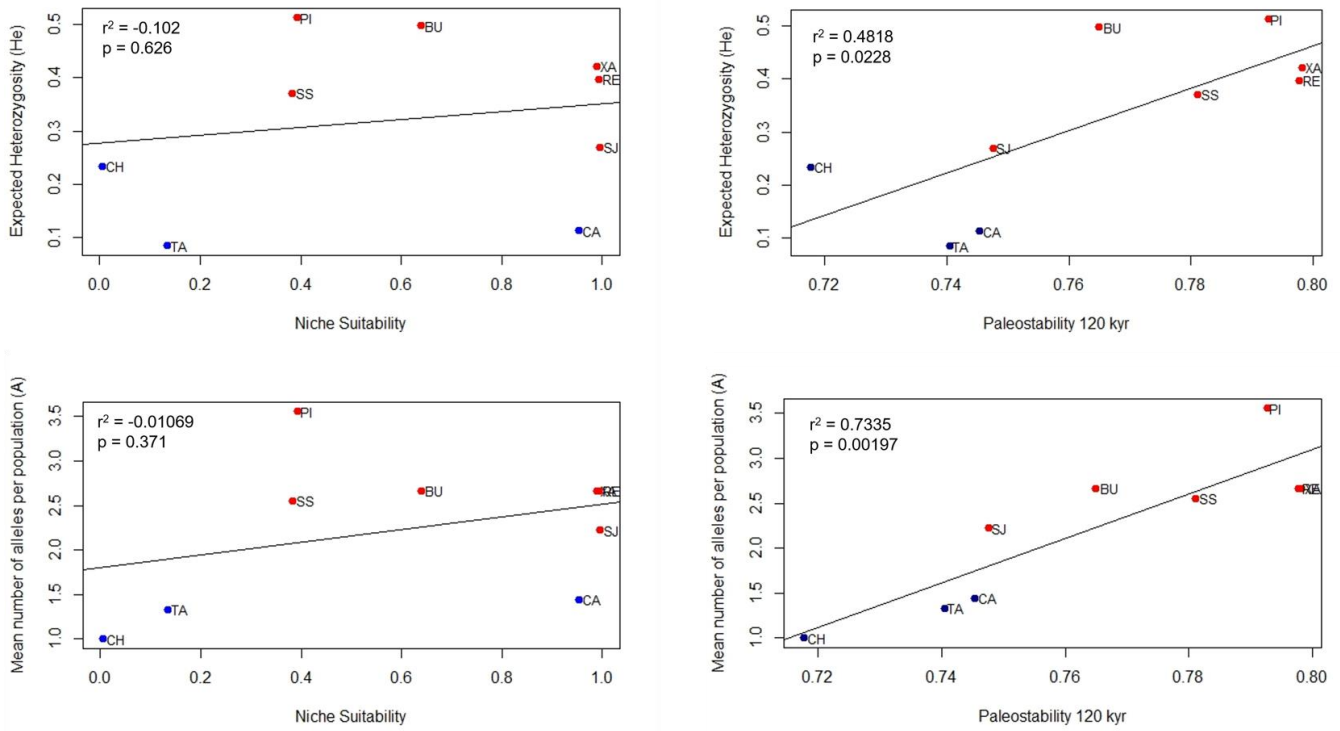


**Figure 1:** Geographic distribution of tuco-tuco-das-dunas (*Ctenomys flamarioni*) along the coastal plain of Rio Grande do Sul, Brazil. The ten population sampled: Xangrilá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bujuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA), Chuí (CH). The four regions divided by the potential natural barriers are indicated.

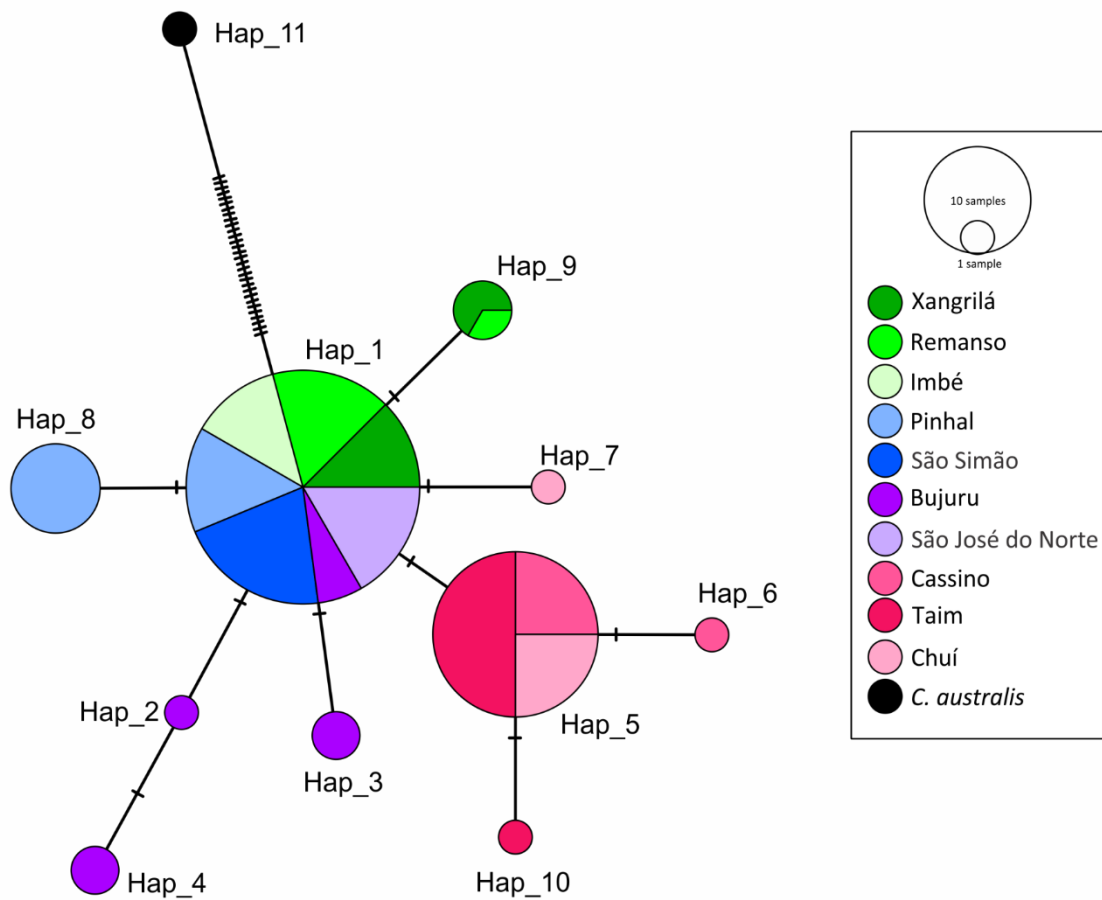




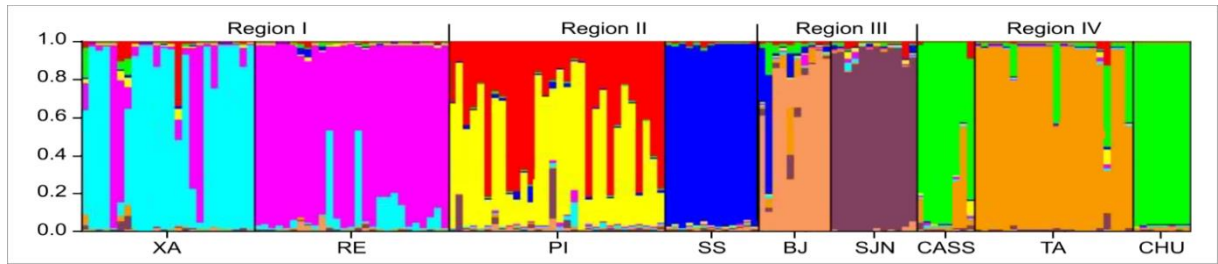
**Figure 2:** Maps of ecological variables. (A) Map of inferred climatic stability of Late Quaternary (adapted from Carnaval et al. 2014). (B) Map of niche suitability of *C. flamarioni* (adapted from Kubiak et al. 2017).



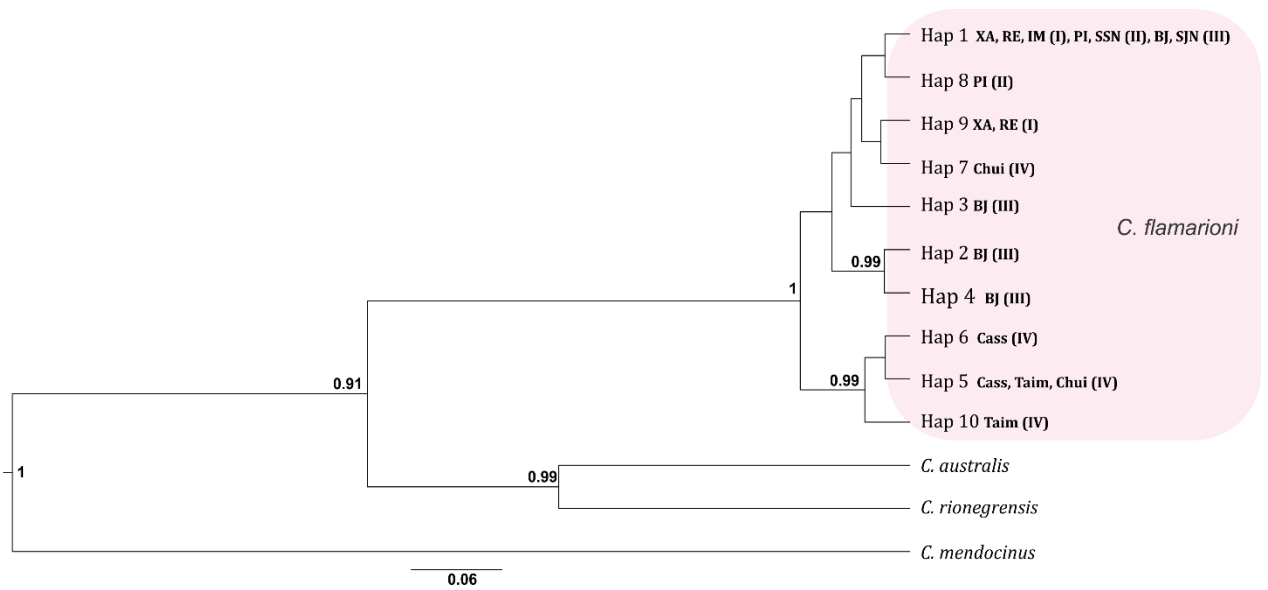
**Figure 3:** Effect of paleostability and present-day niche suitability on genetic diversity of *C. flamarioni* in the coastal plain of Rio Grande do Sul. Response variables are the mean number of alleles per population ( $A$ ) and expected Heterozygosity ( $He$ ).



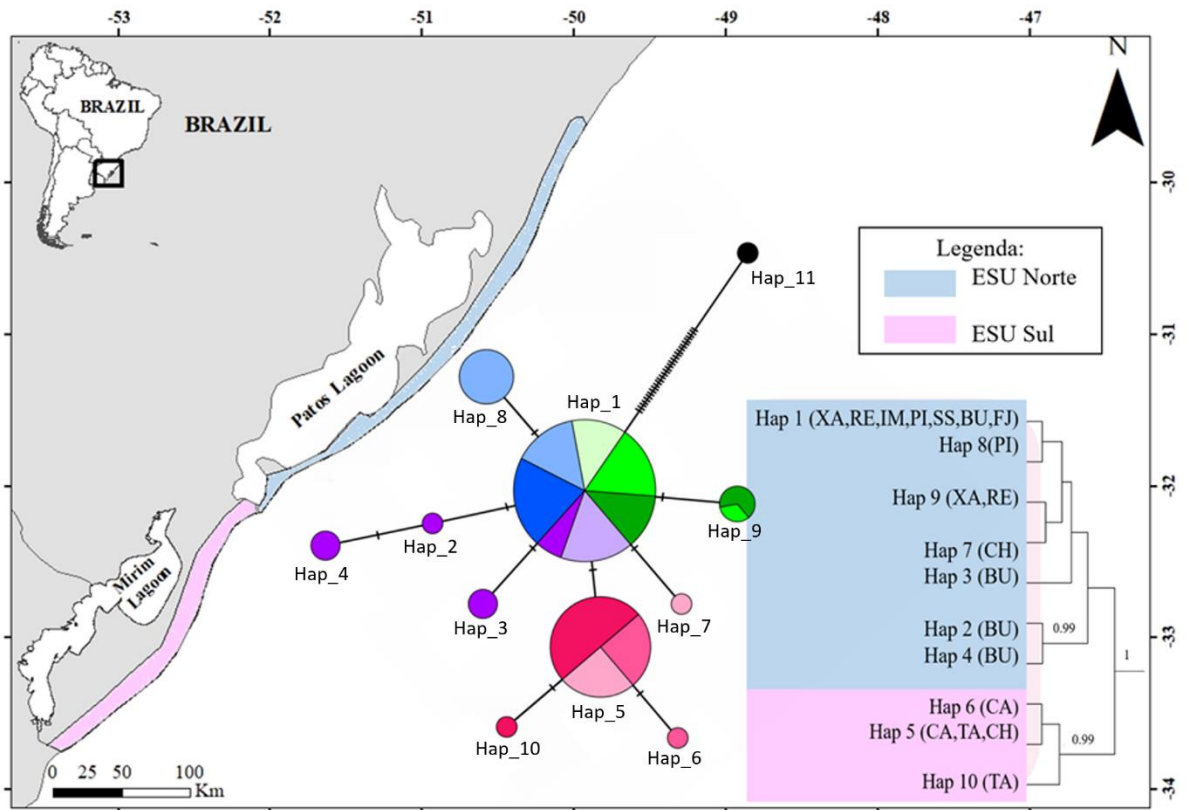
**Figure 4:** Evolutionary relationship between *C. flamarioni* haplotypes (Hap 1 to Hap 10) based on 1,140 base pair of the mitochondrial Cytocrome-*b* gene sequences ( $n = 89$ ). Circle areas are proportional to haplotype frequencies, and each color represents different populations. Crosshatches represent the number of nucleotide substitution between haplotypes. *C. australis* was used as an outgroup (Hap 11).



**Figure 5:** Bayesian cluster analysis of the microsatellite variation for nine *C. flamarioni* populations (n = 154 samples). The proportion of ancestry assigned to each of the 9 clusters with the highest posterior probability ( $K = 9$ ,  $\text{Ln P}(X/K) = -1670.4$ ) was plotted by individual. Each color represents each of the genetic clusters. Population abbreviations correspond to those in Table 1.



**Figure 6:** Bayesian phylogenetic tree for *Ctenomys flamarioni* obtained from 1,140 base pair of the mitochondrial Cytochrome-*b* gene sequences (n = 89). Homologous sequences from *C. australis*, *C. mendocinus* and *C. rionegrensis* were used as outgroup) (GenBank accession numbers are shown in Supplementar Information 2). Population abbreviations correspond to those in Table 1.



**Figure 7:** Map of geographic distribution and phylogenetic association of Evolutionary Significant Units for *C. flamarioni*: Northern ESU (blue) and southern ESU (pink), separated by Patos Lagoon inlet.

## Supplementary Information 1

Variable position of the haplotypes obtained from Cytochrome-*b* dataset (1140 bp,  $n = 90$ ) for populations of *Ctenomys flamarioni*. Dots represent match with nucleotides present in haplotype 1. The distribution of haplotypes by population and the total number of individuals by haplotype and by population are shown. Populations correspond to those on Figure 1 and Table 1.

Hap	Nucleotide position									Haplotype frequencies by population												
										XA	RE	IM	PI	SS	BU	SJ	CA	TA	CH	Total		
	2	3	3	4	7	1	1	1	1													
	2	5	6	1	5	0	0	0	1													
	8	1	1	7	3	3	8	9	3													
					5	2	0	2														
Hap 1	T	C	T	T	A	T	T	A	A	6	8	6	7	10	3	8	-	-	-	-	-	48
Hap 2	.	.	C	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Hap 3	.	T	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
Hap 4	.	.	C	.	G	.	.	.	.	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
Hap 5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	6	12	6	-	24	
Hap 6	C	.	.	C	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
Hap 7	.	.	.	.	.	.	.	C	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	
Hap 8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Hap 9	.	.	.	.	.	C	.	.	.	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Hap10	.	.	.	C	.	.	.	.	C	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	
Total										8	9	6	14	10	8	8	7	13	7		90	

## Supplementary Information 2

GeneBank accession numbers for the complete cytochrome-*b* sequences (and its respective reference) used on the reconstruction of the phylogenetic relationships among haplotypes of *Ctenomys flamarioni*.

*Ctenomys australis*: AF370697 (Slamovits et al. 2001)

*Ctenomys flamarioni*: AF119107 (D' Elia et al. 1999)

*Ctenomys mendocinus*: AF007062 (Lessa and Cook 1998)

*Ctenomys rionegrensis*: AF538374 (Wlasiuk et al. 2003)



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresentou uma abordagem integrativa sobre a história evolutiva de *Ctenomys flamarioni*, mesclando dados ecológicos e moleculares. Os resultados aqui obtidos demonstraram a força de fatores históricos em moldar padrões atuais de diversidade genética e da biogeografia da espécie. Baseados na paleoestabilidade climática e nas relações filogeográficas, é possível inferir alguns passos faltantes na história evolutiva de *C. flamarioni*. Além disso, a ‘hipótese do microrefúgio’, complementa o que já foi proposto por Freitas (1994), Massarini and Freitas (2005) e Cruz (2017), demonstrando que houve um reduto durante eventos de instabilidade histórica, mantendo a diversidade da espécie. A rede de haplótipos encontrada corroborou com essa hipótese, uma vez que demonstrou que os haplótipos do norte da distribuição seriam os mais antigos, a partir dos quais teriam se originado os demais.

Além disso, *C. flamarioni* apresenta uma distribuição linear, ao longo da primeira linha de dunas da Planície Costeira (Freitas 1994). Esse tipo de distribuição é compartilhado com poucas outras espécies de ctenomídeos, e impõe fortes restrições ao fluxo gênico entre populações, favorecendo a migração entre demes vizinhos (Hutchinson e Templeton, 1999). As estimativas de baixo fluxo gênico encontradas para *C. flamarioni* apoiam esse padrão entre todas as populações. Dessa forma, cada população poderia ser considerada como uma Unidade de Manejo independente, devido a sua alta estruturação.

Utilizando conceito genético proposto por (Moritz 1994) demonstramos que as populações da espécie estão divididas em duas Unidades Evolutivamente Significativas, separadas pela barreira da Lagoa dos Patos. Esse fato evidencia que um novo possível evento de especiação alopátrica estaria ocorrendo, separando populações do Norte e do Sul da barreira geográfica.

A ESU do norte se localiza em uma região de alta paleoestabilidade, de alta adequabilidade de nicho atual (Kubiak et al. 2017) e apresenta os mais altos níveis de diversidade genética da espécie. Entretanto, também é alvo de intenso impacto antrópico, associado a fragmentação e destruição do habitat (Esteves et al. 2003). Enquanto que a ESU do sul está localizada em uma área de alta instabilidade histórica, baixa adequabilidade de nicho atual (Kubiak et al. 2017) e baixos níveis de diversidade genética. Apesar do impacto humano não ser tão intenso quanto na região norte, a conversão do habitat em silvicultura também se torna uma ameaça (Esteves et al. 2003).

Esperamos que o levantamento desses dados a respeito da estruturação genética e filogeográfica entre as populações de *C. flamarioni*, juntamente com dados ecológicos a respeito da estabilidade climática históricos e das condições de nicho atuais ao longo de toda a sua distribuição geográfica, contribuam para o planejamento de futuras ações de manejo, visando a conservação do ambiente costeiro e do tuco-tuco-das-dunas.

## REFERÊNCIAS

- Ab'Saber A (1990) Paleoclimas quaternários e pré-história da América Tropical. *Brazilian J Biol* 2:821–831
- Araújo MB, Nogués-Bravo D, Diniz-Filho JAF, et al (2008) Quaternary climate changes explain diversity among reptiles and amphibians. *Ecography (Cop)* 31:8–15. doi: 10.1111/j.2007.0906-7590.05318.x
- Avice JC (1998) The history and purview of phylogeography.pdf. *Mol Ecol* 371–379. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00391.x
- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge
- Avice JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evlution*. Chapman and Hall, New York
- Avice JC, Arnold J, Martin Ball R, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA SN (1987) Intraespecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics an Systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18:489–522
- Avice JC, Hamrick JL (1996) *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York
- Bandelt H-J, Peter Forster and AR, "hl (1999) Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Mol Biol* 16:37–48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol Ecol* 7:367–369. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00424.x
- Bidau CJ (2015) Family Ctenomyidae Lesson, 1842. In: eds. Patton JL, Pardinãs UFJ, D'elía G (eds) *Mammals of South America, V. 2 Rodents*. The University of Chicago Press, Chicago and London. pp. 818-877
- Bretschneider, D.S. (1987) *Alguns aspectos da biologia ecologia de Ctenomys flamarioni Travi, 1981 (Rodentia: Ctenomyidae)*. M.S. dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Busch, C., C.D. Antinuchi, J.C. Del Valle, M.J. Kittlein , A.I. Malizia , A.I. Vassallo, and R.R. Zenuto. 2000. Population ecology of subterranean rodents. Pp. 183-226 in: Lacey, E.A., J.L. Patton, and G.N. Cameron, eds.) *The University of Chicago Press, Chicago, Illinois*.

- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, et al (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* (80- ) 323:785–789. doi: 10.1126/science.1166955
- Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J Biogeogr* 35:1187–1201. doi: 10.1111/j.1365-2699.2007.01870.x
- Carnaval AC, Waltari E, Rodrigues MT, et al (2014) Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proc R Soc B Biol Sci* 281:20141461–20141461. doi: 10.1098/rspb.2014.1461
- Contreras, L.C., And B.K. McNab. (1990) Thermoregulation and energetics in subterranean mammals. Pp. 231-250 in *Biology of subterranean mammals at the organismal and molecular levels* (E. Nevo and O.A. Reig, eds.). New York, Wiley-Liss.
- Corrêa, I.C.S., Baitli, R., Ketzer, J.M. and Martins, R. (1992). Translação horizontal e vertical do nível do mar sobre a plataforma continental do Rio Grande do Sul nos últimos 17.500 anos BP. *Anais III Congresso ABEQUA-Belo Horizonte*, pp. 225-240.
- Crandall K a, Bininda-emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) in *Conservation Biology*. 15:290–295
- Cruz MM (2017) História evolutiva e modelagem de nicho ecológico de *Ctenomys flamarioni* e *Ctenomys australis* ( Rodentia : Ctenomyidae ) História evolutiva e modelagem de nicho ecológico de *Ctenomys flamarioni* e *Ctenomys australis* ( Rodentia : Ctenomyidae ). 1–60
- D. J, Kaustuv R, Valentine JW (2006) Out of the Tropics : Evolutionary Diversity Gradient. *Science* (80- ) 314:102–106. doi: 10.1126/science.1130880
- Da Silva MNF, Patton JL (1998) Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Mol Ecol* 7:475–486. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00276.x
- Del Valle, J.C., M.I. Lohfelt, M. Comparatore, M.S. Cid, and C. Busch. 2001. Feeding selectivity and food preference of *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Mammalian Biology* 66: 165-173.
- Dillenburg S (2009) Geology and Geomorphology of Holocene Coastal Barriers of Brazil
- Dillenburg SR, Roy PS, Cowell PJ, Tomazelli LJ (2000) Influence of antecedent topography on coastal evolution as tested by the shoreface translation-barrier model (STMJ). *J Coast Res* (ISSN 0749-0208) 16:71–81. doi: 10.2112/03-0071.1

- Dizon A, Lockyer C, Perrin W, et al (1992) Rethinking the Stock Concept: a Phylogeographic Approach. *Conserv Biol* 6:24–36
- D'Elia, G., Lessa, E.P. and 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. *J. Mammal. Evol.* 6 (1), 19-38
- Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D.; Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 1969–1973
- Erwin D.H. (2009) Climate as a Driver of Evolutionary Change. *Curr Biol* 19:R575–R583. doi: 10.1016/j.cub.2009.05.047
- Esteves L.S., da Silva A.R.P., Arejano T.B., et al (2003) Coastal development and human impacts along the Rio Grande do Sul beaches, Brazil. *J Coast Res* 548–556
- Esteves L.S., Toldo Jr. E., Dillenburg S.R., Tomazelli L.J. (2002) Long-and-short-term coastal erosion in Southern Brazil. *J Coast Res JCR* 282:273–282
- Excoffier L., Laval G., Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fabre P-H, Hautier L, Dimitrov D, Douzery E.J. (2012) A glimpse on the pattern of rodent diversification: a phylogenetic approach. *BMC Evol Biol* 12:88. doi: 10.1186/1471-2148-12-88
- Fernandes F.A., Fornel R., Cordeiro-Estrela P., Freitas T.R.O. (2009) Intra- and interspecific skull variation in two sister species of the subterranean rodent genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae): Coupling geometric morphometrics and chromosomal polymorphism. *Zool J Linn Soc* 155:220–237. doi: 10.1111/j.1096-3642.2008.00428.x
- 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. M.S. dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- 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 microssatélites e DNA mitocondrial. Tese 193
- Fernández-Stolz G.P., Stolz J.F.B., de Freitas T.R.O. (2007) Bottlenecks and Dispersal in the Tuco-Tuco Das Dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in Southern

- Brazil. *J Mammal* 88:935–945. doi: 10.1644/06-MAMM-A-210R1.1
- Firestone KB, Elphinstone MS, Sherwin WB, Houlden BA (1999) Phylogeographical population structure of tiger quolls *Dasyurus maculatus* (Dasyuridae: Marsupialia), an endangered carnivorous marsupial. *Mol Ecol* 8:1613–1625. doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00745.x
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2010) *Introduction to Conservation Genetics*, 2nd edn. Cambridge University Press, New York
- Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. *Mol Ecol* 10:2741–2752. doi: 10.1046/j.1365-294X.2001.t01-1-01411.x
- Freitas, TRO (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ* 30:53–59. doi: 10.1080/01650521.2014.921976
- Freitas T (2001) Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in Southern Brazil: *Ctenomys lami* spec. nov. Separated from *C. minutus* Nehring 1887. *Stud Neotrop Fauna Environ* 36:1–8. doi: 10.1076/snfe.36.1.1.8882
- Freitas T (2007) *Ctenomys lami*: The highest chromosome variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system. *Acta Theriol (Warsz)* 52:171–180. doi: 10.1007/BF03194212
- Freitas T, Fernandes FA, Fornel R, Roratto PA (2012) An endemic new species of tuco-tuco, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), with a restricted geographic distribution in southern Brazil. *J Mammal* 93:1355–1367. doi: 10.1644/12-MAMM-A-007.1
- Freitas TRO De (1994) Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia-Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. *Cytogenet Cell Genet* 67:193–8
- Freitas, TRO (2016) Family Ctenomyidae (Tuco-tucos). Pp. 498-534 in *Handbook of the Mammals of the World - V. 6 Lagomorphs and Rodents I* (Wilson D.E., T.E. Lacher, Jr and R.A. Mittermeier, eds.) Barcelona: Lynx Edicions Publications
- Freygang CC, Marinho JR, Freitas TRO De (2004) New karyotypes and some considerations about the chromosomal diversification of. *Experientia* 125–132
- Gava A, Freitas TRO (2003) Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica* 119:11–17. doi: 10.1023/A:1024465429856

- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): A computer note computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86:485–486. doi: 10.1093/jhered/est020
- Graham CH, Moritz C, Williams SE (2006) Habitat history improves prediction of biodiversity in rainforest fauna. *Proc Natl Acad Sci* 103:632–636. doi: 10.1073/pnas.0505754103
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lesson for Conservation. *J Hered* 89:415–426
- Hare MP (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends Ecol Evol* 16:700–706. doi: 10.1016/S0169-5347(01)02326-6
- Harpending HC, Batzer M a, Gurven M, et al (1998) Genetic traces of ancient demography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1961–7. doi: 10.1073/pnas.95.4.1961
- Hawkins, BA; Field, R; Cornell, HV; Currie, DJ; Gue´gan, JF; Kaufman, DM; Kerr, JT; Mittelbach, GG; Oberdorff, T; O’ Brien, EM; Porter, EE; Turner J (2003) Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology* 3105–3117
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 359:183–195. doi: 10.1098/rstb.2003.1388
- Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. *Evolution (N Y)* 53:1898. doi: 10.2307/2640449
- IUCN (2010) IUCN Redlist of Threatened Species. In: Int. Conserv. Union. <http://www.iucnredlist.org/>
- Jansson R (2003) Global patterns in endemism explained by past climatic change. *Proc R Soc B Biol Sci* 270:583–590. doi: 10.1098/rspb.2002.2283
- Jarne P, Lagoda P (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11:424–429. doi: 10.1016/0169-5347(96)10049-5
- Kubiak BB, Gutiérrez EE, Galiano D, et al (2017) Can Niche Modeling and Geometric Morphometrics Document Competitive Exclusion in a Pair of Subterranean Rodents (Genus *Ctenomys*) with Tiny Parapatric Distributions? *Sci Rep* 7:. doi: 10.1038/s41598-017-16243-2
- Lacey EA (2001) Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: Molecular properties and population dynamics. *Heredity (Edinb)* 86:628–637. doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00881.x

- Lacey EA, Maldonado JE, Clabaugh JP MM (1999) Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Mol Ecol* 8:1766–1768. doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00723-8.x
- Lacey EA, Patton JL, Cameron G N (2000) *Life Underground*. The University of Chicago Press, Chicago Illinois.
- Lacey, E. A., Braude S. H. & Wierczorek, J. R. (1998). Solitary burrow use by adult Patagonian tuco-tucos (*Ctenomys haigi*). *J. Mammal.* 79, 986–991.
- Leigh JW, Bryant D (2015) POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6:1110–1116. doi: 10.1111/2041-210X.12410
- Lessa EP, Cook JA (1998) The Molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Mol Phylogenet Evol* 9:88–99. doi: 10.1006/mpev.1997.0445
- Maestri R, Fornel R, Gonçalves GL, et al (2016) Predictors of intraspecific morphological variability in a tropical hotspot: comparing the influence of random and non-random factors. *J Biogeogr* 43:2160–2172. doi: 10.1111/jbi.12815
- Mapelli FJ, Mora MS, Mirol PM, Kittlein MJ (2012) Effects of Quaternary climatic changes on the phylogeography and historical demography of the subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. *J Zool* 286:48–57. doi: 10.1111/j.1469-7998.2011.00849.x
- Massarini AI, Freitas TRO (2005) Morphological and cytogenetics comparison in species of the *Mendocinus*-group (genus *Ctenomys*) with emphasis in *C. australis* and *C. flamarioni* (Rodentia-Ctenomyidae). *Caryologia* 58:21–27. doi: 10.1080/00087114.2005.10589427
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press, New York
- McNab BK (1966) The Metabolism of Fossorial Rodents : A Study of Convergence. *Ecology* 47:712–733
- Mora MS, Cutrera AP, Lessa EP, et al (2013) Phylogeography and population genetic structure of the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): Integrating demographic and habitat histories. *J Mammal* 94:459–476. doi: 10.1644/11-MAMM-A-242.1
- Mora MS, Mapelli FJ, Gaggiotti OE, et al (2010) Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC Genet* 11:. doi: 10.1186/1471-2156-11-9
- Moreira DM, Franco MHL, Freitas TRO, Weimar TA (1991) Biochemical Polymorphisms and Phenetic Relationships in Rodents of the Genus *Ctenomys* from Souther Brazil.



- Biochem Genet 29:601–615
- Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philos Trans R Soc A* 349:113–118. doi: 10.1098/rsta.1983.0022
- Moritz C (1994) Defining “ Evolutionarily Significant Units .” *Trends Ecol Evol* 373–375
- Moussalli A, Moritz C, Williams SE, Carnaval AC (2009) Variable responses of skinks to a common history of rainforest fluctuation: Concordance between phylogeography and palaeo-distribution models. *Mol Ecol* 18:483–499. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.04035.x
- Nevo E (1979) Adaptative convergence and divergence of subterranean mammals. *Annu Rev Ecol Syst* 269–308
- Nowak RM (1999) *Walker’s Mammals of the World*, 6th edn. Hopkins University Press, Baltimore
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- R Development Core Team (2017) A language and environment for statistical computing
- Rambaut A (2009) Tracer v.1.5 Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- Reig OA, Bosh C, Contreras J, Ortells M (1990) An overview of evolution, systematic, population biology, cytogenetics, and molecular biology in *Ctenomys*. *Evol Subterr Mamm Org Mol Lev* 71–96
- Rice W (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution (N Y)* 223–225
- Rocha-Barbosa O, Bernardo JSL, Loguercio MFC, et al (2013) Penial morphology in three species of Brazilian tuco-tucos, *Ctenomys torquatus*, *C. minutus*, and *C. flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae). *Braz J Biol* 73:201–209. doi: 10.1590/S1519-69842013000100022
- Roratto PA, Fernandes FA, de Freitas TRO (2015) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys torquatus*: An evaluation of the riverine barrier hypothesis. *J Biogeogr* 42:694–705. doi: 10.1111/jbi.12460
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol Evol* 1:9–10. doi: 10.1016/0169-5347(86)90059-5
- Schlotterer C (1998) Microsatellites. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular Genetic Analysis of*

- Populations – A practical approach. Oxford Irl Press.
- Slamovits CH, Cook JA, Lessa EP, Rossi MS (2001) Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): A phylogenetic approach. *Mol Biol Evol* 18:1708–1719. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003959
- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129:555–562. doi: 10.1093/hmg/7.3.399
- Sokal RR, Oden NL, Thomson BA (1998) Local spatial autocorrelation in biological variables. *Biol J Linn Soc* 65:41–62. doi: 10.1006/bijl.1998.0238
- Stolz JFB, Gonçalves GL, Leipnitz L, Freitas TRO (2013) DNA-based and geometric morphometric analysis to validate species designation: A case study of the subterranean rodent *Ctenomys bicolor*. *Genet Mol Res* 12:5023–5037. doi: 10.4238/2013.October.25.1
- Tautz D (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena SDJ Chakraborty R Epplen TJ ad Jeffreys AJ (ed) *DNA fingerprinting state of the science*. Pp 21-28
- Tomazelli LJ, Dillenburg SR, Villwock JA (2000) Late Quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain, southern Brazil. *Rev Bras Geociencias* 30:474–476
- Tomazelli LJ, Villwock JA (2005) Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. *Gravel* 3:109–115
- Tomazelli LJ, Willwock JA, Dillenburg SR, et al (1998) Significance of Present Day Coastal Erosion and Marine Transgression, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *An Acad Bras Cienc* 70:221–229.
- Tonni EP, Cione AL, Figini AJ (1999) Predominance of arid climates indicated by mammals in the pampas of Argentina during the Late Pleistocene and Holocene. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 147:257–281. doi: 10.1016/S0031-0182(98)00140-0
- van Oosterhout, C; Hutchinson, WF; Wills, DPM; Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 535–538
- Verzi DH, Olivares AI, Morgan CC (2010) The oldest South American tuco-tuco (late Pliocene, northwestern Argentina) and the boundaries of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Mamm Biol* 75:243–252. doi: 10.1016/j.mambio.2009.03.011

- Villwock, J.A., Tomazelli, L.J., Loss, E.L., Dehnhardt, E.A., Horn, N.O., Bachi, F.A., Dehnhardt, B.A., 1986. Geology of the RS coastal province. In: Rabassa, J. (Ed.), Quaternary of South America and Antarctic Peninsula vol. 4, 79–97.
- Vogler AP, Desalle R (1994) Diagnosing units of conservation management. *Conserv Biol* 8:354–363. doi: 10.1046/j.1523-1739.1994.08020354.x
- Waples RS (1995) Evolutionarily Significant Units and the Conservation of Biological Diversity under the Endangered Species Act. *Am Fish Soc Symp* 17:8–27. doi: 10.1111/j.1523-1739.1998.97524.x
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution (N Y)* 38:1358. doi: 10.2307/2408641
- Werneck FP, Nogueira C, Colli GR, et al (2012) Climatic stability in the Brazilian Cerrado: Implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *J Biogeogr* 39:1695–1706. doi: 10.1111/j.1365-2699.2012.02715.x
- Wiens JJ, Graham CH (2005) Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:519–539. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.36.102803.095431
- Wilson DE, Reeder DM (2005) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference.*, 3rd edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Wlasiuk G, Garza JC, Lessa EP (2003) Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys Rionegrensis*): Inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution (N Y)* 57:913–926. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00302.x
- Zenuto, R., and C. Busch. (1995) Influence of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Tuco-tuco) in a sand-dune grassland. *Journal of Mammalian Biology* 60: 277-285.