



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ROEDORES SUBTERRÂNEOS NA ERA GENÔMICA: UM ESTUDO DE CASO NO

GÊNERO *Ctenomys* (CTENOMYIDAE:RODENTIA)

TESE DE DOUTORADO

LEONARDO TRINDADE LEIPNITZ

AGRADECIMENTOS

Dedico esta tese a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional, não só ao longo da minha jornada acadêmica, como ao longo da minha vida.

Dedico esta tese a minha mãe, Lisiane, pois sem seu carinho maternal e seus conselhos cheios de sabedoria seria muito difícil superar os obstáculos que a vida impõe diariamente; com ela aprendi a ser carinhoso e respeitoso com aqueles que me cercam e que quero bem, e levarei para minha vida toda esse aprendizado. Dedico esta tese à memória de meu pai, Paulo Ricardo, que enquanto esteve presente em vida sempre me foi o parâmetro de justiça e de gratidão e sempre me apoiou em tudo o que faço; hoje em morte, procuro honrá-lo em vida, fazendo sempre o meu melhor.

Dedico esta tese aos amigos de infância, os irmãos que a vida me permitiu escolher, pelo apoio e carinho incondicional durante todos estes anos acadêmicos; mesmo por vezes distantes, quando nos vemos parece que ontem mesmo nos falamos. Contem comigo sempre.

Dedico esta tese aos amigos de faculdade, companheiros nessa jornada de esclarecimento sobre a natureza das coisas, parceiros para toda a hora; saibam que a falta que sinto de vocês é enorme e que espero ser mais presente daqui para a frente. Obrigado pela compreensão pela minha ausência, em especial nesses últimos meses de loucura com a tese.

Dedico esta tese aos amigos que fiz no Laboratório de Citogenética e Evolução ao longo de dez anos, entre Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado; saibam que vocês são profissionais excelentes e pessoas maravilhosas, e que sentirei falta da convivência diária, das conversas edificantes sobre ciência e dos cafés, pontualmente às 10h. Jamais

hesitem em me chamar para conversar sobre seus trabalhos e suas vidas, ou para tomar uma cerveja, ou para fazer as duas coisas ao mesmo tempo. Obrigado por tudo.

Dedico esta tese a minhas duas filhas caninas, minhas fiéis companheiras de estudo e a personificação do carinho incondicional; sem saber, elas me ensinam todo o dia a ser uma pessoa melhor. Se os cães não são realmente os melhores amigos do homem, estão muito perto disso.

Finalmente, dedico esta tese a minha amada namorada, Rafaela, minha companheira e confidente, que mesmo sob a constante pressão da vida de profissional da saúde, por vezes árdua e ingrata, nunca deixou de ter tempo para mim. Me ensinastes, e me ensinas, todos os dias a ser um homem melhor, mais responsável e mais carinhoso, nesses quase quatro anos em que me dás o privilégio de dividir minha vida contigo. Te amo muito, e espero te ter ao meu lado para sempre.

De coração, muito obrigado a todos, e nos vemos por aí!

Leonardo.

“Wheels within wheels in a spiral array, a pattern so grand and complex.”

Rush – Natural Science

ÍNDICE:

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

ROEDORES SUBTERRÂNEOS NO MUNDO E A FAMÍLIA

CTENOMYIDAE.....1

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *CTENOMYS* POR
MEIO DE MARCADORES

MOLECULARES.....4

POLIMORFISMOS PROTEICOS E CROMOSSÔMICOS EM

CTENOMYS.....10

MARCADORES MOLECULARES EM *CTENOMYS*: DNA

MITOCONDRIAL, NUCLEAR E MICROSSATÉLITES.....13

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO EM
ESTUDOS ECOLÓGICOS.....18

JUSTIFICATIVA: *CTENOMYS* NO CENTRO-OESTE E NORTE DO BRASIL

COMO ESTUDO DE CASO: COMPARATIVOS ENTRE MARCADORES

CLÁSSICOS E DE NOVA GERAÇÃO.....22

OBJETIVOS.....23

CAPÍTULO II: DESCRIÇÃO MOLECULAR E MORFOMÉTRICA DE LINHAGENS

RECENTEMENTE DERIVADAS DO CENTRO-OESTE E NORTE DO BRASIL

ARTIGO I: “Lineages of Tuco-tucos (Ctenomyidae: Rodentia) from Midwest and
Northern Brazil: Late Irradiations of Subterranean Rodents Towards the Amazon
Forest”.....26

CAPÍTULO III: CONJUNTOS DE DADOS GENÔMICOS E SUAS IMPLICAÇÕES
EM *CTENOMYS*

ARTIGO II: “RAD seq, microsatellites and mitochondrial DNA sequences reveals both different species and genetically divergent populations within the complex <i>Ctenomys</i> (Rodentia) from the Cerrado-Amazon Forest”.....	41
CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES GERAIS, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	101
REFERÊNCIAS.....	110
ANEXOS.....	128

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

ROEDORES SUBTERRÂNEOS NO MUNDO E A FAMÍLIA CTENOMYIDAE

Os roedores subterrâneos distribuem-se em oito famílias e subfamílias da ordem Rodentia presentes em todos os continentes, exceto Oceania e Antártida, e não apresentam relação filogenética direta, ou seja, são parafiléticos (Fabre et al., 2012). Dessa forma, as características comuns encontradas em todos os roedores subterrâneos são convergências adaptativas, isto é, adaptações morfológicas e fisiológicas que os permitiram ocupar nichos semelhantes independentemente (Reig et al., 1990; Lacey et al., 2000). O nicho subterrâneo é marcadamente distinto do arborícola e do terrestre por apresentar baixa concentração de oxigênio e alta concentração de gás carbônico, menor variação de temperatura ao longo do dia, poucos recursos orgânicos disponíveis e material mineral acumulado, fatores que, em tese, limitam a forma geral e o tamanho corporal desses animais e, principalmente, das estruturas especializadas do crânio, as quais são indispensáveis para modificar o ambiente a partir da escavação e para permitir a obtenção de alimento (Stein, 2000). Além disso, roedores subterrâneos apresentam convergência adaptativa em relação a características fisiológicas, tais como fluxo energético, transferência de calor, balanço hídrico e respiração similares, que constituem adequações à vida nas galerias subterrâneas as quais habitam (Buffenstein, 2000); prova disso é que análises de mitogenomas das famílias Octodontidae e Ctenomyidae sugerem seleção positiva de genes mitocondriais em função do ambiente hipóxico no qual os roedores subterrâneos vivem (Tomasco e Lessa, 2011). Fatores ambientais externos às galerias subterrâneas, como distribuição de recursos vegetais e heterogeneidade do solo são determinantes da dispersão de roedores subterrâneos, de forma que a escassez de recursos alimentares e o acúmulo de umidade no solo, por exemplo, limitam a exploração do local

pelos indivíduos (Busch et al., 2000). De fato, uma das prováveis causas da diversificação dos roedores subterrâneos durante a colonização do continente americano, a cerca de 66 milhões de anos atrás, foi a aridização ambiental em escala global a partir do Cenozoico tardio, visto que solos arenosos e drenáveis facilitam a escavação, e por consequência, a exploração do nicho subterrâneo (Nevo, 1979).

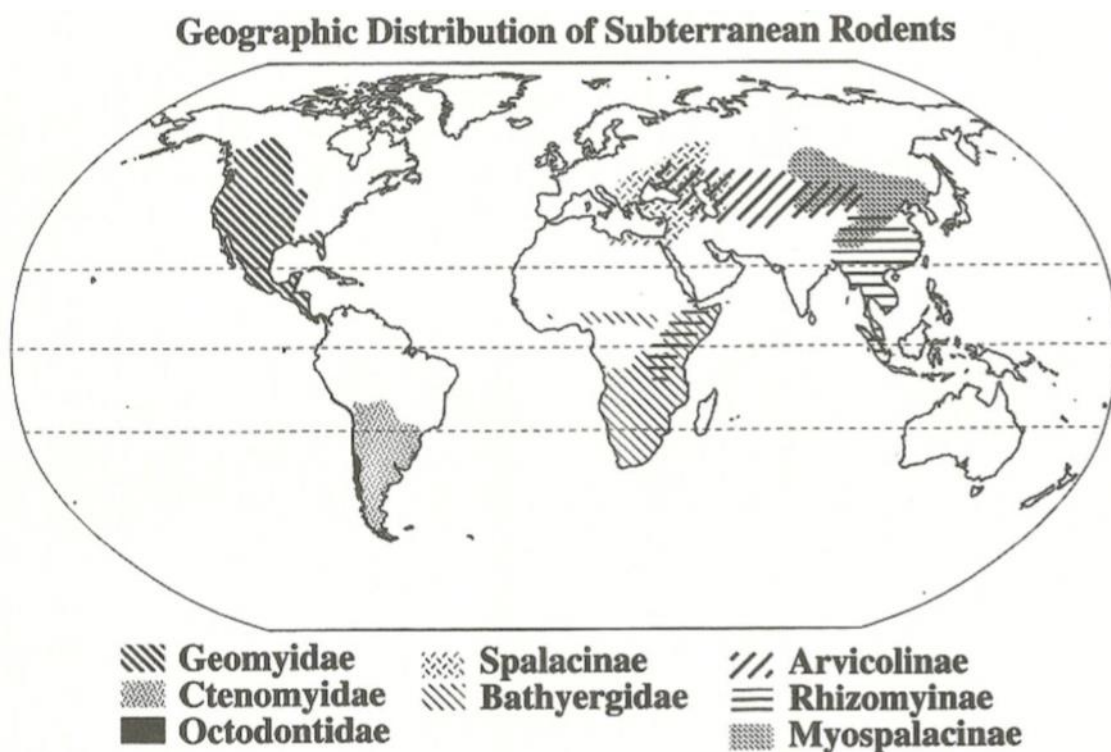


Figura 1. Distribuição geográfica das famílias e subfamílias de roedores subterrâneos, conforme Lacey et al. (2000).

Na América do Sul, os roedores subterrâneos são representados por duas famílias, Octodontidae e Ctenomyidae, que compartilham, além das características comuns aos roedores subterrâneos, um ancestral comum datado de cerca de 10,65 milhões de anos (Marshall e Sempere, 1993; Vucetich et al., 1999). Enquanto Octodontidae constitui uma família rica em gêneros, mas limitada em diversidade de espécies e na sua distribuição

geográfica, restrita a oeste dos Andes (Ojeda et al., 2013), Ctenomyidae constitui-se de gênero único, *Ctenomys*, altamente diverso, compreendendo cerca de 70 espécies nominais válidas (Bidau 2015; Patton et al., 2015; Freitas 2016), e uma distribuição geográfica consideravelmente maior que a da sua família irmã, ocupando a metade sul da América do Sul, desde a Patagônia ao sul do continente, até a porção sul da Amazônia, nos estados do Mato Grosso e de Rondônia, no Brasil, ao norte da distribuição; de oeste para leste, o gênero ocupa os Andes na Argentina, Chile e Bolívia, e o Chaco Paraguai, distribuindo-se até o litoral da Argentina, do Uruguai e dos estados Rio Grande do Sul e Santa Catarina, no Brasil (Figura 1).

O gênero *Ctenomys* tem provável origem na província argentina de Jujuy, há, no mínimo, 3,5 milhões de anos, segundo datação fóssil (Verzi et al., 2010), a partir da qual o gênero diversificou-se até a distribuição conhecida hoje. É composto por espécies predominantemente solitárias, territoriais e simpátricas, a exceção de *C. sociabilis*, que é comunal, de forma que os indivíduos coabitam seus sistemas de galerias subterrâneas apenas durante o acasalamento, comportamento apresentado pelos dois sexos, e para fins de cuidado parental para com os filhotes, característica presente apenas nas fêmeas (Lacey et al., 2000). Habitam, via de regra, áreas de campos abertos, com vegetação rasa ou arbustiva, campos arenosos ou dunas; contudo, há registros de *Ctenomys* em áreas de mata fechada, o que representa uma exceção à regra (Stolz et al., 2013). Os Tuco-tucos, como são comumente chamados, também são exclusivamente herbívoros, alimentando-se principalmente de gramíneas do gênero *Poaceae* (Lopes et al., 2015). Notavelmente, o gênero se destaca entre os roedores, subterrâneos ou não, pela sua alta diversidade específica e alta variação cromossômica interespecífica, com números diploides entre $2n = 10$ em *Ctenomys steinbachi* Thomas, 1907, e $2n = 70$ em *Ctenomys dorbyignii* Contreras e Contreras, 1984 (Anderson et al., 1987; Woods e Kilpatrick, 2005); não obstante,

embora a maioria das espécies apresente um cariótipo específico (Reig et al., 1990), é possível encontrar variação cromossômica intraespecífica em algumas espécies, como em *Ctenomys minutus*, que apresenta número diploide variando entre $2n = 42$ e $2n = 50$, com progênie híbrida de número diploide ímpar e intermediário ao dos parentais de número diploide par (Lopes et al., 2013). Devido a esse grande espectro de variação cromossômica, especula-se que polimorfismos cromossômicos foram fundamentais para permitir a colonização dos diversos ambientes nos quais os Tuco-tucos se estabeleceram e se diversificaram (Reig e Kiblicky, 1969; Reig 1989) e que inversões pericêntricas e fusões e fissões cromossômicas estão entre as principais causas da diversificação cromossômica no gênero (Ortells, 1995), embora uma ligação direta entre diversidade cromossômica e adaptações locais ainda seja desconhecida.

Desde a década de 60, o gênero *Ctenomys* tem sido amplamente estudado como modelo evolutivo devido à ampla variação cromossômica e especiação acelerada, através de uma grande gama de marcadores moleculares, cujas propriedades permitem inferir relações intra e interespecíficas, e cujas aplicações foram sendo implementadas gradualmente, à medida em que esses marcadores se tornaram as ferramentas padrão em ecologia molecular. Abaixo segue breve resumo do desenvolvimento dos principais marcadores moleculares utilizados na caracterização da diversidade biológica em *Ctenomys*, e as principais características intra e interespecíficas elucidadas para o gênero quando da aplicação desses marcadores.

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *CTENOMYS* POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES

Por vezes, a inferência direta da diversidade biológica é impraticável porque demanda muitos recursos financeiros para permitir longos períodos de observação em campo, ou então porque os táxons em questão dificilmente podem ser continuamente observados; ambos os casos são contemplados pelos Tuco-tucos (gênero *Ctenomys*). Dessa forma, a inferência indireta de parâmetros populacionais como fluxo gênico, taxas de migração e tamanho efetivo de população, pode ser obtida por meio de marcadores moleculares (Frankham et al., 2004), permitindo estimar a estrutura populacional e a diversidade de espécies a partir dos padrões evolutivos desses marcadores.

Ao longo da história da disciplina de Genética de Populações, diferentes marcadores foram utilizados na inferência indireta de eventos demográficos e adaptativos, refletindo o surgimento, estabelecimento e substituição dos diferentes marcadores por outros que vieram a suprir os vieses de seus antecessores. De maneira geral, os primeiros estudos populacionais com base em polimorfismos genéticos, nas décadas de 70 e 80, se valeram da variabilidade proteica para inferir variabilidade genética, índices de endogamia, estruturação populacional e retenção de traços adaptativos, a partir do isolamento de bandas de proteínas por eletroforese em gel de agarose. Um número variável de bandas presentes no gel indica que há formas alternativas de uma proteína, o que foi muito explorado em isoenzimas, enquanto que variações no tamanho das bandas indicam inserção ou deleção de aminoácidos, que causam alterações na funcionalidade da proteína. No entanto, grande proporção da variabilidade proteica não pode ser detectada sem a análise da sequência de nucleotídeos que são traduzidos nos aminoácidos que a compõem, uma vez que mutações silenciosas, isto é, aquelas que não alteram o aminoácido, não serão observadas em uma eletroforese de proteínas; mutações não-sinônimas, isto é, aquelas que alteram o aminoácido, e por consequência a atividade e conformação da proteína, podem ser detectadas tanto na sequência de aminoácidos

quanto na sequência de DNA, mas também se eludem quando apenas o padrão de bandas é observado. De toda forma, polimorfismos proteicos foram a mais acessível fonte de polimorfismos genéticos anterior à era do sequenciamento de DNA e têm importância histórica inestimável na teoria e na prática em Genética de Populações, pois foi a partir da análise destes que os primeiros conjuntos de dados genéticos foram acumulados, permitindo comparar distintos táxons de maneira indireta; além disso, teorias como a Teoria Neutra da Evolução Molecular de Kimura (1968), uma das bases teóricas da disciplina de Genética de Populações e de modelos teóricos amplamente utilizados em Filogenética, como Relógio Molecular e a Teoria da Coalescência (Kingman, 1982), tem como base empírica a variação proteica interespecífica.

Ao final da década de 70, Frederick Sanger e colaboradores desenvolveram método para sequenciar DNA, cujo princípio era interromper a extensão da cadeia de DNA a partir da adição de nucleotídeo desprovido de um grupamento hidroxila no terceiro carbono do açúcar pentose (3'-OH faltante), chamado di-deoxi-nucleotídeo (ddNTP), que impede a ligação do próximo nucleotídeo a ser incorporado pela impossibilidade de concluir a ligação fosfo-diéster entre o fosfato ligado ao quinto carbono da pentose (5'-P) desse nucleotídeo e a hidroxila – ausente – em 3' do último nucleotídeo a ser incorporado (Método de Terminação de Cadeia; Sanger et al., 1977). Esses ddNTPs eram marcados com um fosfato radioativo (P_{14}), tornando possível visualizar a extensão dos fragmentos de DNA amplificados em uma lâmina de raio-x. De maneira semelhante à eletroforese de proteínas, a altura da marcação na lâmina de raio-x reflete o tamanho do fragmento e o tipo de ddNTP incorporado, permitindo reconhecer a sequência de DNA pela visualização conjunta dos fragmentos. Anos mais tarde, em meados da década de 80, métodos de automatização da amplificação de DNA em laboratório foram concebidos (*Polymerase Chain Reaction*, PCR; Mullis, 1986), e o método de Sanger aperfeiçoado a

partir da marcação dos ddNTPs por fluorescência, desenvolvimentos que, em conjunto com o crescimento da capacidade computacional e o desenvolvimento de programas de análise estatística, possibilitaram o isolamento e a análise de sequências de DNA a um custo menor, substituindo a eletroforese de proteínas como principal fonte de polimorfismos genéticos para análises populacionais. Os anos seguintes vieram um crescimento no número de oligonucleotídeos de iniciação – ou *primers* – descritos em literatura, permitindo o sequenciamento de fragmentos de centenas de pares de bases de diferentes genes, que passaram a poder ser comparados entre indivíduos de mesma espécie, o que popularizou o uso de sequências de DNA em estudos populacionais, quando intraespecíficos, e filogenéticos, tanto quando intra quanto interespecíficos.

Exemplo muito importante desse avanço é o surgimento da disciplina de Filogeografia. Ao final da década de 80, Avise e cols. (1987) popularizariam o uso de marcadores de DNA em estudos biogeográficos, congregando informação ecológica, geológica e genética, o que o tornaria Avise o “pai” do novo campo de estudos. Nesse contexto, marcadores moleculares de origem mitocondrial (mtDNA) tiveram especial importância, pois possuem características facilitadoras da resolução de relações filogenéticas, como padrão de herança uniparental, ausência de recombinação e múltiplas cópias por célula (Neigel e Avise, 1987; Avise, 2000). A herança uniparental e a ausência de recombinação causam a diminuição do tamanho efetivo populacional, acelerando o processo de coalescência, enquanto que a amplificação de material genético em laboratório é facilitada pelo número inicial de cópias elevado, que ao final do procedimento de PCR, irá gerar um maior número de sequências de interesse. Tal facilidade na amplificação e sequenciamento dessas moléculas de DNA levou ao surgimento de uma aplicação da Filogenética – o estudo das relações interespecíficas por meio de marcadores moleculares – chamado de *DNA barcoding* (Herbert et al., 2003),

cujo objetivo principal é identificar espécies e a sua relação filogenética por meio de um marcador amplificável em todas essas a partir de um mesmo *primer* – dito, nesses casos, universal; nesse contexto, em estudos com vertebrados se destaca o uso do gene Citocromo Oxidase I (COI), para o qual *primers* universais foram desenvolvidos em meados da década de 90, sendo utilizados até hoje em estudos filogenéticos e populacionais (Folmer et al., 1994). Os avanços técnicos na obtenção de sequências de DNA também levaram à identificação de fragmentos de DNA repetitivo, distribuídos no genoma de eucariotos. Esses fragmentos de DNA, conhecidos comumente como microssatélites, acumulam mutações a partir da inserção (Gordon, 1997) ou deleção (Taylor et al., 1999) de motivos de repetição (*tandens*) derivados de erro de replicação da DNA polimerase (Schlötterer e Pemberton, 1998). Por estarem localizados, via de regra, em regiões genômicas não-codificantes, os microssatélites não sofrem pressão seletiva, acumulando, assim, mutações com maior frequência que genes mitocondriais e nucleares, o que os fazem ideais para inferir parâmetros evolutivos populacionais, como fluxo gênico atual entre populações, estruturação genética recente, compartimentalização da variação genética, grau de endogamia atual, entre outros parâmetros (Sunnucks, 2000).

O sequenciamento de Sanger automatizado e por fluorescência era o único método de sequenciamento de DNA em larga escala disponível comercialmente até meados da década de 2000, e, apesar de ter permitido sequenciar o Genoma Humano (Venter et al., 2001), ainda o fez com um custo astronômico, próximo dos 100 milhões de dólares (NIH, 2016). Tal custo exemplifica a impossibilidade de um laboratório de pequeno e médio porte em iniciar pesquisas em nível genômico na época, mesmo que em menor escala, paradigma o qual somente seria modificado com o advento do sequenciamento de nova geração, iniciado pelo Pirosequenciamento (Roche 454 pyrosequencer, 2005). Em poucas palavras, o método de Pirosequenciamento consiste em utilizar a energia da

quebra de adenosina tri-fosfato (ATP) e oxigênio (O₂) em pirofosfato inorgânico (PPi) e adenosina mono-fostato (AMP) para converter luciferina em oxiluciferina, uma reação química que emite luz. Dessa forma, o pirosequenciador pode detectar a incorporação de um nucleotídeo a partir da emissão de luz causada pela quebra da luciferina, cuja intensidade difere para cada tipo possível de nucleotídeo a ser incorporado à sequência nascente (Harrington et al., 2013). Essa técnica incrementou várias ordens de magnitude a capacidade de sequenciamento de DNA em um mesmo processo, permitindo que uma única rodada de sequenciamento gerasse até 0.7 Giga bits (Gb) de informação, em oposição aos 84 Kilo bits (Kb) máximos que o sequenciamento de Sanger pode gerar, e com custos por Mega bit (Mb) sequenciado muito reduzidos (Liu et al., 2012). Ao Roche 454 seguiriam novos modelos de sequenciadores de nova geração com bases metodológicas distintas, dentre os quais podemos destacar, no contexto de estudos ecológicos, o sequenciador Illumina/Solexa HiSeq, que diminuiu erros de sequenciamento e aumentou para 700 Gb a capacidade máxima de sequenciamento em uma rodada, reduzindo ainda mais os custos de sequenciar genomas completos e viabilizou os estudos genômicos em laboratórios de pequeno e médio portes. Essa plataforma de sequenciamento se tornaria a mais popular entre os sequenciadores de segunda geração, sendo a base tecnológica de metodologias de sequenciamento para fins comparativos, como GBS (*Genotyping by Sequencing*; Elshire et al., 2011), CRoPS (*Complexity Reduction of Polymorphic Sequences*; var Orsouw et al., 2007), RRL (*Reduction Representation Librarys*; Van Tassel et al., 2008) e RAD seq (*Restriction Site-Associated DNA sequencing*; Baird et al., 2008). Davey e cols. (2011) oferecem excelente revisão sobre vantagens e desvantagens entre os métodos citados, dos quais o RAD seq será abordado em maiores detalhes na seção “Sequenciamento de Nova Geração e sua utilização em estudos ecológicos”.

Portanto, vê-se que a comunidade acadêmica internacional passa pela terceira “onda” tecnológica dentro do contexto de genômica, no qual o sequenciamento de porções representativas de genomas, e por vezes de genomas inteiros, está cada vez mais acessível a um maior número de pesquisadores, o que deve causar mudanças de paradigmas nos estudos genômicos com vieses ecológicos nas próximas décadas, permitindo inferências indiretas da diversidade biológica com maior robustez, muito embora também trarão desafios no tratamento de grande volume de dados e na interpretação dos resultados (Luikart et al., 2003; Andrews et al., 2016).

No caso específico dos roedores subterrâneos, estudos com abordagens genômicas ainda são incipientes, e limitados a poucos táxons; há estudos de inferências adaptativas a partir de sequenciamento de genomas no Rato-pelado-africano (*Heterocephalus glaber*, Bathyergidae, Fang et al., 2014a) e no Rato-pelado-cego (*Spalax galili*, Spalacidae; Fang et al., 2014b), e, em se tratando especificamente da família Ctenomyidae, alvo desta tese, há apenas um estudo comparativo entre mitogenomas em Octodontidae e Ctenomyidae (Tomasco e Lessa, 2011), mas nenhuma abordagem em nível de genoma nuclear. Abaixo segue breve histórico dos estudos moleculares em *Ctenomys* ao longo das últimas décadas, suas implicações evolutivas e as razões para que se comece a utilizar abordagens genômicas nos estudos evolutivos no gênero.

POLIMORFISMOS PROTEICOS E VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM *CTENOMYS*

Ainda na década de 60, os primeiros estudos comparativos da variabilidade intra e interespecífica em *Ctenomys* investigaram a variação cromossômica do gênero, e serviram como base para distinguir, juntamente com características morfológicas, entre os tipos existentes (Kiblicky e Reig, 1966). Reig e Kiblicky (1969) apresentam descrição

de 13 cariótipos de espécies e subespécies de Tuco-tucos da Argentina, Bolívia e Uruguai, e associam a grande variação cromossômica interespecífica encontrada a um padrão de especiação explosiva. Estudos posteriores viriam a observar, além do referido padrão de especiação, variação cromossômica intraespecífica em morfotipos similares (Ortells, Contreras e Reig, 1990) e a sugerir a inclusão de espécies cromossômicas em grupos de espécies com base nas similaridades encontradas nos números diploide e fundamental, e nos padrões de bandeamento C, G e NOR (Massarini et al., 1991). Padrões de hibridização com sonda de DNA satélite foram comparados com os padrões cromossômicos em espécies de Tuco-tucos da Argentina, evidenciando que cariótipos ditos basais apresentam hibridização da sonda em posições centroméricas, enquanto que cariótipos derivados apresentam hibridização da sonda ao longo dos braços menores dos cromossomos, sugerindo que fissões cromossômicas podem ser responsáveis pela derivação cariotípica (Rossi et al., 1995). Padrões e polimorfismos cromossômicos também foram extensivamente estudados em espécies que ocorrem no sul do Brasil, e sugerem, por exemplo, que translocações Robertsonianas e fusões em *tandem* foram responsáveis pela politipia encontrada ao longo a área de ocorrência de *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 (Freitas, 1997); por outro lado, em *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830, pouca variação cromossômica foi encontrada entre formas da espécie no sul do Brasil ($2n = 40$ e $2n = 46$), provavelmente originadas por fissão cromossômica (Freitas e Lessa, 1984; Fernandes et al., 2009). Esses dados demonstram a alta variabilidade cromossômica intra e interespecífica que ocorre em *Ctenomys* e exemplificam uma complexa evolução cromossômica, com padrões divergentes de diversificação entre espécies distintas, mesmo que de ocorrência geográfica próxima.

Muito embora comparações entre espécies para dados morfológicos e cariotípicos tenham elucidado a existência de padrões evolutivos complexos em *Ctenomys*, estes

foram incapazes de resolver incongruências filogenéticas observadas para o gênero, e tampouco permitiram inferir estruturação populacional e seus parâmetros associados. Nesse contexto, estudos fundados na variação de loci proteicos, especialmente durante a década de 90, foram de extrema importância para inferir estruturação populacional dentro e entre tipos cromossômicos distintos, e comparar a validade dos grupos de espécies inferidos a partir de dados cariotípicos e morfológicos. Gallardo e Köhler (1992), por exemplo, utilizaram 18 loci de proteínas para inferir padrões de estrutura populacional entre *C. maulinus brunneus*, cujo cariótipo apresenta $2n = 26$, e populações parapátricas cujo citótipo é de $2n = 28$, encontrando alta estruturação intra e interpopulacional e coeficientes de endogamia consistentes com endogamia ou subestruturação populacional – ou efeito Wahlund, associada fatores estocásticos e à dispersão reduzida dos animais. Loci proteicos também foram utilizados para testar hipóteses neutralistas e seletivistas de estruturação genética em relação ao ambiente em *Ctenomys porteousi* e *Ctenomys australis* (Apfelbaum et al., 1991). Os autores encontraram altos índices de heterozigosidade e de polimorfismos para esses loci entre populações de *C. australis*, uma espécie cuja área de ocorrência é restrita a uma pequena faixa litorânea na província de Buenos Aires, que não apresenta marcada heterogeneidade ambiental, associando a estruturação observada a fatores demográficos como deriva genética, mas excluindo endocruzamento nessa espécie; por outro lado, em *C. porteousi*, o coeficiente de endogamia inferido para a população analisada indica endocruzamento acentuado. Proteínas também serviram como base para estudos sistemáticos em Tuco-tucos da Bolívia, distinguindo entre sete espécies nominais, anteriormente identificadas por características cromossômicas (Cook e Yates, 1994) e para inferir perda de diversidade genética após eventos estocásticos, como vulcanismo (Gallardo, Köhler e Araneda, 1996).

Contudo, é necessário observar que polimorfismos proteicos podem, muitas vezes, estar sob seleção, o que distorce as estimativas de estruturação populacional; por exemplo, polimorfismos proteicos sob seleção em diferentes populações podem subestimar parâmetros populacionais de heterogeneidade genética, como o F_{ST} , e superestimar as estimativas para número de migrantes Nm , o que, por consequência, superestima o fluxo gênico (Slatkin, 1987). De fato, Wlasiuk, Garza e Lessa (2003) identificaram marcada redução da estimativa de fluxo gênico entre populações da espécie *Ctenomys rionegrensis* a partir da análise de marcadores de DNA mitocondrial e microssatélites e comparação com dados de polimorfismos aloenzimáticos, atribuindo as diferenças a uma maior sensibilidade dos marcadores de DNA, considerados de natureza evolutiva neutra ou aproximadamente neutra. Dessa forma, as relações sistemáticas e populacionais no gênero precisariam ser reavaliadas utilizando esses novos marcadores moleculares.

MARCADORES MOLECULARES EM *CTENOMYS*: DNA MITOCONDRIAL, NUCLEAR E MICROSSATÉLITES

Ao final da década de 90 e início do século XXI, foram isolados *primers* para os genes mitocondriais Citocromo b (*cyt b*) (Smith e Patton 1999; Wlasiuk et al., 2003) e Citocromo Oxidase I (COI) (Folmer et al., 1994), para Região Controladora (CR) da mitocôndria (Kocher et al., 1989; Tomasco e Lessa, 2007), e para 14 loci de microssatélites (Lacey et al., 1999; Lacey, 2001) específicos para o gênero. A acessibilidade a, e a reprodutibilidade de estes marcadores rapidamente os tornaram o padrão em análises filogenéticas e populacionais para o gênero, substituindo marcadores proteicos antes utilizados.

Lessa e Cook (1998) calcularam, com base em sequências de Citocromo b (*cyt b*), a primeira filogenia molecular para o gênero *Ctenomys*, evidenciando clara separação entre as famílias Octodontidae e Ctenomyidae, bem como a monofilia do gênero *Ctenomys*, dado o alto suporte encontrado nas análises. Também evidenciaram politomias basais, isto é, relações mal suportadas na base árvore filogenética calculada, associando o padrão encontrado a uma especiação rápida para o gênero; à época, contudo, apenas algumas espécies bolivianas e argentinas estavam representadas por haplótipos mitocondriais. Dessa forma, estudos que se seguiram complementaram as filogenias moleculares estimadas para o gênero, incluindo espécies do Uruguai e do sul do Brasil (D'Elía, Lessa e Cook, 1999) e da Argentina (Mascheretti et al., 2001), identificando grupos de espécies filogenéticas que, em sua maioria, correspondiam a grupos cromossômicos e morfológicos anteriormente estabelecidos, e resolvendo incongruências com tais classificações quando não correspondente o padrão filogenético com o padrão cromossômico. Filogenética comparada também seria explorada fazendo-se uso de marcadores de DNA mitocondrial. Slamovits e cols. (2001) utilizaram haplótipos de *cyt b* de 23 espécies nominais e cinco formas não identificadas de Tuco-tucos para investigar padrões de herança de regiões repetitivas contendo DNA satélite (RPCS, Rossi et al., 1995) que são, em teoria, capazes de promover rearranjos cromossômicos, evento de extrema importância na evolução do gênero; os autores encontraram dois padrões básicos de herança: i) o primeiro está associado a alta variabilidade em número de cópias do RPCS entre linhagens filogeneticamente próximas, acompanhados de alta variabilidade cromossômica e ii) estabilidade no número de cópias do RPCS, acompanhada da estabilidade dos grupos cromossômicos relacionados. Parada e cols. (2011) analisaram sequências do gene *cyt b* de 38 espécies nominais e 12 formas não-identificadas de *Ctenomys*, estabelecendo oito grupos de espécies com alto suporte estatístico, dois dos

quais (*torquatus* e *magellanicus*) eram anteriormente desconhecidos. Contudo, apesar dos avanços na compreensão da história evolutiva do gênero, alguns aspectos filogenéticos de *Ctenomys* ainda necessitam esclarecimento, como as relações diretas de ancestralidade entre os grupos de espécies encontrados, que ainda são mal resolvidas, e as politomias basais encontradas desde Lessa e Cook (1998), ainda não resolvidas. Mais recentemente, Gardner e cols. (2014) descreveram quatro novas espécies bolivianas de Tuco-tucos com base em análises filogenéticas, morfométricas e cariotípicas, aumentando o número de espécies validadas para 44, considerando a validação de *Ctenomys bicolor* como espécie um ano antes (Stolz et al., 2013) e a descrição de nova espécie do sul do Brasil, *Ctenomys ibiuiensis* dois anos antes (Freitas et al., 2012).

É importante salientar que houve tentativas de estimar as relações filogenéticas do gênero *Ctenomys* com marcadores moleculares que não de origem mitocondrial; Castillo e cols. (2005) utilizaram íntrons dos genes Rodopsina e Vimentina para inferir relações filogenéticas e comparar os resultados com estimativas obtidas anteriormente com marcadores de DNA mitocondrial; no geral, os autores recuperaram alguns grupos de espécies com alto suporte, mas falharam em recuperar outros já conhecidos. Além disso, as estimativas de tempo de origem do gênero com base nesses íntrons de genes nucleares, de aproximadamente 1,4 milhão de anos, estão muito aquém da idade mínima estimada para a origem do fóssil mais antigo conhecido (Verzi et al., 2010), de aproximadamente 3,5 milhões de anos, de forma que o uso desses marcadores para propósitos filogenéticos foi descontinuado; estimativas da origem dos grupos de espécies calculadas a partir do gene *cyt b*, por outro lado, indicam que estes surgiram há cerca de 3 milhões de anos, estimativa condizente com a origem do fóssil mais antigo conhecido (Parada et al., 2011). Upham e Patterson (2012) testaram as relações filogenéticas entre seis famílias e 28 gêneros de roedores da superfamília Octodontoidea, com base em um gene mitocondrial

(12S rRNA) e três genes nucleares (vWF, GHR e RAG1); Ctenomyidae, representada por sequências de três espécies, formam grupo monofilético com Octodontidae, com origem estimada há cerca de 4,3 milhões de anos.

Desde a descrição dos *primers* de microssatélites específicos para o gênero por Lacey e cols. (1999) e Lacey (2001), microssatélites foram, e tem sido, amplamente utilizados na descrição de parâmetros e padrões populacionais em espécies de Tuco-tucos distribuídas em diferentes grupos de espécies. Gava e Freitas (2004) inferiram diversidade genética e estruturação populacional na espécie *Ctenomys minutus*, que pertence ao grupo de espécies *torquatus* (*sensu* Parada et al., 2011) a partir de seis *loci* de microssatélites, e observaram índices de F_{ST} e F_{IS} indicativos de forte estruturação populacional e de uma tendência ao endocruzamento – que, alternativamente, podem ser explicados por subdivisão populacional. De maneira semelhante, nove microssatélites foram utilizados para inferir o efeito de barreiras geográficas, tanto de descontinuidade do ambiente quanto de modificações de origem antrópica, na estruturação populacional em *Ctenomys flamarioni* – grupo *mendocinus* (*sensu* Parada et al. 2011) – que ocupa a primeira linha de dunas no litoral do Rio Grande do Sul, evidenciando forte diferenciação genética entre populações; esta estrutura genética pode estar relacionada tanto a modificações ambientais, como poluição e fragmentação do habitat quanto a fatores demográficos, como reduções históricas no tamanho efetivo populacional (Fernández-Stolz, Stolz e Freitas, 2007). Problemática semelhante é analisada por Mora e cols. (2010) para a espécie *Ctenomys australis*, também do grupo *mendocinus* de espécies, que é restrita à costa da província de Buenos Aires, na Argentina; os autores utilizaram microssatélites para testar o impacto da fragmentação do habitat dessa espécie na sua estruturação populacional, ambiente este ameaçado devido ao desenvolvimento urbano e ao plantio de florestas, e encontram de sinal para estruturação populacional na presença de fluxo

gênico, em escalas espaciais ditas regionais (abaixo de 4 Km), indicando assim que pode haver heterogeneidade ambiental em pequena escala capaz de reduzir a capacidade de deslocamento dos indivíduos, mesmo em escala geográfica reduzida. El Jundi e Freitas (2004) estimaram a estruturação genética em populações de *Ctenomys lami*, espécie que ocorre em restrita área geográfica e que possui alta variabilidade cariotípica; resultados sugerem que, pela ausência de marcada estruturação genética entre populações e pela presença de polimorfismos exclusivos em distintas populações, deve estar se iniciando um processo de diferenciação populacional na espécie, e que, por consequência, a estruturação cariotípica não parece ter impedido o fluxo gênico histórico entre populações. Gonçalves e Freitas (2009) identificam que populações de *Ctenomys torquatus* estão em equilíbrio entre fluxo gênico e deriva, evidenciado pelo padrão de isolamento por distância obtido para as populações de estudo, com base em nove loci de microssatélites e no gene Citocromo b. Diversos outros estudos com abordagens semelhantes foram conduzidos para as espécies *Ctenomys talarum* (Cutrera, Lacey e Busch, 2005), *Ctenomys porteousi* (Mapelli et al., 2012), e *Ctenomys minutus* (Lopes et al., 2013), para citar alguns exemplos, evidenciando o uso dos marcadores moleculares na inferência de padrões populacionais e filogenéticos. A linha do tempo abaixo exemplifica o uso de marcadores moleculares no contexto do estudo do gênero *Ctenomys*, e situa temporalmente alguns dos trabalhos citados anteriormente (Figura 2).

Evolução dos Marcadores Moleculares (Versão *Ctenomys*)

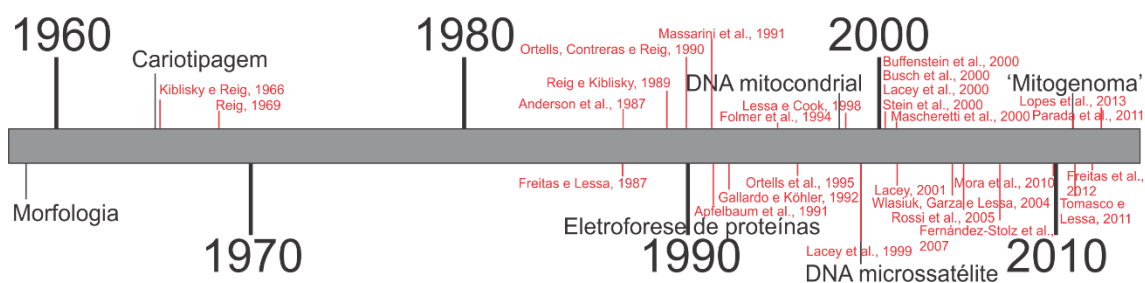


Figura 2. Linha do tempo da evolução dos marcadores moleculares no estudo de *Ctenomys*, exemplificado por alguns dos principais trabalhos publicados entre os anos de 1960 e 2019.

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS ECOLÓGICOS

Com o advento das tecnologias de sequenciamento massivo de DNA, tornou-se possível isolar milhares de polimorfismos genéticos distribuídos ao longo dos genomas de populações inteiras, aumentando consideravelmente a quantidade de informação disponível para resolver problemas biológicos, desde inferir relações filogenéticas entre táxons mal resolvidos (Emerson et al., 2013; Cariou et al., 2013; Combosch e Vollmer, 2015) até o mapeamento de traços qualitativos associados à adaptação local (Hohenlohe et al., 2010) e à seleção sexual (Jones et al., 2013) e de alterações cromossômicas em nível genômico (Kemppainen et al., 2015). Em estudos genômicos com vieses ecológicos, há, de maneira geral, predileção por métodos que permitam o sequenciamento massivo de DNA de modo que as variantes genéticas sejam comparáveis entre indivíduos mesmo sem o conhecimento das posições das variantes em um genoma de referência, visto que o acesso a recursos genômicos está indisponível para a maioria das espécies estudadas. Dentre os métodos que atendem a essas condições está o Sequenciamento de DNA associado a sítio de restrição, ou RADseq (*Restriction site-Associated DNA sequencing*;

Baird et al., 2008), que utiliza enzimas de restrição para promover a clivagem do DNA em regiões específicas, gerando fragmentos que podem ser comparados entre indivíduos, populações ou espécies (Davey et al., 2011). Em geral, o RAD seq está associado ao sequenciamento em plataforma Illumina, também chamado de Sequenciamento por Síntese Reversa (Illumina Inc., 2015). Esse método de sequenciamento tem por definição utilizar apenas a informação da síntese da fita reversa de DNA (de orientação 3'-OH para 5'-P) a partir da detecção de fluorescência emitida por cada um dos nos nucleotídeos incorporados, gerando bilhões de fragmentos curtos de DNA com alta fidelidade, em um único sequenciamento (Bentley et al., 2008). Nesse contexto, são utilizados adaptadores de DNA sintético com sequências complementares ao da enzima de restrição utilizada na digestão do DNA alvo, o que garante a identificação individual dos fragmentos de DNA e o sequenciamento apenas de fragmentos gerados pela clivagem com as enzimas de restrição (Fig. 3).

É importante salientar que, diferentemente das demais técnicas de sequenciamento de DNA que utilizam fragmentação como base – como RRL, GBS e CRoPS, o RAD seq é a única que possui um passo intermediário de seleção de fragmentos por tamanho após a quebra randômica – i.e. sonicação – dos fragmentos de DNA, o que limita o sequenciamento dos fragmentos a uma janela específica de tamanho. Esse passo é fundamental para garantir que o sequenciamento ocorra de maneira efetiva – visto que a Plataforma Illumina comporta apenas fragmentos curtos de DNA, com menos de 150pb – e para garantir a cobertura de cada fragmento de DNA; a cobertura, isto é, o número de repetições de um fragmento de DNA específico em um sequenciamento, é de extrema importância porque garante que eventuais polimorfismos sejam observados com confiança estatística e exclui erros de sequenciamento como causa de um polimorfismo observado, especialmente quando não há genoma de referência que sirva como base para

definir a sequência canônica para um determinado fragmento de DNA (Davey et al., 2011; Allendorf et al., 2016; Fig. 4).

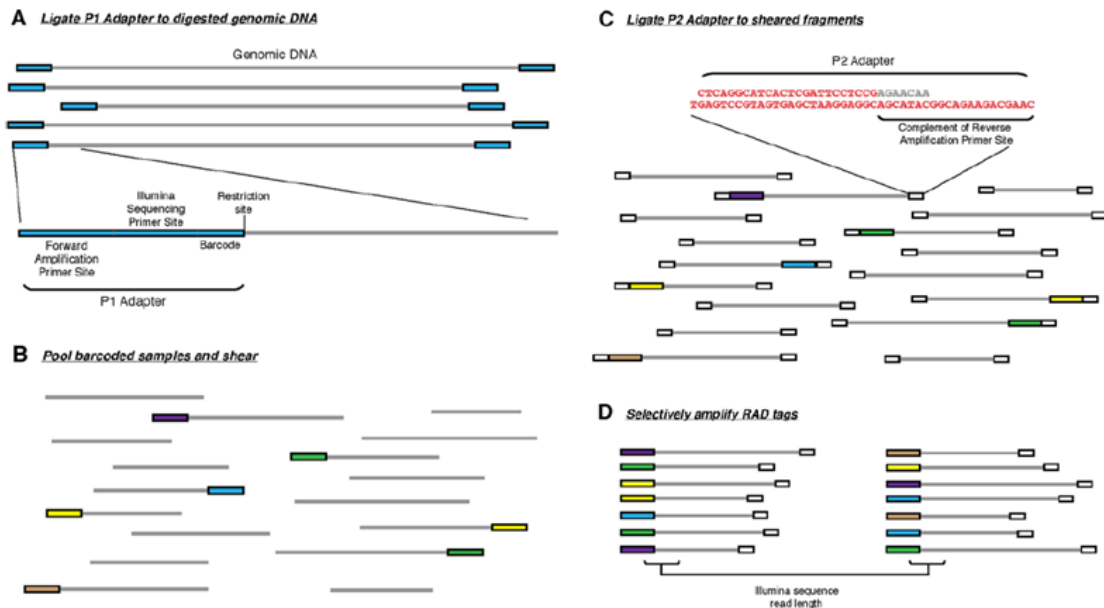


Figura 3. Passos da geração dos fragmentos de DNA pela técnica de RAD seq. A) adaptadores (P1) são ligados às pontas dos fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição; cada adaptador P1 é composto por um sítio de ligação do primer de sequenciamento e uma identificação específica para cada indivíduo (*barcode*). B) as amostras competentes para a ligação dos adaptadores são misturadas e sequenciadas em conjunto; em seguida, fragmenta-se novamente fragmentos os de DNA competentes, dessa vez por sonicação. C) um segundo adaptador (P2) é ligado apenas aos fragmentos competentes para P1, garantindo o sequenciamento destes. D) amplificação seletiva dos fragmentos competentes para P1 e P2. Adaptado de Baird et al. (2008).

Portanto, o RAD seq pode ser proposto como metodologia adequada e acessível para explorar a variação genética em escala genômica em organismos não-modelo, como é o caso das espécies do gênero *Ctenomys*, alvos deste estudo, bem como para servir como comparativo entre as metodologias já utilizadas no estudo do gênero, atualmente restritas ao uso de marcadores genéticos pré-NGS, como marcadores de DNA mitocondrial e DNA microssatélite.

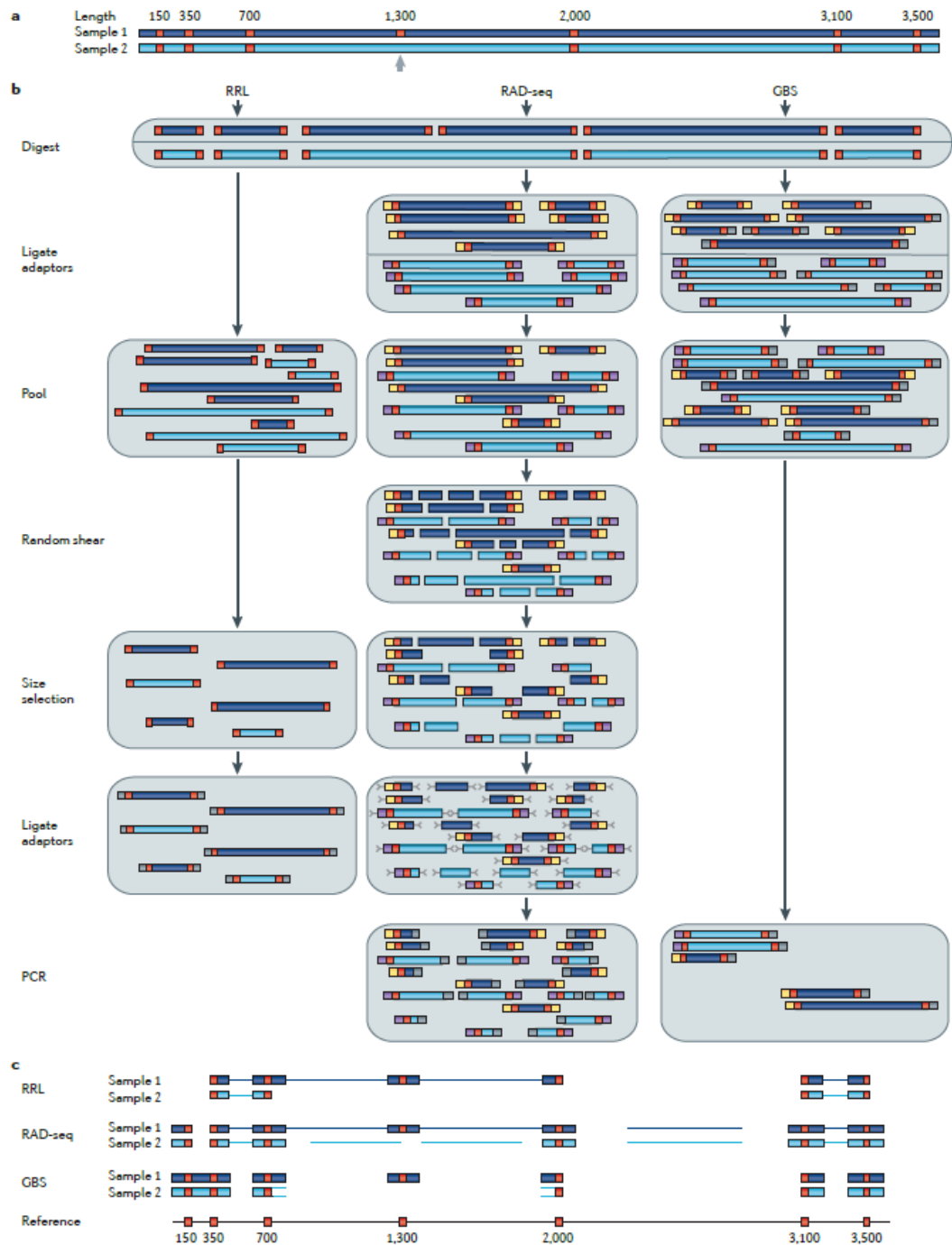


Figura 4. Ilustração das diferenças básicas entre três metodologias de sequenciamento de nova geração associadas ao uso de sítios de restrição. O RAD seq (coluna central) distingue-se dos demais métodos por apresentar clivagem por sonicação (*random shear*) seguida de seleção dos fragmentos por tamanho (*size selection*), restringindo assim o sequenciamento a um grupo de fragmentos e aumentando a cobertura. Adaptado de Davey et al. (2011).

JUSTIFICATIVA – *CTENOMYS* NO CENTRO-OESTE E NORTE DO BRASIL
COMO ESTUDO DE CASO: COMPARATIVOS ENTRE MARCADORES
CLÁSSICOS E DE NOVA GERAÇÃO

No Brasil, o gênero *Ctenomys* ocorre na região Sul, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, em cinco espécies descritas – *Ctenomys minutus*, *Ctenomys lami* Freitas, 2001, *Ctenomys torquatus*, *Ctenomys ibicuiensis* Freitas et al. (2012), e *Ctenomys flamarioni*, Travi, 1981 – em campos abertos, arenosos ou em dunas litorâneas (Fernández-Stolz et al., 2007; Gonçalves e Freitas, 2009; Freitas et al., 2012), e em outras três espécies nas regiões Centro-oeste e Norte, nos estados do Mato Grosso – *Ctenomys nattereri* Wagner, 1848 – e de Rondônia – *Ctenomys bicolor* e *Ctenomys rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914, em regiões de transição entre floresta Amazônica e Cerrado (Stolz et al., 2013; Leipnitz et al., 2018). Diferentemente das espécies estudadas desde a década de 60, cujo conhecimento a respeito dos padrões evolutivos intra e interespecíficos vem sendo incrementado gradualmente até a presente década, os Tuco-tucos do Centro-oeste e Norte do Brasil foram negligenciados até recentemente, quando Stolz e colaboradores (2013) validaram *Ctenomys bicolor* como espécie, com base em caracteres morfológicos, cariotípicos e genéticos. Até então, os únicos registros em literatura sobre a ocorrência do gênero nessas regiões do Brasil constavam da descrição de um morfotipo da espécie *Ctenomys nattereri* por Wagner, em 1848, coletado na região conhecida como Caissara, no Mato Grosso (MT), atualmente a cidade de Cáceres, e de expedições em meados do século XX, nas quais o naturalista Alípio de Miranda Ribeiro coletou e descreveu morfotipos das espécies *Ctenomys bicolor* e *Ctenomys rondoni*, em 1914. O local de coleta dos morfotipos de *C. bicolor* foi rastreado e limitado a uma área de aproximados 1,000 Km² a sudeste do estado de Rondônia (RO) por Bidau e Ávila-Pires

(2009), próximo da qual Stolz e cols. (2013) coletaram espécimes descritos como representativos de *C. bicolor*.

Dessa forma, diante da quase completa falta de conhecimento sobre a diversidade biológica de *Ctenomys* nos estados de MT e RO, que constituem uma lacuna a ser preenchida no contexto global do gênero, e tendo em vista os recentes desenvolvimentos em metodologias de sequenciamento de porções representativas do genoma de indivíduos, mesmo na ausência de um genoma de referência, as quais apresentam potencial para uso em estudos filogenéticos, demográficos, populacionais e adaptativos, proponho aqui utilizar tanto os marcadores de DNA mitocondrial (mtDNA) e Microsatélites, amplamente respaldados na literatura para o gênero *Ctenomys*, quanto conjuntos de marcadores bi-alélicos multi-lócus (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs), para elucidar padrões filogenéticos e de estruturação populacional que ocorrem nas populações amostradas no Centro-oeste e Norte do Brasil. Este novo conjunto de marcadores, de representação genômica, servirá como base para futuros estudos adaptativos, bem como para testar a robustez dos métodos utilizados até o presente momento, que envolvem um número pequeno de marcadores moleculares.

OBJETIVOS

Essa tese tem por objetivos globais, portanto:

Agregar ao conhecimento sobre o gênero *Ctenomys*, e por consequência aos roedores subterrâneos de maneira geral, informações demográficas, filogenéticas e adaptativas sobre populações em área de ocorrência de *Ctenomys* negligenciada historicamente, refinando filogenias e estabelecendo novas espécies e linhagens, quando possível, bem como inaugurar a Era Genômica nos estudos de diversidade biológica no

gênero, comparando os resultados obtidos entre metodologias anteriores à “terceira onda tecnológica” no que tange ao sequenciamento de DNA e as metodologias com base no Sequenciamento de Nova Geração adaptadas a estudos ecológicos.

Tais objetivos globais podem ser desdobrados nos seguintes objetivos específicos:

- 1) Estabelecer linhagens e espécies que ocorrem nos estados do Mato Grosso e de Rondônia, no Brasil, por meio de análises filogenéticas e morfológicas, com base no gene mitocondrial Citocromo b (*cyt b*) e na morfometria geométrica das vistas ventral, dorsal e lateral do crânio dos indivíduos coletados, refinando a filogenia atual para o gênero por meio da calibração do modelo com datações de registro fóssil e da inclusão dos novos táxons, estimando o tempo de origem das linhagens descobertas nesses estados – Capítulo II;
- 2) Inferir parâmetros populacionais de diversidade genética e a estrutura populacional real dos táxons da região bem como a presença de expansão, retração, ou constância populacional – Capítulo III;
- 3) Desenvolver metodologias para inferir padrões filogenéticos, demográficos e adaptativos em *Ctenomys*, a partir de marcadores moleculares derivados de Sequenciamento de Nova Geração associados a tratamentos com Enzimas de Restrição (RAD seq), abrindo o caminho para a utilização de grandes volumes de dados de sequenciamento na caracterização da diversidade biológica de roedores subterrâneos em geral – Capítulo III;
- 4) Testar o poder de resolução de metodologias como o RAD seq na resolução de incertezas filogenéticas, refinando topologias, e na inferência da estrutura genética populacional, de modo a comparar esses resultados com aqueles obtidos por meio de marcadores clássicos, isto é, DNA mitocondrial e

microssatélites, utilizando os Tuco-tucos do Centro-Oeste e Norte do Brasil como modelo – Capítulo III;

- 5) Isolar SNPs potencialmente sob seleção, gerando conjuntos de dados que permitam inferir adaptação local e servir como base para futuros estudos de adaptação em nível genômico – Capítulo III;
- 6) Propor futuras direções no estudo genômico em roedores subterrâneos, com foco em *Ctenomys*, a partir da interpretação dos resultados desta tese – Capítulo IV.



Lineages of Tuco-Tucos (Ctenomyidae: Rodentia) from Midwest and Northern Brazil: Late Irradiations of Subterranean Rodents Towards the Amazon Forest

L. T. Leipnitz¹ · R. Fornel² · L. E. J. Ribas¹ · B. B. Kubiak³ · D. Galiano⁴ · T. R. O. de Freitas¹

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The genus *Ctenomys* comprises approximately 70 recognized living species of subterranean rodents endemic to South America. Phylogenetic studies to date, based on mitochondrial DNA data, place 44 recognized species in eight species groups and provide evidence for a burst of speciation early in the history of the genus. Species from Argentina, Uruguay, Bolivia, and southern Brazil are well studied at the phylogenetic level. However, the taxonomic status of the species inhabiting midwest and northern Brazil remains poorly understood. In this study, we construct phylogenies based on maximum likelihood and Bayesian inference methods with cytochrome b gene haplotypes of *Ctenomys* from midwest and northern Brazil and with haplotypes representative of the genus *Ctenomys* to place the sampled haplotypes into a phylogenetic framework; we also evaluate skull geometric morphometrics data among sampling sites to assess whether skull morphology corroborates the phylogenetic patterns observed. The results show that the sampling sites used in this study are represented by two species, namely, *Ctenomys bicolor*, which is present in the state of Rondônia, and *Ctenomys nattereri*, which is present in Mato Grosso and Bolivia. The results also reveal two lineages of *Ctenomys* distinct from *C. bicolor* and *C. nattereri*, henceforth called *Ctenomys* sp. “xingu” and *Ctenomys* sp. “central.” Both the species and lineages share a most recent common ancestor with *C. boliviensis* and are part of the *boliviensis* species group.

Keywords *Ctenomys* · Cytochrome b · Phylogeny · Species diversity

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10914-018-9450-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ L. T. Leipnitz
lleipnitz@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91509-900, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621, CEP, Erechim, Rio Grande do Sul 99709-910, Brazil

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Frederico Westphalen, Av. Assis Brasil 709, CEP, Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul 98400-000, Brazil

⁴ Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza, Rua Edmundo Gaievsk, 1000, CEP, Realeza, PR 85770-000, Brazil

Introduction

The order Rodentia is the most speciose order of mammals, with approximately 2277 species described and distributed in 34 families (Patton et al. 2015). These mammals occur in almost every continent, except for Antarctica, occupying arboreal, aquatic, terrestrial, or subterranean habitats (Nowak 1999). Subterranean rodents of the genus *Ctenomys* Blainville, 1826, are characterized by a dependency on tunnel systems, leaving the tunnels only for foraging, mating, or dispersing; they are also generally solitary and territorial, with each individual occupying its own tunnel system (Reig et al. 1990; Lacey et al. 2000).

The most speciose family of subterranean rodents, Ctenomyidae, comprises one extant genus, *Ctenomys*, which is distributed throughout the southern half of the Neotropical region (Fig. 1a) and contains approximately 70 valid species based on morphological, karyotypic, and molecular data (Bidau 2015; Patton et al. 2015; Freitas 2016). In the first

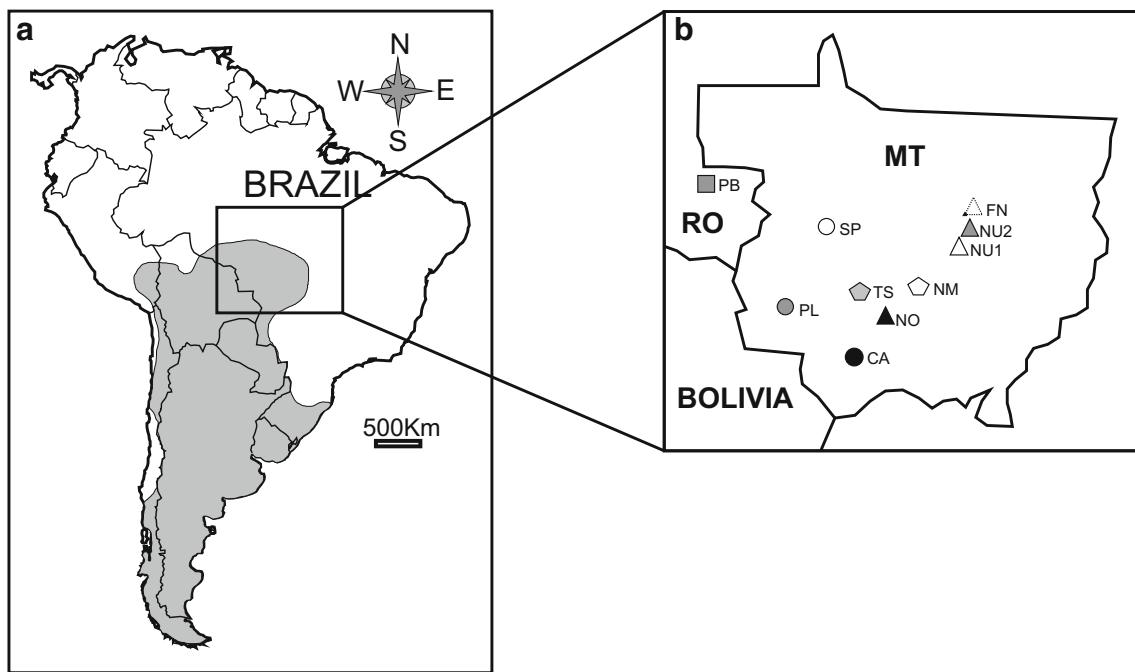


Fig. 1 **a** Distribution of the genus *Ctenomys* throughout southern South America (light gray area). **b** Detailed distribution of sampled localities in the states of Mato Grosso (MT) and Rondônia (RO). Pimenta Bueno –

PB, Pontes e Lacerda – PL, Cáceres – CA, Sapezal – SP, Nova Olímpia – NO, Tangará da Serra – TS, Nova Mutum – NM, Nova Ubiratã 1 – NU1, Nova Ubiratã 2 – NU2, Feliz Natal – FN

phylogenetic study of the genus based on molecular data, Lessa and Cook (1998) identified strong monophyly between Octodontidae and Ctenomyidae in a cytochrome b (cyt b) phylogeny as well as evidence of polytomies in basal nodes of the phylogeny for *Ctenomys*, indicating a rapid radiation in the early history of the genus. Other studies included species from Uruguay and southern Brazil (D'Elía et al. 1999), compared chromosomal rearrangements with phylogenetic structuring (Slamovits et al. 2001), and provided phylogenetic estimates based on nuclear noncoding DNA markers (Castillo et al. 2005). Parada et al. (2011) identified eight monophyletic species groups with strong to moderate statistical support and estimated that most of the species groups originated approximately 3 million years ago, an estimate that is supported by the minimum estimated age of the oldest fossil known for the genus (~3.5 mya; Verzi et al. 2009). Upham and Patterson (2012) estimated that the genus *Ctenomys* originated approximately 4.3 mya, based on a nuclear and a mitochondrial gene. Finally, Gardner et al. (2014), based on cyt b sequences, provided the most comprehensive phylogenetic study to date for the genus *Ctenomys*, including 44 recognized species, four of which were described as new Bolivian species.

In Brazil, eight species of *Ctenomys* are currently known: five in southern Brazil (Rio Grande do Sul State – RS), namely, *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830, *Ctenomys minutus* Nehring, 1887, *Ctenomys lami* Freitas, 2001, *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981, and *Ctenomys ibicuiensis* Freitas et al., 2012; one in the state of Mato Grosso (MT), namely, *Ctenomys nattereri* Wagner, 1848; and two species, namely,

Ctenomys rondoni Miranda Ribeiro, 1914, and *Ctenomys bicolor* Miranda Ribeiro, 1914, in the state of Rondônia (RO) (Bidau and Ávila-Pires 2009). While species from southern Brazil, Argentina, Uruguay, and Bolivia are considerably well studied at the phylogenetic level (Lessa and Cook 1998; D'Elía et al. 1999; Slamovits et al. 2001; Castillo et al. 2005; Parada et al. 2011; Freitas et al. 2012; Gardner et al. 2014), the taxonomic status for the genus *Ctenomys* in midwest and northern Brazil remains poorly resolved. A revalidation of *C. bicolor* as a species based on molecular, karyotypic and morphological evidence (Stolz et al. 2013) is the only study published to date that involves individuals from these regions of Brazil. Considering the species distributed in midwest and northern Brazil, *C. bicolor* and *C. nattereri* are included in the *boliviensis* species group and are sister taxa to the Bolivian species *Ctenomys boliviensis* Waterhouse, 1848, and *Ctenomys steinbachi* Thomas, 1907 (Parada et al. 2011; Stolz et al. 2013; Gardner et al. 2014).

Recently, we sampled new sampling sites for *Ctenomys* in midwest and northern Brazil, further expanding the known distribution for the genus towards the Brazilian Amazon forest. Indeed, some of the individuals we sampled in the northernmost sampling sites were located in forests in areas of transition between the Amazonia and Cerrado (savanna) biomes of Brazil (IBGE 2004). As species within the genus *Ctenomys* are primarily known for inhabiting open areas covered mostly by grassy vegetation, sampling individuals in Mato Grosso is interesting because the southernmost parts of Amazon – roughly, western Rondônia and northern/central

Mato Grosso – present vegetation characteristic of both the “evergreen forests” of the Amazon to the north and the Cerrado (Savanna), dominated by smaller trees and bush-like vegetation, to the south, the same region where our sampling sites are located. The convergence of the two biomes forms a zone of ecological tension (ZOT) that spans hundreds of kilometers at the southern border of the Amazon (Ackerly et al. 1989; Marimon et al. 2013). This ZOT is likely the product of continuous alternation of temperature and precipitation throughout the Quaternary and is dominated by vegetation characteristic of the Amazon during wet events and by vegetation characteristic of the Cerrado during dry events (Marimon et al. 2013 and references therein). Such dynamics may affect the dispersion of *Ctenomys* throughout midwest and northern Brazil, if the changes in vegetation composition represent geographical barriers. In addition, some sampling sites were located near the type locality for the species *C. nattereri* (Cáceres – MT; Miranda Ribeiro, 1914) and *C. bicolor* (Pimenta Bueno – RO, Stolz et al. 2013).

Therefore, these new sampling sites provide an opportunity to clarify the taxonomic status of poorly known species of *Ctenomys* located at the northern end of the distribution of the genus, making way for future population genetics and ecological studies. Herein, we build on previous phylogenetic studies and characterize the known localities of *Ctenomys* from midwest Brazil based on *cyt b* sequences and geometric morphometrics of the skull, placing the haplotypes representative of the localities sampled into a phylogenetic framework and defining, when possible, taxonomic units.

Material and Methods

Sample Collection and DNA Extraction from Field Specimens

We discovered and sampled ten localities for the genus *Ctenomys* between the years 2007 and 2017, totaling 92 specimens (Table 1). We captured the specimens using Oneida

Victor n° 0 Snap Traps (Zenuto and Busch 1998) under a license from the Brazilian government (IBAMA, Authorization No. 14690–1). We conducted at least one field trip per year, with a minimum sampling effort of 14 days per field trip. All procedures involving the captured animals were allowed by IBAMA (Brazil’s environmental agency) and followed the guidelines of the American Society of Mammalogists (Sikes et al. 2016). Liver samples were collected from 92 individuals distributed among 10 sampling sites in the states of Mato Grosso (MT) and Rondônia (RO) (individuals per locality and geographic coordinates of the sampling sites are detailed in Table 1). Tissue samples were housed at the Laboratory of Cytogenetics and Evolution in the Department of Genetics at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and stored in 96° GL alcohol at –20 °C. We extracted DNA from the samples following the CTAB DNA extraction protocol (Doyle and Doyle 1987), with modifications. All DNA extractions were stored at –20 °C.

Mitochondrial DNA Primers We amplified partial coding sequences – CDS (1087 bp) – of the *cyt b* gene (complete CDS: 1146 bp) from 92 individuals using the primer pairs MVZ05 and Tuco06 (Smith and Patton 1999) and Tuco07 and Tuco14 (Wlasiuk et al. 2003). Only forward primers were used for sequencing PCR products.

Cytochrome b PCR conditions and sequencing We conducted PCR using 100 ng of purified genomic DNA, 0.4 µL of 10 mM forward and reverse primers, 0.4 µL of 10 mM deoxynucleotide triphosphates, 2.0 µL of 10X PCR buffer, 1.6 µL of 50 mM MgCl₂ polymerase cofactor, and 0.2 µL of 5 U/uL DNA Taq polymerase (Ludwig Biotec), totaling 20 µL of reaction per sample. PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 1 minute, followed by 30 cycles of denaturation at 93 °C for 1 minute, primer annealing at 45 °C for 1 minute,

Table 1 Individuals sampled for DNA and skull samples and haplotypes by locality. PL, Pontes e Lacerda; CA, Cáceres; SP, Sapezal; NO, Nova Olímpia; NU1, Nova Ubiratã 1; NU2, Nova Ubiratã 2; FN, Feliz Natal; NM, Nova Mutum; TS, Tangará da Serra; PB, Pimenta Bueno

Locality	Sample Size - DNA	Sample Size - Skulls	Coordinates	Haplotypes by locality
PL	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9	15°09'31.38"S, 59°13'47.54"W	H1, H2, H3, H4
CA	<i>n</i> = 11	<i>n</i> = 9	15°58'11.91"S, 57°45'58.13"W	H5
SP	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 4	13°02'11.94"S, 58°48'56.89"W	H4, H6
NO	<i>n</i> = 11	<i>n</i> = 6	14°52'17.32S, 57°17'25.96"W	H7, H8
NU1	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 8	12°57'29.78"S, 54°55'39.84"W	H9, H10
NU2	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 7	12°54'44.16"S, 54°50'25.14"W	H10
FN	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 5	12°35'5.40"S, 54°48'51.95"W	H10, H12, H13
NM	<i>n</i> = 11	<i>n</i> = 10	13°51'54.44"S, 55°16'34.47"W	H14
TS	<i>n</i> = 1	–	14°13'36.09"S, 57°41'15.69"W	H15
PB	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9	12°13'31.84"S, 60°40'47.36"W	H11
Total	<i>n</i> = 92	<i>n</i> = 67		

and fragment extension at 72 °C for 1.5 min, ending with a final extension at 72 °C for 10 min. To confirm amplification, the PCR products were visualized in 1.5% agarose gel prior to sequencing. Sequencing was conducted abroad (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

Mitochondrial DNA Data Sets We created two cyt b data sets. The global data set comprises all unique haplotypes representative of midwest and northern Brazil, 69 sequences representative of the genus *Ctenomys*, and two Octodontidae haplotypes downloaded from GenBank (accession numbers: Table S1) used as outgroups; we used this data set to reconstruct a complete phylogeny for *Ctenomys*, placing Brazilian haplotypes into species groups, and to estimate the time of origin of the most recent common ancestor (MRCA) between taxa of interest. The local data set comprises all haplotypes representative of the sampled localities, ten sequences representative of the *boliviensis* species group (sensu Parada et al. 2011), and six sequences representative of the species *Ctenomys andersoni* Gardner et al., 2014, *Ctenomys erikacuellarae* Gardner et al., 2014, and *Ctenomys yatesi* Gardner et al., 2014, which form a clade sister to *boliviensis* (Gardner et al. 2014). We calculated partial phylogenetic reconstructions to assess intragroup phylogenetic relationships and divergence times between taxa belonging to the *boliviensis* species group; we assumed it was plausible to calculate partial reconstructions for this data set because all haplotypes representative of known sampling sites clustered within the *boliviensis* species group for all phylogenies constructed using the global data set (see Results). In addition, we also compared estimates obtained through the partial phylogenetic reconstruction with those obtained through the complete phylogenetic reconstruction to assess whether the estimates corroborate each other.

Mitochondrial DNA Analysis We inspected chromatograms and trimmed sequences using Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Inc.). We aligned the sequences used in both data sets independently through the MUSCLE algorithm (Edgar 2004) implemented in MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) using the default parameters. Best-fit models of molecular evolution for each data set were calculated using JModelTest2 (Guindon and Gascuel 2003; Darriba et al. 2012). The model selected was based on the smallest variation in the logarithm of the Bayesian Information Criteria (BIC). The haplotype (Hd) and nucleotide diversity (Pi) indexes and number of segregating (S) and invariant (I) sites obtained were estimated using DnaSP 5.0 (Librado and Rozas 2009). We used the Kimura-2-parameters (K2P) substitution model with pairwise deletion of gaps and missing data to estimate percentages of sequence divergence between haplotypes for the cyt b gene, with 1000 bootstrap replicates and considering the 1st, 2nd, and 3rd codon positions, in MEGA 6.0. We performed a

nonspatial genetic mixture analysis in BAPS 6 (Corander et al. 2006, 2008; Cheng et al. 2011) to estimate the genetic clusters formed by individuals of each locality analyzed with the complete data set for the cyt b gene (92 sequences, 1087 bp), using five iterations and a maximum number of clusters of 20 ($K = 20$); all other parameters were left as default.

We constructed maximum likelihood (ML) phylogenies (global data set) in MEGA 6.0 using 1000 bootstrap replicates, considering the 1st, 2nd, and 3rd codon positions; all other parameters were left as default. We constructed Bayesian inference (BI)-based phylogenies for both the global and local data sets in BEAST v2.4.0 (Bouckaert et al. 2014) with empirical base frequencies, four gamma categories and data partitioned into the 1st, 2nd, and 3rd codon positions. As the data are not clock-like, a relaxed uncorrelated lognormal clock (Drummond et al. 2006) was used to allow different mutation rates for each branch in the phylogeny while preserving the time-dependent nature of the evolutionary process. A calibrated Yule speciation prior (Heled and Drummond 2011) was implemented to allow calibration of trees calculated with the global data set for both the Ctenomyidae/Octodontidae split (Marshall and Sempere 1993; Vucetich et al. 1999; Verzi 2002; Table 4) and the MRCA for the genus *Ctenomys* (Verzi et al. 2009; Table 4); we calibrated the local data set with the MRCA estimates for the *boliviensis* species group obtained through the complete phylogenetic reconstruction (see Table 5). Twenty million iterations in a Markov chain Monte Carlo (MCMC) process were used in each run, sampling a tree every 1000 steps in both the global and local analyses; all other parameters were left as default. Six independent runs were calculated for each data set, and the outputs of the runs were submitted to a 25% burn-in and combined into a single tree file using LogCombiner v2.4.3 (Rambaut and Drummond 2015a). The consensus tree was chosen using TreeAnnotator v.1.8.2 (Rambaut and Drummond 2015b). The log files of all runs were inspected in Tracer v1.6 (Rambaut et al. 2013), to ensure that all parameters had estimated sample size (ESS) values higher than 200.

Skull Geometric Morphometric Analysis The sample consisted of 67 skulls of adult specimens of *Ctenomys* from nine sampling sites in midwest and northern Brazil (see Table 1). Skulls from all individuals are housed at the Laboratory of Cytogenetics and Evolution in the Department of Genetics at UFRGS (archive numbers, Table S4). Dorsal, ventral, and lateral left sides of the skulls were photographed with a Canon G10 digital camera at maximum resolution (4416 × 3312) with the macro function activated and without flash. We digitized 29, 30, and 21 morphological landmarks for each individual for the dorsal, ventral and lateral views, respectively (sensu Fernandes et al. 2009), with TPSDig 2.16 (Rohlf 2010). All landmarks plotted were assigned to

each individual by the same person (L.E.J.R.). Coordinates were superimposed by the generalized Procrustes analysis (GPA) algorithm (Dryden and Mardia 1998). We symmetrized landmarks in dorsal and ventral views of the skull and used the symmetric component of variation in each view for our analysis (Kent and Mardia 2001; Klingenberg et al. 2002). We used the residuals of GPA-like shape variables as the shape, and we used the centroid size (the square root of the sum of distances of each landmark from the centroid; Bookstein 1991) as a measure of overall skull size. To avoid redundancy of the three views, we summed the centroid sizes of the three views of the skull and used the obtained mean for the analysis.

We tested skull centroid size for normality with Shapiro's test, sexual dimorphism for size using Student's *t* test, and sexual dimorphism for skull shape with multivariate analysis of variance (MANOVA). We tested differences in size among sampling sites with analysis of variance (ANOVA) and used Tukey's test for pairwise comparisons. We implemented principal component analysis (PCA) to explore shape variation for each view of the skull and multivariate analysis of variance (MANOVA) to test for differences in skull shape between sampling sites. We calculated jackknife cross-validation to generate percentages of correct classification among sampling sites and within hypothesized molecular clades (see Results). We conducted all aforementioned analyses in R software version 3.2.1 (R Core Team 2017) with the *geomorph* package (Adams and Otárola-Castillo 2013). We used canonical variate analysis (CVA) in MorphoJ (Klingenberg 2011) to generate scatterplots and wireframes to discriminate the individuals and localities sampled in shape space.

Data Availability All sequences from the localities studied used in the analyses present in this manuscript are available at GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) under accession numbers MG065617 to MG065634. Detailed individual information on the origin of each sequence we downloaded from GenBank and on the sequences we published is available as supplemental material (Tables S1 and S2, respectively).

Results

Cytochrome b diversity indexes for sampled localities

Partial coding sequences for the *cyt b* gene (1087 bp) were obtained for 92 individuals. A total of 1083 bp were used in the analysis, excluding 4 bp of missing data. The haplotype diversity (*H_d*) and nucleotide diversity (*P_i*) indexes were equal to 0.8830 and 0.01737, respectively. The total number of segregating sites (*S*) was 69, while 1014 sites were invariant (*I*). Eighteen individual sequences corresponded to 15 haplotypes representative of the genetic variability of the sampled localities. Out of these 18

sequences, 15 corresponded to exclusive haplotypes, and three were shared among sampling sites (H4: PL and SP; H10: NU1, NU2, and FN; Fig. 1 and Table S2). Therefore, we included 15 sequences representing the total haplotype variability of the sampling sites in the phylogenetic analyses (GenBank accession numbers, Table S2).

Cytochrome b diversity indexes for the global data set

A total of 86 sequences were used in the complete phylogenetic reconstruction analyses with the global data set: 15 haplotype sequences representing the sampling sites of *Ctenomys* from midwest and northern Brazil, 69 sequences representative of the genus *Ctenomys*, and two Octodontidae sequences as outgroups. The sequences from GenBank were mostly complete (1140 bp), but some were shorter; a few sequences contained small nucleotide gaps or undetermined nucleotides ('N'). Overall, 1042 bp were used in the phylogenetic analyses, given that there were 45 sites with missing data. From a total of 84 haplotypes, 577 were variable sites, and 445 were parsimony informative (*S*) sites. Out of the 1042 sites analyzed, 465 were invariant (*I*).

Genetic Distances between Sampled Localities from Midwest and Northern Brazil

Genetic distances based on the Kimura-2-parameters model for the partial CDS of the *cyt b* gene (1087 bp) presented mean values of 0.2% between PL and SP, 0.1% between NU1 and NU2, and 0.7% between NM and TS. The maximum distance reached was 3.8%, between PB and CA. Some subsets of localities had lower sequence divergence between haplotypes within subsets than other subsets of localities: there was a maximum of 1.3% divergence between sequences from the sampling sites PL, CA, and SP, but a maximum of over 2.0% when compared against any other haplotypes. Sequence divergence between the localities NO, NU1, NU2, and FN presented a mean of 0.6 and 1.6% when compared against NM and TS and a mean of over 2.2% when compared to PL, CA, SP, and PB. PB, the only locality known to represent the species *C. bicolor* (Stolz et al. 2013), diverges from the other localities by a mean of 2.9% (Table 2). Groups of localities, therefore, seem to cluster into clades when the genetic distances between them are considered. We name such clusters by their relative geographic positioning (PL, CA, and SP: Western Clade; NO, NU1, NU2, and FN: Eastern Clade; and NM and TS: Central Clade; Table 3).

Genetic Distances for the Global Data Set

We estimated genetic distances between haplotypes based on the Kimura-2-parameters model (Table 3). Mean genetic distances within clades are lower (Western Clade: 0.7%; Eastern Clade: 0.6%; Central Clade: 0.7%) than those between clades (Western vs. Eastern: 2.7%; Western vs. Central: 2.2%; Eastern vs. Central: 1.6%). The genetic distances between *C. bicolor* (PB) and all other clades are higher than the

Table 2 Cytochrome b (1,087 bp) genetic distances between haplotypes sequenced in this study based on the Kimura-2-Parameters Model. PL, Pontes e Lacerda; CA, Cáceres; SP, Sapezal; NO, Nova Olímpia; NU1, Nova Ubiratã 1; NU2, Nova Ubiratã 2; FN, Feliz Natal; PB, Pimenta Bueno; NM, Nova Mutum; TS, Tangará da Serra

	PL	CA	SP	NO	NU1	NU2	FN	PB	NM	TS
PL	0.1–0.3									
CA	1.1–1.3	–								
SP	0.0–0.4	1.1–1.3	0.2							
NO	2.2–2.5	2.5–2.7	2.4–2.5	0.1						
NU1	2.4–2.8	2.8–3.0	2.3–2.7	0.5–0.8	0.2					
NU2	2.6–2.8	2.9	2.6–2.8	0.7–0.8	0.0–0.2	–				
FN	2.6–3.1	2.8–3.2	2.5–2.9	0.7–1.1	0.0–0.7	0.0–0.7	0.3–0.7			
PB	3.3–3.4	3.8	3.3–3.5	2.2–2.3	2.3–2.6	2.6	2.6–2.8	–		
NM	2.1–2.2	2.4	2.1–2.3	1.4–1.5	1.5	1.5	1.5–1.9	2.3	–	
TS	2.0–2.1	2.3	2.0–2.2	1.3–1.4	1.4–1.6	1.6	1.6–1.8	2.3	0.7	–

distances between clades (Table 3). Genetic distances between the Western Clade and a haplotype representative of *C. nattereri* from Bolivia (HM777484) present a mean of 1.0%; *C. nattereri* from Bolivia diverges in over 1.9% of the sequence when compared against the Eastern and Central Clades (*C. nattereri* vs. Eastern: mean of 2.4%; *C. nattereri* vs. Central: 2.0%) and in 3.2% of the sequence compared to *C. bicolor*. Sequences identified as *C. boliviensis* differ widely from each other (AF007039 and AF007040 compared to AF007037, AF007038, and KJ778554: 5.3%; AF007037 and AF007038 compared to KJ778554: 1.4%) and when compared to *C. nattereri*, *C. bicolor*, and the clades specified above (Table 3). However, the haplotypes AF007039 and AF007040 are known to have been misidentified as *C. boliviensis*, because individuals had a diploid number of $2n = 36$, which is distinct from that known from *C. boliviensis* localities ($2n = 42, 44, \text{ and } 46$) and did not cluster with actual *C. boliviensis* haplotypes in past studies (Lessa and Cook

1998; Mascheretti et al. 2000). Haplotypes of *C. goodfellowi* differ by a mean of 1.3% from true *C. boliviensis* (AF007037, AF007038, and KJ778554) but by over 5.0% from the haplotypes AF007039 and AF007040, which is consistent with the findings of Gardner et al. (2014), who synonymized *C. goodfellowi* with *C. boliviensis* (Table 3). All other haplotypes representative of *Ctenomys* diverge in over 6.0% of their sequences compared to the Western, Eastern, and Central Clades; *C. nattereri* from Bolivia; and *C. bicolor* (PB) (Table 3).

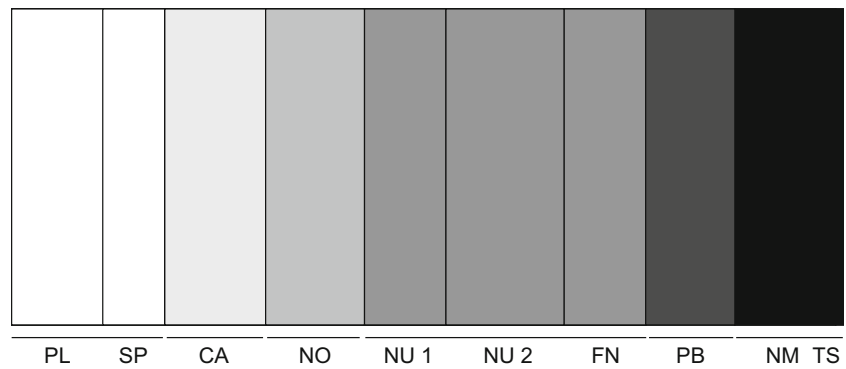
Nonspatial Genetic Mixture Analysis The Bayesian inference of hierarchical clustering of sampling sites estimated in BAPS 6 (Corander et al. 2006, 2008; Cheng et al. 2011) yielded six genetic clusters ($K = 6$), which resemble the clades inferred by genetic distances between sampling sites (PL and SP; CA; NO; NU1, NU2 and FN; PB; and NM and TS; Fig. 2).

Table 3 Cytchrome b (1,087 bp) genetic distances between clades of localities sampled in this study and sequences representative of the *boliviensis* group of species based on the Kimura-2-Parameters Model

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
1. Western Clade	0.0–1.3												
2. Eastern Clade	2.3–3.2	0.0–1.1											
3. <i>C. bicolor</i>	3.3–3.8	2.2–2.8	–										
4. Central Clade	2.0–2.4	1.3–1.9	2.3	0.7									
5. HM777484.1_C_nattereri	0.9–1.1	2.1–2.7	3.2	1.9–2.0	–								
6. AF007039.1_C_boliviensis	1.6–2.1	2.2–2.9	3.4	2.2–2.3	1.9	–							
7. AF007040.1_C_boliviensis	1.6–2.1	2.2–2.9	3.4	2.2–2.3	1.9	0.0	–						
8. AF007037.1_C_boliviensis	5.0–5.3	5.8–6.2	6.8	5.2–5.6	4.9	5.6	5.6	–					
9. AF007038.1_C_boliviensis	5.0–5.3	5.8–6.2	6.8	5.2–5.6	4.9	5.6	5.6	0.0	–				
10. KJ778554.1_C_boliviensis	5.2–5.5	5.9–6.5	6.6	5.0–5.3	5.3	5.6	5.6	1.4	1.4	–			
11. AF007043.1_C_steinbachi	6.4–6.7	7.4–8.1	8.4	7.0–7.5	6.7	6.7	6.6	6.6	7.2	7.0	–		
12. AF007044.1_C_steinbachi	6.3–6.6	7.4–7.9	8.3	6.9–7.4	6.6	6.6	6.5	6.5	7.0	7.9	0.1	–	
13. Other <i>Ctenomys</i> spp.	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0	>6.0

in percentage points. Western Clade: PL, CA, SP; Eastern Clade: NO, NU1, NU2, FN; Central Clade: NM, TS; *Ctenomys bicolor*: PB

Fig. 2 Non-spatial genetic mixture analysis implemented in BAPS 6. Localities sampled in this study structure into six genetic clusters ($K = 6$). Colors from white to dark grey indicate each genetic cluster. From left to right: PL/SP; CA; NO; NU1 NU2, FN; PB; NM, TS



Cytochrome *b* phylogenies: global data set The best-fit model of molecular evolution calculated in JModelTest2 for the global data set was Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al. 1985) + gamma + invariant sites (HKY + G + I). Most species groups were recovered with moderate to strong statistical support in both phylogenies, though the estimated times of divergence between most species groups had only moderate to low support (Figs. 3 and 4). All haplotypes from midwest and northern Brazil are included in the *boliviensis* species group, which is monophyletic, with strong statistical support (Figs. 3a and 4a). Haplotypes from the Western Clade and *C. nattereri* from Bolivia (HM777484) share an MRCA with moderate support in the ML phylogeny (Fig. 3) and strong support in the BI phylogeny (Fig. 4). Haplotypes from the Eastern Clade share an MRCA with *C. bicolor*, while haplotypes from the Central Clade are sister taxa to the Eastern Clade plus *C. bicolor*, with strong statistical support in both phylogenies. All haplotypes from midwest and northern Brazil; the two misidentified haplotypes representative of the species *C. boliviensis* (AF007039 and AF007040) and one haplotype representative of the species *C. nattereri* from Bolivia (HM777484) share an MRCA with five *C. boliviensis* haplotypes (AF007037, AF007038, AF007050, AF007051, and KJ778554) with strong statistical support in both trees. It is important to note that the haplotypes AF007050 and AF007051 are identified in data bases as *C. goodfellowi*, but since Gardner et al. (2014), this species is considered synonymous with *C. boliviensis*. Mean estimates for time of divergence and their 95% highest probability densities (HPD95%) between species groups, between the Ctenomyidae and Octodontidae split, and for the MRCA for the genus *Ctenomys* are summarized in Table 4. The MRCA for the genus *Ctenomys* was estimated at approximately 3.71 mya; the *frater* species group is estimated to be the first species group to have originated, approximately 2.18 mya, while the other species groups are more derived. Conversely, *talarum* and *mendocinus* are the most recently originated species groups (mean time estimates of 0.52 and 0.64 mya, respectively; Table 4; Figs. 3 and 4).

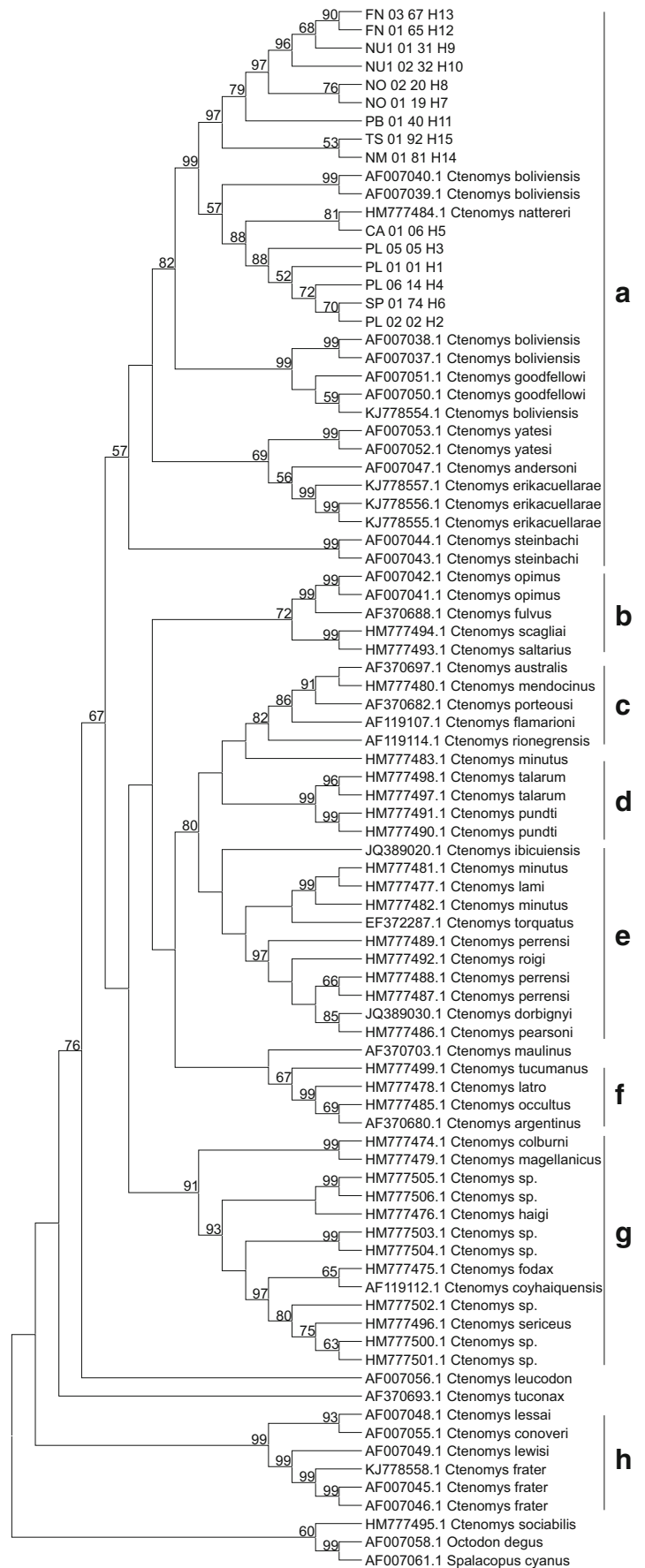
There is one incongruence between the topologies of the BI and ML phylogenies related to the *C. boliviensis* haplotypes

AF007039 and AF007040. When comparing these haplotypes to the others attributed to *C. boliviensis*, the haplotypes AF007039 and AF007040 share an MRCA with *C. nattereri* and the Western Clade but not with the other haplotypes of *C. bicolor*. In both cases, however, there is low statistical support for such positioning (Figs. 3 and 4). Statistical support for the topologies including *C. steinbachi*, *C. erikacuellarae*, *C. andersoni*, and *C. yatesi* as species either within or outside the *boliviensis* species group is equal to one in the BI phylogeny, while the bootstrap values for such clusters are low (57) and moderate (82) in the ML phylogeny for the more inclusive and exclusive groups, respectively (Figs. 3 and 4). Given the maximum support was obtained when including the species in a monophyletic species group (e.g., *boliviensis*) in the BI phylogeny, we chose to consider *boliviensis* as a more inclusive group (species group A; Figs. 3 and 4) as a means to estimate the times of origin for the MRCAs between the taxa of interest while not constraining the analyses to a smaller data set. Therefore, the mean time of divergence for the *boliviensis* species group was estimated at approximately 1.58 mya (Table 4).

Almost all clades within the *boliviensis* species group estimated through the complete phylogenetic reconstruction present moderate (0.70–0.89) to high (0.90–1) statistical support for the given best tree topology, except when considering the clustering of individuals within sampling sites and the positioning of *C. steinbachi* within the species group (posterior probability values less than 0.50). The localities from midwest and northern Brazil share an MRCA with *C. boliviensis* at approximately 1.17 mya. The MRCA between the localities was estimated to have originated 0.57 mya on average, while the clades were estimated to be somewhat more recent (*C. nattereri* and Western Clade, 0.50 mya; Eastern Clade, 0.17 mya; Central Clade, 0.20 mya) (Local group, Table 4).

Cytochrome *b* phylogenies: local data set Bayesian phylogenies for the local data set were calculated in BEAST v2.4.2 using the HKY + G model of nucleotide substitution with four gamma categories and empirical base frequencies. The mean estimated time of divergence for the *boliviensis* species group

Fig. 3 Maximum Likelihood phylogeny for the Cytochrome b gene (1087 bp) calculated for the *global* data set. Haplotypes sampled in this study cluster with the *boliviensis* group of species and share a common ancestor with the Bolivian species *Ctenomys boliviensis*. Western Clade: PL, CA, SP; Eastern Clade: NO, NU1, NU2, FN; Central Clade: NM, TS; *C. bicolor*: PB. Species groups: **(a)** *boliviensis*; **(b)** *opimus*; **(c)** *mendocinus*; **(d)** *talarum*; **(e)** *torquatus*; **(f)** *tucumanus*; **(g)** *magellanicus*; **(h)** *frater*. Bootstrap values under 50 are omitted from the figure



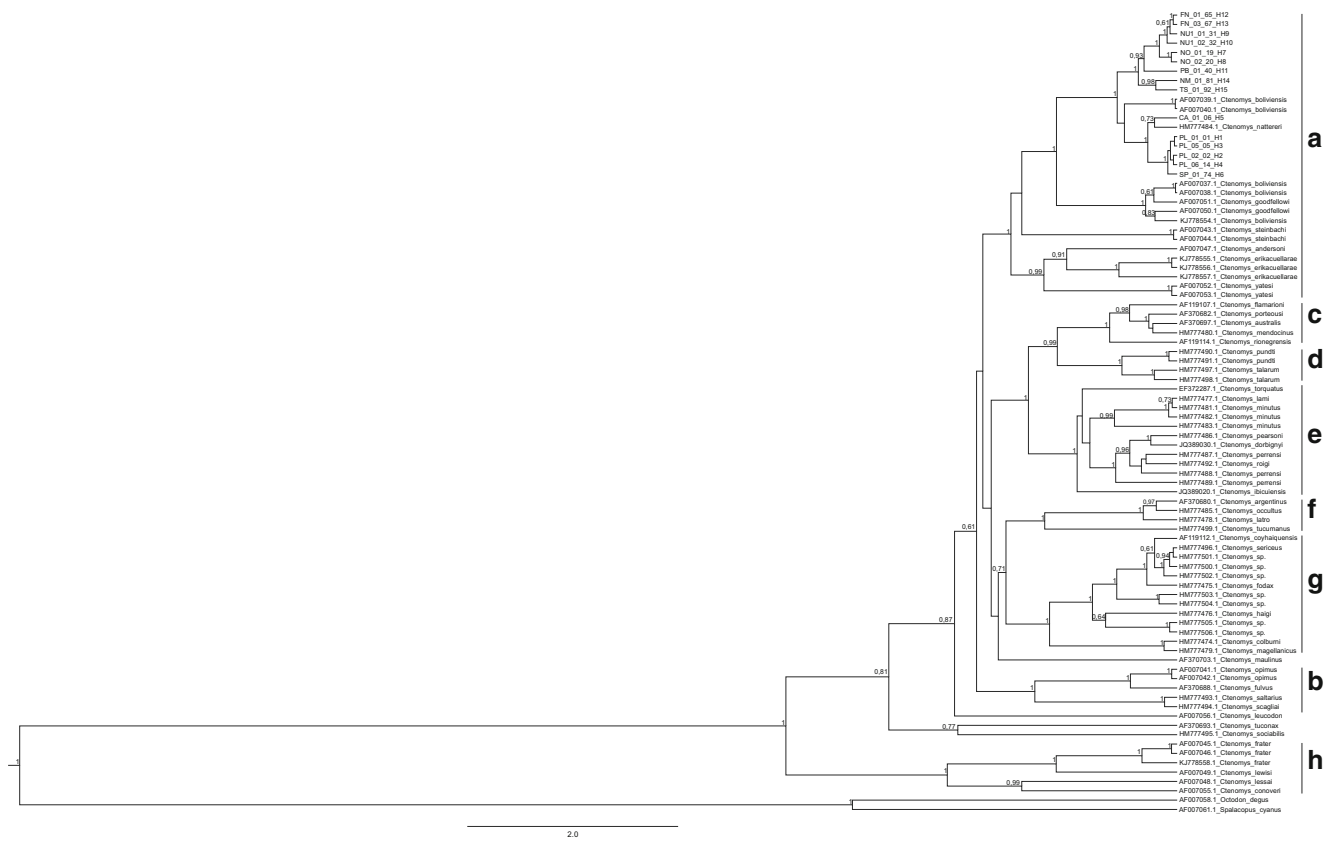


Fig. 4 Bayesian Inference based phylogeny for the Cytochrome b gene (1087 bp) for the global data set. Haplotypes sampled for the studied localities cluster within the *boliviensis* group of species and share a most recent common ancestor (MRCA) with the species *Ctenomys boliviensis*. Western clade: PL, CA and SP; Eastern Clade: NO, NU1, NU2 and FN;

Central Clade: NM and TS; *Ctenomys bicolor*: PB. Species groups: (a) *boliviensis*; (b) *opimus*; (c) *mendocinus*; (d) *talarum*; (e) *torquatus*; (f) *tucumanus*; (g) *magellanicus*; (h) *frater*. Values of posterior probabilities lower than 0.5 were omitted from the figure

was 1.57 mya. *Ctenomys bicolor*, *C. nattereri*, and the Eastern, Western, and Central Clades share an MRCA with *C. boliviensis*, with a mean estimated time of origin of approximately 1.06 mya. The Eastern and Central Clades originated approximately 0.15 and 0.17 mya, respectively, while the Western Clade plus *C. nattereri* from Bolivia (HM777484) is estimated to be somewhat older on average (0.24 mya). The mean estimated times for common ancestors between the taxa in the local data set are summarized in Table 5.

The tree topology is also maintained in the phylogeny calculated with the local data set, with the exception of the positioning of *C. steinbachi*, which clusters as a sister taxon to *C. andersoni*, *C. erikacuellarae*, and *C. yatesi*, albeit with low statistical support (Fig. 5). Almost all nodes representative of valid species and lineages have strong statistical support (posterior probabilities ranging from 0.9 to 1), with the exception of the nodes that separate the species *C. steinbachi* from *C. andersoni*, *C. erikacuellarae*, and *C. yatesi* (0.45), the Western Clade and *C. nattereri* from Bolivia from the two haplotypes misidentified as *C. boliviensis* (AF007039 and AF007040; 0.56) and *C. bicolor* from the Eastern Clade (0.79).

Geometric morphometric analyses – Shapiro-Wilk’s test indicated that the centroid sizes do not differ between localities ($w = 0.97302$, $P = 0.153$) for any of the three views (dorsal: $P = 0.153$; ventral: $P = 0.07$; lateral: $P = 0.233$), except for locality SP, the individuals of which are smaller on average than the ones in other localities ($F_{8, 58} = 6.489$; $P < 0.001$) (Fig. S1). We did not find significant sexual dimorphism for size or shape within or between localities ($t = 0.31798$, $df = 32.362$, $P = 0.7525$; Fig. S1). Therefore, the males and females were pooled together for further analyses.

The PCAs did not show structuring between localities for skull shape (data not shown). Cross-validation tests assigned on average 86%, 68%, and 67% of the individuals to their localities of origin (Table 6) and 91%, 83%, and 64% of the individuals to their respective molecular clade for the dorsal, ventral, and lateral views, respectively (Table 7). There are significant differences among localities for skull shape for the dorsal (Wilk’s $\lambda < 0.0001$; $F_{8, 58} = 5.8889$; $P < 0.001$), lateral (Wilk’s $\lambda < 0.0001$; $F_{8, 58} = 3.7815$; $P < 0.001$), and ventral (Wilk’s $\lambda < 0.0001$; $F_{8, 58} = 3.3744$; $P < 0.001$) views. Pairwise MANOVA revealed significant differences in skull shape between the majority of comparisons for all views

Table 4 Calibration points used (Ctenomyidae/Octodontidae and genus *Ctenomys*), their associated times of divergence and estimated times of divergence obtained for the BI phylogeny between species groups of the genus *Ctenomys* (global data set). Clades: Western, Eastern and Central; *C. bicolor*: PB

Lineage	Calibration points – Mean (HPD95%)	Div. times – Mean (HPD95%)
Higher order groups and species groups		
Ctenomyidae/Octodontidae	10.65 (9.8–11.5)	10.98 (9.08–12.83)
genus <i>Ctenomys</i>	5.0 (3.5–6.5)	3.71 (2.38–5.14)
<i>frater</i>		2.18 (1.22–3.16)
All species groups minus <i>frater</i> and <i>C. sociabilis</i> and <i>C. tuconax</i>		2.74 (1.68–3.86)
<i>opimus</i>		1.35 (0.75–2.00)
<i>mendocinus</i>		0.64 (0.34–0.99)
<i>talarum</i>		0.52 (0.26–0.82)
<i>torquatus</i>		0.95 (0.55–1.38)
<i>magellanicus</i>		1.21 (0.71–1.77)
<i>tucumanus</i>		1.20 (0.73–1.83)
<i>boliviensis</i>		1.58 (0.98–2.24)
Local group (boliviensis)		
<i>C. andersoni</i> , <i>C. erikacuellarae</i> and <i>C. yatesi</i>		1.26 (0.74–1.84)
<i>C. boliviensis</i> , <i>C. bicolor</i> , <i>C. nattereri</i> and other clades		1.15 (0.67–1.65)
<i>C. bicolor</i> , <i>C. nattereri</i> and Clades		0.57 (0.33–0.84)
<i>C. nattereri</i> and Western Clade		0.50 (0.28–0.75)
<i>C. bicolor</i> and Eastern and Central Clades		0.37 (0.20–0.56)
<i>C. bicolor</i> and Eastern Clade		0.31 (0.17–0.47)
Eastern Clade		0.17 (0.08–0.27)
Central Clade		0.20 (0.06–0.37)

(Table S4). The scatterplot of the CVA for the three views of the skull showed different degrees of discrimination for the localities sampled (Fig. S2): in the dorsal view, the localities PB and CA overlap, with the highest negative values for CV1, with the skulls showing a proportionately more-elongated rostrum in positive scores (Fig. S2a). In contrast, NO presents the highest positive values for this axis. All other localities (PL, SP, NU1, NU2, FN, and NM) are differentiated from CA, PB, and NO, clustering with mostly positive values for CV2, though NM presents slightly negative values for CV1; locality FN is differentiated from all other localities by CV2,

presenting the highest positive values for that axis. In the ventral view, the localities PL, CA, and SP are differentiated from all other localities by CV1, where sampling sites with positive scores show skulls enlarged in the tympanic bullae (Fig. S2b). NM and NO present values closest to the mean skull shape for the ventral view, e.g., close to zero, while the NU1, NU2, and FN localities are differentiated by CV2. PB is separated from all other localities by CV1, presenting the most negative values for that CV. In the lateral view, the locality NU1 presents the shape closest to the mean shape, while all other sampling sites are separated from each other and from

Table 5 Calibration point used (*boliviensis* species group), its associated time of divergence obtained for the local phylogeny and estimated times of MRCAs between species and Clades within the *boliviensis* species group

Lineage	Calibration point – Mean (HPD95%)	Div. times – Mean (HPD95%)
<i>boliviensis</i> species group	1.48 (0.92–2.06)	1.57 (1.37–1.77)
<i>C. steinbachi</i> , <i>C. andersoni</i> , <i>C. erikacuellarae</i> and <i>C. yatesi</i>		1.26 (0.72–1.68)
<i>C. boliviensis</i> , <i>C. bicolor</i> , <i>C. nattereri</i> and other clades		1.06 (0.59–1.51)
<i>C. bicolor</i> , <i>C. nattereri</i> and Clades		0.51 (0.28–0.75)
<i>C. nattereri</i> and Western Clade		0.24 (0.11–0.39)
<i>C. bicolor</i> , Eastern and Central Clades		0.33 (0.17–0.49)
<i>C. bicolor</i> and Eastern Clade		0.28 (0.14–0.43)
Eastern Clade		0.15 (0.07–0.24)
Central Clade		0.17 (0.04–0.32)

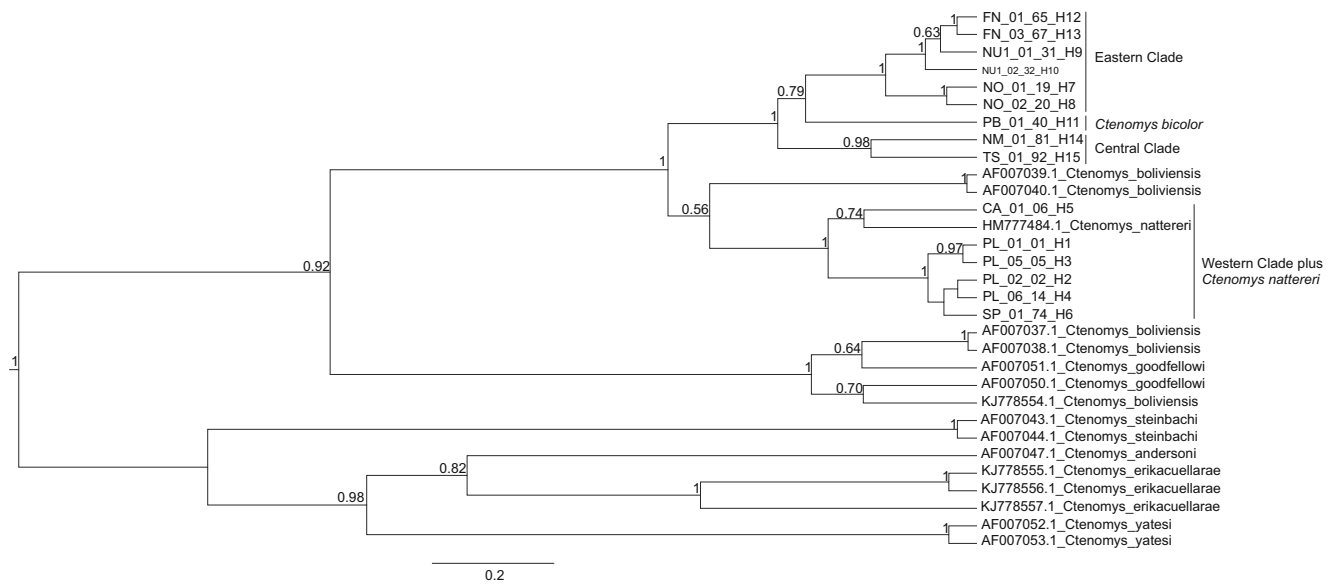


Fig. 5 Bayesian Inference based phylogeny for the Cytochrome b gene (1087 bp) for the local data set. Clades of localities are indicated at the bars to the right. The *boliviensis* species group is monophyletic with

strong statistical support. Posterior probability values lower than 0.5 are omitted from the figure

NU1, with values distant from zero for both CVs. PL, FN, and PB are closely distributed in shape-space, presenting the most negative values for CV1 and little variation in skull shape (Fig. S2c).

Discussion

Diversity indices and general patterns of genetic structuring in *Ctenomys* from midwest and northern Brazil Two haplotypes are shared between localities within clades (PL and SP: H4; NU1, NU2, and FN: H10), which were in turn proposed based on the genetic distances between haplotypes. In every case, the pairwise genetic distances between haplotypes in a clade were lower than those in any other comparison between haplotypes. Indeed, the clades specified are monophyletic with strong statistical support in all phylogenetic analyses and cluster within the *boliviensis* species group (group A; Figs. 3, 4 and 5). In addition, the Bayesian mixture analysis structures localities into six genetic groups, consistent with the groups formed when considering the observed shared

haplotypes, genetic distances, and tree topologies (Fig. 2). The clustering of the haplotypes from midwest and northern Brazil within the *boliviensis* group of species was expected, given that *C. bicolor* (Stolz et al. 2013) and *C. nattereri* from Bolivia (Parada et al. 2011; Gardner et al. 2014) are known to cluster within this species group.

The mean genetic distances observed between *C. nattereri* from Bolivia and the Western Clade (1.0%) are similar to the ones observed within the Western Clade localities (0.7%) and within the Eastern Clade localities (0.6%), which we consider intraclade values, as opposed to the values observed between the Eastern and Western Clades (mean of 2.8%), which can be two to three times larger. In contrast, *C. nattereri* and the Eastern Clade present a mean sequence divergence of 1.9%, while *C. bicolor* diverges in over 2.2% of the sequence when compared to the Western (mean of 3.5%), Eastern (mean of 2.5%), and Central (2.3%) Clades. Such genetic divergence between the haplotypes sampled, combined with the evidence of shared haplotypes, which is reflected by the structuring among haplotypes of the sampled localities, and with the phylogenetic structuring of clades into monophyletic groups with

Table 6 Percentage of correct cross-validation classification for skull shape for nine localities of *Ctenomys* from midwest and northern Brazil based in the skull shape for each of the three views. PL, Pontes e Lacerda;

CA, Cáceres; SP, Sapezal; NO, Nova Olímpia; NU1, Nova Ubiratã 1; NU2, Nova Ubiratã 2; FN, Feliz Natal; PB, Pimenta Bueno; NM, Nova Mutum

	CA	FN	NM	NO	NU1	NU2	PB	PL	SP	Average
Dorsal	66.67	60.00	90.00	100.00	100.00	85.71	100.00	77.78	100.00	86.57
Ventral	66.67	80.00	66.67	66.67	62.50	57.14	77.77	55.55	75.00	68.66
Lateral	100.00	60.00	70.00	50.00	50.00	71.43	66.67	60.67	59.00	67.16

Table 7 Percentage of correct cross-validation classification for skull shape for clades of localities as proposed by molecular analysis for the dorsal, ventral and lateral views of the skull, and its associated average values. *C. bicolor*, PB; Western Clade: PL, CA and SP; Eastern Clade NO, NU1, NU2 and FN; Central Clade, NM

	<i>C. bicolor</i>	Western Clade	Eastern Clade	Central Clade	Average
Dorsal	100.00	86.36	96.15	80.00	91.04
Ventral	77.78	81.82	88.46	80.00	83.58
Lateral	66.67	77.27	61.54	40.00	64.10

strong statistical support indicate that the clades are representative of unique lineages of *Ctenomys* in midwest Brazil. However, proposing thresholds for sequence divergence to delimitate intra- and interspecific genetic distances is difficult, as the same marker may evolve at different rates in different taxa (Avice 1994). Few studies have estimated sequence divergence thresholds for mitochondrial genes. Tobe et al. (2010) compared cytochrome oxidase I (COI) and cytochrome b (cyt b) sequences for 217 mammalian taxa and concluded that at the specific level, cyt b estimates generally correctly assign individuals to their species better than do COI estimates, especially when considering 1.5–2.5% sequence divergence as the threshold to distinguish taxa. Such estimates would imply that our proposed clades present genetic distances within them below the 1.5–2.5% threshold, while the distances between clades can reach values that surpass this threshold, meaning that the clades may represent different species or, at least, represent lineages in the process of speciation. Thus, the distances between *C. bicolor* and the clades are either near or above 2.5%, which is expected because *C. bicolor* is considered a valid species (see Table 3; Figs. 3, 4 and 5).

Phylogenetic trees, skull geometric morphometrics, and diversity of *Ctenomys* in midwest and northern Brazil

The phylogenies calculated using BI and ML methods yield very similar topologies and recover all eight species groups proposed by Parada et al. (2011) with moderate to strong statistical support (Figs. 3, 4 and 5). There are minor incongruences between the phylogenies estimated with the two methods, but they are restricted to the species positioning within species groups, and none of them directly relate to our taxa of interest. Our analyses show that the *boliviensis* species group is one of the oldest species groups to have originated (mean estimate of 1.57 mya; Table 5), considering the estimate generated through the local phylogeny. The lack of resolution for the basal nodes on the phylogenies (bootstrap values under 50 and posterior probabilities under 0.5) demonstrates the rapid radiation of *Ctenomys* throughout South America, as has been pointed out by other authors (Lessa and Cook 1998; Castillo et al. 2005; Parada et al. 2011). The

estimates of origin of MRCAs for the *boliviensis* species group obtained from both the complete and partial phylogenetic reconstructions indicate that the mean and highest probability density (HPD95%) values obtained are consistent between analyses, with minor differences. This demonstrates that the results are reproducible and that the parameters used to reconstruct phylogenies, most notably the calibration points and the enforcing of monophyly of the genus *Ctenomys*, were adequate.

The CVAs for dorsal and ventral views of the skull more closely differentiate the localities in a phylogeny-like pattern: the CV1 for the ventral view of the skull segregates the sampling sites into groups resembling the molecular clades, while in the dorsal view, CV2 also discriminates the sampling sites in a geographical pattern (Fig. S2a and S2b). The CVA for the lateral view of the skull differentiates the localities into single-locality groups, with low variance for skull shape within them (Fig. S2c). The percentages of individuals correctly assigned to their localities of origin through jackknife cross-validation analyses suggest that differences in the dorsal view of the skull best differentiate the sampling sites from one another (86%), while the ventral and lateral views correctly differentiate the sampling sites less often (68 and 67%, respectively; Table 6). However, testing the assignment of individuals based on the proposed phylogenetic clades increased the frequency of correct classification for both the dorsal (91%) and ventral (83%) views, suggesting that skull shape is influenced partially by demography (Table 7), because the increase in correct classification reflects the common origin of the individuals of the localities within a clade. Patterns of discrimination between sampling sites through the CVA analysis corroborate the results obtained through the MANOVA analysis, in which there are significant differences in skull shape for most pairwise comparisons in all three views analyzed (Table S4).

Therefore, the geometric morphometric analysis of the skulls of individuals from our sampling sites demonstrates that variation in skull shape may contain both environmental and phylogenetic signals. Because mitochondrial genes are considered to evolve under near neutrality, and thus are widely used as molecular markers for estimating evolutionary processes dependent on geographical barriers, gene flow and migration (e.g., demographic effects), environmental pressures selecting for a given cranial structure may not reflect a pattern of cranial structure in which variation is caused by demographic effects but rather a pattern that reflects adaptation or both adaptation and demography. Indeed, the structure inferred through the morphometric analysis for both the ventral and dorsal views of the skull closely resembles the structure found in the phylogenetic analysis, while the morphometric analysis with the lateral view of the skull does not, indicating the influence of selection on skull shape.

There are many possible explanations for the differences in skull shape that do not match the patterns of structure inferred from the phylogenies as well as for the lack of differences

between individuals in localities that do belong to different phylogenetic clades; for example, convergence in the feeding apparatus in rodents inhabiting similar habitats is common (Samuels 2009). Therefore, if the habitats present similar ecological pressures, then the differences in skull shape between individuals of localities representative of distinct phylogenetic lineages can be more influenced by environmental pressures than by demography alone. Environmental pressures, such as the hardness of soil, can select for skull shape in fossorial rodents (Marcy et al. 2016), which requires a derived skull morphology with procumbent incisors for digging (Stein 2000); indeed, the bulk density of soils is correlated with bite force in *Ctenomys*, with species that inhabit denser soils generally exhibiting higher bite force measurements (Borges et al. 2017). Alternatively, allometry effects can influence intraspecific skull shape in conjunction with environmental effects, such as primary production and precipitation, or demographic effects, including restricted gene flow and reduced population size (Maestri et al. 2016). Conversely, the times of origin for the Brazilian clades appear to be recent (Table 5), in which case it is possible that not enough time has passed for the lineages to accumulate differences in skull shape. This demographic hypothesis could explain the subtle structural differences found between the three views of the skull. Alternatively, environmental pressures may be selecting for skull shape.

Overall, patterns of phylogenetic structure, sequence divergence between haplotypes, and skull shape differences between individuals within the sampled localities reveal two major lineages in midwest Brazil: i) a lineage including the haplotypes from the Western Clade plus *C. nattereri* from Bolivia (HM777484), and ii) a lineage including all haplotypes from the Central and Eastern Clades and *C. bicolor*. Given that *C. bicolor* is a valid species and is positioned intermediately relative to the Eastern and Central Clades in all phylogenetic analyses, both clades can be considered independent lineages. As the Eastern Clade sampling sites NU1, NU2, and FN are located near Xingu National Park, one of the largest and most conserved protected areas in Brazil, and the Central Clade sampling sites are central to the known distribution of *Ctenomys* in midwest and northern Brazil, we name the lineages *C. sp.* “xingu” and *C. sp.* “central,” respectively.

Potential Shortcomings of the Analyses and Future Directions

Mitochondrial genes have been used extensively in phylogenetic studies due to their mode of inheritance, lack of recombination, and reduced effective sample size, which facilitate coalescence in a phylogeny (Neigel and Avise 1987; Avise 2000). In the case of *Ctenomys*, mitochondrial genes have been instrumental for defining species and confirming the monophyly of the genus. However, time estimates using mitochondrial markers should be interpreted with caution, because these markers may have broad confidence intervals that

may limit inference of the ages of phylogenetic clades (Ballard and Whitlock, 2004 and references therein). In any case, phylogenetic approaches in *Ctenomys* using the cytochrome b gene have yielded more reliable estimates of the origin of both the genus and its species groups than the nuclear markers that have been tested, based on the estimated age of the oldest known fossil (Lessa and Cook 1998; Castillo et al. 2005; Parada et al. 2011).

Ctenomys presents high levels of karyotype heterogeneity, with diploid numbers ranging from $2n = 10$ in *C. steinbachi* to $2n = 70$ in *Ctenomys dorbignyi* Contreras and Contreras, 1984 (Anderson et al. 1987; Woods and Kilpatrick 2005), although the species generally have species-specific karyotypes (Reig et al. 1990, but see Lopes et al. 2013). Therefore, knowing how localities structure karyotype variability is essential to corroborate molecular and morphological data to define and describe species within the genus *Ctenomys*. We concur with Parada et al. (2011) and Freitas (2005) in that additional nuclear markers, such as the ones used by Castillo et al. (2005) and Upham and Patterson (2012), should be sequenced genus-wide to corroborate the karyotype, morphological, and mitochondrial DNA data. Additionally, sequencing additional genes can better estimate species trees, thus mitigating possible incongruences between species and gene trees, and can provide more reliable evidence for dating times of divergence between lineages with narrower confidence intervals.

Conclusions

Molecular phylogenetics and geometric morphometrics approaches have allowed us to resolve phylogenetic lineages and corroborate the presence of *C. bicolor* and *C. nattereri* in midwest and northern Brazil. We identify two independent lineages: *C. sp.* “xingu” and *C. sp.* “central.” At the moment, a lack of karyotype data does not allow us to resolve lineages into defined species; therefore, sampling additional localities of *Ctenomys* from midwest and northern Brazil, and thus increasing the sample size for molecular and morphometric analysis and allowing for the karyotyping of individuals is essential to accomplish this task. In addition to increasing sample size, future population genetics and ecological studies involving *Ctenomys* in Brazil will require more molecular markers, both those that are neutral and those under selection, to estimate population parameters, understand genetic mechanisms of local adaptation, and define evolutionary significant units sensu Moritz (1994). For example, next-generation sequencing (NGS) methods coupled with restriction enzyme digestion (Davey et al. 2011 and references therein), such as RADseq (Baird et al. 2008) and its derivatives (ddRADseq, Peterson et al. 2012), could be employed to generate sets of hundreds to thousands of neutral and potentially adaptive loci, allowing for the fine-tuning of phylogenies (Cariou et al.

2013; Emerson et al. 2010) and identification of polymorphisms that could account for the genetic basis of local adaptation (Manthey and Moyle 2015).

Acknowledgments We thank all colleagues from the Laboratory of Cytogenetics and Evolution (LACE) for their invaluable support in reviewing this manuscript. We also thank Professors Andreia Turchetto, Gislene Lopes Gonçalves, and Renan Maestri for reviewing the methods, results, and discussion sections of this paper. L.T.L. and L.E.J.R. received scholarships from the Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Técnico e Superior (CAPES), and T.R.O.F. received research grants from CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Ackerly DD, Thomas WMW, Ferreira CAC, Pirani JR (1989) The forest – cerrado transition zone in southern Amazonia: results of the 1985 Projeto Flora Amazonica Expedition to Mato Grosso. *Brittonia* 41(2): 113–128
- Adams DC, Otárola-Castillo E (2013) Geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods Ecol Evol* 4:393–399
- Anderson S, Yates TL, Cook JA (1987) Notes on Bolivian mammals, 4: the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) in the eastern lowlands. *Am Mus Novitates* 2891:1–20
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One* 3(10): e3776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* 13: 729–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>
- Bidau CJ, Ávila-Pires FD (2009) On the type locality of *Ctenomys bicolor* Miranda Ribeiro, 1914 (Rodentia: Ctenomyidae). *Mastozool neotrop* 16:445–447.
- Bidau CJ (2015) Family Ctenomyidae. In: Patton, JL, Pardiñas, UFJ, D'Elia G (eds) *Mammals of South America Vol. 2: Rodents*. University of Chicago Press, Chicago
- Bookstein FL (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, London
- Borges LR, Maestri R, Kubiak BB, Galiano D, Fornel R, Freitas TRO (2017) The role of soil features in shaping the bite force and related skull and mandible morphology in the subterranean rodents of genus *Ctenomys* (Hystricognathi: Ctenomyidae). *J Zool* 301:108–117. <https://doi.org/10.1111/jzo.12398>
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ (2014) BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol* 10(4): e1003537. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Cariou M, Duret L, Charlat S (2013) Is RAD-seq suitable for phylogenetic inference? An in silico assessment and optimization. *Ecol Evol* 3(4): 846–852. <https://doi.org/10.1002/ece3.512>
- Castillo AH, Cortinas MN, Lessa EP (2005) Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *J Mammal* 86:170–179
- Cheng L, Connor TR, Aanensen, Spratt BG, Corander J (2011) Bayesian semi-supervised classification of bacterial samples using MLST databases. *BMC Bioinformatics* 12:302
- Corander J, Marttinen P, Mäntyniemi S (2006) Bayesian identification of stock mixtures from molecular marker data. *Fishery Bull* 104: 550–558
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* 9:539
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12(7): 499–510. <https://doi.org/10.1038/nrg3012>
- D'Elia G, Lessa EP, Cook JA (1999) Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae): evaluation of the *mendocinus* species group and the evolution of asymmetric sperm. *J Mammal Evol* 6: 19–38
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- Dryden IL, Mardia KV (1998) *Statistical Shape Analysis*. John Wiley & Sons, New York
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biol* 4:e88
- Edgar R (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797
- Emerson KJ, Merz CR, Catchen JM, Hohenlohe PA, Cresko WA, Bradshaw WE, Holzapfel CM (2010) Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (37):16196–16200. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006538107>
- Fernandes FA, Fornel R, Cordeiro-Estrela P, Freitas TRO (2009) Intra- and interespecific 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
- Freitas TRO (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
- Freitas TRO (2005) Analysis of skull morphology in 15 species of the genus *Ctenomys*, including seven karyologically distinct forms of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). In: Lacey EA, Myers P (eds) *Mammalian Diversification: From Chromosomes to Phylogeography (A Celebration of the Career of James L. Patton)*. Univ Calif Publ Zool 133:131–154
- Freitas TRO (2016) Family Ctenomyidae. In: Wilson DE, Lacher TE Jr, Mittermeier RA (eds) *Handbook of the Mammals of the World: Lagomorphs and Rodents I, Vol. 6*. Lynx Editions, Barcelona, pp 499–534
- Freitas TRO, 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
- Gardner SL, Salazar-Bravo J, Cook JA (2014) New species of *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) from the lowlands and central valleys of Bolivia. *Spec Publ Mus Texas Tech Univ* 62:1–34
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22:160–174
- Heled J, Drummond AJ (2011) Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence time estimation. *Syst Biol* 61:138–149

- IBGE (2004) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Maps of Biomes and Vegetation. Available at: ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/
- Kent JT, Mardia KV (2001) Shape, Procrustes tangent projections and bilateral symmetry. *Biometrika* 88 (2):469–485. <https://doi.org/10.1093/biomet/88.2.469>
- Klingenberg CP (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resources* 11: 353–357
- Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A (2002) Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56:1909–1920
- Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (2000) *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago and London, 449 pp
- 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 (1):88–99
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- Lichtenstein H (1830) Darstellung neuer oder wenig bekannter. Säugethiere in Abbildung und Beschreibungen. Luderitz edit, Berlin (1827–31)
- Lopes CM, Ximenes SSF, Gava A, Freitas TRO (2013) The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity* 111:293–305. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.49>
- Maestri R, Fornel R, Gonçalves GL, Geise L, Freitas TRO, Carnaval AC (2016) Predictors of intraspecific morphological variability in a tropical hotspot: comparing the influence of random and non-random factors. *J Biogeogr* 43:2160–2172
- Manthey JD, Moyle RG (2015) Isolation by environment in White-breasted Nuthatches (*Sitta carolinensis*) of the Madrean Archipelago sky islands: a landscape genomics approach. *Mol Ecol* 24 (14): 3628–3638. <https://doi.org/10.1111/mec.13258>
- Marcy AE, Hadly EA, Sherratt E, Garland K, Weisbecker V (2016) Getting a head in hard soils: convergent skull evolution and divergent allometric patterns explain shape variation in a highly diverse genus of pocket gophers (*Thomomys*). *BMC Evol Biol* 16:207. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0782-1>
- Marimon BS, Marimon-Junior BH, Feldpausch TR, Oliveira-Santos C, Mews HA, Lopez-Gonzalez G, Lloyd J, Franczak DD, Oliveira EA, Maracahipes L, Miguel A, Lenza E, Phillips OL (2013) Disequilibrium and hyperdynamic tree turnover at the forest-cerrado transition zone in southern Amazonia. *Plant Ecol Diversity* 7(1–2):281–292. <https://doi.org/10.1080/17550874.2013.818072>
- Marshall LG, Sempere T (1993) Evolution of the Neotropical Cenozoic land mammal fauna in its geochronologic, stratigraphic, and tectonic context. In: Goldblatt P (ed) *Biological Relationships Between Africa and South America*. Yale University Press, New Haven, pp 329–392
- Mascheretti S, Mirol P, Gimenez M, Bidau C, Contreras J, Searle J (2000) Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Biol J Linn Soc* 70:361–376
- Miranda-Ribeiro A De (1914) *Zoologia*. Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas de Matto Grosso ao Amazonas. Anexo 5, Historia Natural; publ no 17, Mammíferos. 49 pp + Append, 3 pp + 25 pls
- Moritz C (1994) Defining ‘evolutionary significant units’ for conservation. *Trends Ecol Evol* 9 (10):373–375
- Neigel JE, Avise JC (1987) Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: Nevo E, Karlin S (eds) *Evolutionary Processes and Theory*. Academic Press, New York, pp 515–534. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398760-0.50026-2>
- Nowak RM (1999) *Walker’s Mammals of the World*. 6th edition, volume 2. Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Parada A, D’Elía G, Bidau CJ, Lessa EP (2011) Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *J Mammal* 92(3):671–682
- Patton JL, Pardiñas UFJ, D’Elía, G (2015) *Mammals of South America*, Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012) Double digest RADseq: an inexpensive method for *de novo* SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One* 7(5):e37135. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- R Core Team (2017) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Rambaut A, Drummond AJ (2015a) LogCombiner v1.8.2. <http://beast.bio.ed.ac.uk>
- Rambaut A, Drummond AJ (2015b) TreeAnnotator v1.8.2: MCMC Output analysis. <http://beast.bio.ed.ac.uk>
- Rambaut A, Suchard M A, Xie W, Drummond AJ (2013) Tracer v.1.6.0: MCMC Trace Analysis Tool. <http://beast.bio.ed.ac.uk>
- Reig OA, Busch C, Ortells MO, Contreras JR (1990) An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. In: Nevo E, Reig OA (eds) *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels*. Wiley- Liss, New York, pp 71–96
- Rohlf FJ (2010) TPSDig 2.16. Stony Brook New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook
- Sikes RS, the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists (2016) 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J Mammal* 97(3):663–688
- Samuels JX (2009) Cranial morphology and dietary habits of rodents. *Zool J Linn Soc* 156:864–888
- 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
- Smith MF, Patton JL (1999) Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *J Mammal Evol* 6(2): 89–128 S
- Stein B (2000) Morphology of subterranean rodents. In: Lacey AP, Patton JL, Cameron GN (eds) *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago, pp 19–60
- 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(4): 5023–5037
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Tobe SS, Kitchener AC, Linacre AMT (2010) Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PLoS One* 5(11): e14156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014156>
- Travi VH (1981) Nota prévia sobre nova espécie do gênero *Ctenomys* Blainville, 1826 (Rodentia: Ctenomyidae). *Iheringia* 60: 123–124
- Upham NS, Patterson BD (2012) Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystrichognathi). *Mol Phylogenet Evol* 60-2: 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.01.020>
- Verzi, DH (2002) Patrones de evolución morfológica en Ctenomyiinae (Rodentia, Octodontidae). *Mastozool neotrop* 9:309–328.
- Verzi DH, Olivares AI, Morgan CC (2009) The oldest South American tuco-tuco (late Pliocene, northwestern Argentina) and the

- boundaries of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammal Biol* 75:243–252
- Vucetich MG, Verzi DH, Hartenberger JL (1999) Review and analysis of the radiation of the South American Hystricognathi (Mammalia, Rodentia). *Paleontology* 329:763–769
- Wagner A (1848) Beiträge zur Kenntniss der Arten von *Ctenomys*. *Archiv für Naturgeschichte* 14:72–78
- Wlasiuk G, Garza JC, Lessa EP (2003) Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57:913–926
- Woods CA, Kilpatrick CW (2005) Infraorder Hystricognathi. In: Wilson DE, Reeder DM (eds) *Mammal Species of the World*. (3rd ed.). Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 1538–1600
- Zenuto RR, Busch C (1998) Population biology of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a coastal dunefield in Argentina. *Z Säugetierk* 63:357–367

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Poucos estudos para o gênero *Ctenomys* consideraram abordagens comparativas entre marcadores moleculares de origem e modo evolutivo distintos, como é o caso do estudo de Wlasiuk, Garza e Lessa (2003), no qual os autores comparam polimorfismos proteicos com polimorfismos de DNA em *C. rionegrensis*; contudo, nenhum havia considerado, até o presente momento, conjuntos de milhares marcadores distribuídos ao longo dos genomas das espécies, para inferir padrões filogenéticos e populacionais. Apresento nesta tese, uma abordagem inédita para a resolução da estruturação populacional e filogenética de *Ctenomys*, com potencial para ser reproduzida em qualquer grupo de roedores subterrâneos, e cujos dados podem ser reavaliados em estudos adaptativos, uma vez que os recursos genômicos necessários estejam disponíveis. Esse último ponto será defendido em maiores detalhes neste capítulo, pois dele dependem os estudos associativos entre genótipo e fenótipo que poderão ser conduzidos a partir das metodologias de RAD seq em futuros trabalhos.

No Capítulo I, é apresentado breve histórico sobre o surgimento e a utilização de marcadores moleculares na inferência de parâmetros populacionais de diversidade e estruturação genética, com enfoque nos marcadores utilizados especificamente no estudo de *Ctenomys*, e as justificativas para a utilização de metodologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) em estudos do gênero. Para demonstrar a utilidade dessas metodologias de NGS na compreensão da história evolutiva de *Ctenomys*, foi escolhido como estudo de caso um conjunto de táxons mal estabelecidos e pouco estudado por estudiosos do gênero por mais de um século, sob o ponto de vista ecológico, genético e filogenético, e ao qual apenas recentemente foi acrescida informação sobre uma espécie

local, *Ctenomys bicolor* (Stolz et al., 2013) sob um prisma molecular, que são os Tuco-tucos do Centro-oeste e Norte do Brasil. Tal escolha foi feita porque permite traçar comparativos sobre marcadores moleculares – mitocondriais, microssatélites e SNPs –, de origens – mitocondriais e nucleares –, modos evolutivos – neutros e sob seleção – e padrões de herança distintos – haploides e diploides, no que tange a padrões filogenéticos e de estrutura populacional, ao passo que agrega conhecimento sobre novas linhagens de *Ctenomys* antes quase totalmente desconhecidas.

Iniciamos os estudos sobre *Ctenomys* nos estados do Mato Grosso e de Rondônia buscando elucidar a diversidade de espécies na região, através de uma reconstrução filogenética do gênero por meio de haplótipos do gene Citocromo b (*Cyt b*), que incluísse os novos táxons amostrados, bem como buscamos observar se fatores não demográficos poderiam estar envolvidos na alteração ou manutenção das estruturas cranianas, indispensáveis para o hábito de vida subterrâneo, a partir de análises de morfometria geométrica do crânio dos indivíduos amostrados, tópicos os quais foram objeto do Capítulo II da presente Tese, já publicado no periódico *Journal of Mammalian Evolution* (Leipnitz et al., 2018). Neste trabalho, os autores validam as espécies *C. nattereri* e *C. bicolor* e identificam dois novos clados na região, denominados *C. sp. xingu* e *C. sp. central*, com base em dados moleculares e de morfometria geométrica, esclarecendo assim, pela primeira vez, o status filogenético dos táxons amostrados no Centro-oeste e Norte do Brasil. Além disso, o estudo também revalida os oito grupos de espécies monofiléticos encontrados por Parada e cols. (2011), identificando que as espécies e linhagens estabelecidas no presente estudo pertencem ao grupo *boliviensis* de espécies e tem ancestral comum direto com *Ctenomys boliviensis*, estimando a origem destes clados a partir de 500 mil anos. As estimativas de diversidade genética e de estruturação populacional inferidas a partir do gene analisado no Capítulo II indicaram baixa

variabilidade e alta estruturação genética entre as populações amostradas, indicando que as populações estão, desde muito tempo, diferenciadas; de fato, esse padrão de estrutura iria se repetir nas análises do Capítulo III, e viria a ser interpretado como resultado de forte deriva gênica e subsequente fixação e/ou perda de alelos. Os dados gerados no Capítulo II constituem o mais completo registro da diversidade genética do gênero *Ctenomys* nas regiões de estudo já publicado e abrem precedência para as análises comparativas realizadas no Capítulo III desta Tese. Já os dados de morfometria geométrica, não menos importantes que os moleculares, indicam que as estruturas ósseas contidas na vista lateral do crânio devem ser fortemente influenciadas por fatores adaptativos, uma vez que o padrão de estruturação populacional para a forma do crânio nesta vista é muito distinto daquele observado nas demais vistas – dorsal e ventral – e do padrão filogenético gerado pelas análises moleculares; tal informação acresce à importância de uma ênfase adaptativa nos estudos em *Ctenomys* a partir de marcadores moleculares, o que ainda não ocorre para o gênero e acaba limitando a capacidade de inferir causa e efeito entre genótipos e fenótipos observados, como as estruturas cranianas exploradas no Capítulo II e que, especula-se, são atribuídas a fatores ambientais, como a dureza do solo (Marcy et al., 2016) e a força da mordida (Borges et al., 2017), à convergência adaptativa do aparato bucal para explorar o hábito subterrâneo (Samuels 2009), ou então possivelmente a efeitos alométricos associados a fatores ambientais e genéticos (Maestri et al., 2016); quando um genoma de referência estiver disponível, será possível observar, por exemplo, relação direta entre algum gene de desenvolvimento e a forma do crânio nas populações analisadas, a partir do mapeamento de SNPs sob seleção positiva nos genomas de diversas linhagens.

É importante salientar também que a filogenia para o gênero apresentada neste trabalho é a primeira a utilizar calibração fóssil para gerar estimativas do tempo de origem

dos clados e também é a mais inclusiva para o gênero até o presente momento; tais características contribuíram para gerar estimativas de origem dos grupos de espécies e dos táxons de interesse mais refinadas – isto é, com menores intervalos de confiança – uma vez que calibrações fósseis proveem limiares mínimos para a origem de grupos específicos, e refinam, por consequência, as estimativas das taxas evolutivas dos marcadores utilizados; o aumento no número haplótipos representativos de distintos táxons, por sua vez, refina as estimativas de taxas mutacionais internas aos grupos de espécies, por consequência reduzindo a amplitude das estimativas máximas e mínimas da origem dos clados que compõem esses grupos. No entanto, cabe salientar também que filogenias embasadas em apenas um marcador molecular serão limitadas no seu poder de inferência topológica e temporal, via de regra porque não representam a história evolutiva das espécies, e sim a do gene em particular (Mallo e Posada, 2016; Scornavacca e Galtier, 2016); de fato, as relações filogenéticas estimadas a partir de marcadores bi-alélicos codominantes (SNPs), refinam ainda mais a filogenia para o grupo de espécies do MT e de RO, pois não suportam a existência dos clados *C. sp. xingu* e *C. sp. central*, agrupando ambos em apenas um clado monofilético (i.e. *C. sp. leste*), possivelmente porque o conjunto de SNPs genômicos utilizado nas análises do Capítulo III é verdadeiramente representativo da história evolutiva do gênero, visto que não possuem origem restrita a determinadas posições genômicas ou ao genoma mitocondrial, como ocorre com os marcadores atualmente utilizados em análises filogenéticas em *Ctenomys*. De toda forma, mesmo frente a limitações analíticas, o Capítulo II cumpre com seus objetivos e estabelece as bases para o estudo das linhagens e espécies definidas neste, que servirão como hipóteses iniciais para as análises populacionais e filogenéticas do Capítulo III.

No Capítulo III, marcadores moleculares de DNA mitocondrial e microssatélites e os SNPs genômicos foram utilizados para testar a validade dos clados filogenéticos

inferidos no Capítulo II, a partir da comparação entre esses marcadores sob uma perspectiva majoritariamente populacional e filogenética. Foi mostrado que, de maneira geral, as populações estudadas são fortemente estruturadas, a julgar pelos índices de F_{ST} e AMOVAs gerados a partir dos marcadores clássicos, ambos estatisticamente significativos para estruturação genética entre pares populacionais, pela ausência de sinal de expansão ou retração do tamanho populacional estimado para o DNA mitocondrial a partir de três estatísticas distintas – D de Tajima, F_s de Fu e R_2 de Ramos-Onsins-Rozas, e pelas estimativas de estruturação populacional geradas a partir de análises bayesianas nos programas STRUCTURE e Geneland para os dados de microssatélites, que, quando admitem subestruturação genética de uma população ou aglomeração de populações geográficas em um mesmo grupo genético, o fazem apenas dentro um mesmo clado filogenético, delimitados no Capítulo II.

A abordagem genômica proporcionada pelo RAD seq permitiu isolar milhares de marcadores moleculares bi-alélicos neutros e centenas potencialmente adaptativos, permitindo inferir com maior refinamento a diversidade genética para *Ctenomys* na região de estudo. De fato, estimativas de estruturação genética com base nos SNPs genômicos delimitam agrupamentos genéticos homogêneos, sem os efeitos potencialmente contraditórios da homoplasia de marcadores, que ocorre, em casos isolados, nas estimativas de estruturação populacional calculadas com base nos marcadores microssatélites. Além disso, muito embora concordante com as análises de microssatélites no que tange a separar espécies (*C. bicolor* e *C. nattereri*) das demais populações, a análise genômica dos marcadores evolutivamente neutros (22,220 SNPs) difere da sua análoga com microssatélites, principalmente por diferenciar sistematicamente as populações antes assinaladas à *C. nattereri* – i.e. Pontes e Lacerda (PL), Cáceres (CA) e Sapezal (SP) –, independentemente do modelo estatístico utilizado, indicando se tratar de

linhagens evolutivas distintas; a estruturação filogenética encontrada com base nos mesmos marcadores genômicos corrobora a diferenciação de PL, CA e SP, indicando que, se CA é considerada a localidade tipo de *C. nattereri*, PL e SP devem ser derivações desta espécie. De maneira contrária, os clados mitocondriais *C. sp. xingu* e *C. sp. central* não encontram suporte estatístico nas análises filogenômicas, de modo que as populações que os compõem formam um único clado monofilético, chamado de “*C. sp. leste*” (em inglês *C. sp. eastern*, Capítulo III), indicando que há uma história evolutiva comum recente entre essas populações, e não uma ancestralidade comum em um passado distante, como se poderia pensar ao observar a marcada separação entre os clados mitocondriais. Ainda cabe ressaltar que a metodologia tem o potencial de discernir indivíduos dentro de populações, como acontece nas análises filogenéticas desenvolvidas nesta Tese, e também, como exemplificado na literatura, de resolver relações filogenéticas entre táxons com divergência estimada em mais de 80 milhões de anos (Cariou et al., 2013; Herrera e Shank, 2016), exemplificando o potencial para resolver relações filogenéticas em diferentes escalas temporais; para efeitos de comparação, as filogenias geradas desde Lessa e Cook (1998) até hoje (Leipnitz et al., 2018) para *Ctenomys* a partir do gene Citocromo b falham em resolver os nodos mais basais da filogenia e as relações filogenéticas entre populações recentemente derivadas dentro de clados moleculares, mesmo considerando o gradual aumento da representatividade das espécies na filogenia, o desenvolvimento de modelos bayesianos complexos e as calibrações fósseis empregadas, mostrando as limitações de uma análise que utiliza apenas um marcador. Ainda resta reanalisar as filogenias geradas neste estudo sob modelos Bayesianos que considerem as posições individuais dos SNPs entre espécies e linhagens, como o pacote SNAPP (Bryant et al., 2012) implementado no programa BEAST v.2.5.0 (Bouckaert et al., 2014). Tal abordagem foi objeto deste estudo, mas não gerou resultados aproveitáveis

devido a problemas relacionados à capacidade computacional dos servidores utilizados – o que tornava as análises muito lentas – e também ao emprego de parâmetros *a priori* que não se assemelham à real distribuição dos dados *a posteriori*, impedindo a amostragem dos parâmetros em níveis confiáveis (isto é, ESS acima de 200); para resolver esta problemática técnica, será necessário analisar conjuntos reduzidos de indivíduos representativos das linhagens observadas e iterar parâmetros *a priori* para gerar modelos evolutivos que reflitam a real distribuição dos dados em tempo hábil. Esta análise é fundamental para que intervalos de confiança para a origem dos clados observados sejam gerados, permitindo comparar essas estimativas com as obtidas a partir dos tradicionais marcadores mitocondriais.

As maiores lacunas do Capítulo III, estão, contudo, relacionadas às análises de viés adaptativo, visto que a falta de um genoma de referência específico para o gênero impede o estabelecimento de relações de causa e efeito entre genótipo e fenótipo. De fato, as análises de estruturação populacional com base nos mais de 200 SNPs sob seleção positiva indicam padrões de estruturação distintos daqueles encontrados para os SNPs neutros, agrupando as populações PL e SP, e Nova Ubiratã 1 (NU1), Nova Ubiratã 2 (NU2) e Feliz Natal (FN) nas análises conduzidas sob modelos Bayesianos e de Máxima Verossimilhança; contudo, na ausência de um genoma de referência, torna-se impossível discernir se tais diferenças são resultado da fixação de alelos por deriva gênica – o que parece ser muito comum no gênero *Ctenomys*, vide Capítulo I – ou se são, ao menos em parte, fruto de seleção positiva em resposta à pressões ambientais. Dessa forma, concordo com Lessa e cols. (2014) em relação à necessidade de se gerar recursos genômicos para inferir seleção e adaptação em estudos de diversidade genética em roedores, e enfatizo a urgência na síntese de um genoma de referência para o gênero *Ctenomys* especificamente, de modo a introduzir os roedores subterrâneos sul-Americanos na Era Genômica de fato.

A partir da síntese deste genoma de referência, considerando um contexto filogenético, variantes genéticas envolvidas na adaptação local poderão ser identificadas e comparadas entre populações e espécies do gênero, a exemplo do que ocorre na espécie *Sitta carolinensis*, na qual foram identificados SNPs sob seleção em genes associados à adaptação a diferentes altitudes (Manthey e Moyle, 2015). Traços evolutivos restritos a conjuntos de espécies ou que tenham sido derivados a partir de espécies basais na filogenia de *Ctenomys* poderão ser identificados a partir de análises filogenômicas comparativas, por meio da reconstrução da filogenia do gênero a partir de SNPs neutros, confirmando ou refutando os padrões filogenéticos inferidos pelo gene *cyt b*, e pela análise de SNPs sob seleção conservados em espécies e grupos de espécies; abordagem semelhante foi utilizada para traçar a origem e a dispersão de um caractere sob seleção sexual no gênero de peixes *Xiphophorus* (Jones et al., 2013). Genomas de referência em diversas espécies de *Ctenomys* poderiam ser utilizados de modo a detectar fusões e fissões cromossômicas e seus padrões de herança, inferidos pela análise de conjuntos de SNPs sob ligação, através da técnica de LDna (Kemppainen et al., 2015), a qual permite identificar tanto polimorfismos sob seleção quanto os eventos macroevolutivos – isto é, em escala cromossômica; essa abordagem será de grande valia na identificação e mensuração do papel da evolução cromossômica no gênero *Ctenomys*, que desde a década de 60 (Kiblicky e Reig, 1966; Reig e Kiblicky, 1969) é hipotetizada como possível fonte primária de variação genética envolvida na especiação rápida observada.

A metodologia do RAD seq ainda tem potencial para identificar processos naturais que ocorram em escala microespacial, ou seja, local, como fluxo gênico atual, gargalos de garrafa, expansão populacional e efeitos de barreiras geográficas em escala local na dispersão – e conseqüentemente, no fluxo gênico – de populações geograficamente próximas (McRae, 2006; Manel et al., 2010). Tal abordagem não foi utilizada no presente

estudo porque se faz necessária amostragem de maior número de populações em uma reduzida escala geográfica, e as populações atualmente conhecidas estão muito espaçadas geograficamente; no contexto de *Ctenomys* do Centro-oeste e Norte do Brasil, o complexo de populações NU1/NU2/FN constitui um excelente ponto de partida para futuros estudos de diversidade genética em escala local, desde que novas populações no entorno sejam coletadas e os indivíduos sequenciados utilizando a mesma metodologia desta Tese.

De maneira geral, o Capítulo III cumpre os objetivos propostos, pois amplia o conhecimento sobre e refina os padrões filogenéticos e populacionais observados para as populações estudadas, mesmo com reduzida amostragem, e prova que abordagens genômicas são viáveis e reprodutíveis no contexto dos roedores subterrâneos. Espero que este trabalho abra o caminho para a estrada que leva à Era Genômica dos estudos ecológicos e que sirva de embasamento para futuros estudos comparativos, não somente no gênero *Ctenomys*, mas também entre as diversas famílias de roedores subterrâneos, as quais exibem traços comportamentais, fisiológicos e genéticos únicos e que merecem esforço especial na sua caracterização.

REFERÊNCIAS

CAPÍTULO I

Apfelbaum, L.I., Massarini, A.I., Daleffe, L.E., Reig, O.A., 1991. Genetic variability in the subterranean rodents *Ctenomys australis* and *Ctenomys porteousi* (Rodentia: Octodontidae). *Bio Syst Ecol.* 19(6):467-476. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(91\)90067-A](https://doi.org/10.1016/0305-1978(91)90067-A).

Anderson, S., Yates, T.L., Cook, J.A., 1987. Notes on Bolivian mammals, 4: the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) in the eastern lowlands. *Am Mus Novitates* 2891:1–20
Woods CA, Kilpatrick CW (2005) Infraorder Hystricognathi. Em: Wilson DE, Reeder DM (eds) *Mammal Species of the World*. (3rd ed.). Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 1538–1600.

Andrews, K.R., Good, J.M., Miller, M.R., Luikart, G., Hohenlohe, P.A., 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet.* 17(2):81-92. doi:10.1038/nrg.2015.28

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.

Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.

Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., Johnson, E.A., 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One* 3(10) e3776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>.

Bidau, C.J., Ávila-Pires, F.D., 2009. On the type locality of *Ctenomys bicolor* Miranda Ribeiro, 1914 (Rodentia: Ctenomyidae). *Mastozool neotrop* 16:445–447.

Bidau, C.J., 2015. Family Ctenomyidae. In: Patton, JL, Pardiñas, UFJ, D'Elía G (eds) *Mammals of South America Vol. 2: Rodents*. University of Chicago Press, Chicago Patton JL, Pardiñas UFJ, D'Elía, G., 2015. *Mammals of South America, Vol. 2*. University of Chicago Press, Chicago.

Buffenstein, R., 2000. Ecophysiological Responses to Underground Habitats. Em: Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (eds). *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago and London, 449 pp.

Busch, C., 2000. Population Ecology of Subterranean Rodents. Em: Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (eds). *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago and London, 449 pp.

Castillo, A.H., Cortinas, M.N., Lessa, E.P., 2005. Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *J Mammal* 86:170–179

Cook, J.A., Yates, T.L., 1994. Systematic Relationships of the Bolivian Tuco-tucos, Genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *J Mammal.* 75(3):583-599. <https://doi.org/10.2307/1382506>.

Cutrera, A.P., Lacey, E.A., Busch, C., 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Mol Ecol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02551.x>.

Davey, J.W., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M., Blaxter, M.L., 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12(7): 499–510. <https://doi.org/10.1038/nrg3012>.

D'Elía, G., Lessa, E.P., Cook, J.A., 1999. Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae): evaluation of the mendocinus species group and the evolution of asymmetric sperm. *J Mammal Evol* 6: 19–38

El Jundi, T.A.R.J., de Freitas, T.R.O. 2004. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae). *Hereditas.* 140(1):18-23. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01776.x>.

Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., Mitchell, S.E., 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>.

Fabre, P.H., Hautier, L., Dimitrov, D., Douzery, E.J.P., 2012. A glimpse on the pattern of rodent diversification: a phylogenetic approach. *BMC Evol Biol.* 12:88. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-88>.

Fang, X., Seim, I., Huang, Z., Gerashchenko, M.V., Xiong, Z., Turanov, A.A. et al., 2014. Adaptations to a Subterranean Environment and Longevity Revealed by the Analysis of Mole Rat Genomes. *Cell reports.* 8(5):1354-1364. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.030>.

Fang, X., Nevo, E., Han, L., Levanon, E. Y., Zhao, J., Avivi, A., et al., 2014. Genome-wide adaptive complexes to underground stresses in blind mole rats *Spalax*. *Nat. Comm.* 5(1):3966. <https://www.nature.com/articles/ncomms4966>.

Fernandes, F.A., Gonçalves, G.L., Ximenes, S.S.F., de Freitas, T.R.O., 2009. Karyotypic and molecular polymorphisms in *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae): taxonomic considerations. *Genetica.* 136:449-459. DOI: 10.1007/s10709-008-9345-8.

Fernández-Stolz, G.P., Stolz, J.F.B., Freitas, T.R.O., 2007. Bottlenecks and Dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in Southern Brazil. *J Mammal.* 88(4):935-945. <https://doi.org/10.1644/06-MAMM-A210R1.1>.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-297.

Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2004. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press. Pp. 220.

Freitas, T.R.O., Lessa, E.P., 1984. Cytogenetics and Morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Octodontidae). J Mammal. 65(4):637-642. <https://doi.org/10.2307/1380845>.

Freitas, T.R.O., 1997. Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). Braz J Genet. 20(1). <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-845519970001100001>.

Freitas, T.R.O., Fernandes, F.A., Fornel, R., Roratto, P.A., 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

Freitas, T.R.O., 2016. Family Ctenomyidae. In: Wilson DE, Lacher TE Jr, Mittermeier RA (eds) Handbook of the Mammals of the World: Lagomorphs and Rodents I, Vol. 6. Lynx Editions, Barcelona, pp 499–534.

Gallardo, M.H., Köhler, N., 1992. Genetic Divergence in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from the Andes of Chile. J Mammal. 73(1):99-105. <https://doi.org/10.2307/1381870>.

Gallardo, M.H., Köhler, N., Araneda, C., 1996. Loss of genetic variation in *Ctenomys coyhaiquensis* (Rodentia, Ctenomyidae) affected by volcanism. Mastozool Neotrop. 3(1):7-13.

Gardner, S.L., Salazar-Bravo, J., Cook, J.A., 2014. New species of *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) from the lowlands and central valleys of Bolivia. *Spec Publ Mus Texas Tech Univ.* 62:1-34.

Gava, A., Freitas, T.R.O., 2004. Microsatellite Analysis of a Hybrid Zone Between Chromosomally Divergent Populations of *Ctenomys minutus* from Southern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *J Mammal.* 85(6):1201-1206. <https://doi.org/10.1644/BEL-017.1>.

Gonçalves, G.L., Freitas, T.R.O., 2009. Intraspecific Variation and Genetic Differentiation of the Collared Tuco-Tuco (*Ctenomys torquatus*) in Southern Brazil. *J Mammal.* 90(4):1020-1031.

Gordon, A.J.E., 1997. Microsatellite birth register. *J Mol Evol.* 45:337-338.

Harrington, C.T., Lin, E.I., Olson, M.T., Eshleman, J.R., 2013. Fundamentals of Pyrosequencing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 137(9):1296-1303. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA>.

Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B. (Suppl.)*. 270, S96–S99. DOI 10.1098/rsbl.2003.0025.

Kiblisky, P., Reig, O.A., 1966. Variation in Chromosome Number within the Genus *Ctenomys* and Description of the Male Karyotype of *Ctenomys talarum talarum* Thomas. *Nature*. 212(5060):436-438. doi:10.1038/212436a0.

Kimura, M., 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature*. 217:624-626.

Kingman, J.F.C., 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*. 13(3):235-248.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of the mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Scie USA* 89: 6196-6200.

Lacey, E.A., Maldonado, J.E., Clabaugh, J.P., and Matocq, M.D., 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Mol Ecol*. 8(10); 1754 1756.

Lacey, E.A., 2000. Spatial and Social Systems of Subterranean Rodents. Em: Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (eds). *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago and London, 449 pp.

Lacey, E.A., 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity*. 86, 628-637.

Leipnitz, L.T., Fornel, R., Ribas, L.E.J., Kubiak, B.B., Galiano, D., Freitas, T.R.O., 2018. Lineages of Tuco-Tucos (Ctenomyidae: Rodentia) from Midwest and Northern Brazil: Late Irradiations of Subterranean Rodents Towards the Amazon Forest. *J Mammal Evol.* <https://doi.org/10.1007/s10914-018-9450-0>.

Lessa, E.P., Cook, J.A., 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Mol Phylogenet Evol* 9 (1):88–99

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 11 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/251364>.

Lopes, C.M., Ximenes, S.S.F., Gava, A., Freitas, T.R.O., 2013. The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity* 111:293– 305. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.49>.

Luikart, G., England, P.R., Tallmon, D., Jordan, S., Taberlet, P., 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Rev Genetics.* 4:981-994.

Mapelli, F.J., Mora, M.S., Mirol, P.M., Kittlein, M.J. 2012. Population structure and landscape genetics in the endangered subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. *Conserv Genet.* 13:165-181. DOI 10.1007/s10592-011-0273-2

Marshall, L.G., Sempere, T., 1993. Evolution of the Neotropical Cenozoic land mammal fauna in its geochronologic, stratigraphic, and tectonic context. In: Goldblatt P (ed) Biological Relationships Between Africa and South America. Yale University Press, New Haven, pp 329–392.

Mascheretti S, Mirol P, GimenezM, Bidau C, Contreras J, Searle J., 2000. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome b sequences. Biol J Linn Soc 70:361–376.

Massarini, A.I., Barros, M.A., Ortells, M.O., Reig, O.A., 1991. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). Genetica. 83(2):131-144. doi: 10.1007/bf00058530.

Mora, M.S., Mapelli, F.J., Gaggiotti, O.E., Kittlein, M.J., Lessa, E.P., 2010. Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. BMC Genetics. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-9>.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, R., Erlich, H., 1986. Specific Enzyme Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chian Reaction. *Symposia on Quantitative Biology*, 51(0), 263-273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032.

National Institute of Health., 2016. Disponible em:
<https://www.genome.gov/27565109/the-cost-of-sequencing-a-human-genome/>

Neigel, J.E., Avise, J.C., 1987. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: Nevo E, Karlin S (eds) *Evolutionary Processes and Theory*. Academic Press, New York, pp 515–534.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398760-0.50026-2>.

Nevo, E., 1979. Adaptive Convergence and Divergence of Subterranean Mammals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10:269-308. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.10.110179.001413>.

Ojeda, A.A., Novillo, A., Ojeda, R.A., Roig-Juñent, S., 2013. Geographical distribution and ecological diversification of South American octodontid rodents. 289 (2013) 285–293. doi:10.1111/jzo.12008.

Ortells, M.O., Contreras, J.R., Reig, O.A., 1990. New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia, Octodontidae) from north-eastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. *Genetica.* 82(3):189-201. doi:10.1007/bf00056362.

Ortells, M.O., 1995. Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. *Biol J of the Linnean Society.* 54(1):43-70. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1995.tb01022.x>.

Parada, A., D'Elía, G., Bidau, C.J., Lessa, E.P., 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *J Mammal.* 92(3):671–682.

Reig, O.A., Kiblicky, P., 1969. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Chromosoma.* 28(2):211-244.

Reig, O.A., 1989. Karyotypic Repatterning as One Triggering Factor in Cases of Explosive Speciation. *Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations.* Pp 246-289.

Reig, O.A., Busch, C., Ortells, M.O., Contreras, J.R., 1990. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. Em: Nevo, E., Reig, O.A. (eds). *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels.* Wiley- Liss, New York, pp 71–96.

Rossi, M.S., Redi, C.A., Viale, G., Massarini, I.A., Capanna, E., 1995. Chromosomal distribution of the major satellite DNA of South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Cytogenet Cell Genet.* 69:179-184. <https://doi.org/10.1159/000133956>.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 74(12):5463-5467.

Schlötterer, C., Pemberton, J., 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. pp 71-86.

Slamovits, C.H., Cook, J.A., Lessa, E.P., Rossi, M.S., 2001. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Mol Biol Evol* 18:1708–1719.

Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236(4803):787-792. DOI: 10.1126/science.3576198.

Smith, M.F., Patton, J.L., 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *J Mammal Evol* 6(2): 89–128 S.

Stein, B.R., 2000. Morphology of Subterranean Rodents. Em: Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (eds). *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago and London, 449 pp.

Stolz, J.F.B., Gonçalves, G.L., Leipnitz, L., Freitas, T.R.O., 2013. DNA-based and geometric morphometric analysis to validate species designation: a case study of the subterranean rodent *Ctenomys bicolor*. *Genet Mol Res*. 12(4): 5023-5037.

Sunnucks, P., 2000. Efficient markers for population biology. *TREE*. 15(5):199-203.

Taylor, J.S., Durkin, J.M.H., Breden, F., 1999. The Death of a Microsatellite: A Phylogenetic Perspective on Microsatellite Interruptions. *Mol Biol Evol.* 16(4):567-572.

Tomasco, I.H., Lessa, E.P., 2007. Phylogeography of the Tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. The quintessential naturalist. Honoring life and legacy of Oliver P. Pearson (ed. by D.A. Kelt, E.P. Lessa, J. Salazar-Bravo and J.L. Patton). University of California Publications, Berkeley. pp. 859-882.

Tomasco, I.H., Lessa, E.P., 2011. The evolution of mitochondrial genomes in subterranean caviomorph rodents: adaptation against a background of purifying selection. *Mol Phylogenet Evol.* 61(1):64-70. doi: 10.1016/j.ympev.2011.06.014.

Upham, N.S., Patterson, B.D., 2012. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystrichognathi). *Mol Phylogenet Evol* 60-2: 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.01.020>

Van Orsouw, N.J., Hoger, R.C.J., Janssen, A., Ylacin, F., Snoeijers, S., Verstege, E. et al., 2007. Complexity Reduction of Polymorphic Sequences (CRoPS™): A Novel Approach for Large-Scale Polymorphism Discovery in Complex Genomes. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001172>.

Van Tassel, C.P., Smith, T.P.L., Matukumalli, L.K., Taylor, J.F, Schnabel, R.D., Lawley, C.T., et al., 2008. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of

reduced representation libraries. *Nature Methods*. 5(3):247-252.
doi:10.1038/nmeth.1185.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., et al., 2001. The Sequence of the Human Genome. 291(5507):1304-1351. DOI: 10.1126/science.1058040.

Verzi, D.H., Olivares, A.I., Morgan, C.C., 2009. The oldest South American tuco-tuco (late Pliocene, northwestern Argentina) and the boundaries of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammal Biol* 75:243–252.

Vucetich, M.G., Verzi, D.H., Hartenberger, J.L., 1999. Review and analysis of the radiation of the South American Hystricognathi (Mammalia, Rodentia). *Paleontology* 329:763–769.

Wlasiuk, G., Garza, J.C., Lessa, E.P., 2003. Genetic and geographic differentiation in the rio negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution*. 57(4):913-926. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00302.x>.

CAPÍTULO IV

Borges, L.R., Maestri, R., Kubiak, B.B., Galiano, D., Fornel, R., Freitas, T.R.O. 2017. The role of soil features in shaping the bite force and related skull and mandible morphology in the subterranean rodents of genus *Ctenomys* (Hystricognathi: Ctenomyidae). *J Zool* 301:108–117. <https://doi.org/10.1111/jzo.12398>.

Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ (2014) BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLoS Comput Biol 10(4): e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.

Bryant, D., Bouckaert, R., Felsenstein, J., Rosenberg, N.A., RoyChoudhury, A., 2012. Inferring species trees directly from biallelic genetic markers: bypassing gene trees in a full coalescent analysis. Mol Biol Evol. 29(8):1917-1932. doi: 10.1093/molbev/mss086.

Cariou, M., Duret, L., Charlat, S., 2013. Is RAD-seq suitable for phylogenetic inference? An in silico assessment and optimization. Ecol Evol. 3(4): 846–852. doi: 10.1002/ece3.512.

Herrera, S., Shank, T.M., 2016. RAD sequencing enables unprecedented phylogenetic resolution and objective species delimitation in recalcitrant divergent taxa. Mol Phyl Evol. 100:70-79. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.010>.

Jones, J.C., Fan, S., Franchini, P., Scharl, M., Meyer, A., 2013. The evolutionary history of *Xiphophorus* fish and their sexually selected sword: a genome-wide approach using restriction site-associated DNA sequencing. Mol Ecol. 22, 2986-3001. Doi: 10.1111/mec.12269.

Kemppainen, P., Knight, C.G., Sarma, D.K., Hlaing, T., Prakash, A., Maung Maung, Y.N., Somboon, P., Mahanta, J., Walton, C., 2015. Linkage disequilibrium network analysis

(LDna) gives a global view of chromosomal inversions, local adaption and geographic structure. *Mol Ecol Resour.* 15(5):1031-45. doi: 10.1111/1755-0998.12369

Kibliskey, P., Reig, O.A., 1966. Variation in Chromosome Number within the Genus *Ctenomys* and Description of the Male Karyotype of *Ctenomys talarum talarum* Thomas. *Nature.* 212(5060):436-438. doi:10.1038/212436a0.

Leipnitz, L.T., Fornel, R., Ribas, L.E.J., Kubiak, B.B., Galiano, D., Freitas, T.R.O., 2018. Lineages of Tuco-Tucos (Ctenomyidae: Rodentia) from Midwest and Northern Brazil: Late Irradiations of Subterranean Rodents Towards the Amazon Forest. *J Mammal Evol.* <https://doi.org/10.1007/s10914-018-9450-0>.

Lessa, E.P., Cook, J.A., 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Mol Phylogenet Evol* 9 (1):88–99

Maestri, R., Fornel, R., Gonçalves, G.L., Geise, L., Freitas, T.R.O., Carnaval, A.C. 2016. Predictors of intraspecific morphological variability in a tropical hotspot: comparing the influence of random and non-random factors. *J Biogeogr* 43:2160–2172.

Mallo, D., Posada, D., 2016. Multilocus inference of species trees and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 371:20150335. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0335>.

Manel, S., Joost, S., Epperson, B.K., Holderegger, R., Storfer, A., Rosenberg, M.S., Scribner, K.T., Bonin, A., Fortin, M. 2010. Perspectives on the use of landscape genetics to detect genetic adaptive variation in the field. *Mol Ecol.* 19(17):3760-3772

Manthey, J.D., Moyle, R.G., 2015. Isolation by environment in White-breasted Nuthatches (*Sitta carolinensis*) of the Madrean Archipelago sky islands: a landscape genomics approach. *Mol Ecol.* 24(14):3628-2638. <https://doi.org/10.1111/mec.13258>

Marcy, A.E., Hadly, E.A., Sherratt, E., Garland, K., Weisbecker, V. 2016. Getting a head in hard soils: convergent skull evolution and divergent allometric patterns explain shape variation in a highly diverse genus of pocket gophers (*Thomomys*). *BMC Evol Biol* 16:207. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0782-1>.

McRae, B.H. 2006. Isolation by resistance. *Evolution.* 60(8):1551-1561. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb00500.x>

Parada, A., D'Elia, G., Bidau, C.J., Lessa, E.P., 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *J Mammal.* 92(3):671–682.

Reig, O.A., Kiblicky, P., 1969. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Chromosoma.* 28(2):211-244.

Samuels, J.X. 2009. Cranial morphology and dietary habits of rodents. *Zool J Linn Soc* 156:864–888.

Scornavacca, C., Galtier, N., 2017. Incomplete Lineage Sorting in Mammalian Phylogenomics. *Sys Bio.* 66:1, 112-120. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw082>.

Stolz, J.F.B., Gonçalves, G.L., Leipnitz, L., Freitas, T.R.O., 2013. DNA-based and geometric morphometric analysis to validate species designation: a case study of the subterranean rodent *Ctenomys bicolor*. *Genet Mol Res.* 12(4): 5023-5037.

Lessa, E.P., Cook, J.A., D'Elia, G., Opazo, J.C. 2014. Rodent diversity in South America: transitioning into the genomics era. *Front. Ecol. Evol.* doi.org/10.3389/fevo.2014.00039.

Wlasiuk, G., Garza, J.C., Lessa, E.P., 2003. Genetic and geographic differentiation in the rio negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution.* 57(4):913-926. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00302.x>

ANEXOS – ARTIGO I – TABELAS SUPLEMENTARES

Table S1: Cytochrome b sequences used in phylogenetic analyses as downloaded from GenBank. Columns from left to right: species for each sequence, accession number and reference study. Species names are as presented at the NCBI's accession number page.

Species	Accession number	Reference study
<i>Ctenomys andersoni</i>	AF007047	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys argentinus</i>	AF370680	Slamovitz <i>et al.</i> , 2001
<i>Ctenomys australis</i>	AF370697	Slamovitz <i>et al.</i> , 2001
<i>Ctenomys boliviensis</i>	AF007037	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys boliviensis</i>	AF007038	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys boliviensis</i>	AF007039	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys boliviensis</i>	AF007040	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys boliviensis</i>	KJ778554	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>Ctenomys colburni</i>	HM777474	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys conoveri</i>	AF007055	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys coyhaiquensis</i>	AF119112	D'Élia <i>et al.</i> , 1999
<i>Ctenomys dorbignyi</i>	JQ389030	Freitas <i>et al.</i> , 2012
<i>Ctenomys erikacuellarae</i>	KJ778555	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>Ctenomys erikacuellarae</i>	KJ778556	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>Ctenomys erikacuellarae</i>	KJ778557	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>Ctenomys flamarioni</i>	AF119107	D'Élia <i>et al.</i> , 1999
<i>Ctenomys fodax</i>	HM777475	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys frater</i>	AF007045	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys frater</i>	AF007046	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys frater</i>	KJ778558	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>Ctenomys fulvus</i>	AF370688	Slamovitz <i>et al.</i> , 2001
<i>Ctenomys goodfellowi</i>	AF007050	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys goodfellowi</i>	AF007051	Lessa & Cook, 1998

<i>Ctenomys haigi</i>	HM777476	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys ibicuiensis</i>	JQ389020	Freitas <i>et al.</i> , 2012
<i>Ctenomys lami</i>	HM777477	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys latro</i>	HM777478	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys lessai</i>	AF007048	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>Ctenomys leucodon</i>	AF007056	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys lewisi</i>	AF007049	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys magellanicus</i>	HM777479	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys maulinus</i>	AF370703	Slamovitz <i>et al.</i> , 2001
<i>Ctenomys mendocinus</i>	HM777480	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys minutus</i>	HM777481	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys minutus</i>	HM777482	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys minutus</i>	HM777483	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys nattereri</i>	HM777484	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys occultus</i>	HM777485	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys opimus</i>	AF007041	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys opimus</i>	AF007042	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys pearsoni</i>	HM777486	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys perrensi</i>	HM777487	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys perrensi</i>	HM777488	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys perrensi</i>	HM777489	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys porteousi</i>	AF370682	Slamovitz <i>et al.</i> , 2001
<i>Ctenomys pundti</i>	HM777490	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys pundti</i>	HM777491	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys rionegrensis</i>	AF119114	D'Élia <i>et al.</i> , 1999
<i>Ctenomys roigi</i>	HM777492	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys saltarius</i>	HM777493	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys scagliai</i>	HM777494	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys sericeus</i>	HM777496	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys sociabilis</i>	HM777495	Parada <i>et al.</i> , 2011

<i>Ctenomys steinbachi</i>	AF007043	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys steinbachi</i>	AF007044	Lessa & Cook, 1998
<i>Ctenomys talarum</i>	HM777497	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys talarum</i>	HM777498	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys torquatus</i>	EF372287	Gonçalves & Freitas, 2009
<i>Ctenomys tuconax</i>	AF370693	Slamovitz <i>et al.</i> , 2001
<i>Ctenomys tucumanus</i>	HM777499	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys yatesi</i>	AF007052	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>Ctenomys yatesi</i>	AF007053	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>Ctenomys sp.</i>	HM777500	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys sp.</i>	HM777501	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys sp.</i>	HM777502	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys sp.</i>	HM777503	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys sp.</i>	HM777504	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys sp.</i>	HM777505	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Ctenomys sp.</i>	HM777506	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>Octodon degus</i>	AF007058	Lessa & Cook, 1998
<i>Spalacopus cyanus</i>	AF007061	Lessa & Cook, 1998

Table S2: 18 *Cytochrome b* sequences representative of 92 individuals sampled in Midwest and Northern Brazil, sampling sites haplotype number, collection registry at Departamento de Genética and GenBank accession numbers. ^a unique haplotypes used in the molecular analysis. ^b sequences not used in the molecular analysis given their redundancy.

Individual	Sampling sites	Haplotype	Collection registry	Acession numbers
PL_01_01	Pontes e Lacerda	H1 ^a	TR1424	MG065617
PL_02_02	Pontes e Lacerda	H2 ^a	TR1425	MG065618
PL_05_05	Pontes e Lacerda	H3 ^a	TR1428	MG065619
PL_06_14	Pontes e Lacerda	H4 ^a	TR1437	MG065620
SP_02_75	Sapezal	H4 ^b	TR1869	MG065621
CA_01_06	Cáceres	H5 ^a	TR1429	MG065622
SP_01_74	Sapezal	H6 ^a	TR1868	MG065623
NO_01_19	Nova Olímpia	H7 ^a	TR1442	MG065624
NO_02_20	Nova Olímpia	H8 ^a	TR1443	MG065625
NU1_01_31	Nova Ubiratã 1	H9 ^a	TR1453	MG065626
NU1_02_32	Nova Ubiratã 1	H10 ^a	TR1454	MG065627
NU2_01_52	Nova Ubiratã 2	H10 ^b	TR1474	MG065628
FN_02_66	Feliz Natal	H10 ^b	TR1830	MG065629
PB_01_40	Pimenta Bueno	H11 ^a	TR1819	MG065630
FN_01_65	Feliz Natal	H12 ^a	TR1829	MG065631
FN_03_67	Feliz Natal	H13 ^a	TR1831	MG065632
NM_01_81	Nova Mutum	H14 ^a	TR1875	MG065633
TS_01_92	Tangará da Serra	H15 ^a	TR2819	MG065634

Table S3: Sampling sites IDs and Collection registry for skulls (n = 67) used in geometric morphometry analysis. Individuals labeled with a "*" are still to receive a collection registry number.

Individual	Population	Collection registry
PL_02_02	Pontes e Lacerda	TR1425
PL_03_03	Pontes e Lacerda	TR1426
PL_04_04	Pontes e Lacerda	TR1427

PL_05_05	Pontes e Lacerda	TR1428
PL_06_14	Pontes e Lacerda	TR1437
PL_07_15	Pontes e Lacerda	TR1438
PL_08_16	Pontes e Lacerda	TR1439
PL_09_17	Pontes e Lacerda	TR1440
PL_10_18	Pontes e Lacerda	TR1441
CA_01_06	Cáceres	TR1429
CA_02_07	Cáceres	TR1430
CA_03_08	Cáceres	TR1431
CA_04_09	Cáceres	TR1432
CA_05_10	Cáceres	TR1433
CA_06_11	Cáceres	TR1434
CA_07_12	Cáceres	TR1435
CA_08_13	Cáceres	TR1436
CA_10_24	Cáceres	TR1447
SP_02_78	Sapezal	TR1869
SP_04_80	Sapezal	TR1871
SP_05_81	Sapezal	TR1872
SP_06_82	Sapezal	TR1873
NO_01_19	Nova Olímpia	TR1442
NO_02_20	Nova Olímpia	TR1443
NO_03_21	Nova Olímpia	TR1444
NO_07_27	Nova Olímpia	TR1449
NO_08_28	Nova Olímpia	TR1450
NO_10_30	Nova Olímpia	TR1452
NU1_01_31	Nova Ubiratã 1	TR1453
NU1_02_32	Nova Ubiratã 1	TR1454
NU1_03_33	Nova Ubiratã 1	TR1455
NU1_05_35	Nova Ubiratã 1	TR1457
NU1_06_36	Nova Ubiratã 1	TR1458

NU1_07_37	Nova Ubiratã 1	TR1459
NU1_08_38	Nova Ubiratã 1	TR1460
NU1_09_39	Nova Ubiratã 1	TR1461
NU2_02_53	Nova Ubiratã 2	TR1475
NU2_04_55	Nova Ubiratã 2	TR1477
NU2_05_56	Nova Ubiratã 2	TR1478
NU2_06_57	Nova Ubiratã 2	TR1479
NU2_11_62	Nova Ubiratã 2	TR1484
NU2_12_63	Nova Ubiratã 2	TR1485
NU2_12_63	Nova Ubiratã 2	TR1485*
FN_01_65	Feliz Natal	TR1832
FN_06_70	Feliz Natal	TR1837
FN_07_71	Feliz Natal	TR1838
FN_09_73	Feliz Natal	TR1840
FN_09_73*	Feliz Natal	TR1840*
NM_01_80	Nova Mutum	TR1875
NM_03_82	Nova Mutum	TR1877
NM_04_83	Nova Mutum	TR1878
NM_05_84	Nova Mutum	TR1879
NM_06_85	Nova Mutum	TR1880
NM_08_87	Nova Mutum	TR1882
NM_09_88	Nova Mutum	TR1883
NM_09_88*	Nova Mutum	TR1883*
NM_10_89	Nova Mutum	TR1884
NM_11_90	Nova Mutum	TR1885
PB_01_40	Pimenta Bueno	TR1462
PB_02_41	Pimenta Bueno	TR1463
PB_03_42	Pimenta Bueno	TR1464
PB_04_43	Pimenta Bueno	TR1465

PB_05_44	Pimenta Bueno	TR1466
PB_06_45	Pimenta Bueno	TR1467
PB_07_46	Pimenta Bueno	TR1468
PB_09_48	Pimenta Bueno	TR1470
PB_10_49	Pimenta Bueno	TR1471

Table S3: Sampling sites IDs and Collection registry for skulls (n = 67) used in geometric morphometry analysis. Individuals labeled with a "*" are still to receive a collection registry number.

Individual	Population	Collection registry
PL_02_02	Pontes e Lacerda	TR1425
PL_03_03	Pontes e Lacerda	TR1426
PL_04_04	Pontes e Lacerda	TR1427
PL_05_05	Pontes e Lacerda	TR1428
PL_06_14	Pontes e Lacerda	TR1437
PL_07_15	Pontes e Lacerda	TR1438
PL_08_16	Pontes e Lacerda	TR1439
PL_09_17	Pontes e Lacerda	TR1440
PL_10_18	Pontes e Lacerda	TR1441
CA_01_06	Cáceres	TR1429
CA_02_07	Cáceres	TR1430
CA_03_08	Cáceres	TR1431
CA_04_09	Cáceres	TR1432
CA_05_10	Cáceres	TR1433
CA_06_11	Cáceres	TR1434
CA_07_12	Cáceres	TR1435
CA_08_13	Cáceres	TR1436
CA_10_24	Cáceres	TR1447
SP_02_78	Sapezal	TR1869
SP_04_80	Sapezal	TR1871
SP_05_81	Sapezal	TR1872
SP_06_82	Sapezal	TR1873
NO_01_19	Nova Olímpia	TR1442
NO_02_20	Nova Olímpia	TR1443
NO_03_21	Nova Olímpia	TR1444
NO_07_27	Nova Olímpia	TR1449
NO_08_28	Nova Olímpia	TR1450
NO_10_30	Nova Olímpia	TR1452
NU1_01_31	Nova Ubiratã 1	TR1453
NU1_02_32	Nova Ubiratã 1	TR1454
NU1_03_33	Nova Ubiratã 1	TR1455
NU1_05_35	Nova Ubiratã 1	TR1457
NU1_06_36	Nova Ubiratã 1	TR1458
NU1_07_37	Nova Ubiratã 1	TR1459
NU1_08_38	Nova Ubiratã 1	TR1460
NU1_09_39	Nova Ubiratã 1	TR1461
NU2_02_53	Nova Ubiratã 2	TR1475
NU2_04_55	Nova Ubiratã 2	TR1477
NU2_05_56	Nova Ubiratã 2	TR1478
NU2_06_57	Nova Ubiratã 2	TR1479
NU2_11_62	Nova Ubiratã 2	TR1484
NU2_12_63	Nova Ubiratã 2	TR1485
NU2_12_63	Nova Ubiratã 2	TR1485*
FN_01_65	Feliz Natal	TR1832
FN_06_70	Feliz Natal	TR1837
FN_07_71	Feliz Natal	TR1838

FN_09_73	Feliz Natal	TR1840
FN_09_73*	Feliz Natal	TR1840*
NM_01_80	Nova Mutum	TR1875
NM_03_82	Nova Mutum	TR1877
NM_04_83	Nova Mutum	TR1878
NM_05_84	Nova Mutum	TR1879
NM_06_85	Nova Mutum	TR1880
NM_08_87	Nova Mutum	TR1882
NM_09_88	Nova Mutum	TR1883
NM_09_88*	Nova Mutum	TR1883*
NM_10_89	Nova Mutum	TR1884
NM_11_90	Nova Mutum	TR1885
PB_01_40	Pimenta Bueno	TR1462
PB_02_41	Pimenta Bueno	TR1463
PB_03_42	Pimenta Bueno	TR1464
PB_04_43	Pimenta Bueno	TR1465
PB_05_44	Pimenta Bueno	TR1466
PB_06_45	Pimenta Bueno	TR1467
PB_07_46	Pimenta Bueno	TR1468
PB_09_48	Pimenta Bueno	TR1470
PB_10_49	Pimenta Bueno	TR1471

Table S4. Pairwise multivariate analysis of variance (AMOVA) for skull shape among nine **localities** for *Ctenomys* from the Midwest and Northern Brazil. P-values for variance of skull shape for each view for a given pairwise comparison are separated by a slash; values are ordered by dorsal, ventral and lateral views, respectively. Bold values indicate non-significant differences in skull shape ($P < 0.05$). PL, Pontes e Lacerda; CA, Cáceres; SP, Sapezal; NO, Nova Olímpia; NU1, Nova Ubiratã 1; NU2, Nova Ubiratã 2; FN, Feliz Natal; PB, Pimenta Bueno; NM, Nova Mutum.

	CA	FN	NM	NO	NU1	NU2	PB	PL	SP
CA	-								
FN	0.006/0.015/0.044	-							
NM	0.008/ 0.060 /0.019	0.095 /0.027/ 0.171	-						
NO	0.001/0.001/0.005	0.002/0.008/0.006	0.001/0.003/0.002	-					
NU1	0.016/0.017/ 0.061	0.351/0.502/0.350	0.006/0.001/ 0.117	0.009/0.009/0.042	-				
NU2	0.001/0.008/0.001	0.001/0.036/0.005	0.006/0.017/0.001	0.001/0.020/0.001	0.005/0.032/0.001	-			
PB	0.001/0.002/0.001	0.002/0.006/0.012	0.001/0.007/0.001	0.004/0.003/0.001	0.002/0.002/0.001	0.005/0.034/0.002	-		
PL	0.034/0.003/0.009	0.072 /0.017/ 0.271	0.271 /0.005/0.040	0.001/0.012/0.006	0.016/0.010/0.032	0.001/0.007/0.001	0.001/0.004/0.001	-	
SP	0.067 /0.002/0.012	0.015/0.004/ 0.067	0.001/0.001/0.003	0.001/0.001/0.001	0.028/0.008/ 0.066	0.001/0.001/0.004	0.001/0.001/0.002	0.015/0.002/0.005	-

ANEXOS – ARTIGO I – FIGURAS COMPLEMENTARES

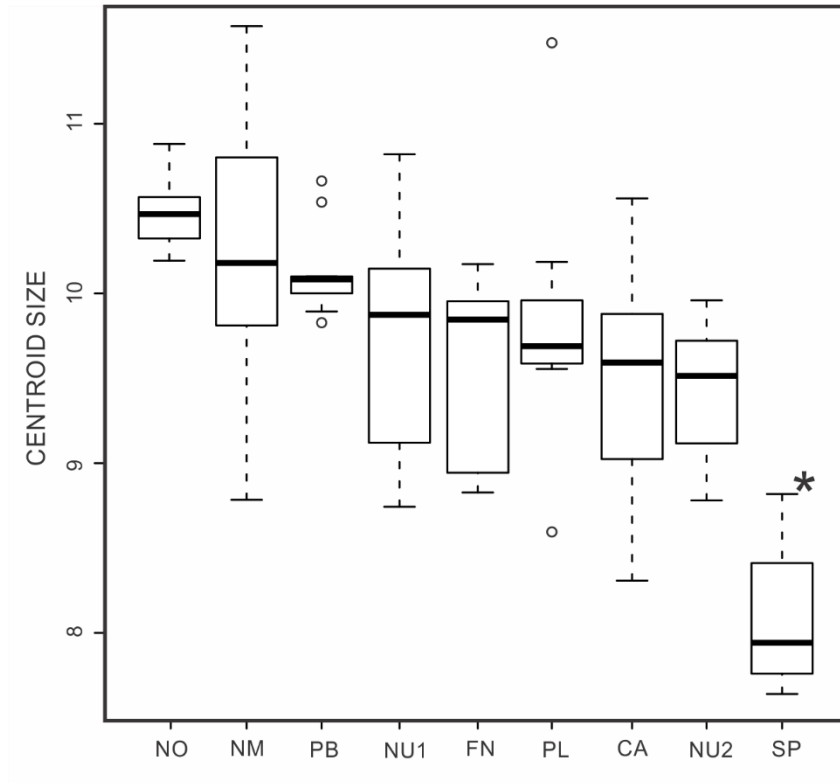


Figure S1. Box plot of skull centroid size variation among nine *Ctenomys* localities from Midwest Brazil for the mean of the sum of three views of the skull, dorsal, ventral, and lateral. The horizontal line represents the median, box margins are at the 25th and 75th percentiles, bars extend to 5th and 95th percentiles, and circles are outliers. Asterisk above boxes represent significant differences among localities for Tukey's multiple comparison tests at the 5% level.

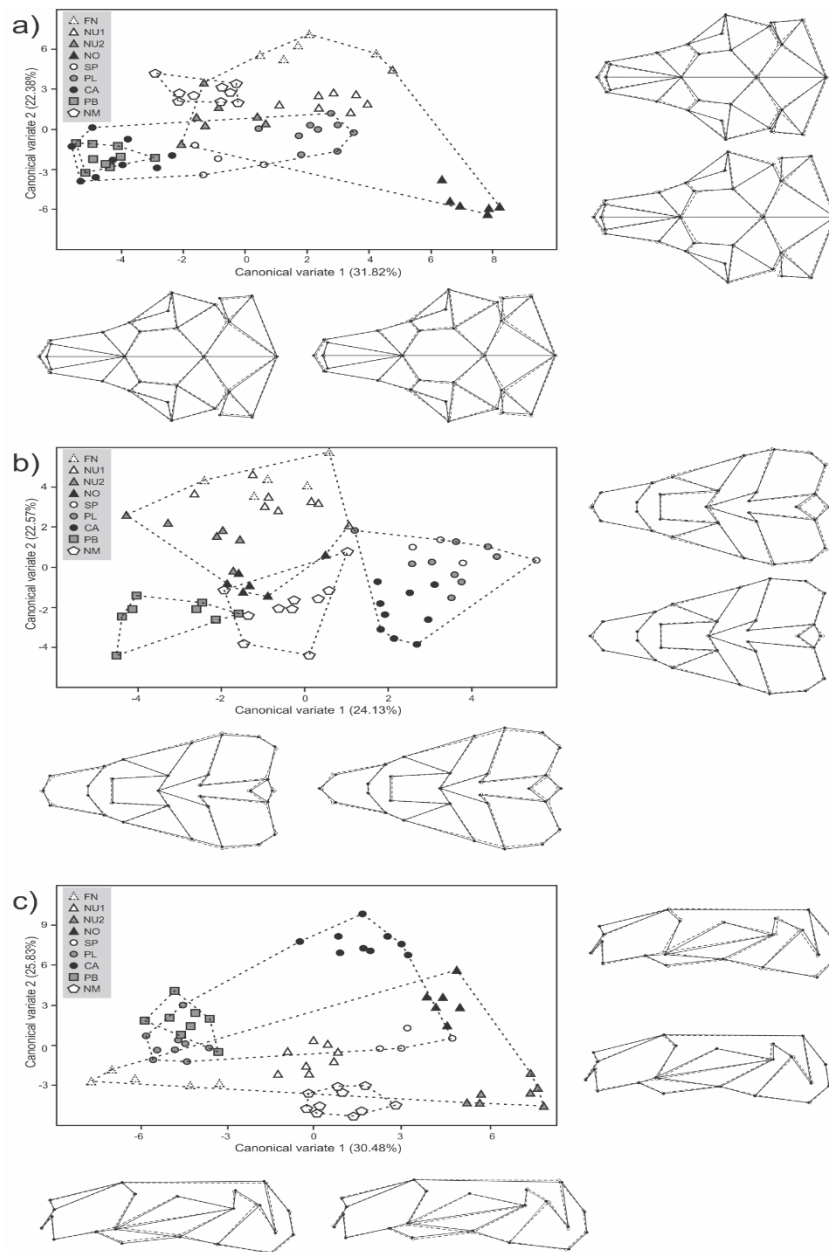


Figure S2. Canonical Variance Analysis for **localities** of *Ctenomys* from Midwest and Northern Brazil for (a) dorsal, (b) ventral and (c) lateral views, and its associated wireframes. PL, Pontes e Lacerda; CA, Cáceres; SP, Sapezal; NO, Nova Olímpia; NU1, Nova Ubiratã 1; NU2, Nova Ubiratã 2; FN, Feliz Natal; PB, Pimenta Bueno; NM, Nova Mutum. Dashed lines represent the maximum variance for skull shape between **localities** belonging each molecular clade (Western, Eastern and Central). For each wireframe,

black lines represent the maximum and minimum variance for skull shape and the grey lines represent the mean shape.