

**ANÁLISE DE DUAS BARREIRAS AO FLUXO GÊNICO
ENTRE POPULAÇÕES DE *Ctenomys minutus*
(RODENTIA-CTENOMYIDAE) DA PLANÍCIE
COSTEIRA
DO SUL DO BRASIL**

LIGIA TCHAICKA

**PORTO ALEGRE
SETEMBRO DE 2002**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DE DUAS POSSÍVEIS BARREIRAS AO FLUXO
GÊNICO ENTRE POPULAÇÕES DE *Ctenomys minutus*
(RODENTIA-CTENOMYIDAE) DA PLANÍCIE COSTEIRA DO
SUL DO BRASIL

LIGIA TCHAICKA

PROF. ORIENTADOR: THALES RENATO DE FREITAS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM
GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

PORTO ALEGRE
SETEMBRO DE 2002

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado por: Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), World Wildlife Foundation (WWF) e United States Agency for International Development (USAID).

Dizem que se não fosse por Terr-Werr, o tuco-tuco, não existiriam os tehuelches. E é verdade porque foi ele quem ocultou Elal recém-nascido em sua cova salvando o bebê do pai que o perseguia para matar... depois convocou as aves para que o levassem para longe, e Elal se tornou o herói que mais tarde criou os homens da Patagônia...

Lenda do povo Tehuelches

*Aos meus pais, Arilda e Natalio,
com todo amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Thales, pela oportunidade de trabalho, orientação, confiança e paciência, e por me apresentar ao “fascinante mundo dos tuco-tucos”.

A todos os companheiros das coletas: Míriam (um obrigado especial pela parceria!), Vanina (obrigado pela ajuda antecipada!), Juliana, Thales, Carlos, Cris, Gabi, Charlis, Gleo, Jorge, Camila; e tantos outros que dedicarem seu tempo aos trabalhos de campo. Pelo auxílio imprescindível, prestado sempre com empenho (ignorando o cansaço) e por todo o cuidado com os tucos.

Ao Sr. Zeferino Amaral, Sr. Belmiro Weber, à direção da Fazenda Maribo e à Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Torres, por gentilmente permitirem a utilização das áreas de coleta.

Aos professores do Departamento de Genética por sua contribuição à minha formação.

A Elmo, Helen, Lucia Andréa, Rose e Luciano, por toda a ajuda cotidiana e pelas divertidas conversas.

À Capes, CNPq e WWF pelo apoio financeiro.

A toda a galera do laboratório: Adriana Gava, Ana Lupe, Camila Castilhos, Cristina Freygang, Cristine, Daniel Prá, Elise Giacomoni, Gabriela Fernandez, Gislene Gonçalves, Juliana da Silva, Juliano Coelho, Leandro Jeruzalinski, Lucas Klasman, Lidiane, Priscila Farinha, Pedro Fruet, Tanise, Tatiane Trigo, Tarik El Jundi, Thaís, Thaísa, Vanessa Andrade, Vanessa, Vanina Heuser; pela alegre convivência,

pelos cafés, risadas, incentivos (em todas as áreas!)... por todas as pequenas-grandes coisas que tornam a vida melhor.

À Adriana, Tatiane, Elise, Tarik e Gabriela, pela paciência em me ajudar com as técnicas e estarem sempre dispostos a discussão dos métodos e resultados.

Aos novos amigos (destes últimos dois anos), aos que transformaram a convivência em amizade e assim tornaram-se parte de meu mundo.

A todos os velhos amigos que continuaram torcendo por mim e me incentivando a distância.

Ao Charlis, Gleomar, Andréia e Sara, além de amigos "parceiros" desse percurso. Por encararem com o mesmo companheirismo as diversões (que não foram tantas quanto gostaríamos), uma viagem, uma coleta, as tarefas do dia-a-dia, um almoço de domingo ou às minhas chatas e constantes reclamações. Pelo apoio e especialmente por toda a alegria que acrescentaram aos meus dias.

Aos meus pais Natalio e Arilda e ao meu irmão Cleber, mesmo distantes sempre tão presentes. Pela força de todas as horas, pelo amor incondicional que construiu e mantém a pessoa que sou.

A toda minha família, pelo carinho e apoio.

A Deus, por tudo.

APOIO FINANCEIRO



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Os Roedores e o Ambiente Subterrâneo.....	01
1.2. O Gênero <i>Ctenomys</i>	02
1.3 A Estrutura das Populações.....	04
1.3.1 A Distribuição das Populações e o Fluxo Gênico.....	04
1.3.2 Fatores Envolvidos na Determinação do Fluxo Gênico entre as Populações.....	06
1.3.3 Os Marcadores Moleculares no Estudo das Populações..	08
1.3.4 Análises Moleculares no Estudo de Populações do Gênero <i>Ctenomys</i>	09
1.4 As Espécies de <i>Ctenomys</i> do Rio Grande do Sul.....	12
1.4.1 <i>Ctenomys minutus</i> Nehring, 1887.....	14
1.5 A História da Planície Costeira e a Evolução de <i>Ctenomys</i> <i>minutus</i>	15
1.5.1 Antigas Barreiras Geográficas.....	15
1.5.2 O Panorama Atual: Barreiras Recentes.....	18
1.6 O Impacto das Estradas sobre as Populações.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Área de Estudo.....	23
3.2 Amostragem.....	27
3.3 Estudo Molecular.....	28
3.3.1 Extração de DNA.....	28
3.3.2 Determinação dos Alelos dos Microssatélites.....	28
3.3.3 Análise de Dados.....	29
4.RESULTADOS.....	31
4.1 Amostragem.....	31
4.2 Análise Molecular.....	31

4.2.1 Características dos <i>Loci</i> Analisados.....	31
4.2.2 Estrutura Populacional.....	38
5.DISSCUSSÃO.....	42
5.1 Características dos <i>Loci</i> Analisados e das Populações como Unidades Distintas.....	42
5.2 Estruturação entre as Populações.....	45
5.3 Isolamento, Fluxo Gênico e Efetividade das Barreiras.....	47
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	50
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1.INTRODUÇÃO

1.1 Os Roedores e o Ambiente Subterrâneo

Os roedores constituem a ordem mais diversificada da fauna atual de mamíferos (NOWAK, 1999) e a mais abundante na Região Neotropical (REIG, 1981). Sua distribuição é praticamente cosmopolita, com exceção da Antártica, podem ser encontrados atualmente em todos os continentes. São habitantes nativos da Austrália e Nova Guiné e, introduzidos pelo homem, invadiram as demais ilhas oceânicas (NOWAK, 1999).

O uso do habitat por estes animais é extremamente variado. Seus representantes são terrestres, arbóreos, semi-aquáticos, ou subterrâneos (NOWAK, 1999). A ocupação deste último ambiente, tido como simples, estável e previsível (NEVO, 1979), deu origem a um fascinante grupo de espécies possuidoras de adaptações muito peculiares.

Como definição, animais subterrâneos são aqueles de hábito fossorial, que passam a maior parte de sua vida no interior de túneis fechados (NEVO, 1979; LACEY e cols., 2000). A grande maioria destes roedores ocorre em áreas abertas como savanas e estepes, preferindo regiões de solo não alagável e não sujeito ao congelamento, podendo ser encontrados em todos os continentes com exceção da Austrália (LACEY e cols., 2000).

As adaptações associadas à ocupação do nicho subterrâneo deram origem ao processo de convergência que assemelhou morfológica e ecologicamente as espécies de roedores subterrâneos (NEVO, 1979; LACEY e cols.,2000). Atualmente este modo de vida está presente nas famílias Muridae do leste europeu e Ásia, Bathyergidae da África, Geomyidae na América do Norte e

Octodontidae e Ctenomyidae na América do Sul (LACEY e cols., 2000).

1.2 O Gênero *Ctenomys*

A família Ctenomyidae, recentemente separada de Octodontidae (LESSA & COOK, 1998; KÖHLER e cols., 2000; HUCHON & DOUZERY, 2001), possui um único gênero atual: *Ctenomys*, que compreende 50 a 60 espécies e é o mais diversificado entre os gêneros de roedores fossoriais (NOWAK, 1999; LACEY e cols., 2000). Estes animais são popularmente conhecidos como tuco-tucos por sua vocalização característica, ou como ocultos, por passarem a maior parte da vida dentro de túneis (PEARSON e cols., 1968; NOWAK, 1999; REIG e cols., 1990).

Acredita-se que a diferenciação da família Ctenomyidae tenha ocorrido no Mioceno Médio-tardio, durante a segunda grande radiação dos Histicognatos, acontecimento que determinou o quadro taxonômico atual para o grupo (VUCETICH e cols., 1999; VERZI e cols., 1999; VUCETICH & VERZI, 1999). Este período é marcado pela transformação do ambiente para um meio cada vez mais árido, com substituição das florestas por campos e desertos. Tal paisagem foi responsável pela extinção massiva de várias taxa e o surgimento de espaço para a radiação adaptativa dos roedores fossoriais (NEVO, 1979; VUCETICH e cols., 1999).

A origem do gênero *Ctenomys* ocorreu no centro da Argentina, durante o Plioceno tardio-Pleistoceno (NEVO, 1979; REIG, 1986 e 1989; CONTRERAS e cols., 1987; REIG e cols., 1990 e 1992; LESSA & COOK, 1998, VERZI e cols., 1999). Subseqüentemente o gênero sofreu uma explosiva cladogênese, fato confirmado recentemente por dados moleculares, que produziu o grande número de espécies atuais, tornando-o dominante na exploração do nicho subterrâneo na

Região Neotropical (REIG, 1989; REIG e cols., 1990; 1992; LESSA & COOK, 1998; COOK & LESSA, 1998; MASCHARETI e cols., 2000).

A distribuição do Gênero *Ctenomys* é ampla, estendendo-se desde o Peru e Sul da Bolívia até o extremo insular austral da América do Sul, desde o nível do mar até mais de 4000 metros nos Andes Peruanos (PEARSON, 1959; REIG e cols., 1990; NOWAK, 1999).

As características morfológicas dos tuco-tucos, estão associadas ao hábito fossorial e a vida dentro dos túneis: o corpo robusto e cilíndrico, a cabeça grande, a cauda curta, a abertura bucal atrás dos incisivos, o ouvido externo reduzido. O pescoço e os membros são curtos e musculosos, sendo os membros anteriores menores que os posteriores e apresentando ambos unhas fortes (PEARSON, 1959; NEVO, 1979; REIG e cols., 1990; NOWAK, 1999).

A constatação da presença destes animais no campo pode ser feita pela observação de amontoados de areia que correspondem aos "tampões" que os indivíduos usam para fechar suas tocas (PEARSON e cols., 1968). A abertura e fechamento do túnel servem para o controle da temperatura e concentração de gases do ambiente, que, embora seja estável, exige adaptações fisiológicas para suportar as baixas concentrações de O₂ e altas concentrações de CO₂ (CONTRERAS, 1970; NEVO, 1979; REIG e cols., 1990; NOWAK, 1999).

A estrutura do túnel consiste de uma galeria principal e várias ramificações partindo desta, terminando em aberturas ou fundo cego. Ao longo das galerias são encontradas câmaras especializadas para depósito de comida ou defecação (NEVO, 1979; GALLARDO & ANRIQUE, 1991; ALTUNA e cols., 1999; RUI & GASTAL, 1997; BUSCH e cols., 2000). O desenho do sistema de covas é afetado principalmente pela distribuição espacial, pela densidade da população, disponibilidade de recursos tróficos, padrões de busca de alimento e de tipo de solo (REIG e cols., 1990; COMPARATORE e cols., 1995a).

Durante o forrageio, os tuco-tucos mantêm-se sempre próximos ao túnel, nas bordas das saídas, como meio de evitar a predação. Alimentando-se especialmente de gramíneas, sendo generalistas na maioria dos casos e tendo assim grande influência sobre as comunidades de plantas das regiões que habitam (NEVO, 1979; GALLARDO & ANRIQUE, 1991; MALIZIA e cols., 1995; BORRUEL e cols., 1998; ALTUNA e cols., 1999; BUSCH e cols., 2000).

1.3 A Estrutura das Populações

1.3.1 A Distribuição das Populações e o Fluxo Gênico

A ocupação do nicho subterrâneo condicionou não apenas as características morfológicas e fisiológicas dos tuco-tucos, mas também o comportamento das espécies e a estrutura de suas populações. Alguns atributos como: distribuição fragmentada, limitada vagilidade, territorialismo e sistema de cruzamento, segundo REIG e cols. (1990), ajudam a entender a extraordinária taxa de diversificação do gênero.

A maioria das espécies de animais está organizada em grupos locais semi-isolados (HARTL & CLARK, 1997). Entre os Ctenomideos a distribuição fragmentada é bastante evidente, determinada por condições ecológicas e barreiras geográficas (NEVO, 1979; REIG e cols., 1990; COOK e cols., 1990; STEINBERG & PATTON, 2000)

As características do solo, como compactação e capacidade de troca de gases, calor e umidade, são os maiores limitantes da ocupação de novas áreas por roedores fossoriais. Tais variáveis devem ser compatíveis com o gasto energético do hábito de cavar (REIG e cols., 1990, BUSCH e cols., 2000).

Como o ambiente subterrâneo é descontínuo, um mosaico de áreas de solo favorável e recursos disponíveis interpostas a áreas

desfavoráveis, prevalece entre as populações a distribuição fragmentada. A maioria das espécies apresentam distribuição em parapatría e alopatria (PEARSON, 1984; REIG e cols., 1990), embora existam casos de simpatria (CONTRERAS & REIG, 1965; MALIZIA e cols., 1991; COMPARATORE e cols., 1995b).

Um reforço ao isolamento entre estes demes parece ser desempenhado pela baixa vagilidade dos indivíduos, o que restringe o fluxo gênico entre os grupos (PEARSON e cols., 1968; NEVO, 1979; REIG e cols., 1990; MALIZIA e cols., 1995; FREITAS, 1995a). Ao longo da evolução destas espécies, este processo possivelmente contribuiu para que os novos rearranjos cromossômicos fossem fixados (PATTON & SHERWOOD, 1983; REIG, 1989), dando origem a alta variabilidade cariotípica existente: de $2n=10$ até $2n=70$, a mais ampla variação entre os mamíferos (REIG & KIBLISKY, 1969; KIBLISKY e cols., 1977; GALLARDO, 1979; FREITAS & LESSA, 1984; FREITAS, 1990; ORTELLS e cols., 1990; REIG e cols., 1990; MASSARINI e cols., 1991 a e b; REIG e cols., 1992; FREITAS, 1994 e 1997; GIMENEZ e cols., 1997; MASSARINI e cols., 1998; PONSA e cols., 1998; BRAGIO e cols., 1999; GIMENEZ e cols., 1999; PONSA e cols., 2000a; 2000b).

Segundo SLATKIN (1994) o fluxo gênico entre grupos de indivíduos é o maior determinante de sua estrutura porque estabelece em que grau esta população é uma unidade evolutiva independente. Para *Ctenomys*, conforme citado, o fluxo gênico é considerado baixo, indicado pela baixa vagilidade dos indivíduos (PEARSON e cols., 1968; NEVO, 1979; REIG e cols., 1990; MALIZIA e cols., 1995; FREITAS, 1995a). No entanto os dados obtidos para estas espécies são ainda escassos. O uso de métodos diretos para determinar taxas de dispersão é bastante limitado pela dificuldade de acesso ao ambiente subterrâneo (SMITH, 1993; BUSCH e cols., 2000; LACEY, 2000) e são ainda poucos os trabalhos com marcadores moleculares.

1.3.2 Fatores Envolvidos na Determinação do Fluxo Gênico entre as Populações

Alguns fatores importantes na determinação dos níveis de fluxo gênico são a interação entre os indivíduos, as taxas de dispersão e o sucesso reprodutivo (LACEY, 2000; BUSCH e cols., 2000).

O primeiro destes fatores, a interação entre os indivíduos, apresenta mais de um padrão no gênero *Ctenomys*. Algumas espécies, como *C. sociabilis*, são consideradas sociais, com machos e fêmeas compartilhando os mesmos túneis (PEARSON & CHRISTIE, 1985). Em outras, como *C. peruanus* e *C. porteousi* existe o compartilhamento de túneis apenas pelas fêmeas, sendo os machos solitários (PEARSON, 1959; CONTRERAS & MACEIRA, 1970).

A maioria das espécies, no entanto, é solitária e territorial, o que determina, em geral, uma baixa densidade populacional (PEARSON, 1959; PEARSON e cols., 1968; NEVO, 1979; REIG e cols., 1990; LACEY e cols., 1998; BUSH e cols., 2000). Para estas espécies, o território de um indivíduo é a área do seu sistema de túneis, e ele a defende com a emissão de som. Os sinais sexuais também são sonoros e espalham-se por até 6 metros pelo solo e muito mais na superfície (FRANCESCOLI, 1992 e 1998). Durante a época de reprodução pode haver conexão dos túneis de machos e fêmeas e os filhotes geralmente são encontrados habitando o túnel da mãe (REIG e cols., 1990; LACEY e cols., 1998; BUSCH e cols., 2000). Dada a forte territorialidade dos indivíduos, especialmente dos machos, os juvenis permanecem aproximadamente três meses em sua toca de nascimento, sendo posteriormente expulsos e obrigados a dispersar (PEARSON, 1959; PEARSON e cols., 1968; REIG e cols., 1990; MALIZIA & BUSCH, 1991; GALLARDO & ANRIQUE, 1991; MALIZIA & BUSCH, 1997; ALTUNA e cols., 1999; NOWAK, 1999). Neste momento são especialmente vulneráveis, sendo já documentada a predação preferencial de jovens por algumas espécies

de corujas (PEARSON e cols., 1968; GALLARDO & ANRIQUE, 1991; VASSALLO e cols., 1994).

A dispersão em *Ctenomys* foi abordada em poucos trabalhos, na maior parte deles através da remoção de todos os animais de uma área e observação da recolonização. Os indivíduos dispersantes foram sempre jovens, com proporções equivalentes de machos e fêmeas (PEARSON, 1959; GALLARDO & ANRIQUE, 1991; MALIZIA e cols., 1995).

O uso do método de marcação e recaptura mostrou um maior índice de recaptura de fêmeas e área de vida maior para machos, indicando que os machos dispersam mais (FERNANDEZ, 2002). MALIZIA e cols. (1995) sugerem que a procura sexual seja o primeiro determinante na migração dos machos e que outros fatores, como a disponibilidade da área, influenciem a dispersão das fêmeas.

BUSH e cols. (2000) salientam que baixas taxas descritas podem ser resultantes da dificuldade de documentação para o movimento dos animais entre populações naturais.

Quanto à reprodução, os tuco-tucos são considerados K-estrategistas (REIG e cols., 1990; MALIZIA & BUSCH, 1991; MALIZIA e cols., 1995; MALIZIA & BUSCH, 1997; ZENUTO & BUSCH, 1998). Ao nascimento e entre os sub-adultos o número de fêmeas e machos é equivalente (MALIZIA e cols., 1995; FERNANDEZ, 2002), entre adultos, porém, a proporção de fêmeas é maior na maioria das populações analisadas (PEARSON, 1959; MALIZIA & BUSCH, 1991; GASTAL, 1994; MALIZIA e cols., 1995; ZENUTO & BUSCH, 1998; FERNANDEZ, 2002).

Uma possível explicação para a modificação na razão sexual é a maior incidência de morte de machos durante a dispersão (MALIZIA & BUSCH, 1991; ZENUTO & BUSCH, 1998) ou a maior agressividade entre estes (MALIZIA e cols., 1995; FERNANDEZ, 2002).

A existência de mais fêmeas em relação aos machos nas populações tem sido usada para sugerir poliginia para diversas

espécies (PEARSON e cols., 1968; REIG e cols., 1990; GALLARDO & ANRIQUE, 1991; MALIZIA e cols., 1995; FERNANDEZ, 2002). ZENUTO e cols. (1999) confirmaram a poliginia em *C. talarum* pela análise do DNA de vários filhotes usando a técnica de *fingerprint*.

1.3.3 Os Marcadores Moleculares no Estudo das Populações

A estrutura populacional é composta por duas partes distintas inter-relacionadas: estrutura demográfica e estrutura genética (SLATKIN, 1994). A última é determinada não só pelas características da população, mas também por processos como mutação e fluxo gênico que aumentam a variabilidade genética, e deriva genética, seleção e endocruzamento responsáveis por perdas da variabilidade (MEFEE & CARROL, 1997; AMOS & HARWOOD, 1998). O desenvolvimento das recentes técnicas moleculares de análise do DNA facilitaram os estudos populacionais acerca destas questões.

Entre os marcadores moleculares empregados destacam-se: as tradicionais alozimas, estudos com RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sequências de DNA mitocondrial, DNA *fingersprint* usando regiões de minissatélites, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e polimorfismos em região de microssatélites (AVISE, 1994).

Para as análises de fluxo gênico, um dos marcadores mais usados têm sido os microssatélites (por ex. SCRIBNER & PEARCE, 2000; BALLOUX e cols., 2000; BLUNDELL e cols., 2002).

Os microssatélites são parte do grupo de *loci* chamados VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*). São compostos de uma simples seqüência de não mais que 6 pares de bases, repetidas em um número de 10 a 50 cópias (SNUSTAD & SIMMONS, 1997; HANCOCK, 1998; SCRIBNER & PEARCE, 2000) e sofrem uma elevada

taxa de mutação (10^{-2} à 10^{-6} mutações por loco por geração) devido a eventos de *slippage* e recombinação das moléculas de DNA (HANCOCK, 1998; SCRIBNER & PEARCE, 2000). Por apresentarem altos níveis de variabilidade (AVISE, 1994; SNUSTAD & SIMMONS, 1997; HANCOCK, 1998; SCRIBNER & PEARCE, 2000) e serem seletivamente neutros, tem altas chances de serem afetados por curtos períodos de isolamento ou endocruzamento (TAUTZ, 1993; SCRIBNER & PEARCE, 2000).

As informações genéticas obtidas pela análise deste marcador contribuem para o entendimento das relações evolutivas e preservação da diversidade (PASZEK e cols., 1998). Seu uso tem crescido significativamente em trabalhos abordando estruturação de populações (por ex. LEON, 1997; PAUTKAU, 1998; DALLAS e cols., 1999; STOW e cols., 2001; SHIKANO e cols., 2001; GOSENS e cols., 2001), paternidade e parentesco (por ex. VIGILANT e cols., 2001; NESJE e cols., 2000) e relações filogeográficas (por ex. WYNER e cols; 1999; JOHNSON e cols 1999).

1.3.4 Análises Moleculares em Populações do Gênero *Ctenomys*

Os trabalhos investigando a estruturação genética bem como os níveis de fluxo gênico entre as populações de *Ctenomys* tem feito uso especialmente de *loci* protéicos. Trabalhos recentes com uso de marcadores microssatélites e DNA mitocondrial tem acrescentado informações.

APFENBAUM e cols., (1991) compararam a estrutura genética de populações de *C. australis* e *C. porteousi* usando 31-35 *loci* protéicos. *C. porteousi* apresentou F_{IS} (parâmetro usado para estimar endocruzamento) baixo enquanto *C. australis* apresentou F_{IS} alto, resultado de endocruzamento ou subdivisão na população. Para o

cálculo de F_{st} (parâmetro que estima a estruturação entre populações), *C. australis* tem um valor considerado médio de 0,128, relacionado às características geográficas da área.

GALLARDO & KHOLER (1992) estudaram oito populações de *Ctenomys maulinus brunneus* de dois diferentes cariótipos, utilizando 18 *loci* protéicos. A similaridade genética entre as populações se mostrou baixa e o cálculo de F_{st} mostrou uma forte estruturação entre estas, não estando relacionado à distância entre as populações ou a forma cariotípica, mostrando-se mais forte entre populações de um mesmo cariótipo do que entre diferentes cariótipos. Os valores de F_{is} altos, bem como o baixo número de heterozigotos, indicaram endocruzamento. Os autores salientam que o fluxo gênico deve ser efetivo somente entre populações separadas por ambientes relativamente homogêneos.

Em populações de *C. porteousi* MASSARINI e cols (1992), analisaram a estrutura genética com 31 *loci* protéicos. Os valores de F_{st} calculados foram muito baixos, sendo de 0,009 e 0,002 para rearranjos cromossômicos e *loci* protéicos, respectivamente. O número de migrantes estimado foi de 27,2 e 11,3 indivíduos/geração para um e outro marcador. Este resultado indica ausência de estruturação entre as populações.

LIZARRALDE e cols. (2001) analisaram 19 *loci* protéicos em duas formas cariotípicas diferentes de *C. magelanicus* que não possuem diferenças morfológicas e obtiveram resultados que mostram homogeneidade entre as populações.

D'ELIA e cols. (1998) usaram 20 *loci* protéicos para testar a hipótese da fixação do melanismo por deriva genética entre populações pequenas e isoladas de *C. rionegrensis*. O número de migrantes estimado foi de 6,342 indivíduos/geração indicando alto fluxo gênico, suficiente para prevenir a deriva genética. A ausência do padrão de isolamento pela distância indicou que a distribuição é fruto de expansão recente. Porém LESSA e cols. (*in press*), usando

microsatélite e citocromo b para comparar populações de *C. rionegrensis* encontraram valores menores de fluxo gênico, sendo o número de migrantes menor que 1 indivíduo/geração. Os resultados com microsatélites mostram boa estruturação das populações, e valores altos de F_{IS} indicam subdivisão dentro de cada unidade populacional. A expansão recente é confirmada tanto pelos dados de microsatélites quanto de DNA mitocondrial.

LACEY (2001), analisando 13 *loci* de microsatélites para duas espécies, *C. haigi* e *C. sociabilis* relatou maior variabilidade em *C. haigi*. Tal fato é atribuído tanto a fatores comportamentais, já que *C. sociabilis* é social e *C. haigi* é solitário, quanto a fatores históricos de ocorrência de gargalos de garrafa nas populações.

GAVA (2001) investigou as variações nas frequências de seis *loci* de microsatélites entre quatro diferentes cariótipos em populações parapátricas de *C. minutus* e uma zona híbrida entre *C. minutus* e *C. lami*. Com esta análise verificou que quanto maior a divergência cromossômica entre populações parentais hibridizantes maior a razão da variação inter/intra. Para a hibridação inter-específica encontrou baixos índices de diversidade genética.

FERNANDEZ (2002) analisou três populações de *C. flamarioni* utilizando quatro *loci* de microsatélites. As populações mostraram estruturação entre si, com $F_{ST} = 0,322$. Quando comparadas par a par as populações mostram índices de F_{ST} concordantes com o isolamento pela distância. O número de migrantes entre as duas áreas mais próximas (2,5Km) é maior que 1 e o F_{IS} é alto para a maioria das populações.

1.4 As Espécies de *Ctenomys* do Rio Grande do Sul

Quatro espécies são descritas para o Rio Grande do Sul: *Ctenomys flamarioni*, *Ctenomys torquatus*, *Ctenomys lami* e *Ctenomys minutus*

Ctenomys flamarioni apresenta uma distribuição restrita a primeira linha de dunas da região Costeira do Rio Grande do Sul, desde Santa Vitória do Palmar ao Sul, até aproximadamente 25 km ao Sul de Torres, limite norte. Possui coloração clara e tem corpo bastante robusto em relação aos tuco-tucos de distribuição mais interior ao continente. Várias características mostram que esta espécie é mais próxima do grupo mendocinus de espécies argentinas do que das outras três espécies. Apresenta apenas um cariótipo com $2n=48$ (FREITAS, 1994).

Ctenomys torquatus ocupa principalmente as terras baixas da região central do estado, distingui-se morfologicamente de *Ctenomys minutus* e *C. lami* pela presença de um colar branco que parte do pavilhão da orelha contornando o pescoço ventralmente até o lado oposto (TRAVI, 1983; FREITAS 1995a). Apresenta no Rio Grande do Sul dois números diplóides diferentes $2n=44$ e $2n=46$ (FREITAS & LESSA, 1984).

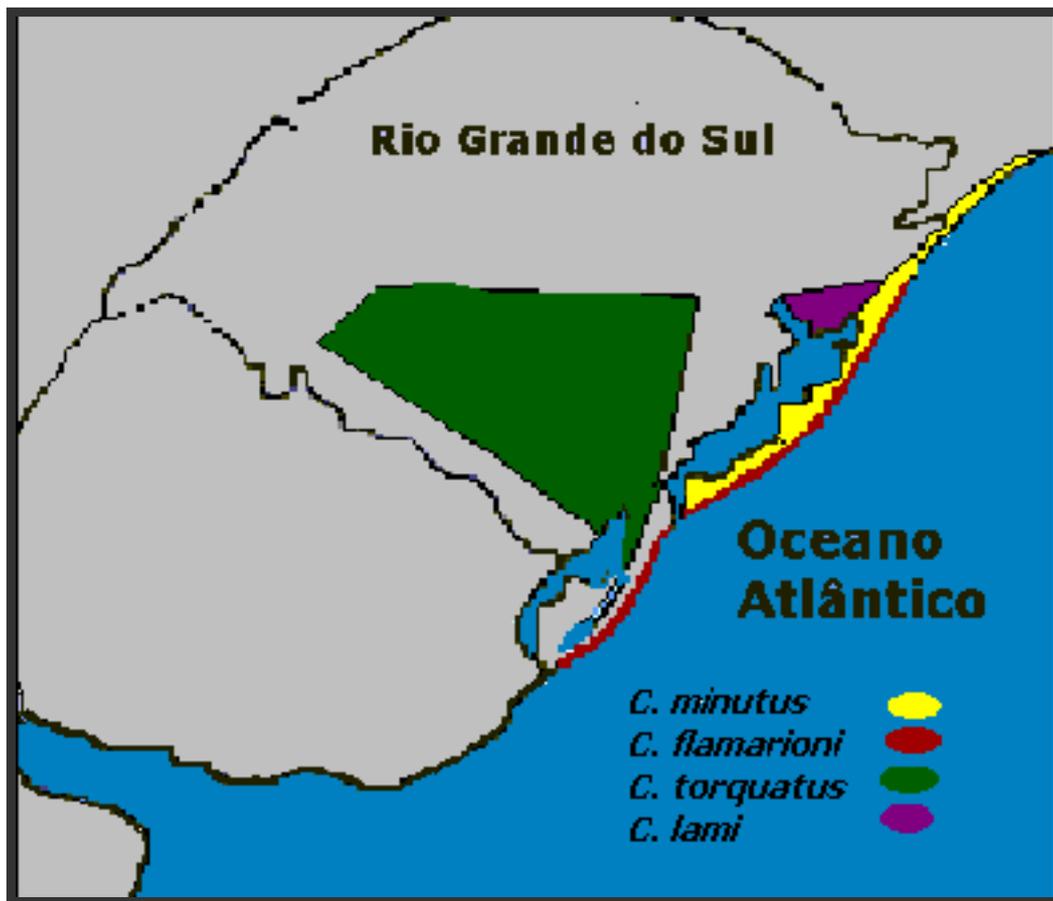


Figura 1. Distribuição das espécies de *Ctenomys* no Sul do Brasil

Ctenomys lami, morfologicamente semelhante a *C. minutus*, ocupa a região da Coxilha das Lombas. Possui cariótipo bastante variável com $2n=54$ como padrão, variando entre $2n=54$ a $2n=58$ (FREITAS, 1990; FREITAS, 2001).

O alto índice de similaridade genética encontrado entre as duas espécies para a análise de *loci* protéicos, sugere que *C. minutus*, a quarta espécie, seja derivada de *C. lami*, hipótese corroborada pela forma dos espermatozoides e por dados citogenéticos e morfológicos (MOREIRA e cols., 1991; FREITAS 1995b; FREITAS, 2001).

1.4.1 *Ctenomys minutus* Nehring, 1887

A espécie alvo deste trabalho habita campos arenosos e dunas da Planície Costeira do Sul do Brasil, do Rio Grande do Sul até Santa Catarina. As populações se distribuem, a partir de seu limite norte no município de Jaguaruna (SC), até as margens do Rio Mampituba, pela primeira linha de dunas da Costa. Deste ponto até São José do Norte (RS), limite ao sul, apenas é encontrado nos campos mais interiores da Planície Costeira (FREITAS, 1990; FREITAS, 1995a; MARINHO & FREITAS, 2000; FREYGANG, 2002).

Ctenomys minutus tem coloração variável entre castanho escuro e amarelado e tamanho mediano (REIG e cols., 1966).

Os indivíduos são solitários e sedentários. A dispersão é feita geralmente pelos jovens, sendo as regiões periféricas da área da população habitadas por sub-adultos (GASTAL, 1994; RUI & GASTAL, 1997; MARINHO, 1997; MARINHO & FREITAS, 2000). MARINHO (1997) relata uma tendência a um maior número de fêmeas nas populações.

A época de reprodução começa em setembro indo até outubro (GASTAL, 1994) e apresentam dimorfismo sexual com machos

maiores que as fêmeas (RUI & GASTAL, 1997; MARINHO & FREITAS, 2000).

Para construção de seus túneis, *C. minutus*, prefere ambientes abertos e superfícies inclinadas como taludes de estradas, o que pode estar relacionado à proteção contra enchentes nos períodos de intensas chuvas. A inclinação do túnel parece estar relacionada com o tipo de solo, sendo mais suaves em solos menos compactos (GASTAL, 1994; MARINHO, 1997).

1.5 A História da Planície Costeira e a Evolução de *Ctenomys minutus*

1.5.1 Antigas Barreiras Geográficas

Uma das características mais interessantes de *C. minutus* é a ampla variação cariotípica e a ocorrência de zonas híbridas entre populações de diferente número diplóide. Ao longo de sua distribuição onze diferentes cariótipos são descritos: $2n= 42$, 46a e b, 47a e b, 48a e b , 49a e b e 50a e b (FREITAS, 1997; FREYGANG, 2002). A distribuição dos tuco-tucos e a fixação destes polimorfismos estão intimamente relacionados com a evolução geológica da Planície Costeira (FREITAS, 1995a; 1997; FREYGANG 2002).

De acordo com Freitas (1995a; 1997), *C. minutus* habita a segunda e a terceira extensões de formação da Planície Costeira. Essas regiões são chamadas sistemas de laguna-barreira e derivaram de quatro eventos de regressão e transgressão durante o Pleistoceno e Holoceno.



Figura 2. Exemplar de *Ctenomys minutus*

Das áreas habitadas por *C. minutus*, a segunda barreira foi formada no Pleistoceno médio e começou a isolar as Lagoas Mirim e dos Patos, a terceira barreira formou-se no fim do Pleistoceno, e a quarta barreira, do início do Holoceno, adicionou a atual linha de dunas da Costa (VILWOCK e cols., 1986).

Durante este processo várias barreiras geográficas foram formadas, provocando o isolamento de populações onde rearranjos foram fixados dando origem as atuais raças cromossômica (FREITAS, 1997).

Os processos que levaram a formação da fronteira entre a Planície Costeira e plataforma continental atual ainda estão agindo, e esta é, na verdade, apenas uma linha transiente que tem se modificado durante o tempo (GAVA, 1996).

Quanto às zonas híbridas, duas são descritas nas áreas de contato entre os cariótipos $2n=46a \times 48a$ e $2n=42 \times 48a$, e outras duas são sugeridas nas áreas de contato entre $2n=46b \times 48b$ e $2n=48b \times 50b$. Ainda uma região de hibridação inter-especifica é relatada entre *C. minutus* e *C. lami* (GAVA, 2001; GAVA & FREITAS 2002). Estas regiões representam áreas de contato secundário onde no passado existiram barreiras entre as populações (GAVA, 1996; FREYGANG, 2002; GAVA & FREITAS, 2002 e *in press*).

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

GAVA (2001) analisou várias populações desta área usando seis *loci* de microssatélites e obteve a indicação de uma forte estruturação entre as populações locais, maior do que a estruturação entre as metapopulações de cariótipos diferentes. Os valores baixos de divergência inter-citótipo indicam que o polimorfismo cromossômico não tem agido como barreira de isolamento. A área

localiza-se na região do banhado de Cidreira, local de alagamento periódico, uma barreira atualmente permeável a dispersão dos indivíduos (GAVA, 1996; GAVA & FREITAS, 2002).

1.5.2 O Panorama Atual: Barreiras Recentes

Atualmente a distribuição de *Ctenomys minutus* é cortada pelos rios Mampituba e Araranguá, por terras baixas e alagadiças da região de Palmares do Sul (FREITAS, 1995a) e pela rodovia RS 030.

O Rio Araranguá representa uma barreira efetiva ao fluxo gênico entre as populações. Na análise filogenética para os diferentes cariótipos de *C. minutus* o número diplóide $2n=50a$, que ocorre à sua margem norte, aparece como o mais ancestral dos cariótipos e bastante separado de $2n=46a$ localizado à margem sul (FREYGANG, 2002). Também GAVA (2001) usando seis *loci* microssatélites, constatou forte divergência genética entre os cariótipos de lados opostos do Rio.

De formação recente, o Rio Mampituba nasce nas escarpas basálticas da Serra Geral e deságua no Oceano Atlântico, drenando uma área de 1800 Km² entre os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A montante tem seu curso controlado por estruturas lineares e, próximo à foz, na região de Torres, apresenta inúmeros meandros, na forma de ferraduras e de meia-luas, abandonados ou em processo de abandono, bastante modificados com o passar do tempo geológico. Atualmente a desembocadura deste rio está fixada por molhes para evitar a migração que ocorre para nordeste (REGINATO, 1996).

Os rios que compõem a Bacia Hidrográfica do Sudeste dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Nordeste do Rio Grande do Sul são rios geomorfologicamente recentes, com origem no Terciário Superior/Quaternário (JUSTUS, 1990).

A RS 030 é uma via de acesso à BR 101, junto a Osório, sendo uma rodovia que liga Porto Alegre ao litoral norte do Rio Grande do Sul. O tráfego de veículos nesta estrada é constante nos meses de março a outubro, aumentando consideravelmente no período de veraneio.

1.6 O Impacto das Estradas sobre as Populações

Várias áreas de diferentes ecossistemas encontram-se alteradas em todo o mundo pela grande extensão da malha viária atual (FORMAN & ALEXSANDER, 1998). Só no Rio Grande do Sul são 10.543,76 Km de estradas estaduais sendo mais 5.437,58 Km de rodovias federais (DAER, 2002).

Os efeitos ecológicos da presença de vias trafegadas por veículos afetam diretamente a estrutura das comunidades e comportamento dos animais. (FORMAN & ALEXSANDER, 1998; CUPERUS e cols., 1999; TROMBULACK & FRISSEL, 2000; HELS & BUSCWALD, 2001; JAARSMAN & WILLEMS, 2002; SAUNDERS e cols., 2002; CLEVENGER e cols., *in press*). Tais alterações têm início no período de construção da rodovia que provoca a morte direta tanto de organismos sésseis quanto de pouca movimentação (TROMBULACK & FRISSEL, 2000). Posteriormente o ambiente sofre alterações químicas, físicas e bióticas.

O solo encontra-se especialmente atingido pela presença das estradas. A compactação é aumentada nas áreas marginais onde ocorrem modificações da temperatura e umidade, perturbações na sedimentação e deposição de poluentes (TROMBULACK & FRISSEL, 2000). A manutenção e o uso das rodovias provocam o acúmulo de pelo menos cinco classes de moléculas químicas: metais pesados, sais, moléculas orgânicas, ozônio e nutrientes. A maior contribuição para acumulação destas moléculas vem do uso de combustíveis pelos

veículos, principalmente da gasolina. Também contribuem os defensivos agrícolas e adubos químicos, dada abertura de espaço pelas estradas para a agricultura (FORMAN & ALEXANDER, 1998; TROMBULACK & FRISSEL, 2000).

HEUSER e cols. (*in press*) analisaram a ação dos poluentes emitidos por automóveis nas populações de tuco-tucos que margeiam a RS 030 (as mesmas utilizadas neste estudo). O estudo mostrou um aumento significativo no índice de danos no DNA destes animais, sendo as fêmeas adultas mais atingidas, tanto que a relação fêmea/macho é maior em outras populações, afastadas da estrada.

A poluição relacionada às estradas pode provocar distúrbios fisiológicos, queda na resistência a patógenos, disfunções de reprodução ou morte dos indivíduos (TROMBULACK & FRISSEL, 2000; FORMAN & ALEXANDER, 1998). Como resultado, acarreta modificações nos parâmetros demográficos das populações e, conseqüentemente, causa alterações na estrutura genética das mesmas (BICKHAM e cols., 2000).

A abertura do espaço pela presença de estradas repercute diretamente nas comunidades vegetais marginais. As modificações podem ser notadas tanto na diversidade de espécies quanto na densidade das populações, causada pela maior exposição à luminosidade, maior dispersão de sementes e introdução de espécies exóticas. (FORMAN & ALEXANDER, 1998, TROMBULACK & FRISSEL, 2000). Esta mudança, em geral é acompanhada por modificação na dinâmica das populações animais da área, especialmente para pequenos mamíferos em busca de alimento (CLEVENGER e cols., *in press*).

Todas as estradas servem como barreiras ou filtros para movimento de muitos animais, devido, entre outros efeitos, ao elevado índice de atropelamentos (FORMAN & ALEXANDER, 1998; TROMBULACK & FRISSEL, 2000; JAARSMA & WILLENS, 2002). O "efeito de barreira" é influenciado pelo nível em que esta estrada

inibe a tentativa de travessia dos animais, o número de animais que morre ao atravessá-la e pelos padrões normais de dispersão para cada espécie. Os dois primeiros fatores estão ligados a extensão das estradas e aos níveis de fluxo de veículos, medidos em quantidade e velocidade (JAARSMA & WILLEMS, 2002; TROMBULACK & FRISSEL; 2000).

Para pequenos vertebrados o número de mortes ao atravessar estradas está relacionado com sua história natural, no que diz respeito à sazonalidade de dispersão e reprodução. Exercem grande influência ainda as características das áreas adjacentes, como topografia e vegetação. Para pequenos mamíferos os maiores índices de atropelamentos são descritos em estradas de pequeno e médio fluxo (CLEVENGER e cols., *in press*).

As estradas além de servirem como barreiras físicas, que cortam os ambientes, abrem espaço para a fragmentação de áreas próximas. SAUNDER e cols. (2002) relatam o aumento no número de fragmentos de áreas florestais e a diminuição no tamanho destes na região dos Grandes Lagos dos Estados Unidos de acordo com o aumento da densidade da malha de rodovias na região.

A fragmentação dos habitats modifica atributos como taxas de reprodução, distribuição etária da população, mortalidade e proporção sexual (GOODMAN, 1987). A barreira física da presença de uma estrada diminui a possibilidade de dispersão dos indivíduos, diminuindo as taxas de fluxo gênico. A longo prazo processos genéticos podem ser desencadeados, como a deriva genética e endocruzamento, e conseqüentemente a perda de variabilidade (LACY, 1997; BRODERS e cols., 1999).

2.OBJETIVOS

Dada a influência de barreiras geográficas na variabilidade genética das populações, e tendo em vista a compreensão da estrutura populacional e fluxo gênico em *C. minutus*, este trabalho teve por objetivos:

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas de quatro *loci* de microssatélites em seis diferentes populações de *Ctenomys minutus*;
- Relacionar as diferentes populações estudadas com base nas frequências alélicas dos *loci* analisados;
- Quantificar o fluxo gênico entre as populações;
- Determinar e comparar o efeito da barreira natural (Rio Mampituba) sobre o fluxo gênico entre duas populações e da barreira artificial (rodovia RS 030) sobre outras duas populações;
- Contribuir com dados genéticos ao entendimento da dinâmica das populações visando sua conservação.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Considerando os objetivos do trabalho, foram selecionadas duas áreas de estudo contendo seis populações ao longo da distribuição de *Ctenomys minutus* na Planície Costeira dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

A Planície Costeira ocupa uma estreita e diversificada faixa ambiental, sendo constituída de uma ampla área de terras baixas formada por extensas praias e sistemas de lagos e lagoas (REGINATO, 1996; VIEIRA & RANGEL, 1988). Possui cerca de 37.000 km² de área, 640 km de extensão e mais de 100 corpos de água que representam 39% da área total (DELANEY, 1965).

Cruzando a área encontram-se a rodovia RS 030 e o Rio Mampituba. Ambos inserem-se na porção norte da Planície Costeira, microrregião do litoral Setentrional, onde se encontra o sistema lagunar da região Tramandaí-Osório (VIEIRA e RANGEL, 1988; RAMBO, 2000).

A primeira área escolhida (**Figura 4**) está situada próxima ao Município de Osório-RS e possui quatro das seis populações estudadas. A primeira população, Campo Weber, e a segunda, Campo Amaral, margeiam a RS 030, estando situadas a uma distância de menos de 100 metros da rodovia, porém em lados opostos, distando entre si em 1 Km (Km 80-81). A terceira e a quarta população, Maribo A e Maribo B, estão separadas por um espaço de 700 metros e não possuem barreira aparente, estando também afastadas de qualquer rodovia.

A região é composta de campos de solo relativamente duro e seco, com vegetação predominante de gramíneas e ciperáceas

(GAVA, 1996). Os terrenos são intensamente empregados na criação de animais.

A segunda área (**Figura 3**), contendo as outras duas populações, está localizada entre os municípios de Torres (RS) e Sombrio (SC). A quinta população, Parque da Guarita (Torres) e a sexta população, Praia da Gaivota (Sombrio) estão separadas por uma distância de aproximadamente 25 Km e pela interposição do Rio Mampituba.

Nesta região as populações de *C. minutus* podem ser encontradas tanto na primeira linha de dunas da Costa quanto mais para o interior do continente. A linha atual da Costa é praticamente retilínea sendo interrompida, entre outros, pela foz do Rio Mampituba e pelos promontórios de Torres (REGINATO, 1996). Na extensão das praias as populações encontram-se bastante ameaçadas pela ocupação imobiliária. A região mais interior apresenta-se muito explorada, especialmente pelas culturas de arroz e fumo e por plantações de *Pinus* e *Eucaliptus*. O número de indivíduos encontra-se bastante diminuído nesta região, dada a diminuição de área disponível.

Tabela 1. Localização dos pontos de coleta de amostras.

Ponto de Coleta	Município /Estado	Localização em UTM	Barreira próxima
Campo Weber	Osório/RS	22J,574251593,6685292985	RS030
Campo Amaral	Osório/RS	22J,573542962,6686048123	RS030
Maribo 1	Osório/RS	22J,579487171,6696277776	Sem barreira
Maribo 2	Osório/RS	22J,579332729,6696418580	Sem barreira
Gaivota	Sombrio/SC	22J, 0639142, 7774237	Rio Mampituba
Guarita	Torres/RS	22J,0623065, 6752038	Rio Mampituba

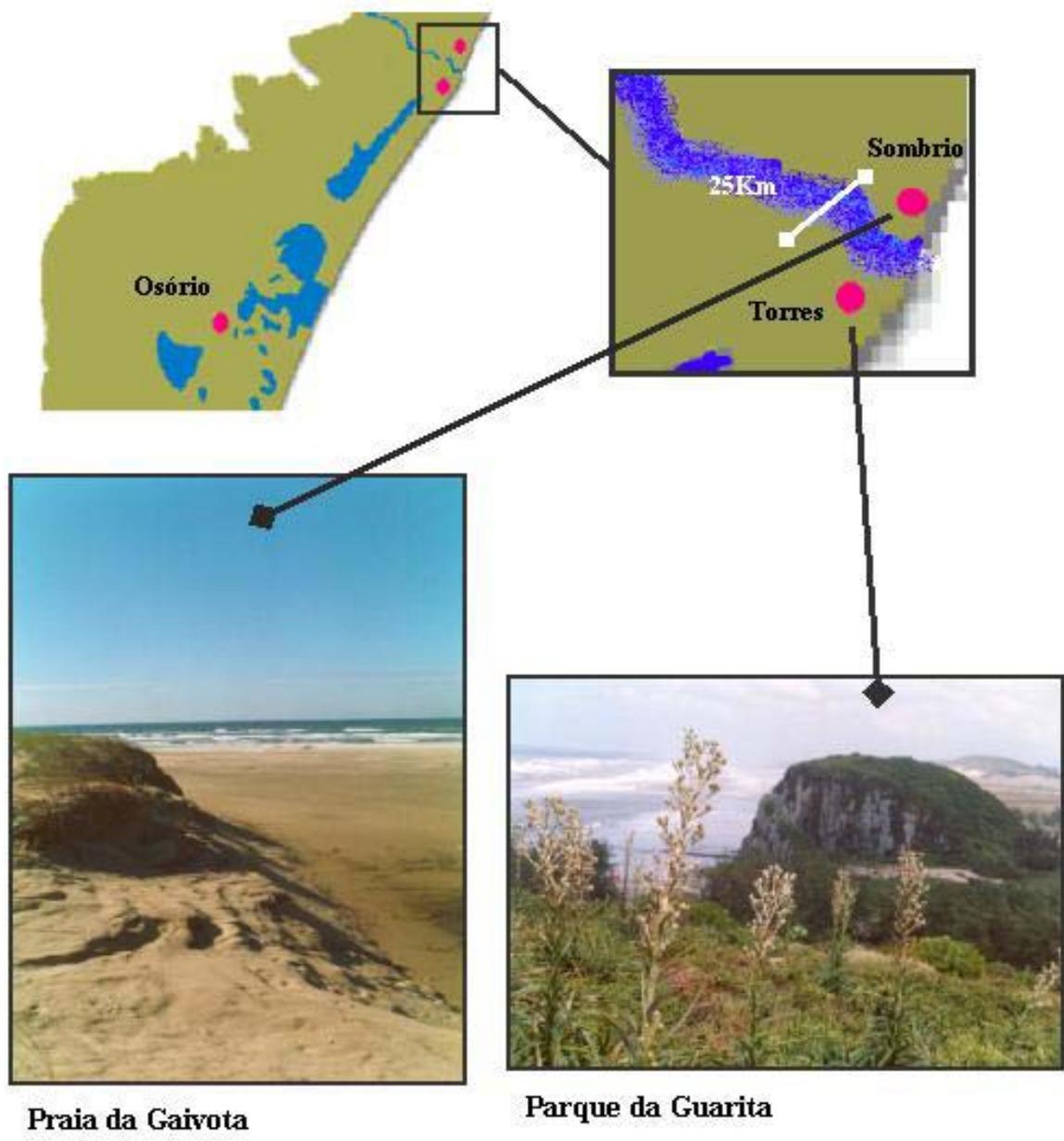


Figura 3. Localização dos pontos de coleta de Torres (RS) e Sombrio (SC).

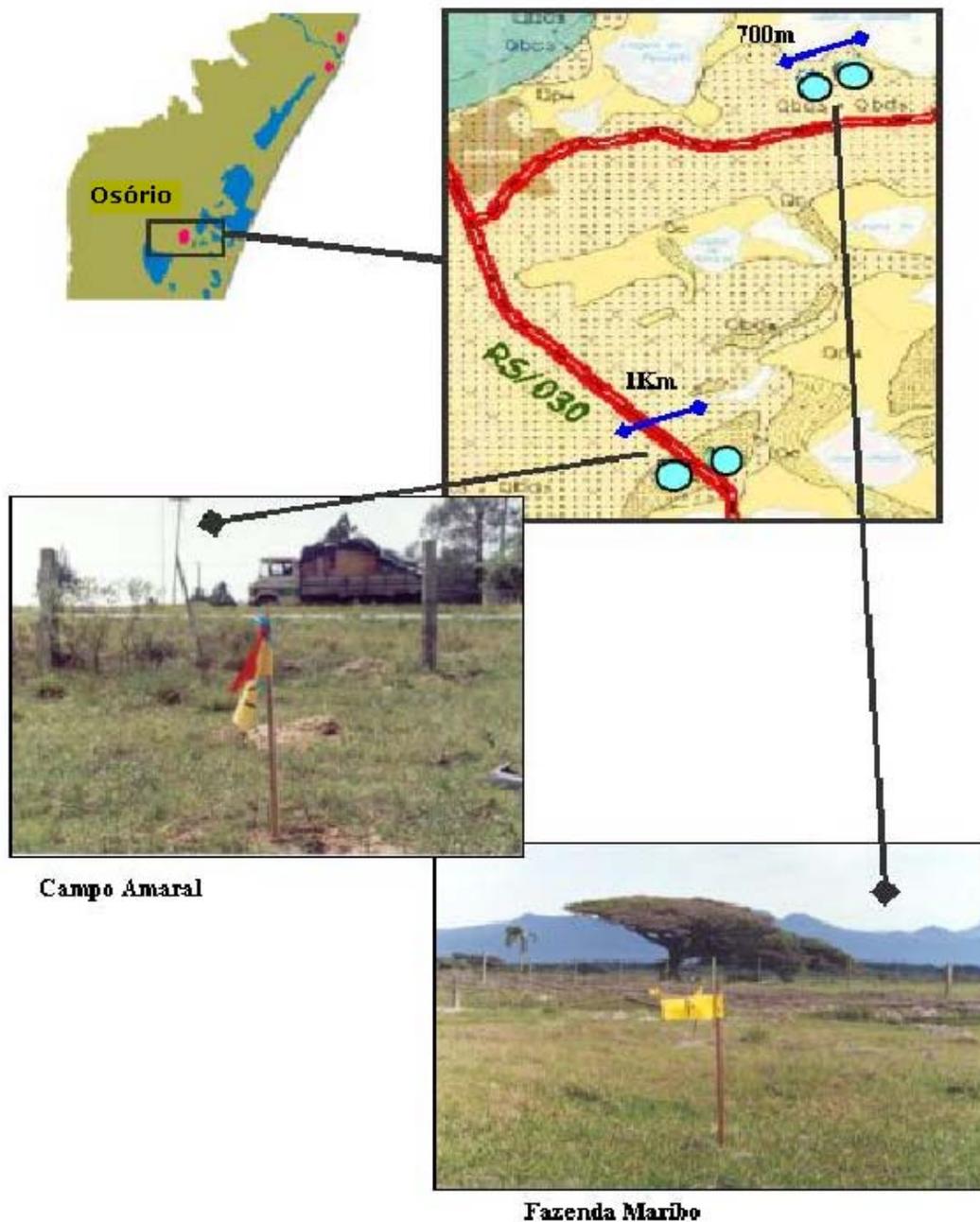


Figura 4. Localização dos pontos de coleta do município de Osório (RS).

3.2 Amostragem

Os exemplares de *Ctenomys minutus* foram capturados com armadilhas do tipo Oneida-Victor nº 0, usadas com auxílio de estacas para fixação na abertura das tocas (**Figura 5**). Depois da captura, os animais foram anestesiados com Zoletil (anestésico de uso veterinário) e procedeu-se o registro de algumas características dos indivíduos em caderno de campo. Para identificação em caso de recaptura, foi feita uma tatuagem numérica na parte interna da coxa. Foi observada a distribuição das tocas para que, ao final dos procedimentos, o animal fosse devolvido a sua toca de origem.



Figura 5. Tocas de *C. minutus* (aberta e fechada), armadilha utilizada para coleta dos animais, exemplar da espécie e extração de tecido da cauda dos exemplares.

Para posterior extração de DNA e análises genéticas foi retirado, com auxílio de bisturi, um pequeno fragmento do tecido da cauda de cada um dos animais coletados. Os tecidos foram armazenados em etanol absoluto até o uso em laboratório.

3.3 Estudo Molecular

3.3.1 Extração de DNA

Os fragmentos de tecido permaneceram estocados em freezer -20°C. Uma parte do material, aproximadamente 20mg, foi utilizada para a extração de DNA através da técnica de MEDRANO e cols. (1990) que utiliza precipitação com sal.

3.3.2 Determinação dos Alelos dos Microssatélites

Quatro *loci* de microssatélites (**Tabela 2**) foram escolhidos com base no trabalho de LACEY e cols., (1999), para a espécie co-genérica *Ctenomys haigi*. Procedeu-se a amplificação das regiões específicas utilizando a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (PALUMBI, 1996). As reações foram realizadas em um volume de 10 µl, contendo 25-100ng de DNA, 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 1X Taq *Buffer* (1,5 mM MgCl₂, 10mM de Tris-HCL, 50 mM de KCl), e 0,75 unidades de Taq DNA *polymerase* (Gibco). A amplificação contou com um período inicial de 5 minutos a 94°C para desnaturação, seguido de 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Tais ciclos foram constituídos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a temperatura de anelamento específica para cada *primer* (**Tabela 2**) e 45 segundos a 72°C, respectivamente. A extensão final foi realizada durante 45 segundos a 72 °C. Depois de amplificados, os fragmentos foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante. As bandas correspondentes a

cada um dos alelos foram visualizadas após a coloração do gel com nitrato de prata, escoradas com auxílio de marcador de peso molecular 25 pb e comparadas com fragmentos anteriormente amplificados.

Tabela 2. Identificação, motivo de repetição dos *loci* de microssatélites utilizados e seqüências e temperatura de anelamento dos *primers* (LACEY e cols., 1999; com modificações).

<i>Locus</i>	Seqüência do Primer 5` -3`	T _a ^o C ^o	Repetições
Hai2	TCTGAGCTGTGTAGTGAGAGC	58	(CA) ₁₅
	GTGATTTACAGGGTTTCTCCC		(CA) ₁₃
Hai3	CAATTGCCCATGCTTCTCTAT	58	(CA) ₂₆
	TGATCAGAGCTCGTTCTACCA		(CA) ₂₆
Hai4	CACCCTGTAGACCCTTCACTA	60	(CA) ₁₈
	CATCATCACTCTGGCTGAATC		(CA) ₂₅
Hai12	TACATACCCAGTCCTGATGTGG	60	(ATT) ₁₅
	ACGCCTGTAATCCCAGAGCT		(ATT) ₁₂

3.3.3 Análise de Dados

Apartir dos dados obtidos para os *loci* de microssatélites foi efetuado o cálculo das frequências alélicas em cada população. Para estimar a variabilidade genética foram observados o número de *locus* polimórficos, número de alelos por *locus* e número de diferentes alelos por população.

A existência de desequilíbrio de ligação entre os *loci* foi testada para todos os pares de *locus* para cada população.

As Heterozigosidades Esperada (He) e Observada (Ho) foram calculadas e a partir destas foram testados os desvios em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A ocorrência déficit de heterozigotos foi

testada para cada um dos *locus* em cada uma das populações, para todas as populações juntas e para todos os *locus* juntos.

O desequilíbrio de ligação e o desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (RAYMOND & ROUSSET, 1995) foram analisados com o uso do algoritmo "Markov Chain Method" (1000 *dememorizations*, 100 *batches*, 1000 *iterations*)(GUO & TOMPSON, 1992).

Para estimar a estruturação entre as populações, foi usada a estatística F (WRIGHT, 1965) através de dois de seus estimadores: F_{st} (WEIR & COCKERHAM, 1984), assumindo o modelo IAM de mutação (infinitos alelos); e Rho_{st} (ROUSSET, 1996), que assume o modelo SMM (mutação escalonada) utilizando a AMOVA - Análise da Variância Molecular (MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996). O número de migrantes foi estimado pelo método dos alelos privados (SLATKIN, 1985; BARTON & SLATKIN, 1986), bem como a partir de F_{st} e Rho_{st} ($Nm = 1/4[(1/X)-1]$, onde $X = F_{st}$ ou $X = Rho_{st}$ (WRIGHT, 1951).

Os valores de Rho_{st} foram submetidos a análise do isolamento pela distância (SLATKIN, 1993), cuja significância foi submetida ao teste de Mantel.

Todas as análises acima foram processadas no programa Genepop 3.3 (RAYMOND E ROUSSET, 1995). Os valores de F_{st} e F_{is} para os dois estimadores tiveram sua significância testada através do teste de χ^2 ($\chi^2 = F_{st} \times 2N (k-1)$; $\chi^2 = (F_{is})^2 \times N (k-1)$).

Para testar a existência de sub-estruturação em algumas populações e a representatividade destas amostras como populações, utilizou-se o programa Structure (PRITCHARD, 2000) para o cálculo da probabilidade do número de populações amostradas.

4.RESULTADOS

4.1 Amostragem

Foram coletados, ao todo, 227 indivíduos, incluindo as amostras das seis populações (**Tabela 3**).

Tabela 3. Número de indivíduos amostrados por população.

População	Nº de indivíduos
Amaral	52
Weber	50
Maribo A	50
Maribo B	38
Guarita	18
Gaivota	19
Total	227

4.2 Análise Molecular

4.2.1 Características dos *Loci* Analisados:

Todos os quatro *loci* analisados mostraram-se polimórficos, apresentando um total de 27 alelos diferentes. Na **Tabela 4** são encontrados os números de alelos para cada *locus* e a variação de seus tamanhos.

Tabela 4. Número de alelos obtidos para cada *locus* e variação do tamanho em pares de base para os alelos de cada *locus*.

<i>Locus</i>	Nº de alelos	Varição no Tamanho dos alelos em pb
Hai 2	5	168-176
Hai 3	10	150-162
Hai 4	7	154-176
Hai 12	5	126-140

O número de alelos por *locus*, quando analisado em cada população, mostrou-se variável (**Tabelas 5, 6, 7, 8, 9, e 10**).

Considerando-se os quatro *loci*, Maribo A foi a população com maior número de alelos: 22, e a população com menor número foi Weber com 17 diferentes alelos.

As freqüências alélicas mostraram relação com as áreas de estudo, especialmente para os alelos Hai4 e Hai2. Os alelos 160pb e 164pb do *locus* Hai3 não foram observados na população de Gaivota, porém ocorreram em todas as populações ao Sul do Rio Mampituba. Já os alelos 168pb e 172pb do *locus* Hai2 só foram encontrados nas populações de Torres e Gaivota, área Norte de nossa amostragem (**Figuras 6, 7, 8 e 9**). Apenas um alelo exclusivo foi encontrado, com 150pb para o *locus* Hai3 na população de Gaivota.

Tabela 5. Número de alelos para cada *locus*, tamanhos dos alelos em pares de bases e Heterozigosidade observada (Ho) e Esperada (He) para cada *locus* na população do Campo Amaral.

<i>Locus</i>	Nº de alelos	Tamanho dos alelos em pb	Ho	He
Hai2	3	170-172-174	23	24.16
Hai3	6	154-156-158-160-162-164	13*	38.49
Hai4	5	154-158-168-170-176	12*	28.55
Hai12	5	126-131-134-137-140	15*	37.52

*Desvio significativo $p < 0,01$

Tabela 6. Número de alelos para cada *locus*, tamanhos dos alelos em pares de bases e Heterozigosidade observada (Ho) e Esperada (He) para cada *locus* na população do Campo Weber.

<i>Locus</i>	Nº de alelos	Tamanho dos alelos em pb	Ho	He
Hai2	3	170-172-174	8*	23.98
Hai3	5	154-156-158-160-162	15*	35.63
Hai4	4	158-168-170-176	13*	26.11
Hai12	5	126-131-134-137-140	11*	38.58

*Desvio significativo $p < 0,01$

Tabela 7. Número de alelos para cada *locus*, tamanhos dos alelos em pares de bases e Heterozigosidade observada (Ho) e Esperada (He) para cada *locus* na população Maribo A.

<i>Locus</i>	Nº de alelos	Tamanho dos alelos em pb	Ho	He
Hai2	3	170-172-174	4*	24.43
Hai3	8	154-156-158-160-162-164-166-168	10*	38.23
Hai4	6	154-156-158-168-170-176	24*	31.66
Hai12	5	126-131-134-137-140	13*	33.06

*Desvio significativo $p < 0,01$

Tabela 8. Número de alelos para cada *locus*, tamanhos dos alelos em pares de bases e Heterozigosidade observada (Ho) e Esperada (He) para cada *locus* na população Maribo B.

<i>Locus</i>	Nº de alelos	Varição de tamanho dos alelos	Ho	He
Hai2	2	170-172	1*	11.95
Hai3	7	152-154-158-160-162-164-168	8*	28.32
Hai4	5	154-158-168-170-176	15*	26.56
Hai12	5	126-131-134-137-140	8*	27.55

*Desvio significativo $p < 0,01$

Tabela 9. Número de alelos para cada *locus*, tamanhos dos alelos em pares de bases e Heterozigosidade observada (Ho) e Esperada (He) para cada *locus* na população de Torres.

<i>Locus</i>	Nº de alelos	Tamanho dos alelos em pb	Ho	He
Hai2	5	168-170-172-174-176	3*	10.96
Hai3	5	158-160-162-164-166	4*	11.79
Hai4	4	156-168-170-176	1*	7.68
Hai12	5	126-131-134-137	1*	5

*Desvio significativo $p < 0,01$

Tabela 10. Número de alelos para cada *locus*, tamanhos dos alelos em pares de bases e Heterozigosidade observada (Ho) e Esperada (He) para cada *locus* na população da Praia da Gaivota.

<i>Locus</i>	Nº de alelos	Tamanho dos alelos em pb	Ho	He
Hai2	5	168-170-172-174-176	14	11.72
Hai3	6	150-152-154-156-158-162	5*	12.75
Hai4	4	168-170-172-176	3*	11.78
Hai12	5	126-131-134-137-140	8*	13.48

*Desvio significativo $p < 0,01$

Desvios significativos entre a heterozigosidade observada e esperada para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram encontrados no teste global, quando analisadas todas as populações em conjunto, bem como quando incluídos todos os *locus* ($p=0$). Para o teste de cada *locus* e cada população em separado, houve a indicação de déficit de heterozigotos em todas as situações, com exceção do *locus* Hai2 para as populações de Gaivota e Amaral ($p>0,05$).

O teste para existência de desequilíbrio de ligação indicou desequilíbrio entre os *locus* Hai4 e Hai2 nas populações de Torres e Weber ($P<0,05$).

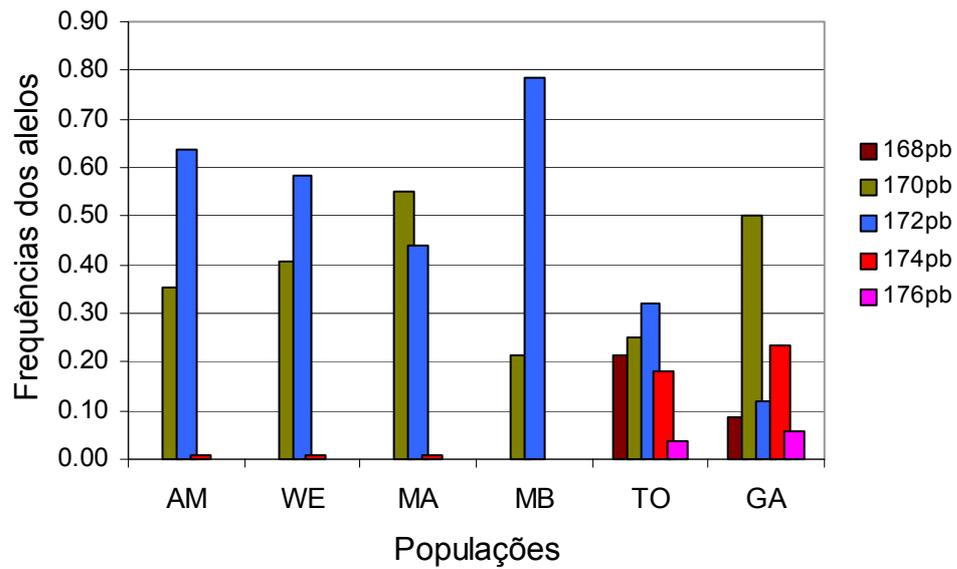


Figura 6. Frequência dos diferentes alelos para o *locus* Hai2 nas populações de Amaral (AM), Weber (WE), Maribo A (MA), Maribo B (MB), Torres (TO) e Guarita (GA).

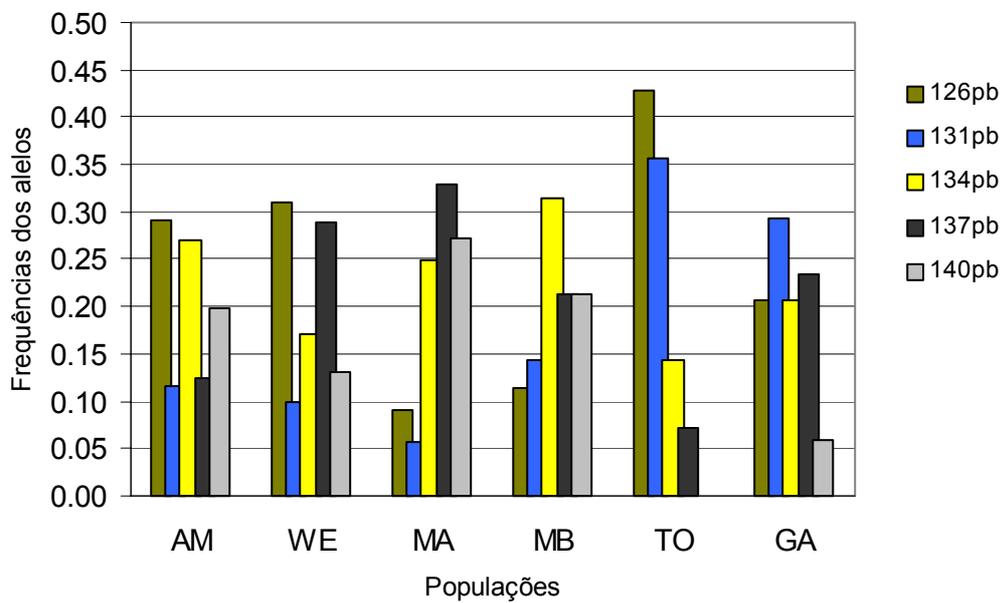


Figura 7. Frequência dos diferentes alelos para o *locus* Hai12 nas populações de Amaral (AM), Weber (WE), Maribo A (MA), Maribo B (MB), Torres (TO) e Guarita (GA).

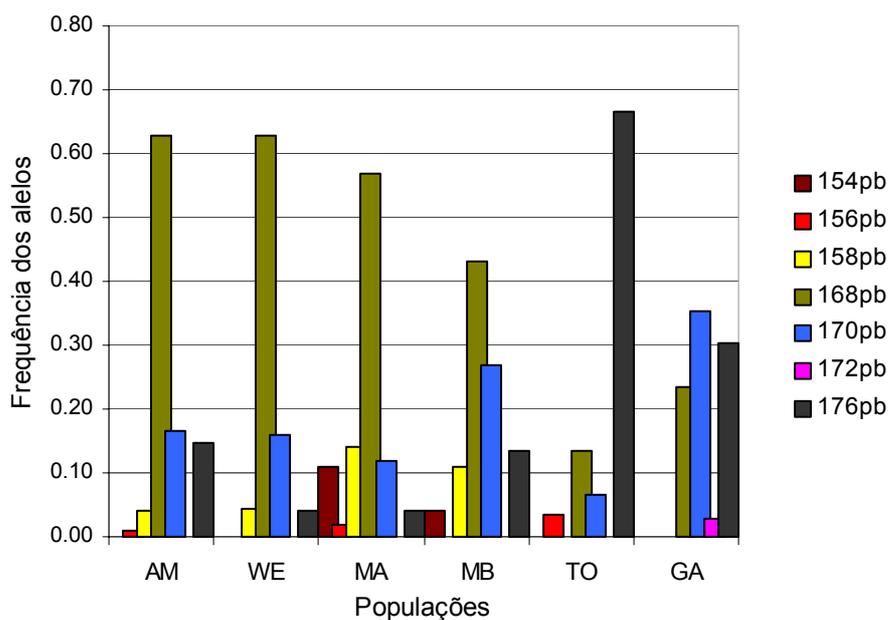


Figura 8. Frequência dos diferentes alelos para o *locus* Hai4 nas populações de Amaral (AM), Weber (WE), Maribo A (MA), Maribo B (MB), Torres (TO) e Guarita (GA).

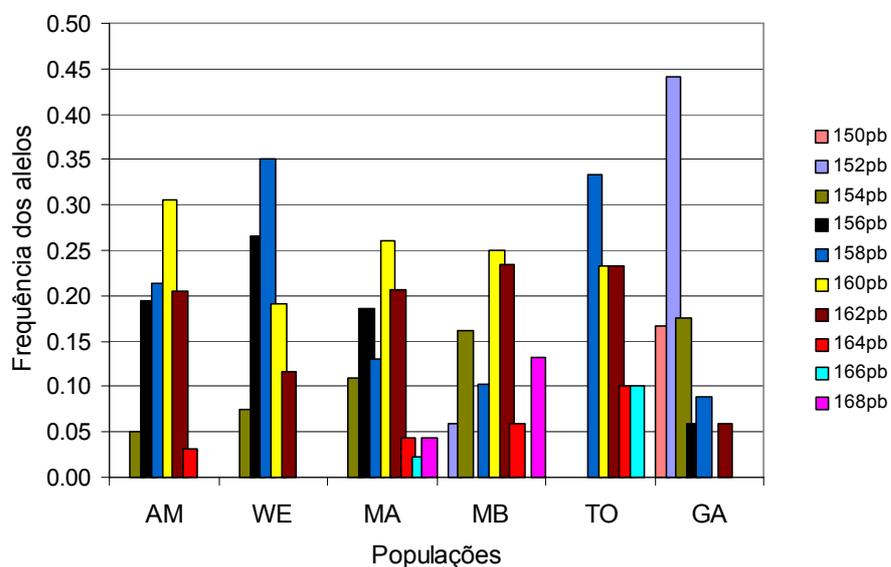


Figura 9. Frequência dos diferentes alelos para o *locus* Hai3 nas populações de Amaral (AM), Weber (WE), Maribo A (MA), Maribo B (MB), Torres (TO) e Guarita (GA).

4.2.2 Estrutura Populacional

A análise da estrutura populacional foi realizada através da Estatística F (WHRIGHT, 1965) usando dois de seus estimadores F_{st} (WEIR & COCKERAM, 1984) e Rho_{st} (ROUSSET, 1996).

Quando consideradas todas as populações, observou-se valores de $F_{st}=0,1323$ e $Rho_{st}=0,3636$ ($p<0,05$).

Para ambos os estimadores, considerando-se apenas as populações mais próximas entre si, a estruturação mostrou-se mais forte entre as populações de Gaivota e Torres (0,0739 e 0,3770 respectivamente), sendo significativa apenas o valor obtido para Rho_{st} ($p<0,05$). Os menores valores de F_{st} e Rho_{st} , não diferentes de zero (0,0021 e -0,0062 respectivamente; não significantes) foram obtidos entre as populações de Weber e Amaral, que margeiam a RS030.

Para as populações da Fazenda Maribo existe maior concordância entre os diferentes estimadores, com valor de F_{st} de 0,0455 e Rho_{st} de 0,0407 ($p>0,05$; não significativa) (**Tabela 11 e 12**).

Tabela 11. Valores de F_{st} (WEIR & COCKERAM, 1984) entre os pares de populações.

	Amaral	Weber	Maribo A	Maribo B	Torres
Weber	0.0021				
Maribo A	0.0248	0.0267			
Maribo B	0.0228	0.0509	0.0455		
Torres	0.1014	0.1001	0.1433	0.1196	
Gaivota	0.1440	0.1298	0.1218	0.1372	0.0739

Tabela 12. Valores de Rho_{st} (ROUSSET, 1996) entre os pares de populações.

	Amaral	Weber	Maribo A	Maribo B	Torres
Weber	-0.0062				
Maribo A	0.1400	0.1687			
Maribo B	0.0242	0.0575	0.0407		
Torres	0.1945	0.2086	0.4248	0.2588	
Gaivota	0.2788	0.2129	0.4149	0.3320	0.3770

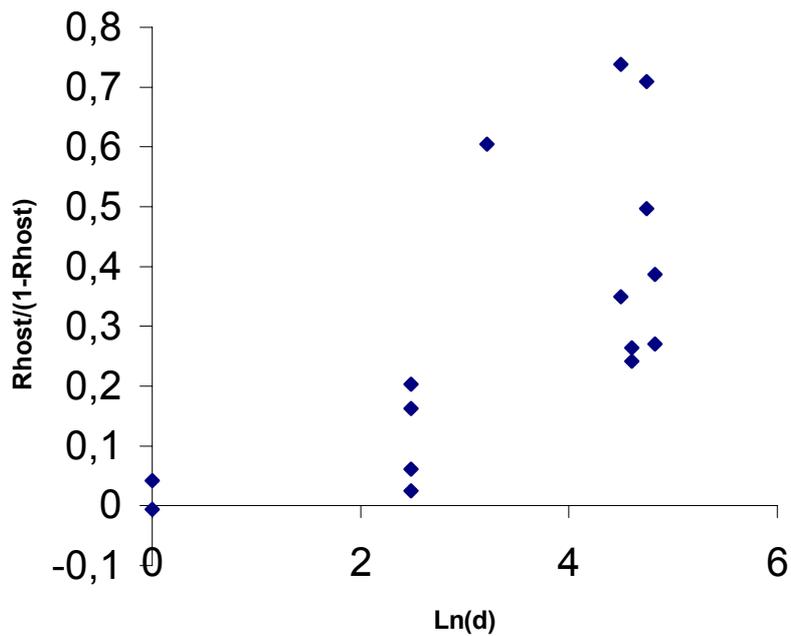


Figura 10. Isolamento pela distância ($p=0,025$ para o Teste de Mantel).

Quando analisados os valores do parâmetro Rho_{st} em relação à distância entre as populações (**Figura 10**), o resultado mostra-se concordante com o padrão de isolamento pela distância ($p > 0,01$, valores significantes para o Teste de Mantel) (SLATKIN, 1993).

O fluxo gênico calculado através do método dos alelos privados (SLATKIN, 1985; BARTON & SLATKIN, 1986) mostrou-se mais confiável, já que houve superestimativa quando usado o cálculo do número de migrantes a partir de F_{st} e Rho_{st} (WRIGHT, 1951) com valores de $Nm > 40$ entre as populações de Weber e Amaral.

Entre as duas populações da Fazenda Maribo o número de migrantes calculado foi de 1,629 indivíduos/geração. Para as populações que margeiam a RS 0.30, Weber e Amaral, obteve-se o maior número de migrantes, sendo de 6,331 indivíduos/geração. A ausência de fluxo gênico foi indicada apenas entre as populações de Torres e Gaivota ($Nm = 0.42$).

Dada a existência de fluxo gênico entre Maribo A – Maribo B e Weber – Amaral, foi estimado o número de migrantes entre estes blocos, considerando-se cada par de populações como uma população. O valor encontrado foi de 1.082 indivíduos/geração.

O parâmetro F_{is} , usado como índice de endocruzamento revelou valores considerados altos para os dois estimadores usados, conforme mostrado na **Tabela 14**.

O teste para estimar o número de populações amostradas (PRITCHARD, 2000) revelou para a população de Weber uma maior probabilidade de existência para quatro populações, com $P = 0,9$, sendo $P = 6,47555^{-65}$, $p = 3,48744^{-21}$ e $p = 5,53114^{-6}$ para uma, duas e três populações existentes respectivamente.

Tabela 13. Valores de F_{is} (WEIR & COCKERAM, 1984) e de Rho_{is} (ROUSSET, 1996), para cada *locus* e para os *locus* em conjunto, considerando todas as populações.

	Hai2	Hai3	Hai4	Hai12	Todos os <i>loci</i>
F_{is}	0,5087*	0,6704*	0,4898*	0,6427*	0,5911*
Rho_{is}	0,4440*	0,8448*	0,4887*	0,8030*	0,6749*

*Desvio significativo $p < 0,01$

.

Tabela 14. Valores de F_{is} (WEIR & COCKERAM, 1984) e de Rho_{is} (ROUSSET, 1996), para os *locus* em conjunto, considerando cada população.

	F_{is}	Rho_{is}
Amaral	0,5166*	0,6809*
Weber	0,6225*	0,7912*
Maribo A	0,6077*	0,6364*
Maribo B	0,6682*	0,6334*
Torres	0,7619*	0,8280*
Gaivota	0,4045*	0,4594*

*Desvio significativo $p < 0,01$

O mesmo teste realizado para as duas populações da Fazenda Maribo em conjunto, indicou a probabilidade de existência de cinco populações nesse bloco, com $P=0,9999$.

Testados os pares de amostras de Weber - Amaral e Gaivota - Torres, a probabilidade de existência de duas populações é de $p=1$ para os dois casos.

5.DISSCUSSÃO

5.1 Características dos *Locí* Analisados e das Populações como Unidades Distintas

Os *loci* de microssatélites utilizados neste trabalho mostraram-se bastante polimórficos (Hai₂=5, Hai₃=10, Hai₄=7 e Hai₁₂=5 alelos). GAVA (2001), usando os mesmos *loci*, obteve polimorfismo semelhante (Hai₂=5, Hai₃=10, Hai₄=12 e Hai₁₂=9) para uma zona híbrida na distribuição de *C. minutus* e ainda maior quando analisados indivíduos de vários cariótipos diferentes. A variabilidade observada confirma a aplicabilidade destes *loci* na análise genética de populações desta espécie.

O teste realizado para verificar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg revelou deficiência de heterozigotos em praticamente todos os *loci* de todas as populações ($p < 0,05$), e assim também em relação ao teste global, quando analisadas em conjunto as populações, os *loci* ou ambos ($p = 0$).

Para duas espécies de *Ctenomys*, *C. lami* (um *locus*) e *C. flamarioni* (quatro *loci*) foram verificados déficits de heterozigotos em alguns *loci* de microssatélites nos trabalhos de CASTILHO (2001) e FERNANDEZ (2002), respectivamente. Em outras espécies de vertebrados, quando utilizado este marcador, também verificou-se o mesmo. Como exemplo, obtiveram tal desvio, NEWMAN & SQUIRE, (2001) para *Rana sylvatica*, BLUNDELL e cols. (2002) para *Lontra canadensi*, GOOSSENS e cols. (2001) para *Marmota marmota*, WYTTENBACH e cols., (1999) para *Sorex araneus*, PAETKAU e cols. (1998) para *Ursus arctos* e LEON e cols. (1997) para *Dicentrarchus labrax*.

A deficiência no número de heterozigotos em populações naturais pode ser atribuída a diversas causas: cruzamento preferencial, sub-estruturação da população, endocruzamento,

existência de alelos nulos, seleção contra o heterozigoto ou efeito Wahlund.

A sub-estruturação ocorre quando uma população natural é composta de várias unidades de cruzamento distintas. Nestes casos, quando considerada toda a população como unidade panmítica, déficit de heterozigotos em relação ao número esperado podem ser observados para a população como todo, mesmo que cada sub-população encontre-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta propriedade é conhecida como efeito Wahlund e é determinada simplesmente pelo efeito de amostragem (NEI, 1987). Um parâmetro bastante informativo na análise de sub-estruturação, bem como da existência de endocruzamento é o F_{is} , cujos valores, quando elevados, indicam a presença destas características.

Em nossas amostras os valores desse parâmetro, para os dois estimadores utilizados, apresentaram valores significativos e considerados altos para todos os *loci* (0,59 e 0,67 respectivamente), bem como para cada *locus* em particular.

Observando a distribuição das populações estudadas, temos amostras grandes para a Região de Osório (38-52 indivíduos) provenientes de uma área extensa de coleta em cada ponto. É provável que, para estas populações, os altos valores de F_{is} indiquem sub-estruturação e justifiquem a baixa heterozigosidade causada por efeito Wahlund. Já para as populações de Torres e Gaivota pode-se considerar a hipótese de endocruzamento (que justificaria os valores altos de F_{is} e de baixa heterozigosidade), devido ao menor número de indivíduos analisados, correspondente a uma menor área da população. Estes indivíduos amostrados podem representar uma única unidade familiar para cada localidade.

Acerca desta questão, é bastante esclarecedora a análise efetuada através do teste para a probabilidade do número de populações amostradas em cada área (PRITCHARD, 2000). As populações da fazenda Maribo, quando testadas em conjunto,

mostram uma alta probabilidade de estarem subdivididas em cinco unidades ($P=0,9999$). O efeito é também indicado na análise de uma única população, Weber, cujos resultados indicam a existência de quatro subunidades ($P=0,9$).

Algumas características atribuídas aos tuco-tucos como sedentarismo e baixa vagilidade podem propiciar a formação de sub-estruturas populacionais correspondentes a grupos aparentados.

Considerando as outras possíveis causas no desvio ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, a hipótese de cruzamento preferencial parece pouco provável já que não existem indícios de tal comportamento para estes animais.

A seleção contra o heterozigoto, a princípio, não deve ser assumida, dado que os microssatélites são considerados neutros. No entanto, SLATKIN (1995) demonstrou a possibilidade de ligação entre *locus* de microssatélites e *locus* sobre efeito de seleção diminuindo os níveis de variabilidade do marcador.

A possibilidade de ocorrência de alelos nulos não deve ser totalmente descartadas, já que sua exclusão depende de análises mais detalhadas. A adição de informações referentes a um número maior de *loci* à este estudo pode diluir este efeito se ele for verdadeiro.

Quando se testa a existência de desequilíbrio de ligação entre dois *loci*, resultados positivos podem ser tanto indicadores de ligação real quanto artefatos da análise (OTHA, 1982). Para as populações analisadas neste trabalho, apenas os *locus* Hai2 e Hai4 nas populações de Torres e Amaral obtiveram indicação de ligação ($p<0,05$). Tais *locus* não apresentaram indícios de ligação em trabalho anterior para a mesma espécie (GAVA, 2001). Segundo OTHA (1982) a sub-estruturação de populações e o endocruzamento podem produzir esta indicação, assim, para Amaral e Torres a ocorrência de tais eventos, conforme discutido anteriormente, explicariam os resultados.

5.2 Estruturação entre as Populações

Um grande número de diferentes estimadores para estruturação genética entre populações tem sido desenvolvidos baseados na Estatística F de WHRIGT (1965). A adequação destes cálculos ao uso de dados provenientes de microssatélites como marcadores moleculares é ainda uma questão controversa.

A complexidade do processo evolutivo que origina os polimorfismos nos microssatélites, e a variação deste processo entre diferentes *loci* (GAGGIOTTI e cols, 1999), são os principais fatores responsáveis pela diferença na performance dos diversos estimadores. Dois modelos de processo mutacional são propostos para estes marcadores: o modelo IAM (infinitos alelos)(KIMURA e WEISS, 1964) e o modelo SMM (mutação escalonada)(OTHA e KIMURA, 1973). O primeiro assume que cada nova mutação dá origem a um novo alelo, e o segundo considera a ocorrência de homoplasias. Tanto estimadores que assumem IAM quanto os que assumem SMM tem sido utilizados nas análises populacionais através de microssatélites, não havendo consenso acerca do melhor desempenho.

Influem também na aplicabilidade dos estimadores o tamanho da amostra e os níveis de fluxo gênico (GAGGIOTTI e cols., 1999).

Para nosso estudo, foram usados dois estimadores: F_{st} (WEIR E COCKERAM, 1984) que assume AIM, e Rho_{st} (ROUSSET, 1996) que assume SMM. Os resultados apenas diferiram consideravelmente em relação às populações de Torres e Gaivota, sendo $F_{st} = 0,07$ e $Rho_{st} = 0,32$.

GAGGIOTTI e cols. (1999) sugerem o uso do pressuposto de SMM para análise de amostras grandes ($N > 50$), como a usada em neste trabalho ($N = 227$). Porém, a determinação exata do melhor indicador exigiria o conhecimento da taxa real de mutação de cada *locus*, o que depende de sua sequência, tamanho de repetição e da

região flaqueadora (WYTTENBACH e cols., 1999, NIELSEN & PALSBOELL, 1999).

Através dos testes de estrutura genética se obteve um alto valor para Rho_{st} (0,3636) e médio para F_{st} (0,1323), o que sugere um forte isolamento entre as populações estudadas, considerando os índices determinados por NEI (1978) ($F_{st} < 0,05$ baixo, $0,05 < F_{st} < 0,15$ médio e $F_{st} > 0,15$ alto)

Os valores de F_{st} e Rho_{st} quando analisadas as populações par a par indicam grau variável de isolamento entre elas, concordante com o modelo de isolamento pela distância e a existência de uma barreira geográfica, o Rio Mapituba. As frequências alélicas bastante relacionadas às regiões estão reproduzidas em tais resultados. Avaliando a significância obtida para cada valor de F_{st} , apenas o valor de Rho_{st} entre Torres e Gaivota se mostra significativa, não diferindo os demais de zero. Assim, não há estruturação entre Weber e Amaral, existe uma tendência a estruturação entre Maribo A e B, e estruturação alta entre Torres e Gaivota quando considerado Rho_{st} .

Na estimação do número de migrantes, no entanto, o cálculo a partir de F_{st} e Rho_{st} mostrou-se pouco confiável, superestimando os resultados. O número de migrantes obtido através do método de alelos privados (BARTON & SLATKIN, 1996) mostrou-se mais aplicável nesta análise, como sugerido para microssatélites em situações de baixas taxas de migração (GAGGIOTTI e cols, 1999).

5.3 Isolamento, Fluxo Gênico e Efetividade das Barreiras

O maior índice de isolamento quando tomadas as populações próximas deste trabalho par a par é encontrado entre as populações de Torres e Gaivota, sendo $F_{st} = 0,0739$ e $Rho_{st} = 0.3770$.

O número de migrantes entre estas populações não é efetivo, sendo de 0,42 indivíduos/geração. Na discussão acerca da causa deste isolamento seria possível considerar o efeito da distância entre estas populações (25Km) como sendo o determinante principal da ausência de fluxo gênico. Tal fato parece menos relevante quando consideramos os valores de $Nm = 1,082$ encontrados entre os blocos Maribo X Weber/Amaral que encontram-se separados por uma extensão de 12Km.

Assim, a despeito de sua origem recente e de seu histórico de modificações da posição do leito à jusante, o Rio Mampituba é indicado por nossos resultados como barreira efetiva ao fluxo gênico entre populações de *Ctenomys minutus*. Embora as populações de lados opostos apresentem os mesmos cariótipos ($2n = 46a$) e o rio não represente uma barreira quando da análise filogenética para os cariótipos da espécie (FREYGANG, 2002), a separação pôde ser evidenciada pelo uso de marcadores afetados por curtos períodos de tempo, como os microssatélites.

A alta probabilidade da existência de duas populações ($p = 1$) quando testadas as amostras de Torres e Gaivota para a probabilidade do número de populações, corrobora a indicação.

A análise de estruturação entre as populações Maribo A e Maribo B indica baixo isolamento entre estas e fluxo gênico da ordem de 1,629 indivíduos/geração. Segundo MILLS & ALLENDORF (1996), valores de $Nm > 1$ são suficientes para evitar a diferenciação genética das populações e prevenir a deriva genética. Estes dados são condizentes com as características da área, sendo que não há

barreira visível entre as duas populações e ambas distam entre si em apenas 700 metros.

As populações da Fazenda Maribo encontram-se separadas das populações das margens da RS 030 por uma extensão aproximada de 12 Km, área para a qual não se tem relatos acerca da existência de populações de tuco-tucos. O cálculo do número de migrantes entre estes blocos indicou a existência de fluxo gênico, sendo da ordem de 1,082 indivíduos/geração, sugerindo que esta área apresente um contínuo na distribuição das populações de *Ctenomys minutus*.

Os dados acima discutidos comparados aos obtidos para as populações de Weber e Amaral servem como indicadores do efeito da RS 030 sobre estas populações de tuco-tucos.

Os valores de F_{st} e Rho_{st} encontrados mostraram-se os menores entre as populações estudadas (0,0021 e -0,0062, respectivamente) e conseqüentemente os níveis de fluxo gênico apresentaram-se altos, sendo de 6,333 indivíduos/geração.

A efetividade da barreira, a princípio fica descartada, porém algumas considerações se fazem necessárias. Apesar dos microssatélites permitirem a identificação de modificações genéticas entre populações em curtos períodos, devido à sua neutralidade e altas taxas de mutação, o tempo de uso da RS 030 (aproximadamente 80 anos) é possivelmente muito curto para modificar as freqüências dos alelos deste marcador nas populações. No entanto, os resultados encontrados, quando comparados aos obtidos para Maribo A e Maribo B mostram-se bons indicadores da distribuição inicial destas duas populações. A homogeneidade de freqüências que determina os valores baixos de isolamento e altos de fluxo gênico, pode sugerir a existência de uma única população inicial que se apresenta atualmente dividida pela RS 030. Os microssatélites, neste caso, podem ser melhores indicadores da história destas populações do que de níveis atuais de fluxo gênico.

Ainda considerando o impacto da RS 030, HEUSER e cols. (*in press*), estudando as populações tuco-tucos de Weber e Amaral relataram um aumento no índice de danos de DNA nos indivíduos e atribuíram estes resultados à presença de poluentes produzidos pelos automóveis.

BICKHAM e cols. (2000) indicaram como efeito mais comum da poluição ambiental sobre a estrutura genética de populações a queda de variabilidade da mesma. Para o diagnóstico de tal quadro, ELLEGREN e cols. (1997) utilizou microssatélites para a análise de populações de aves de uma área da Ucrânia atingida pela contaminação nuclear no acidente de Chernobyl.

Embora não tenhamos realizado análise mais específicas, não há indicação de queda de variabilidade genética nestas populações, dado que os índices de polimorfismo gênico e heterozigosidade são concordantes com os encontrados para outras populações de *C.minutus*, tanto neste trabalho quanto no realizado por GAVA (2001).

6.RESUMO E CONCLUSÕES

O gênero *Ctenomys* (família Ctenomyidae) compreende 50 a 60 espécies de animais conhecidos popularmente como tuco-tucos. De hábito fossorial, este grupo representa os mamíferos dominantes na exploração do nicho subterrâneo na Região Neotropical.

A distribuição das espécies é bastante fragmentada, influenciada por vários fatores limitantes como barreiras ecológicas e geográficas. Seu pequeno poder de dispersão (baixa vagilidade) causa uma restrição ao fluxo gênico.

Ctenomys minutus, a espécie alvo deste trabalho, habita campos arenosos e dunas da Planície Costeira do Sul do Brasil, do Rio Grande do Sul até Santa Catarina. Uma interessante característica da espécie é a ampla variação cariotípica, apresentando onze diferentes cariótipos. A fixação destes polimorfismos, bem como a distribuição desta espécie, estão amplamente relacionada a história de formação geológica da região que habita, especialmente a existência de barreiras geográficas.

Atualmente, cruzando a área norte de sua distribuição encontram-se a rodovia RS 030, uma via de ligação do interior do estado ao litoral, e o Rio Mampituba, uma barreira geográfica de origem recente.

A fim de entender os níveis de fluxo gênico entre populações de *Ctenomys minutus* e testar a efetividade destas barreiras, este trabalho utilizou quatro *loci* de microsatélites como marcadores moleculares na determinação da estrutura genética das populações.

Foram selecionados seis locais de estudo correspondentes a seis populações ao longo da distribuição da espécie. Quatro pontos estão próximos ao Município de Osório e correspondem a duas populações que margeiam a RS 030, Campo Amaral e Campo Weber, ambos situados a uma distância de menos de 100 metros em lados

opostos da rodovia (distantes entre si em 1Km), e a Maribo A e Maribo B, populações sem barreira aparente entre si (afastadas em 700m). Outros dois locais estão localizados nos municípios de Torres (RS) e Sombrio (SC) correspondendo as populações do Parque da Guarita e da Praia da Gaivota, respectivamente. Estão separados pelo Rio Mampituba e distantes em 25Km.

A obtenção de um fragmento de pele da cauda para posterior extração de DNA foi realizada com a captura dos animais (auxílio de armadilhas do tipo oneida-vitor nº0), retirada do material e devolução dos animais vivos à toca de origem. A amostra contou com 227 indivíduos, sendo 50 para a população de Weber, 50 para Maribo A, 52 para Amaral, 38 para Maribo B, 19 para Gaivota e 18 para Torres.

Na amplificação dos quatro *loci* de microssatélites foram empregados *primers* descritos para a espécie co-genérica *C. haigi*, obtendo-se ao todo 27 diferentes alelos. A análise das frequências destes alelos indicou subestruturação populacional nas amostras através de altos valores de F_{st} baixa heterozigosidade observada e alta probabilidade de subdivisão na análise para a probabilidade do número de populações.

Os valores de F_{st} revelaram isolamento entre as populações e, analisados em relação a disposição geográfica entre os locais de coleta, mostraram um padrão de isolamento pela distância.

Foram também avaliadas as populações par a par para determinação do isolamento entre elas e níveis de fluxo gênico. Quando analisadas Maribo A e Maribo B observou-se baixo isolamento, com níveis de fluxo da ordem de 1,082 indivíduos/geração para estas populações não separadas por barreiras. Os resultados obtidos para a análise de Torres e Gaivota foram indicadores de alto isolamento, com número de migrantes não efetivo. Para Weber e Amaral obteve-se a menor estruturação, sendo o número de migrantes de 6,33 indivíduos por geração.

Acerca destes resultados fica evidenciada a efetividade do Rio Mampituba como barreira ao fluxo gênico entre as populações de *Ctenomys minutus* de lados opostos de suas margens.

Para a RS 030, não houve indicação de sua efetividade como barreira ao fluxo gênico, nem de queda na variabilidade genética das populações próximas quando comparadas às demais populações. Os valores de F_{st} e número de migrantes, no entanto, sugerem a existência de uma única população inicial atualmente dividida pela presença da rodovia.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The genus *Ctenomys* (Ctenomyidae family) comprises 50 to 60 species, which animals are popularly known as tuco-tucos. With fossorial habits, this group represents the dominating mammals on the exploration of the subterranean niche in the Neotropical region.

The distribution of these species is largely patchy, with the influence of several limiting factors like ecological and geographical barriers. This species has low power of dispersion (low vagility) which causes a restriction of gene flow.

Ctenomys minutus, the target species of this work, inhabits sandfields and dunes in the Coastal Plains of South Brasil, from the Rio Grande do Sul to the Santa Catarina States. An interesting characteristic of this species is the large karyotype variation, which has eleven distinct karyotypes. This polymorphism fixation and species distribution are closely related to the history of geology formation in the region, as well as to geographical barriers.

Nowadays, the geographic distribution of *C. minutus* is crossed by the RS 030 road, a route that connects the inlands of the State to the shore, and by the Mampituba river, a recent geographical barrier.

In order to understand the gene flow levels between populations of *Ctenomys minutus* and to examine the effectivity of this barriers, this work were conducted using four *loci* of microsatélites as molecular markers to determine the genetic structure of the populations.

Six study sites were selected with six populations distributed along the species' distribution. Four localities are near to the City of Osório: two populations are in the RS 030 border, Amaral Field and Weber Field, both situated less than 100 meters of the road, but in opposite sites with a distance of 1Km between each other; the Maribo A and Maribo B, populations do not have barriers between them and are about 700m from each other. The other two localities are Parque

da Guarita and Praia da Gaivota, in Torres (RS), and Sombrio (SC), respectively. These sites are separated by Rio Mampituba with a distance of 25 km from each other.

The field work was conducted as a capture and release process of animals, with Oneida-Victor no. 0 traps. From each animal a skin biopsy was obtained from the tail for extracting DNA. The total sample is constituted by 227 animals, 50 in the Weber population, 50 in the Maribo A, 52 in the Amaral, 38 in Maribo B, 19 in Gaivota and 18 in Torres.

In the amplification of four microsatellites' loci, primers designed for a species of the same genus, *C. haigi*, were used, and a total of 27 distinct alleles was obtained. The analysis of frequencies of this locus indicated a substructure in the populations due to large values of F_{IS} , low values of heterozygosity, and high probability of subdivision, in the probabilistic analysis of the number of populations. The F_{ST} values analyzed in relation to geographic distribution, showed isolation of populations by distance.

The populations were also analyzed in pairs to determine of isolation and levels of gene flow. For Maribo A e Maribo B, which are not separated by any barrier, we obtained low isolation with gene flow level of 1,082 individuals/generation. The results obtained for the analysis of populations from Torres and Gaivota showed high isolation with few individuals migrating from one population to the other. For the populations in Weber and Amaral, we obtained less structure, with the numbers of migrating individuals as 6.333 individuals/generation.

Regarding the obtained results, there is a clear evidence of the effectiveness of the Mampituba River as a barrier for gene flow between populations of *Ctenomys minutus* inhabiting both margins.

For the RS 030, there is no indication of its effective as a barrier to gene flow. Also, there is no evidence of any diminishing factor in the genetic variability of near populations when compared to distant ones. Values of F_{ST} and the number of migrating individuals, however,

suggest the existence of a single initial population, which was recently divided by the road.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTUNA, A.C.; FRANCESCOLO, G.; TASSINO, B. & IZQUIERDO, G.E., 1999. Ecoetologia y Conservacion de Mamíferos Subteraneos de Distribuição Restringida: el Caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontinae) en el Uruguay. **Etologia**, 7:47-54.
- AMOS, W. E. & HARDWOOD, J., 1998. Factors Affecting Levels of Genetic Diversity in Natural Populations. **Philosophy Transaction Royal Society London of Biology**, 353: 77-186.
- APFELBAUM, L.I.; MASSARINI, A.I.; DALEFFE, L.H. & REIG, O.A., 1991. Genetic Variability in Subterranean Rodents *Ctenomys australis* and *Ctenomys porteousi* (Rodentia: Octodontidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 19: 467-476.
- AVISE, J.C., 1994. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman & Hall. New York.p 511.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. & HAUSSER, J., 2000. Estimating Genetic Flow Across Hybrid Zones: How Reliable Are Microsatellite? **Acta Theriologica**, 45: 93-101.
- BARTON, N.H.; & SLATKIN, M., 1986. Quasi-Equilibrium Theory Of The Distribution Of A Rare Alleles In A Subdivides Population. **Heredity**,56: 409-415.
- BICKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L. & ATHWAL, R., 2000. Effects of Chemical Contaminants on Genetic Diversity in Natural Populations: Implications for Biomonitoring and Ecotoxicology. **Mutation Research**, 463: 33-51.

- BLUNDEL, G.M.; DAVID, M.B.; GROVES, R.T.; BOWYER, R.T. & GEFFEN, E., 2002. Characteristics Of Sex-Biased Dispersal And Gene Flow In Coastal River Otters: Implications For Natural Recolonization Of Extirpated Populations. **Molecular Ecology**, 11: 289-303.
- BORRUEL, N.; CAMPOS, C.M.; GIANNONI, S.M. & BORGHI, A., 1998. Effects Of Herbivorous Rodents (Cavies And Tuco-Tucos) On A Shrub Community In The Monte Desert, Argentina. **Journal of Arid Enviroments**, 39: 33-37.
- BRAGGIO, E.; GIMENEZ, M.D.; CONTRERAS, J.R.; JUSTO, E. & BIDAU, C.J., 1999. Karyotypic Variation in Populations of *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from La Pampa Province (Argentina). **Caryologia**, 52: 131-140.
- BRODERS, H.G.; MAHONEY, S.P.; MONTEVECCHI, W.A. & DAVIDSON, W.S., 1999. Population genetic structure and the efect of founder events on the genetic variability of moose, *Alces alces*, in Canada. **Molecular Ecology**, 8: 1309-1315.
- BUSCH, C.; ANTINUCHI, C.D.; DEL VALLE, J.C.; KITTLEIN, M.J.; MALIZIA, A.I.; VASSALLO, A.I. & ZENUTO, R.R., 2000. Population Ecology of Subterranean Rodents. In: LACEY, E.A.; PATTON J.L. & CAMERON, G.N. (eds.) **Life Underground. The Biology of Subterranean Rodents** Chicago: The University of Chicago Press p.183-226.
- CASTILHO, C.S., 2001. Análise de Microssátelite em Duas Zonas de Hibridação e a Efetividade de Uma Barreira Geográfica na Distribuição de *Ctenomys lami* (Rodentia, Octodontidae). **Curso de Ciências Biológicas, UFRGS**: Porto Alegre p 27.(Graduação)
- CLEVINGER, A.P.; CHRUSZCZ, B. & GUNSON, K.E., *in press*. Spatial Patterns And Factors Influencing Small Vertebrate Fauna Road-Kill Aggregations. **Biological Conservation**.

- COMPARATORE, V.M.; CID, M.S. & BUSCH, C., 1995a. Dietary Preferences In Two Sympatric Subterranean Rodent Populations In Argentina. **Revista Chilena de Historia Natural**, **68**: 197-206.
- COMPARATORE, V.M.; MACEIRA, N. & BUSCH, C., 1995b. Habitat Relationship In *Ctenomys talarum* (Caviomorpha, Octodontidae) In A Natural Grassland. **Zeitschrift für Säugetierkunde**, **56**: 112-28.
- CONTRERAS, J.R.; 1970. Bases Ecologicas Para el Control del Tucu-Tucu (*Ctenomys* sp). **Zoologica Platense**, **11**: 37-43.
- CONTRERAS, J. & MACEIRA, A.J., 1970. Relaciones Entre El Tuco-Tuco Y Los Processos Del Sueloen La Region Semiarida Del Sudoeste Bonaerense. **Agro**, **12**: 3-17.
- CONTRERAS, J.R. & REIG, O.A., 1965. Datos Sobre La Distribución Del Género *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) En La Zona Costera De La Provincia De Buenos Aires Comprendida Entre Necochea Y Bahía Blanca. **Physis**, **25**: 169-186.
- CONTRERAS, L. C.; TORRES-MURA, J. C. & YÁÑEZ, J. L., 1987. Biogeography of Octodontid Rodents: an Eco-Evolutionary Hypotesis. **Fieldiana Zoology**, **39**: 401-411.
- COOK, J.A.; ANDERSON, S. & YATES, T., 1990. Notes on Bolivian Mammals 6.The Genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the Highlands. **Americam Museum Novitates**, **2980**:315-320 .
- COOK, J.A. & LESSA, E.P., 1998. Are rates of diversification in subterranean South American Tuco-Tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) unusually high? **Evolution**, **52 (5)**: 1521-1527.

CUPERUS, R.; CANTERS, J.K.; HAES, H.A.U. & FRIEDMAN, D.S.H., 1999. Guidelines for Ecological Compensation Associated with Highways. **Biological Conservation**, 90:41-51.

DAER, 2002. Capturado: www.daer.rs.gov.br/w.estradas.html.

DALLAS J.F.; BACON, P.J.; CARSS, D.N.; CONROY, J.W.H.; GREEN, R.; JEFFERREIS, D.J.; KRUK, H.; MARSHALL, F.; PIERTNEY, S.B. & RACEY, P.A., 1999. Genetic Diversity In Eurasian Otter, *Lutra Lutra*, In Scotland. Evidence From Microsatellite Polymorphism. **Biological Journal of Linnean Society**, 68: 73-86.

DELANEY, P.J.V., 1965. **Fisiografia e Geologia da Superfície da Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Escola de Geologia da URS, Porto Alegre. Publicação Especial, n. 6, p 105.

D'ELIA, G.; LESSA, E.P. & COOK, J.A., 1998. Geographic Structure, Gene Flow, and Maintenance of Melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia, Octodontidae). **Zeitschrift Fur Saugtierkunde**, 63:285-296.

ELLEGREN, H.; LINDGREN, C.R.; PRIMMER, A.P.; MOLLER, G., 1997. Fitness loss and germline mutation in barn swallows breeding in Chernobyl. **Nature** 389:539-596.

FERNÁNDEZ, G.P., 2002. Análise de estrutura Populacional e da Variabilidade Genética em Três Populações de *Ctenomys flamarioni* (Rodentia, Ctenomyidae) Através de *loci* de Microsatélites. **Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular**, UFRGS; Porto Alegre. p 96. (Dissertação de Mestrado).

FORMAN, R.T.T. & ALEXANDER, L.E., 1998. Roads and their Major Ecological Effects. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 29:207-31.

- FRANCESCOLI, G., 1992. Aportes Al Estudio Sistemizado Y Analítico De La Comunicación Acústica En El Género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). **Actas de las III Jornadas Zoológicas del Uruguay**, 7:47-48.
- FRANCESCOLI, G., 1998. La Comunicación Acústica En Poblaciones De *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae) De Uruguay, Con Consideraciones Sobre El Uso Del Canal Vibratorio Por Los Roedores Subterráneos. **Pedeciba Biología (Zoología)**, Montevideo (Tesis Doctoral).
- FREITAS, T.R.O. & LESSA, E.P., 1984. Cytogenetics and Morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia-Octodontidae). **Journal of Mammalogy**, 65: 637-642.
- FREITAS, T.R.O., 1990. Estudos Citogenéticos e Craniométricos em Três Espécies do Género *Ctenomys*. **Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular**, UFRGS: Porto Alegre, p 102. (Tese de Doutorado).
- FREITAS, T.R.O., 1994. Geographical Variation of Heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia Octodontidae) and its Cytogenetic Relationship with other Species of the Genus. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 67: 193-198.
- FREITAS, T.R.O., 1995a. Geographic Distribution and Conservation of Four Species of the Genus *Ctenomys* in Southern Brazil. **Studies On Neotropical Fauna And Environment**, 30: 53-59.
- FREITAS, T.R.O., 1995b. Geographic distribution of sperm forms in the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). **Revista Brasileira de Genética**, 18: 43-46.
- FREITAS, T.R.O., 1997. Chromosome Polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia- Octodontidae). **Revista Brasileira de Genética**, 20: 1-7.

- FREITAS, T.R.O., 2001. Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in Southern Brazil: *Ctenomys lami* Spec. Nov. separated from *C. minutus*. **Studies On Neotropical Fauna And Environment**, 36: 1-8.
- FREYGANG, C.K., 2002. Variação Cromossômica Em *Ctenomys minutus* Ao Longo De Sua Distribuição Geográfica. **Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular**, UFRGS; Porto Alegre. P 90. (Dissertação de Mestrado)
- GAGGIOTTI, O.E.; LANGE, O.; RASSMAN, K. & GLIDDON, C. A., 1999. Comparison Of Two Indirect Methods For Estimating Average Levels Of Gene Flow Using Microsatellite Data. **Molecular Ecology**, 8: 1513-1520.
- GALLARDO, M., 1979. Las Especies Chilenas de *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae): Estabilidad Cariotipica. **Arch. Biol. Med. Exper**, 12: 71-82.
- GALLARDO, M.H. & ANRIQUE, J.A., 1991. Populational parameters and burrow systems in *Ctenomys maulinus brunneus*. **Medio Ambiente**, 11: 48-53.
- GALLARDO, M.H. & KOHLER, A., 1992. Genetic divergence in *Ctenomys* (Rodentia Ctenomyidae) from the Andes of Chile. **Journal of Mammalogy**, 73:99-105.
- GASTAL, M.L., 1994. Sistema de Túneis e Área de Vida de *Ctenomys minutus* NEHRING, 1887 (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae) **Inheringia**, 77: 35-44.
- GAVA, A., 1996. Uma zona de hibridação em *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae): abordagem citogenética. **Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular**, UFRGS: Porto Alegre, 102p. (Dissertação de mestrado).

- GAVA, A., 2001. Estudos Citogenéticos E Sua Relação Com Marcadores Moleculares Em Tuco-Tucos (*Ctenomys minutus*) (Rodentia-Ctenomyidae). **Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular**, UFRGS: Porto Alegre. (Tese de Doutorado).
- GAVA, A. & FREITAS, T.R.O. 2002. Characterization Of A Hybrid Zone Between Chromosomally Divergent Population Of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Ctenomyidae). **Journal of Mammalogy**,.
- GAVA, A. & FREITAS, T.R.O., *in press*. Inter And Intra-Specific Hybridization In Tuco-Tucos (*Ctenomys*) From Brazilian Coastal Plains (Rodentia:Ctenomyidae).**Genetica**.
- GIMENEZ, M.D.; BIDAU, C.J.; ARGUELLES, C.F. & CONTRERAS, J.R., 1999. Chromosomal Characterization and Relationship Between Two New Species of *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from Northern Cordoba Province, Argentina. **Zeitschrift Fur Säugetierkunde**, 64: 91-106.
- GIMENEZ, M.D.; CONTRERAS, J.R. & BIDAU, C.J., 1997. Chromosomal Variation in *Ctenomys pilarensis*, a Recently Described Species from Eastern Paraguay (Rodentia, Ctenomyidae). **Mammalia**, 61:385-398.
- GOODMAN, D., 1987. The Demography of Chance Extinction. In: Soulé, M.E. (ed.) **Viable Populations for Conservation**. Cambridge: University Press p.11-34.
- GOOSSENS, B.; CHIKHI, P.; TABERLET, L.P.; WAITS, L.P. & ALLAINÉ, D., 2001. Microsatellites Analysis Of Genetic Variation Among And Within Alpine Marmot Populations In The French Alps. **Molecular Ecology**, 10: 41-52.
- GUO, S. & THOMPSON, E., 1992. Performing The Exact Test Of Hardy-Weinberg Proportion For Multiple Alleles. **Biometrics**, 48: 361-372.

- HANCOCK, J.M., 1998. Microsatellites and other Simple Sequences : Genomic Context and Mutational Mechanisms. In: GOLDSTEIN,, D.B. & SCHLÖTTERER, G. **Microsatellites, Evolution And Applications**. Oxford University Press Cap 1: 2-9.
- HARTL, D.L.; & CLARK, J., 1997. **Principles of Populations Genetics**, 3^o ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 448p.
- HELST, T. & BUSCHWALD, E., 2001. The effect of Road Kills on amphibian Populations. **Biological Conservation**, 99: 331-340.
- HEUSER, V.D.; DA SILVA, J.; MORISKE, H.J.; DIAS, J.F.; YONEAMA, M.L. & FREITAS, T.R.O., *in press*. Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using the Comet Assay and the Micronucleus Test in Native Rodent *Ctenomys minutus*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**.
- HUCHON, D. & DOUZERY, E.J.P., 2001. From the Old World to the New World: A Molecular Chronicle of the Phylogeny and Biogeography of Hystricognath Rodents. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 20: 238-251.
- JAARSMA, C.F. & WILLEMS, G.P.A., 2002. Reducing Habitat Fragmentation By Minor Rural Roads Through Traffic Calming. **Landscape And Urban Planning**, 58: 125-135.
- JOHNSON, W.E.; SLATTERY, J.P.; EIZIRIK, E.; KIM, J.H.; RAYMOND, M.M.; BONACIC, C.; CAMBRE, R.; CRAWSHAW, P.; NUNES, A.; SEUÁNEZ, H.N.; MOREIRA, M.A.M.; SEYMOUR, K.L.; SIMON, F.; SWANSON, W. & O'BRIEN, S.J., 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. **Molecular Ecology**, 8: S79-S94

- JUSTUS, J.O., 1990. Hidrografia. In: IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Geografia Do Brasil Região Sul**. Vol. p 2420.
- KIBLISKY, P.; BRUM-ZORILLA, N.; PEREZ, G. & SAEZ, F. A., 1977. Variabilidade Cromossômica entre Diversas Poblaciones del Roedor Cavador del Género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). **Mendeliana**, 2: 85-93.
- KIMURA, M. & WEISS, G.H., 1964. The Stepping Stone Model Of Population Structure And The Decrease Of The Genetic Correlation With Distance. **Genetics**, 49: 561-576.
- KÖHLER, N.; GALLARDO, M.H.; CONTRERAS, L.C. & TORRES-MURA, J.C., 2000. Allozymic Andsystematic Relationships of The Octodontidae And Allied Taxa (Mammalia , Rodentia). **Journal of Zoology**, 252:243-250.
- LACEY, E.A., 2000. Spacial and Social Sístems of Subterranean Rodents. In: LACEY, E.A.; PATTON, J.L. & CAMERON, G.N. (eds.) **Life Underground. The Biology of Subterranean Rodents**. Chicago: The University of Chicago Press 257-296.
- LACEY, E.A., 2001. Microsatellite Variation In Solitary And Social Tuco-tucos: Molecular Properties And Population Dynamics. **Heredity**, 86: 628-637.
- LACEY, E.A.; MALDONADO, J.E.; CLABAUGH, J.P. & MATOCQ, M.D., 1999. Interspecific Variation in Microsatelites Isolated from Tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). **Molecular Ecology**, 8: 1753-1768.
- LACEY, E.A.; BRAUDE, S.H. & WIEZORECK, J.R., 1998. Solitary burrow use by adult patagonian tuco-tucos. **Journal of mammalogy**, 79: 986-991.

- LACY, R.C., 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian population. **Journal of Mammalogy**, 78: 320-335.
- LEON, F.J.G.; CHIKHI, L. & BONHOMME, F., 1997. Microsatellites Polymorphism And Population Subdivision In Natural Populations Of European Sea Bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Molecular Ecology**, 6: 51-62.
- LESSA, E.P. & COOK, J.A., 1998. The Molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 9: 88-99.
- LESSA, E.P.; WLASIUK, G.; GARZA, C. & TASSINO, B., in press. Dynamics of Genetics Differentiation in the Rio Negro Tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*) at the Local and Geographical Levels. **Evolution**.
- LIZARRALDE, M.; DEFERRARI, G.; ALVAREZ, S. & ESCOBAR, J., 2001. Diferenciación Evolutiva en *Ctenomys magellanicus*: Variación Morfológica, Alosímica y Consideraciones Biogeográficas de duas Formas Cromosômicas. **Interciência**, 26: 12-34.
- MALIZIA, A.I. & BUSCH, C., 1991. Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). **Mammalia**, 55: 293-305.
- MALIZIA, A.I. & BUSCH, C., 1997. Breeding biology of the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). **The Zoological Society of London**, 242: 463-471.
- MALIZIA, A.I.; VASSALLO, A.I. & BUSCH, C., 1991. Population and habitat characteristics of two sympatric species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). **Acta Theriologica**, 36: 87-94.

- MALIZIA, A.I.; ZENUTO, R.R.; BUSCH, C., 1995. Demographic and Reproductive Attributes of Dispersers in 2 Populations of the Subterranean Rodent *Ctenomys-talarum* (Tuco-Tuco). **Canadian Journal Of Zoology-Revue**,73:732-738.
- MARINHO, J.R., 1997. Estrutura Populacional e Variação Craniométrica Intraespecífica em uma Zona de Hibridação de *Ctenomys minutus* Nehring, 1887. **Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal**. UFRGS: Porto Alegre. (Dissertação de mestrado).
- MARINHO, J.R. & FREITAS, T.R.O., 2000. Intraespecific Craniometric Variation in a Chromosome Hybrid Zone of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi). **Zeitschrift Fur Saugetierkunde**, 65: 226-231.
- MASCHARETTI, S.; MIROL, P.M.; GIMÉNEZ, M.D.; BIDAU, C.J.; CONTRERAS, J.R. & SEARLE, J.B., 2000. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae: Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome b sequences. **Biological journal of the Linnean Society**, 70: 361-376.
- MASSARINI A.I.; BARROS, M.A.; ROIG, V. & REIG, O.A., 1991a. Banded karyotypes of *Ctenomys mendocinus* (Rodentia: Octodontidae) from Mendoza, Argentina. **Journal Mammalogy**, 72: 194-197.
- MASSARINI, A. I.; DOPAZO, H. J.; BOUZAT, J.L.; HASSON, E. & REIG, O.A., 1992. The Population Genetic Structure of *Ctenomys porteousi* (Rodentia: Octodontidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 20: 723-734.
- MASSARINI, A.I.; BARROS, M.A.; ORTELLS M.O. & REIG, O.A., 1991b. Chromosomal Polymorphism and Small Karyotypic Differentiation in a Group of *Ctenomys* Species from Central Argentina (Rodentia-Octodontidae). **Genética**, 83: 131-144.

- MASSARINI, A.I.; DYZENCHAUZ, F.J. & TIRANTI, S., 1998. Geographic Variation of Chromosomal Polymorphism in Nine Populations of *Ctenomys azarae*, Tuco-tucos of the *Ctenomys mendocinus* Group (Rodentia : Octodontidae). **Hereditas**, 128: 207-211.
- MEDRANO, J.F.; AESEN, E. & SHARROW, L., 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, 8: 43.
- MEFEE, G.K. & CARROL, C.R., 1997. Genetics: Conservation of Diversity Within Species. In: MEFEE, G.K.; CARROL, C.R., CONTRIBUTORS. **Principles Of Conservation Biology**, 2^o ed. Sinauer Associates Inc. Publishers. p 161.
- MICHALAKIS, Y. & EXCOFFIER, L., 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci. **Genetics**, 142: 1061-1064.
- MILLS, L.S. & ALLENDORF, F.W., 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. **Conservation Biology**, 10: 1509-1518.
- MOREIRA, D.M.; FRANCO, M.H.L.P.; FREITAS, T.R.O. & WEIMER, T.A., 1991. Biochemical Polymorphisms and Phenetic Relationships in Rodents of the Genus *Ctenomys* from Southern Brazil. **Biochemical Genetics**, 29: 11-12.
- NEI, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89: 583-590.
- NEI, M., 1987. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press.
- NESJE, M.; ROED, K.H.; LIFJELD, J.T.; LINDBERG, P. & STEENS, O.F., 2000. Genetic relationships in the falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, 9: 53-60.

- NEVO, E., 1979. Adaptive Convergence and Divergence of Subterranean Mammals. **Ann.Rev. Ecol.Syst.** 10: 269-308.
- NEWMAN, R.A. & SQUIRE, T., 2001. Microsatellite Variation in fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). **Molecular Ecology**, 10:1087-1101.
- NIELSEN, R. & PALSBOELL, P.J., 1999. Single locus of Microsatellite Evolution: Multi Step Mutations and Constraints on allele Size. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 11:477-484.
- NOWAK, R.M., 1999. **Walker's Mammals of the World**, 7^a.ed. Ed Johns Hopkins University Press. Londres,. 1560 .
- 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: 189-291.
- OTHA, T. & KIMURA, M., 1973. A Model Of Mutation Appropriated To Estimate A Number Of Electrophoretically Detectable Alleles in A Finite Population. **Genetic Research**, 22: 201-204.
- OTHA, T., 1982. Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 79: 1940-1944.
- PAETKAU, D.; SHIELDS, F.G. & STROBECK, C., 1998. Gene Flow Between Insular, Coastal And Interior Populations Of Brown Bears In Alasca. **Molecular Ecology**, 7: 1283-1292.
- PALUMBI, S.R., 1996. Nucleic Acids II: The Polimerase Chain Reaction. In: **Molecular Systematic** (2a. ed.) Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland.

- PASZEK, A.A.; FLICKINGER, G.H.; FONTANEST, L.; BEATTIE, C.W.; ROHRER, G.A.; ALEXANDER, L. & SCHOOK, L.B., 1998. Evaluating Evolutionary Divergence With Microsatellites. **Journal of Molecular Evolution**, 46: 121-126.
- PATTON, J.L.; SHERWOOD, S.W., 1983. Chromosome Evolution and Speciations in Rodents. **Annual Review of Systematics**, 14:139-581.
- PEARSON, O.P., 1959. Biology of Subterranean Rodents, *Ctenomys*, in Peru. **Memorias Museo Natural "Javier Prado"**, 9: 1-56.
- PEARSON, O.P., 1984. Taxonomy And Natural History Of Some Fossorial Rodents Of Patagonia, Southern Argentina. **J. Zool. Lond**, 202: 225-237.
- PEARSON, O.P. & CHRISTIE, M.I., 1985. Los tuco-tucos (género *Ctenomys*) de los Parques Nacionales Lanin y Nahuel Huapi, Argentina. **Historia Natural**, 5: 337-343.
- PEARSON, O.P.; BINZTEIN, N.; BOIRY, L.; BUSCH, C.; DI PACE, M.; GALLOPIN, G.; PENCHASZADEH, P. & PIANTANIDA, M., 1968. Estrutura social, distribuição espacial y composición de edades de una población de tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). **Investigaciones Zoológicas Chilenas**, 13: 47-80.
- PONSA, M.; EGOZCUE, J. & GARCIA, M., 1998. Comparative Chromosomal Analysis in five *Ctenomys* Species (Rodentia, Octodontidae). **Cytogenetics And Cell Genetics**, 81: 90.
- PONSA, M.; EGOZCUE, J. & GARCIA, M., 2000a. Comparative Chromosomal Analysis and Phylogeny in four *Ctenomys* Species (Rodentia, Octodontidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 69: 103-120.

- PONSA, M.; EGOZCUE, J. & GARCIA, L., 2000b. Cytogenetic Variation in *Ctenomys perrensi* (Rodentia, Octodontidae) **Biological Journal of the Linnean Society**, 71: 615-624.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M. & DONNELLY, P. Inference of a Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics** 12; 945-959.
- RAMBO, B., 2000. **A Fisionomia Do Rio Grande Do Sul**. 3º Ed. Editora Da Unisinos, Porto Alegre. (1) p 56.
- RAYMOND, M. & ROUSSET, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test ecumenism. **Journal of Heredity**, 86: 248-249.
- REGINATO, P.A.R., 1996. Geologia e Evolução Holocênica da Região Norte da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. **Instituto de Geociência da UFRGS**; Porto Alegre. (Tese de Doutorado)
- REIG, O.A., 1981. Teoría del Origen e Desarrollo de la Fauna de Mamíferos de América del Sur. **Museo Municipal de Ciencias Naturales "Lorenzo Scaglia"**, 1: 162.
- REIG, O.A., 1986. **Diversity Patterns And Differentiation of High Andean Rodents**. Oxford University Press. (16). 405-439p
- REIG, A.O., 1989. Karyotypic Repatterning as One Triggering Factor in Cases of Explosive Speciations. In: **Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations**. Ed Fontdevila, Germany. 246-289.
- REIG, O.A. & KIBLISKY, P., 1969. Chromosome Multiformality in the Genus *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). **Chromosoma**, 28: 211-244.

- REIG, O.A.; MASSARINI, A.I.; ORTELLS, M.A.; BARROS, M.A.; TIRANTI, S.I. & DYZENCHAUS, F.J., 1992. New Karyotypes and C-Banding Patterns of the Subterranean Rodents of the Genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. **Mammalia**, 54: 603-623.
- REIG, O.A.; BUSCH, C.; ORTELLS, M.O. & CONTRERAS, J.L., 1990. An Overview Of Evolution, Systematic, Population Biology And Molecular Biology In *Ctenomys*. In: Nevo, E. & Reig, O.A. (eds.) **Biology of subterranean mammals at the organismal and molecular levels**. New York: Allan Liss p.422.
- REIG, O.A.; CONTRERAS, J.R. & PIANTANIDA, M.J., 1966. Contribucion A La Elucidacion De La Sistemática De Las Entidades Del Genero *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). **Contribuciones Científicas**, Serie Zoologica, 2:290.
- ROUSSET, F., 1996. Equilibrium values of measure of population subdivision for stepwise mutation processes. **Genetics**, 142: 1357-1362.
- RUI, A.M. & GASTAL, M.L.A., 1997. Estrutura de Sistemas de Túneis e Distribuição Espacial de *Ctenomys minutus* NEHRING 1887 (Rodentia, Ctenomyidae) em Área de Restinga, Torres, RS, Brasil. **Biociências**, Porto Alegre, V5, n2.33-44p.
- SAUNDERS, S.C.; MISLIVETS, M.R.; CHEN, J. & CLELAND, D.T., 2002. Effects of roads and Landscape structure within nested ecological units of the northern Great Lakes Region, USA. **Biological Conservation**, 103: 209-225.
- SCRIBNER, K.T. & PEARCE, J.M., 2000. Microsatellites: Evolutionary and Methodological Background and Empirical Applications at Individual, Population and Phylogenetic Levels. In : BAKER, A.J. **Molecular Methods In Ecology**, 1º Ed Methods In Ecology , 235p.

- SHIKANO, T.; CHIYOKUBO, T. & TANIGUCHI, N., 2001. Temporal Changes in Allele frequency, Genetic Variation and Inbreeding Depression in Small Populations of the Guppy, *Poecilia reticulata*. **Heredity**, 86: 153-160.
- SLATKIN, M., 1985. Rare Alleles As Indicators Of Gene Flow. **Evolution**, 39: 53-65.
- SLATKIN, M., 1993. Isolation By Distance In Equilibrium And Non-Equilibrium Populations. **Evolution**, 12: 473-480.
- SLATKIN, M., 1994. Gene Flow and Population Structure. In: REAL, L.A.; **Ecological Genetics**. Princeton University Press. 238p.
- SLATKIN, M., 1995. Hitchhiking andd associative overdominance at a microsatellite locus . **Molecular Biology and Evolution**, 47: 264-279.
- SMITH, R., 1993. The Natural History of Inbreeding and Outbreeding in Small Mammals. In: Thornhill, N.W. (ed.) **The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives**. Chicago: The University of Chicago Press p. 575.
- SNUSTAD, P. & SIMMONS, J.M.; 1997. **Principles of Genetics**. 2^o Edition Wiley & Sons, 606p.
- STEINBERG, E.A. & PATTON, J.L., 2000. Genetic Structure and Geography Speciations in Subterranean Rodents: Opportunities and Constraints for Evolutionary Diversification. In: LACEY, E.A.; PATON, J.L.; CAMERON, G. **Life Underground : the Biology of Subterranean Rodents**. The University of Chicago Press.(8) 301p.
- STOW, A.J.; SUNNUCKS, P.; BRISCOE, D.A. & GARDNER, M.G., 2001. The Impact Of Habitat Fragmentation On Dispersal Of Cunninghams Skink (*Egernia Cunninghami*): Evidence From Allelic And Genotypic Analyses Of Microsatellites. **Molecular Ecology**, 10: 867-878.

- TAUTZ, D., 1993. Notes on the Definition and Nomenclature of Tandemly Repetitive DNA Sequences. In: PENA, S.D.J.; CHAKRABORTY, R.; EPPLEN, T.J.; JEFFREYS, A.J. **DNA fingerprinting: state of the science** 21-28p.
- TRAVI, V.H., 1983. Etologia de *C. torquatus* Lischetenstein, 1830 (Rodentia, Ctenomyidae) na Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS. Porto Alegre. 75p.
- TROMBULAK, S.C. & FRISSEL, A.F., 2000. Review of Ecological Effects of Roads on Terrestrial and Aquatic Communities. **Conservation Biology**, 14:18-30.
- VASSALLO, A.I.; KITTLEIN, M.J. & BUSCH, C., 1994. Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae). **Journal of Mammalogy**, 75: 725-732.
- VERZI, D.H.; MONTALVO, C.L. & VUCETICH, M.G., 1999. Afinidades y significado evolutivo de *Neophanomys biplicatus* (Rodentia, Octodontidae) Del Mioceno tardio-Plioceno temprano de Argentina **Ameghiniana**,36:83-90.
- VIEIRA, E.F. & RANGEL, S.R.S., 1988. **Planície Costeira do Rio Grande do Sul : Geografia Física, Vegetação e Dinâmica Sócio Demográfica**. Porto Alegre: Sagra, 256p.
- VIGILANT, L.; HOFREITER, M.; SIEDEL, H. & BOESCH, C., 2001. Paternity And Relatedness In Wild Chimpanzee Communities. **PNAS**, 6: 12890-12895.
- VILLWOCK, J.A.; TOMAZELLI, L.J.; LOSS, E.L.; DEHNHARDT, E.A.; HORN FILHO, N.O.; BACHI, F.A. & DEHNHARDT, B.A., 1986. Geology of the Rio Grande do Sul coastal province. In: Rabassa, J.A.A. (eds.) **Quaternary of South America and Antarctic Peninsula**

- VUCETICH, M.G.; VERZI, D.H.; HARTENBERG, J.L., 1999. Review and analysis of the Radiation of the South American Hystricognathi (Mammalia, Rodentia). **Paleontology**, 329:763-769.
- VUCETICH, M.G. & VERZI, D.H., 1999. Changes in diversity and distribution of the Caviomorph Rodents During the late Cenozoic in Southern South America. In: RABASSA, J.; & SALEME, M. **Quaternary of South America and Antarctic Peninsula**. A.A. Balkema-Rotterdam.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38: 1358-1370.
- WRIGHT, S., 1951. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**, 15: 323-354.
- WRIGHT, S., 1965. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. **Evolution**, 19: 395-420.
- WYNER, Y.M.; AMATO, G. & DESALLE, R., 1999. Captive breeding, reintroduction, and the conservation genetics of black and white ruffed lemurs, *Varecia variegata variegata*. **Molecular Ecology**, 8: S107-S115.
- WYTENBACH, A.; GOUDET, J.; COURNET, J.M. & HAUSSER, J., 1999. Microsatellite Variation Reveals Subdivision In A Chromosome Race Of *Sorex Araneus* (Mammalia, Insectivora). **The Journal Of Heredity**, 90: 323-327.
- ZENUTO, R.R. & BUSCH, C., 1998. Population Biology Of The Subterranean Rodent *Ctenomys Australis* (Tuco-Tuco) In A Coastal Dunefield In Argentina. **Zeitschrift Für Säugetierkunde**, 63: 357-367.

ZENUTO, R.R.; LACEY, E.A. & BUSCH, C., 1999. DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. **Molecular Ecology** **8**: 1529-1532.