

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA – LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO  
MOLECULAR

ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES EM ROEDORES SUL AMERICANOS, TUCO-  
TUCOS (CTENOMYIDAE: RODENTIA) DO CENTRO-OESTE E NORTE DO BRASIL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LEONARDO TRINDADE LEIPNITZ

ORIENTADOR: THALES RENATO OCHOTORENA DE FREITAS

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos colegas de laboratório pela revisão constante desse trabalho, desde seu início à sua conclusão, por meio de apresentações, conversas e muitas trocas de e-mail para tirar as dúvidas, e também pela excelente convivência tanto no laboratório quanto fora dele. Em especial, agradeço ao Professor Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas por aceitar ser meu orientador de mestrado, às colegas Mayara Medeiros, Gisele Souza e Sandra Bülau por toda a ajuda em laboratório e na revisão do trabalho; agradeço aos colegas Daniel Galiano, Bruno Kubiak e Patrícia Langone por toda a ajuda durante as coletas de material e na taxidermia; às colegas Paula Roratto e Carla Lopes cabem agradecimentos especiais por toda a ajuda desde os tempos de minha graduação, já trabalhando com os mesmos roedores, e aprendendo muito das técnicas de laboratório que sei hoje a partir de suas experiências. De maneira geral, de todos os colegas de trabalho, houve importante feedback, que permitiu que erros fossem corrigidos, análises refeitas e reestruturadas e que meu aprendizado fosse mais completo. Peço desculpas se esqueci de alguém, mas todos foram, e continuam sendo, muito importantes. E vocês são muitos.

Fora do laboratório, devo agradecer a todos os amigos e familiares que, ao longo da minha vida, me proporcionaram momentos de alegria e me mantiveram firme para que hoje esteja concluindo mais uma importante etapa da minha vida acadêmica. Em especial, agradeço à minha mãe, pelo carinho incondicional que sempre me teve, e dedico este trabalho ao meu pai, falecido em 2012, que com certeza teria muito orgulho de seu filho e infelizmente não está aqui para vê-lo concluindo esta etapa de sua vida.

Agradeço também às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPERGS, Projeto Tucutu e a ONG Mamíferos RS, sem as quais este trabalho não poderia ser realizado. Muito obrigado a todos!

## ÍNDICE:

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| RESUMO.....                     | 4  |
| INTRODUÇÃO.....                 | 7  |
| MATERIAL E MÉTODOS.....         | 13 |
| RESULTADOS.....                 | 18 |
| DISCUSSÃO.....                  | 51 |
| CONCLUSÕES.....                 | 66 |
| PERSPECTIVAS.....               | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |
| ANEXOS.....                     | 79 |

## RESUMO

A Ordem Rodentia é considerada a mais diversa entre os mamíferos, compreendendo cerca de 2.277 espécies descritas, distribuídas em 34 famílias. Roedores subterrâneos têm representantes distribuídos em todos os continentes, à exceção da Oceania e da Antártida. Na América do Sul, são representados pela família Ctenomyidae e seu único gênero, *Ctenomys*, o mais diverso entre os roedores subterrâneos, com cerca de 60 espécies descritas. Ctenomídeos são territorialistas, em geral solitários, e dependentes de um sistema de galerias para sobrevivência, deixando esses sistemas apenas para buscar alimento, procurar parceiro para reprodução ou para migração. Tais características refletem na estruturação genética entre populações, que podem ser divididas em subpopulações, ou demes. Neste estudo foram analisados 91 indivíduos de *Ctenomys*, distribuídos em nove populações localizadas nos estados do Mato Grosso – populações PL (Pontes e Lacerda), CA (Cáceres), SP (Sapezal), NO (Nova Olímpia), NU1 (Nova Ubiratã 1), NU2 (Nova Ubiratã 2), FN (Feliz Natal) e NM (Nova Mutum) – e de Rondônia; PB (Pimenta Bueno), para quatro *loci* de DNA mitocondrial e 14 *loci* de microssatélites, de modo a inferir padrões estruturação genética ancestral e atual para as populações conhecidas, posicionando-as numa filogenia expandida para o gênero *Ctenomys*. Análises dos marcadores mitocondriais revelam estruturação genética ancestral entre a maioria dos pares populacionais, à exceção de populações geograficamente próximas, para alguns marcadores; filogenias interpopulacionais formam dois grandes clados, o Norte – populações NO, NU1, NU2 e FN – e o Sul – populações PL, CA e SP. PB e NM compartilham ancestral comum mais recente para alguns dos *loci* mitocondriais, mas variam de posição nas filogenias, não constituindo um clado. Na filogenia interespecífica, as populações de estudo constituem as espécies mais derivadas do grupo *boliviensis*, sendo um grupo monofilético, que compartilha ancestral comum mais recente com o grupo de espécies do oeste e sudoeste da Bolívia, norte do Chile e norte da Argentina (grupo *opimus*). Análises com microssatélites encontram estruturação genética atual entre todos os pares de populações do Clado Norte e do Clado Sul, mesmo entre populações geograficamente

próximas. O padrão de estruturação genética encontrado não pode ser explicado apenas pela disposição geográfica das populações, sendo propostas algumas barreiras geográficas, que, em conjunto com o acúmulo aleatório de mutações nas sequências de DNA dos marcadores analisados, possam explicar o padrão de estruturação genética observado. Análises acessórias às análises com marcadores moleculares, como identificação do padrão cariotípico e da morfologia craniana de cada indivíduo, são necessárias para confirmar o número de espécies presentes na área de estudo, que são estimadas em, no mínimo três, com base nas análises moleculares conduzidas neste estudo e em estudos anteriores, e conhecimento prévio do padrão cariotípico e da morfologia craniana de algumas populações.

#### ABSTRACT

The Order Rodentia is considered to be the most diverse among mammals, comprising approximately 2,277 known species, sorted among 34 families. Subterranean rodents are distributed in all continents, except for Oceania and Antartida. In South America they are represented by the Family Ctenomyidae and its single genus, *Ctenomys*, the most diverse genus of subterranean rodents, comprising approximately 60 known species. Individuals of the genus *Ctenomys* are generally solitary, territorialist, and rely upon a system of galleries to survive, emerging only to secure food, mate, or migrate. Such characteristics result in genetic structuring among populations, which can be subdivided in subpopulations – or demes. 91 individuals from nine populations from the states of Mato Grosso – PL (Pontes e Lacerda), CA (Cáceres), SP (Sapezal), NO (Nova Olímpia), NU1 (Nova Ubiratã 1), NU2 (Nova Ubiratã 2), FN (Feliz Natal) and NM (Nova Mutum) populations – and Rondônia – PB (Pimenta Bueno) population – were amplified for four mitochondrial DNA *loci*, and 14 microsatellite *loci*, allowing the inference of patterns of ancestral and present genetic structure for the known populations, and positioning them in an expanded phylogeny for the genus *Ctenomys*. Mitochondrial markers reveal genetic structure between most pairs of population comparisons, except for geographically close populations, given the marker. Population level phylogenies structure populations into two major clades, the Northern Clade – NO, NU1, NU2 and FN

populations – and the Southern Clade – PL, CA and SP populations. The PB and NM populations share their most recent common ancestor depending on the locus being analyzed, but do not occupy a fixed position in the phylogenies neither comprise a clade of their own. A species level phylogeny considers the study populations to be the most recently diverged populations among the *boliviensis* group, a monophyletic group of species, and share their most recent common ancestor with the *opimus* group, which comprise species distributed in West and Southwest Bolivia, Northern Chile and Northern Argentina. Microsatellite analysis of present population structure reveal genetic structuring between all pairs of populations from the Southern and Northern clades. Overall patterns of genetic structuring cannot be resolved by the geographic distance between populations, and so geographic barriers have to be proposed in order to explain the patterns of genetic structure observed, complementing the random accumulation of mutations in diverging DNA sequences of neutrally evolving molecular markers. Analysis which are complementary to molecular analysis, such as karyotype and skull morphometry analysis, are required to confirm the number of species present at the study area, which is estimated at at least three species, based on this study's molecular analysis and previous knowledge of karyotype and skull morphometry patterns available for some of the populations.

## **1. Introdução**

### **1.1 Ordem Rodentia**

Ordem Rodentia é considerada a mais diversa entre os mamíferos, compreendendo cerca de 2.277 espécies descritas distribuídas em 34 famílias (Honeycutt, 2009). Ocorrem em quase todos os continentes – com exceção da Antártida – ocupando os mais variados ambientes, sendo arborícolas, aquáticos, terrestres ou subterrâneos (Nowak, 1999).

### **1.2 Os Roedores Subterrâneos**

Os roedores subterrâneos são animais escavadores, que constroem galerias subterrâneas onde passam a maior parte de sua vida, emergindo apenas para fins de alimentação, reprodução e migração. São amplamente distribuídos no globo, com gêneros representantes em todos os continentes (Figura 1) – à exceção da Oceania e Antártida (Lacey *et al.*, 2000).

Apesar de ocupar grande variedade de habitats, o ambiente subterrâneo tende a ser mais homogêneo que o terrestre, apresentando alta umidade do ar e pressão de gás carbônico, baixos níveis de oxigênio, baixa luminosidade e baixa variação de temperatura, exigindo uma série de adaptações fisiológicas para a sobrevivência nesses ambientes (Reig *et al.*, 1990; Lacey *et al.*, 2000). Somam-se as condições de dureza do solo, que pode limitar a adequabilidade do ambiente, o hábito subterrâneo e o territorialismo, aos fatores ambientais, e tem-se uma distribuição fragmentada para alguns gêneros. (Lacey *et al.*, 2000). A exceção de uma única espécie social – *Ctenomys sociabilis* – as demais espécies de tuco-tuco são solitárias e territorialistas, dividindo seu sistema de túneis apenas na época do acasalamento ou, no caso das fêmeas, para fins de cuidado parental (Lacey *et al.*, 2000). São herbívoros, alimentando-se principalmente de gramíneas do gênero *Poaceae* (Lopes *et al.*, in prep.).

### 1.3 O Gênero *Ctenomys*

Na América do Sul, os roedores subterrâneos são representados pela família Ctenomyidae e seu único gênero, *Ctenomys* (Blainville, 1826), o mais especioso entre os roedores subterrâneos, com cerca de 60 espécies descritas (Reig *et al.*, 1990; Lacey *et al.*, 2000). Popularmente conhecidos como Tuco-tucos, estes roedores habitam essencialmente áreas de campos abertos e dunas, distribuindo-se desde o sul da Patagônia na Argentina, no Uruguai, e até as regiões centrais da Bolívia (Figura 2); no Brasil, representantes do gênero *Ctenomys* encontram-se nos estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Rondônia. Surpreendentemente, populações amostradas nos estados do Mato Grosso e de Rondônia foram encontradas em áreas de mata fechada, o que é inédito na distribuição do gênero no Brasil.

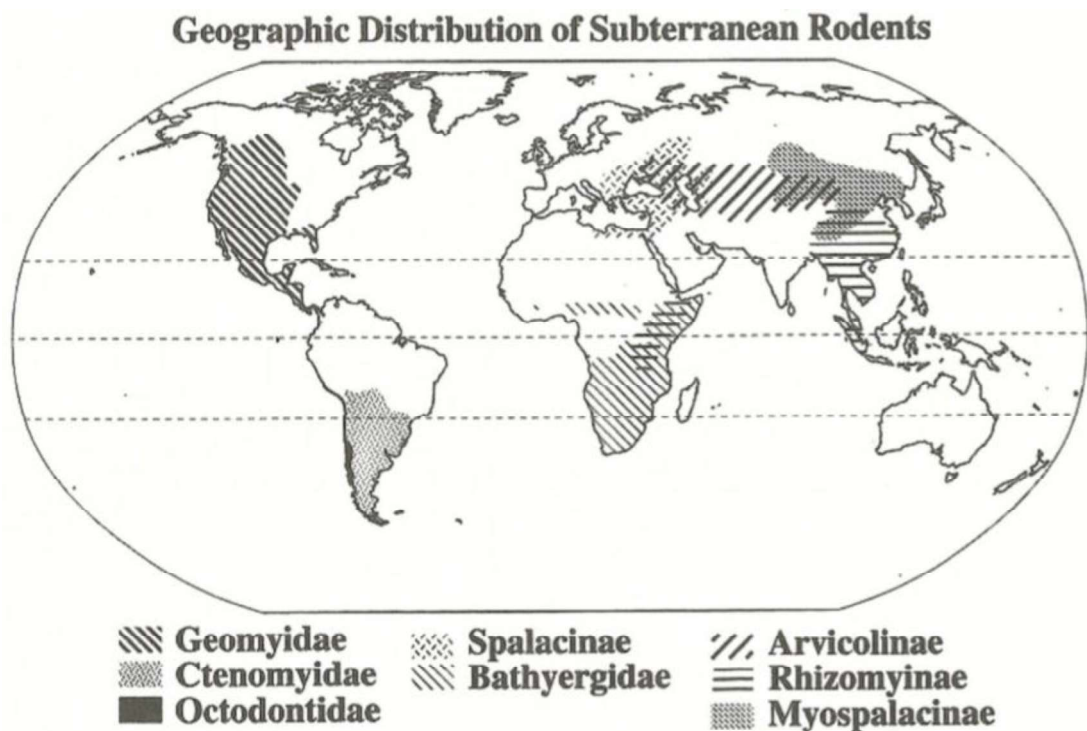


Figura 1: Distribuição das famílias e subfamílias de roedores fossoriais ao redor do mundo. A América do Sul é representada pela família Ctenomyidae (Lacey *et al.*, 2000).



#### 1.4. Variabilidade genética e o gênero *Ctenomys*

Marcadores de DNA mitocondrial (mtDNA) são utilizados em análises filogenéticas e de estruturação populacional ancestral por apresentarem herança uniparental, ausência de recombinação, evolução neutra e taxas de mutação compatíveis com a inferência de padrões eventos geográficos e genéticos em escala de milhares a milhões de anos (Avice, 1994; Moritz, 1994). Em termos moleculares, filogenias geradas para o gênero *Ctenomys*, baseadas em mtDNA (Lessa & Cook, 1998; D'Élia *et al.*, 1999; Mascheretti *et al.*, 2000; Slamovits *et al.*, 2001; Parada *et al.*, 2011) e em íntrons dos genes nucleares Rodopsina e Vimentina (Castillo *et al.*, 2005) identificam a presença de uma politomia basal para o gênero, decorrente de uma especiação rápida no início da diversificação deste, com início há cerca de 3,7 milhões de anos segundo estimativas para o gene Citocromo b (Lessa e Cook, 1998), 1.1 milhão de anos para o íntron da Rodopsina e 1.7 milhão de anos para o íntron da Vimentina (Castillo *et al.*, 2005), sugerindo radiação adaptativa. Estimativas para Citocromo b (Parada *et al.*, 2011) reconstituem grupos de ctenomídeos com alto suporte, como o grupo *torquatus*, que inclui quatro espécies descritas no Rio Grande do Sul: *C. minutus*, Nehring, 1887; *C. lami*, Freitas, 2001; *C. torquatus*, Lichtenstein, 1830; e *C. ibicuiensis*, Freitas *et al.*, 2012. A única espécie do RS que não pertence a esse grupo é *C. flamarioni* Travi 1981, que pertence ao grupo *mendocinus*.

O grupo *boliviensis*, que inclui, entre outras, duas das três espécies já descritas no Centro-Oeste e no Norte do Brasil, uma no Mato Grosso (*Ctenomys nattereri*, Wagner, 1848) e outra em Rondônia (*C. bicolor*, Miranda Ribeiro, 1914) também foi recuperada. Embora exista registro para uma terceira espécie, descrita no estado do Mato Grosso (*C. rondoni*, Miranda Ribeiro 1914), o município onde o espécime-tipo foi coletado não consta junto ao mesmo, que se encontra depositado em coleção no Museu Nacional, no Rio de Janeiro. O registro fóssil mais antigo de *Ctenomys*, oriundo do Noroeste da Argentina, data do Plioceno Tardio – cerca de 3,5 milhões de anos atrás (Verzi *et al.*, 2010), datação próxima da estimativa de início de diversificação por Citocromo-b (Cyt-b, mtDNA) (Lessa & Cook, 1998; Parada *et al.*, 2011).

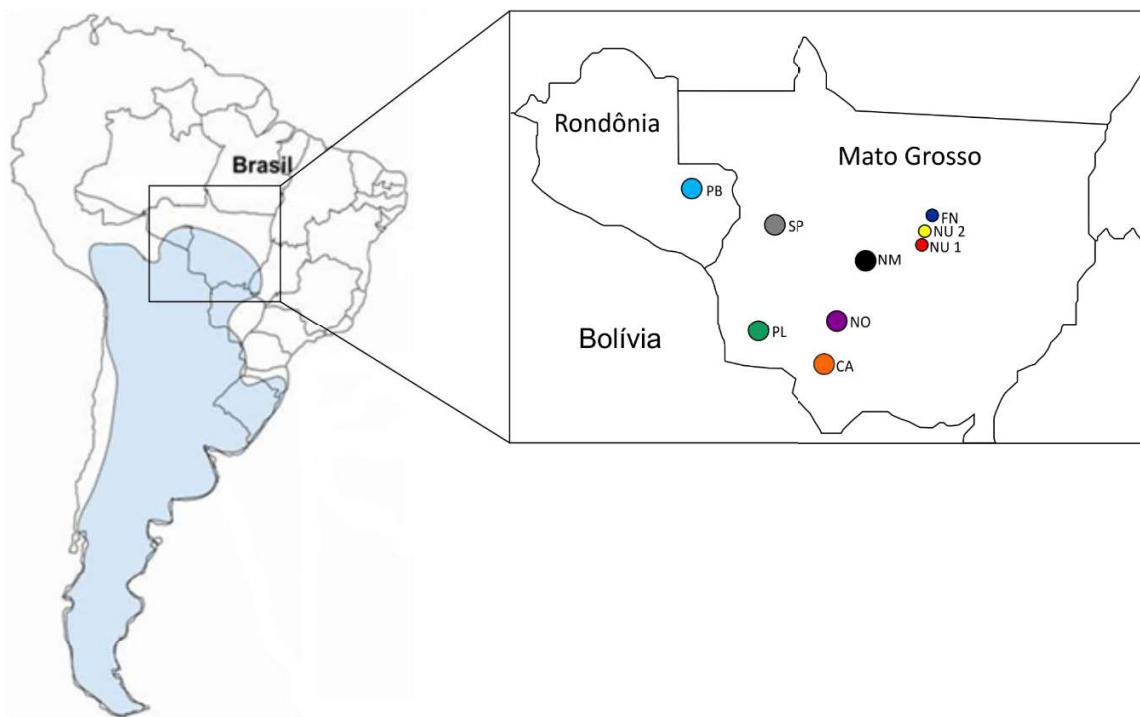


Figura 2: Mapa da distribuição do gênero *Ctenomys* e detalhe da distribuição das populações amostradas nos estados do Mato Grosso e de Rondônia. PL, Pontes e Lacerda; CA, Cáceres; SP, Sapezal; NO, Nova Olímpia; NU 1, Nova Ubiratã 1; NU 2, Nova Ubiratã 2; FN, Feliz Natal.

Microsatélites são repetições em tandem de um a seis pares de bases, que se acumulam nos genomas por meio de erro da enzima DNA polimerase, seja por erro de replicação durante a divisão celular ou no reparo de lesão no DNA, ou por malpareamento entre as fitas de DNA repetitivo durante divisão celular, “nascendo” quando as repetições surgem por mutação espontânea, a partir destas aumentando ou diminuindo de tamanho (Gordon, 1997) e “morrendo” quando mutações interrompem as repetições em tandem, descaracterizando o microsatélite (Taylor *et al.*, 1999). Por não se tratarem de regiões codificantes ou regulatórias no genoma, mutações em microsatélites acumulam-se mais rapidamente do que em marcadores mitocondriais e nucleares codificantes. Essas características, somadas à codominância dos marcadores e a especificidade dos *primers*,

uma vez isolados, faz dos microssatélites uma ferramenta molecular importante para a análise de variação genética em nível populacional (Sunnucks, 2000; Schlötterer, 1998).

Análises populacionais com base nestes marcadores foram utilizadas em estudos com populações de *Ctenomys* de espécies da Argentina, do Uruguai e do Rio Grande do Sul, e permitem inferir variabilidade genética atual nas populações, acessar a estruturação populacional presente em uma espécie e a existência ou ausência de fluxo gênico entre populações, e ainda inferir graus de parentesco entre indivíduos de uma ou mais populações de interesse (Gava & Freitas, 2004; Cutrera *et al.* 2005; Fernández-Stolz *et al.* 2007; Gonçalves & Freitas, 2009; Mora *et al.* 2010).

Em contraste com a grande quantidade de estudos em nível populacional para as espécies conhecidas na distribuição sul de *Ctenomys*, não há quaisquer estudos publicados para as populações da Bolívia, Mato Grosso e Rondônia com este escopo. As publicações existentes para espécies exclusivamente bolivianas (*Ctenomys boliviensis* Waterhouse 1848, *C. steinbachi* Thomas 1907, *C. conoveri* Osgood 1946, *C. opimus* Wagner 1848, *C. leucodon* Waterhouse 1848, *C. lewisi* Thomas 1926 e *C. frater* Thomas 1902; *C. andersoni*, *C. yatesi*, *C. erikacuellarae* e *C. lessai*, Gardner *et al.*, 2014. *Ctenomys goodfellowi* Thomas 1921 foi posta como sinônimo de *C. boliviensis* (Gardner *et al.*, 2014) limitam-se a descrição das espécies e área de ocorrência destas, ou então em filogenias para o gênero (Lessa e Cook, 1998; D'Elía *et al.*, 1999; Slamovits, 2001; Parada *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2012; Gardner *et al.*, 2014). Para populações no Centro-Oeste e Norte do Brasil, Stolz (2011) identifica cinco populações de tuco-tucos, quatro do Mato Grosso e uma de Rondônia, que apresentam medidas cranianas (Figura S1) e cariótipos (*C. nattereri*,  $2n = 36$ ; *C. sp.n.*,  $2n = 34$ ) compatíveis com a classificação destas cinco populações em três espécies distintas: *C. nattereri* Wagner, 1848, populações de Pontes e Lacerda – MT e Cáceres – MT; *C. bicolor* Miranda Ribeiro, 1914, população de Pimenta Bueno – MT; e *C. sp.*, populações de Nova Olímpia – MT e Nova Ubiratã 1 – MT. Neste mesmo estudo, uma filogenia baseada em Máxima Verossimilhança relaciona os indivíduos de Pimenta Bueno – RO como grupo irmão da espécie *C. boliviensis*, a qual possui distribuição conhecida no Centro-leste da Bolívia, próximo à fronteira com o Brasil no estado de Rondônia; a mesma

filogenia ainda relaciona os indivíduos de Nova Olímpia e Nova Ubiratã 1 entre si, o mesmo ocorrendo entre os indivíduos de Pontes e Lacerda e Cáceres; Cáceres e Pimenta Bueno constituem as localidades-tipo para as espécies *Ctenomys nattereri* e *Ctenomys bicolor*, respectivamente, enquanto que assume-se as populações de Nova Olímpia e Nova Ubiratã 1 como representantes de uma espécie ainda não descrita, e sugere-se o nome específico *Ctenomys amazonicus* para estas populações, visto que a população de Nova Ubiratã 1 foi amostrada em área de mata fechada, em região de transição entre Cerrado e Floresta Amazônica; no entanto esta sugestão para a classificação de uma nova espécie não foi publicada em quaisquer anais de publicações científicas. Dados deste estudo também serviram de base para a redescrição e revalidação de *C. bicolor* como espécie (Stolz *et al.*, 2013).

### **1.5. Justificativa**

Tendo em vista a ausência de estudos relacionados às populações de *Ctenomys* do Centro-Oeste e Norte do Brasil, a disponibilidade de marcadores microssatélites para análises populacionais específicos para o gênero, e o uso amplo de marcadores mitocondriais para a inferência de filogenias para o gênero e para a identificação de padrões genéticos ancestrais das linhagens que deram origem às populações atuais, por meio de estudos de filogeografia, torna-se indispensável a caracterização das populações conhecidas de *Ctenomys* nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil por meio de marcadores moleculares.

### **1.6. Objetivos**

A partir de marcadores moleculares de uso amplo no estudo da variabilidade genética para *Ctenomys*, este estudo tem por objetivos i) classificar as populações de *Ctenomys* do Centro-Oeste e Norte do Brasil de acordo com as espécies encontradas através da análise de informação de regiões do genoma mitocondrial, relacionando-as com as espécies conhecidas e posicionando-as numa filogenia expandida em relação as filogenias de Lessa e Cook (1998) e Parada *et al* (2011); ii) reconstruir os padrões de

colonização dos estados do Mato Grosso e Rondônia pelo gênero *Ctenomys* por meio de estudo filogenético, identificando o tempo de divergência entre as linhagens conhecidas e as recém descobertas nos estados do Mato Grosso e Rondônia, com base em marcadores moleculares mitocondriais e iii) testar presença e/ou ausência de fluxo gênico nas populações de *Ctenomys* conhecidas, identificando estruturação genética quando presente, a partir da análise de *loci* de microssatélites.

## 2. Material e Métodos

Foram realizadas nove coletas de espécimes entre os anos de 2007 e 2015, oito no Mato Grosso e uma em Rondônia, com um total de 91 espécimes coletados (Pontes e Lacerda (PL) – MT, n = 10; Cáceres (CA) – MT, n = 11; Nova Olímpia (NO) – MT, n = 11; Nova Ubiratã 1 (NU1) – MT, n = 9; Nova Ubiratã 2 (NU2) – MT, n = 13; Feliz Natal (FN) – MT, n = 9; Sapezal (SP) – MT, n = 7; Nova Mutum (NM) – MT, n = 11; e Pimenta Bueno (PB) – RO, n = 10) (Ver Figura 2 para posição geográfica; Tabela S1 para distâncias geográficas entre pontos de coleta); os animais foram capturados com armadilhas do tipo *snap trap* (Oneida-Victor no. 0, Zenuto e Busch, 1998) e sacrificados de acordo com os procedimentos adotados pelo Comitê de Ética da Sociedade Americana de Mastozoologia (*Animal Care and Use Committee - American Society of Mastozoologists*, 1998). Tecidos de fígado, coração e músculo estriado foram coletados dos indivíduos adultos e pedaços de tecido de orelha coletados dos indivíduos jovens; todas as amostras foram conservadas em álcool 70º GL e estocadas em freezer a -20ºC.

O DNA total de todos os indivíduos foi extraído através de técnica de extração por CTAB (Doyle & Doyle, 1987) com modificações em laboratório e estocado em freezer a -20ºC em diluição de 50uL de TRIS-EDTA 1x e posteriormente quantificada a concentração de DNA extraído a partir de quantificação por espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific); após quantificação, todas as amostras foram diluídas para uma concentração de DNA de 50pg/uL e estocadas em freezer a -20ºC para posterior utilização em Reações em Cadeia de Polimerase (PCR).

### 2.1.1. Amplificação e Sequenciamento de DNA Mitocondrial

Foram amplificadas quatro regiões do genoma mitocondrial – Citocromo b (Cyt-b; duas regiões: *primers* Tuco7 e Tuco14, Região 1; e *primers* MVZ5 e Tuco 6, Região 2 (Smith & Patton, 1999; Wlasiuk *et al.*, 2003); Sequência Hipervariável 1 (HVS1) da Região Controladora (CR; *primers* Tuco Pro (Tomasco & Lessa, 2007) e TDKD (Kocher *et al.*, 1987) e Citocromo Oxidase I (COI; *primers* LCO1490 e HCO2198; Folmer *et al.*, 1994); apenas o primer 5' – 3' foi sequenciado para cada região (*primers* Tuco7, sequência 5' – ATTACAGCAATAGTAATAAT – 3', 20pb ; MVZ5, sequência 5' – GCTTGATATGAAAAACCATCGTT – 3', 23pb; TDKD, sequência 5' – CTGAAGTAGGAACCAGATG – 3', 19pb; e LCO1490, sequência 5' – CAACAAATCATAAAGATATTGG – 3', 22pb ) com conjuntos de indivíduos amplificados com sucesso para os *loci* (HVS1, 86 indivíduos; COI, 68 indivíduos; Cyt-b 1, 71 indivíduos; Cyt-b 2, 90 indivíduos). As regiões de DNA amplificadas serão chamadas, a partir de agora, de HVS1 (Região Controladora), COI (Citocromo Oxidase I), Cyt-b 1 (*primer* Tuco7, Citocromo b, região 1) e Cyt-b 2 (*primer* MVZ05; Citocromo b, região 2). Para todos os *loci*, foi utilizado um mix de reação, por amostra, contendo 13,0uL de água destilada, 2,0uL de tampão para PCR 1x, 1,6uL de co-fator MgCl<sub>2</sub> 50nM, 0,4uL de dNTPs 10uM, 0,4uL de primer *forward* e *reverse* e 0,2uL de enzima Taq Polimerase 1U, somados a 2,0uL de DNA total, totalizando 20,0uL por amostra. As condições para amplificação dos produtos de PCR foram como segue, para o loco Citocromo b (ambas as regiões): desnaturação inicial a 94°C por um minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 93°C por um minuto, anelamento de *primers* a 45°C por um minuto e extensão por um minuto e meio a 72°C, finalizando com uma extensão final a 72°C por 10 minutos; para o loco Citocromo Oxidase I (COI, uma região): desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento de *primers* a 53°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, terminando com uma extensão final a 72°C por cinco minutos; para o loco HVS1 (Região Controladora, uma região): desnaturação inicial a 94°C por um minuto,, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de *primers* a 47°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos,

finalizando com uma extensão final a 72°C por cinco minutos. A amplificação dos produtos de PCR foi conferida em gel de agarose 1% e posteriormente as amostras foram enviadas para sequenciamento em empresa terceirizada (Macrogen Inc., Coréia do Sul).

### **2.1.2. Análises de DNA Mitocondrial**

Cromatogramas foram inspecionados e editados com o auxílio do programa Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Inc.), posteriormente alinhados, e novamente inspecionados a olho nu, com o auxílio do programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2011) através do algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Sequências editadas foram conferidas por homologia com outras sequências similares disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – GenBank) para evitar a incorporação de pseudogenes nas análises. Arquivos de entrada para os programas DNAsp v5.0 (Librado e Rozas, 2009) e BEAST 1.75 (Drummond *et al.*, 2012) foram gerados no programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2011); arquivos de entrada para análises de rede de haplótipos no programa NETWORK 4.6.1.3 (Bandelt *et al.*, 1999) e análises populacionais no programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) foram gerados no programa DNAsp v5.0 (Librado e Rozas, 2009); o modelo mais adequado para a evolução molecular das sequências de mtDNA foi obtido através do programa JModelTest 2 (Posada, 2008; Darriba *et al.*, 2012; Guindon & Gascuel, 2003) com base em critérios de inferência Bayesiana (BIC), com 95% de confiança, entre 1624 modelos possíveis. Testes de neutralidade – D de Tajima e  $F_s$  de Fu -, análises de estruturação populacional, Análise de Variância Molecular (AMOVA), cálculo de heterozigosidade observada e esperada, número de *loci* exclusivos, número de sítios segregantes e diversidade nucleotídica e haplotípica foram obtidos através do programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010); árvores filogenéticas para os *loci* concatenados e para *loci* individuais foram calculadas, com base em função de Máxima Verossimilhança (Felsenstein, 1981) no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando os critérios que se seguem: 1000 réplicas de bootstrap, utilizando o modelo de evolução molecular HKY (Hasegawa *et al.*, 1985), com modelos de heterogeneidade entre sítios variando de acordo com o marcador (ver detalhes nos Resultados); foram analisadas as três posições

dos códons; o método de heurística escolhido foi o NNI (*Nearest Neighbor Interchange*), partindo de uma árvore inicial obtida através do algoritmo de *Neighbor Joining* (NJ). Árvores filogenéticas para *loci* concatenados e *loci* individuais com base em inferência Bayesiana foram calculadas no programa BEAST v1.75 (Drummond *et al.*, 2012), seguindo os seguintes critérios: modelo HKY, com modelos de heterogeneidade entre sítios variando de acordo com o marcador (ver Resultados), 10.000.000 de passos na Cadeia de Markov para análises filogenéticas em nível de população e 15.000.000 de passos para análises filogenéticas em nível de espécie, amostrando a cada 1000 passos. As taxas de evolução do relógio molecular utilizadas neste trabalho são originadas de Roratto *et al* (*in press*) e foram utilizadas como priors (ver Resultados). Seis simulações independentes foram corridas por *loci* (*loci* individuais: HVS1, COI, Cyt-b 1 e Cyt-b 2; e concatenados: HVS1 + Cyt-b 2, Citocromo b (Cyt-b 1 + Cyt-b 2) para filogenias em nível populacional – apenas entre indivíduos amostrados nos estados do Mato Grosso e de Rondônia – assumindo-se um relógio molecular restrito e utilizando todas as amostras disponíveis para cada *loci*. Para filogenias em nível de espécie, seis simulações independentes foram corridas, assumindo-se relógio molecular relaxado, como sugerido por Parada *et al* (2011). O processo de Yule (Gernhardt, 2008; Yule, 1925) foi utilizado como prior, por tratar-se de filogenias em nível de espécie. Para cada simulação, a árvore consenso foi obtida no programa TreeAnnotator v1.7.5 (Drummond *et al.*, 2012), utilizando burnin de 2500 árvores por simulação para filogenias interpopulacionais e 3750 árvores por simulação para filogenias interespecíficas, o equivalente a 25% das árvores simuladas.

Análises de estruturação populacional baseadas em inferência Bayesiana e modelos de admistura foram calculadas no programa BAPS 6 (Corander & Marttinen 2006; Corander *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009), permitindo inferir qual provável distribuição das populações em clusters – ou grupos – genéticos possíveis.

### **2.2.1. Amplificação de Microssatélites**

Foram amplificados 14 *loci* de microssatélites isolados para as espécies *Ctenomys haigi* (*loci* HAI, n = 8, Lacey *et al.*, 1999) e *Ctenomys sociabilis* (*loci* SOC, n = 6, Lacey, 2001)



(ver Tabela 1) para 80 indivíduos – a exceção da população de Nova Mutum – MT. O mix de reação por amostra foi composto por 13,2uL de água destilada, 2,0uL Tampão para PCR 1x, 0,6uL de co-fator MgCl<sub>2</sub> 50nM, 0,2uL de dNTPs 10uM, 0,4uL de cada primer (*forward* e *reverse*) e 0,2uL de enzima Taq Polimerase 1U, somados a 2,0uL de DNA total, totalizando 20,0uL por amostra; os *primers* para cada *loci* foram marcados com fluorescências FAM (*primers* HAI) e Hex (*primers* SOC).

As condições de amplificação foram como segue: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento de *primers* por 30 segundos, entre 55°C e 62°C conforme o loco – ver Tabela 1 – e extensão a 72°C por 45 segundos, terminando com um alongamento final de cinco minutos a 72°C.

Tabela 1: *Loc*i de microssatélites utilizados no estudo. Alcance do número de repetições conhecidos e temperatura ótima de anelamento para *loci* HAI (Lacey *et al.*, 1999) e SOC (Lacey, 2001).

| Lócus        | Nº de Repetições        | Temp. Anelamento (°C) |
|--------------|-------------------------|-----------------------|
| <b>Soc1</b>  | (CA) <sub>128-133</sub> | 55                    |
| <b>Soc2</b>  | (CA) <sub>72-79</sub>   | 59                    |
| <b>Soc3</b>  | (CA) <sub>57-67</sub>   | 60                    |
| <b>Soc4</b>  | (CA) <sub>193-197</sub> | 55                    |
| <b>Soc5</b>  | (CA) <sub>125-139</sub> | 60                    |
| <b>Soc6</b>  | (CA) <sub>104-105</sub> | 62                    |
| <b>Hai2</b>  | (CA) <sub>87-98</sub>   | 55                    |
| <b>Hai3</b>  | (CA) <sub>69-85</sub>   | 60                    |
| <b>Hai4</b>  | (CA) <sub>77-90</sub>   | 58                    |
| <b>Hai5</b>  | (CA) <sub>97-106</sub>  | 55                    |
| <b>Hai6</b>  | (CA) <sub>54-55</sub>   | 55                    |
| <b>Hai9</b>  | (CA) <sub>106-112</sub> | 59                    |
| <b>Hai10</b> | (CA) <sub>150-157</sub> | 62                    |
| <b>Hai12</b> | (ATT) <sub>42-47</sub>  | 55                    |

### **2.2.2. Genotipagem e Análises de Microssatélites**

Os produtos de PCR obtidos para os 14 *loci* de microssatélites foram genotipados por sequenciador automático (ABI 3730, Applied Biosystems) por serviço terceirizado (Macrogen Inc., Coréia do Sul); picos de genotipagem foram conferidos com o auxílio do programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems), gerando dados a serem transformados em arquivos de entrada para análises de heterozigosidade observada e esperada, número total de alelos polimórficos e exclusivos, alcance alélico, estruturação populacional – baseada em índice de Fixação  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984) – análise de variância molecular (AMOVA), número médio de migrantes por geração, Desequilíbrio de Ligação (LD) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) no programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010); estruturação genética estimada com base em Inferência Bayesiana foi calculada pelo programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003), baseada no modelo de admistura com frequências correlacionadas 1.000.000 de passos na Cadeia de Markov Monte Carlo e 500.000 passos de burnin. A população de Pimenta Bueno – RO foi excluída das análises de estruturação populacional e AMOVA por ser a única representante da espécie *C. bicolor*, não podendo, portanto, ser comparada com outra população.

## **3. Resultados**

### **3.1. Análise de DNA mitocondrial**

#### **3.1.1. DNA mitocondrial, análises por loco: índices básicos, diversidade nucleotídica e haplotípica, testes de neutralidade e rede de haplótipos**

Do total de 91 indivíduos amostrados, foram amplificados 86 indivíduos para o loco HVS1 (Região Controladora; 349pb; Pontes e Lacerda – MT, n = 10; Cáceres – MT, n = 11; Nova Olímpia – MT, n = 11; Nova Ubiratã 1 – MT, n = 8; Nova Ubiratã 2 – MT, n = 13; Feliz Natal – MT, n = 8; Pimenta Bueno – RO, n = 9; Sapezal – MT, n = 7; Nova Mutum – MT, n = 9), 68 indivíduos para o loco COI (Citocromo Oxidase I; 573pb; Pontes e Lacerda – MT, n =

Portanto, um estudo molecular que integre grande número de *loci*, permitindo análises tanto em nível de espécie quanto em nível populacional, associado a uma amostragem representativa das regiões geomorfológicas onde ocorrem as populações conhecidas, é indispensável para identificar possíveis barreiras geográficas ancestrais e atuais que influenciem na distribuição das populações de ctenomídeos nessa região do país. Tal estudo já foi proposto e estará em andamento nos próximos anos.

## 6. Perspectivas

A análise de marcadores mitocondriais e microssatélites permite fazer diversas inferências sobre a história evolutiva das populações de *Ctenomys* no Centro-Oeste e Norte do Brasil, de modo que o presente trabalho lança as bases para futuros trabalhos, propondo hipóteses que expliquem a estruturação genética observada e posicionando as populações de estudo no contexto filogenético do gênero *Ctenomys*. O próximo passo será concluir a amplificação das regiões de DNA mitocondrial e de microssatélites faltantes para os indivíduos amostrados até o momento, analisar cariótipos e concluir as análises de morfometria craniana para definir o número de espécies existentes e descrevê-las e requerer junto ao Curador do Museu Nacional amostras de tecido do espécime tipo de *Ctenomys rondoni*. Uma vez obtido o tecido, DNA será extraído com kit apropriado; o indivíduo será então analisado para os quatro *loci* de DNA mitocondrial utilizados neste estudo e comparado com os demais indivíduos, inserindo a espécie *Ctenomys rondoni* no contexto filogenético do gênero.

O próximo esforço de coleta está agendado para o início do segundo semestre de 2015, e terá foco na coleta de indivíduos, das populações CN (próxima a localidade de Campo Novo dos Parecis) e SA, na Província Serrana, e no mapeamento de novas populações. A coleta de indivíduos de ambas as populações é de extrema importância, pois estes são os primeiros registros de populações de *Ctenomys* nas regiões geomorfológicas da Chapada dos Parecis e da Província Serrana, e o perfil genético destas

populações pode dar pistas sobre o papel dos diferentes relevos na estruturação populacional ancestral e atual de *Ctenomys*.

Apesar de informativos, marcadores mitocondriais, utilizados em análises filogenéticas e filogeográficas são considerados neutros, acumulando mutações de maneira randômica, e, portanto, não permitem inferir adaptação; além disso, não constituem evidência independente da história evolutiva observada quando comparados entre si, porque são herdados numa mesma unidade (Castillo *et al.*, 2005). Logo, é necessário acessar a diversidade genética contida em sequências de DNA nuclear intrônico e/ou codificante, de modo a comparar a história evolutiva inferida por diferentes marcadores, para validar ou refutar um padrão observado e avaliar indivíduos para seleção positiva. No entanto, a amplificação de diversos *loci* independentes por sequenciamento de Sanger é custosa em termos de recurso financeiro gasto por volume de dados gerados, quando comparada ao custo benefício dos métodos de sequenciamento de nova geração. Além disso, nem sempre há disponibilidade de *primers* para genes candidatos à seleção adaptativa, especialmente quando o organismo de estudo não é um organismo modelo.

Marcadores microssatélites, apesar de permitirem inferir os padrões de estruturação populacional atuais das populações, são de difícil isolamento e geram pequena quantidade de dados em relação a outras técnicas que permitem avaliar a variabilidade genética atual ou recente de populações de estudo.

O sequenciamento de nova geração é capaz de gerar até bilhões de bases de informação com baixo custo, e, acoplado a diferentes metodologias, gerar fragmentos de interesse para diversas áreas de estudo dentro na biologia molecular e na genética, como filogeografia, genética de paisagens e genética de populações. Métodos de sequenciamento de nova geração se utilizam da geração de uma biblioteca de fragmentos de DNA representativos do genoma completo do organismo, permitindo a identificação de regiões repetitivas – como, por exemplo, microssatélites, polimorfismos de nucleotídeos únicos (Single Nucleotide Polimorphism ou SNPs) e loci sob seleção (Cruaud *et al.*, 2014).

Um desses métodos é o Restriction Amplified DNA Sequencing (RAD-Seq) (Baird et al., 2008), que será utilizado em estudos futuros para o gênero *Ctenomys*. Trata-se de uma técnica semelhante ao AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), mas que amplifica fragmentos de DNA aleatórios em escala genômica, a partir da degradação do DNA genômico por uma enzima de restrição, e subsequente amplificação de milhares a milhões de fragmentos únicos de DNA (Davey e Blaxter, 2011). Após triagem dos dados por métodos computacionais, é possível identificar SNPs, regiões de repetição de DNA, e loci sob seleção. Genotipando SNPs em escala genômica, é possível amostrar *loci* tanto sob seleção quanto *loci* neutros em quantidade suficiente para inferir filogenias precisas (Emerson et al., 2010) e com maior evidência independente da história evolutiva dos *loci*, encontrando relações entre traços adaptativos e diferentes condições ambientais, como barreiras geográficas e composição vegetal. Esta técnica já é amplamente utilizada na filogenética (Cruaud et al., 2014; Hipp et al., 2014; Cariou et al., 2013; Rubin et al., 2012) e na filogeografia e genética de populações (Hess et al., 2013; Catchen et al., 2013; Zellmer et al., 2012; Emerson et al., 2010; Hohenlohe et al., 2010).

## 7. Referências

Avice JC. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman and Hall, 1994.

Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Nigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.

Baird NA, Etter PD, Atwood TS, et al. (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. PLoS One 3:e3376

Bandelt HJ; Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, v. 16, p. 37-48, 1999.

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

Castillo AH, Cortinas MN, Lessa EP (2005) Rapid diversification of south american tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): Contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *J Mammal* 86:170–179.

Catchen J, Hohenlohe PA, Bassham S, Amores A, Cresko W (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol Ecol* 22:3124–3140.

Corander J, Marttinen P. Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology*, 2006, 15, 2833-2843.

Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9:539.

Cutrera AP, Lacey EA, Busch C. 2006. Intraspecific variation in effective population size in Talar Tuco-tucos (*Ctenomys talarum*): the role of demography. *Journal of Mammalogy* 87(1):108–116.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.

Davey JW, Blaxter ML (2011) RADSeq: next-generation population genetics. *Brief Funct Genomics* 9:416–423.

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

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution* 29: 1969-1973

Edgar R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792–1797.

Emerson KJ, Merz CR, Catchen JM, et al. (2010) Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci United States Am* 107:16196–16200.

Excoffier, L, Lischer, HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. (2003) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 1981, Volume 17, Issue 6, pp 368-376

Fernandes FA, Fernández-Stolz GP, Lopes CM, and Freitas TRO. 2007. The conservation status of the tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Ctenomyidae: Rodentia), in southern Brazil. *Braz. J. Biol.*, 67(4, Suppl.): 839-847.

Fernández-Stolz GP, Stolz JFB, and Freitas TRO. 2007. Bottlenecks and Dispersal in the Tuco-Tuco das Dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88(4):935-945.

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

Freitas HA, Pessenda LCR, Avarena R, Gouveia SEM, Ribeiro AS, Boulet R. 2001. Late Quaternary Vegetation Dynamics in the Southern Amazon Basin Inferred from Carbon Isotopes in Soil Organic Matter. *Quaternary Research* 55, 39–46 (2001)

Freitas TRO, Fernandes FA, Fornel R, Roratto PA. (2012) An endemic new species of tuco-tuco, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), with a restricted geographic distribution in southern Brazil. *J Mammal* 93:1355–1367.

Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics*, 147:915–925, 1997.

Galiano, D. Análise das Relações Físicas e Biológicas do Ambiente com uma Espécie de Tuco-tuco – *Ctenomys minutus* (Ctenomyidae: Rodentia).

Gardner SL, Bravo JS, Cook JA. 2014. New Species of *Ctenomys* Blainville 1826 (Rodentia: Ctenomyidae) from the Lowlands and Central Valleys of Bolivia. *Special Publications of the Museum of Texas Tech University*, no. 62

Gava A, and Freitas TRO. 2004. Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from Southern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 85(6):1201–1206.

Gonçalves GL, and Freitas TRO. 2009. Intraspecific variation and genetic differentiation of the collared Tuco-tuco (*Ctenomys torquatus*) in Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 90(4):1020–1031.



Gordon, AJE. Microsatellite Birth Register. *J. Mol. Evol.* 1997. 45:337-338.

Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology* 52: 696-704.

Hasegawa M, Kishino H, Yano T. 1985. Dating the humanape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160–174.

Hess JE, Campbell NR, Close DA, Docker, MF, Narum SR (2013) Population genomics of Pacific lamprey: adaptive variation in a highly dispersive species. *Mol Ecol* 22:2898–2916.

Hipp AL, Eaton DAR, Cavender-Bares J, Fitzek E, Nipper R, Manos PS (2014) A framework phylogeny of the American oak clade based on sequenced RAD data. *PLoS One* 9:e93975.

Hohenlohe PA, Bassham S, Etter PD, Stiffler N, Johnson EA, Cresko WA (2010) Population Genomics of Parallel Adaptation in Threespine Stickleback using Sequenced RAD Tags. *PloS Genet* 6:e1000862.

Honeycutt RL (2009) Rodents (Rodentia). In: Hedges SB, Kumar S (eds) *The Timetree of Life*. Oxford University Press, New York, pp 490-494.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2002. Mapa Geomorfológico do Estado do Mato Grosso. Disponível em:  
[ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas\\_tematicos/geomorfologia/unidades\\_federacao/mt\\_geomorfologia.pdf](ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/geomorfologia/unidades_federacao/mt_geomorfologia.pdf)

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2009a. Manual Técnico de Geomorfologia, 2ª Edição.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2009b. Mapa de Solos do Estado do Mato Grosso. Disponível em:

[ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas\\_tematicos/pedologia/unidades\\_federacao/mt\\_pedologia.pdf](ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/pedologia/unidades_federacao/mt_pedologia.pdf)

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca F, Wilson AC (1989) Dynamics of the mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Scie USA* 89: 6196-6200

Lacey EA, Patton JL, and Cameron GN. 2000. *Life Underground: the biology of subterranean rodents*. The University of Chicago Press, Chicago and London, 449 pp.

Lacey EA, Maldonado JE, Clabaugh JP, and Matocq MD. 1999. *Molecular Ecology*. 8(10); 1754 – 1756.

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

Lessa EP, Cook JA. 1998. The Molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 9, No. 1, February, pp. 88–99.

Librado P, Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 251364.

Mascheretti S, Mirol PM, Giménez MD, Bidau CJ, Contreras JR, Searle JB. 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.

Mora MS, Mapelli FJ, Gaggiotti OE, Kittlein EJ, and Lessa EP. 2010. Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC Genetics* 2010, 11:9

Moritz C. 1994. Applications of mitochondrial DNA in conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3:403-413

Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. 6ª edição, volume 2. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Parada A, D'Elía G, Bidau CJ, and Lessa EP. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, 92(3):671–682, 2011

Posada, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* v. 25, p. 1.253-1.256, 2008.

Posada D, Crandall KA. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. 2001. *TREE* Vol.16 Nº1, 2000.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959.

Reig OA, Busch C, Ortells MO, Contreras JR (1990) An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. In: Nevo E e Reig OA (eds) *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. Alan R. Liss Inc., Nova York, pp. 71-96.

Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223–225.

Rubin BER, Ree RH, Moreau CS (2012) Inferring phylogenies from RAD sequence data. *PLoS One* 7:e33394.

Schlötterer, C. (1998) Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? *Current Biology* 1998, 8:R132–R134

Slamovits, CH, Cook JA, Lessa EP, Rossi MS. 2001. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution* 18:1708–1719.

Smith MF, Patton JL. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *J. Mamm. Evol.* 6(2): 89-128 S.

Stolz JFB, Gonçalves GL, Leipnitz L, Freitas TRO (2013). DNA-based and geometric morphometric analysis to validate species designation: a case study of the subterranean rodent *Ctenomys bicolor*. *Genet Mol Res.* 12(4): 5023-5037.

Stoneking, M. Hypervariable Sites in the mtDNA Control Region Are Mutational Hotspots. 2000. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1029-1032

Sunnucks, P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *TREE vol. 15, no. 5.*

Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585–595, 1989.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Taylor JS, Durkin JMH, Breden F. The Death of a Microsatellite: A Phylogenetic Perspective on Microsatellite Interruption. (1999) *Mol. Biol. Evol.* 16(4):567–572. 1999

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

Van der Hammen T, Absy ML. 1994. Amazonia during the last glacial. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 109 (1994) 247-261

Verzi DH, Olivares AI, Morgan CC. 2010. The oldest South American tuco-tuco (late Pliocene, northwestern Argentina) and the boundaries of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammalian Biology* 75:243–252.

Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38(6): 1358-1370

Wlasiuk G, Garza JC, Lessa EP. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57:913–926.

Woods CA, Kilpatrick CW. (2005). "Infraorder Hystricognathi". In Wilson, D. E.; Reeder, D. M. *Mammal Species of the World* (3rd ed.). Johns Hopkins University Press. pp. 1538–1600. ISBN 978-0-8018-8221-0. OCLC 62265494

Yule, G. U. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J. C. Willis, F.R.S. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 213, 21–87 (1925).

Zellmer AJ, Hanes MM, Hird SM, Carstens BC (2012) Deep phylogeographic structure and environmental differentiation in the carnivorous plant *Sarracenia alata*. *Syst Biol* 61:763–77.

Zenuto RR, 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.

## 8. Anexos

Figura S1: Análise de medidas cranianas para cinco populações de *Ctenomys* do Brasil, e representantes de duas espécies da Bolívia (*C. steinbachi* e *C. boliviensis*). boliv, *C. boliviensis*; stein, *C. steinbachi*; bicolor, *C. bicolor* (população PB); nat, *C. nattereri* (populações PL e CA); nova, *C. sp.n.* (populações NO e NU1). Adaptado de Stolz, 2011 (Tese de Doutorado).

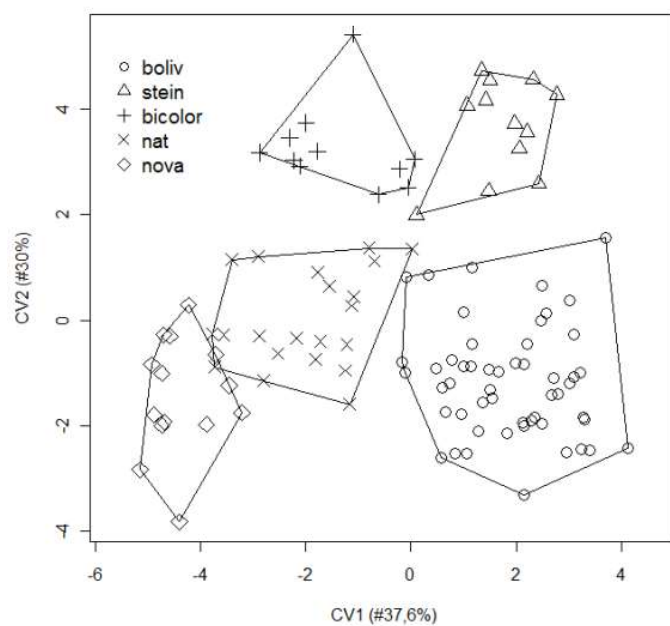


Tabela S1: Distâncias geográficas aproximadas entre populações de estudo, em quilômetros.

|     | PL  | CA  | SP  | NO  | NU1  | NU2  | FN  | PB  | NM |
|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|----|
| PL  | -   |     |     |     |      |      |     |     |    |
| CA  | 192 | -   |     |     |      |      |     |     |    |
| SP  | 245 | 372 | -   |     |      |      |     |     |    |
| NO  | 213 | 133 | 291 | -   |      |      |     |     |    |
| NU1 | 530 | 462 | 448 | 341 | -    |      |     |     |    |
| NU2 | 538 | 470 | 454 | 348 | 7,54 | -    |     |     |    |
| FN  | 557 | 494 | 463 | 371 | 32,5 | 25,5 | -   |     |    |
| PB  | 352 | 524 | 190 | 468 | 627  | 633  | 639 | -   |    |
| NM  | 342 | 306 | 280 | 174 | 190  | 197  | 215 | 468 | -  |