

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Departamento de Genética

Análises citogenéticas em uma zona híbrida interespecífica entre *Ctenomys minutus* e *Ctenomys lami* (Rodentia:Ctenomyidae) na planície costeira do Sul do Brasil

Simone Sousa Freitas Ximenes

Orientador: Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Co-orientadora: Msc Carla Martins Lopes

Trabalho apresentado como requisito
para obtenção do grau de Bacharel
no Curso de Ciências Biológicas

Porto Alegre, Dezembro de 2009.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS:

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

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);
- ONG Mamíferos RS;
- Projeto Tuco-tuco.

*Aos meus pais, Élea e Luis,
pelo amor incondicional e
investimento na educação.*

"A imensa satisfação intelectual e o prazer de poder de fato entender por que as coisas são como são na natureza, nos abrem as portas para um eterno, inesgotável caso de amor com o mundo natural. O maior legado de Darwin não foi qualquer fato que ele tenha descoberto. O maior legado de Darwin foi nos ensinar a perguntar por quê." (modificado de "o poema imperfeito" de Fernando Fernandez)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho encerra os meus quatro anos e meio de graduação e muitas pessoas contribuíram para que eu chegasse até aqui. Não sei se vou conseguir lembrar o nome de todas, mas desde já agradeço a todos que colaboraram de alguma forma.

Ao meu orientador Thales R. O. de Freitas, pela oportunidade, confiança, paciência, por acreditar em mim desde o segundo semestre da graduação, pelo relacionamento sempre muito humano e convivência amigável. E principalmente por ter me apresentado aos tuco-tucos.

À minha amiga Carla Martins Lopes pela paciência, incentivo, sempre pronta a me escutar e discutir sobre o trabalho e pelos inúmeros ensinamentos, principalmente sobre a evolução dos tuco-tucos.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Evolução: Benhur, Camila, Carla, Carla Moreira, Chico, Claiton, Daniel, Darli, Fabiano, Flávia, Gabi, Gislene, Jorge, José, Laura, Leonardo, Lívia, Luciana, Nice, Patricia, Paula, Pedro, Rodrigo, Tatinski, Josmael, Tati Rech, Tati Trigo pelo convívio que tornou os dias de trabalho mais alegres e interessantes.

Em especial ao Fabiano, que mesmo não estando presente no laboratório esse ano, foi essencial para minha formação como pesquisadora, sempre me apoiando e me instigando a aprender. Ao querido casal Rodrigo com grande coração e Tatinski pessoa encantadora, grande amiga para todas as horas, que foi muito importante durante esses anos, e obrigada pelas fotos e materiais gráficos. À Gis pelas diversas conversas e ensinamentos que foram muito importantes para minha formação. À Darli querida pela amizade e por ser uma pessoa muito especial. À Gabi pela sua simpatia e carinho incomparáveis, além de ser uma grande professora. À Lívia sempre presente durante toda graduação me ajudando muito em vários momentos. Às amigas Pati e Paula sempre prontas para uma conversa e um chimarrão.

À Carla, Darli, Loreci (“Ci”), Luciano, Patrícia, Tatinski, Thales pela importante ajuda nas coletas deste trabalho.

Ao Luciano pelo trabalho no laboratório, por toda disponibilidade e pelo seu bom humor.

À Lucinha pela ajuda e paciência em todos os momentos.

A todos os amigos que fiz durante a graduação que foram muito importantes durante essa trajetória, em especial às grandes amigas Dalila, Giovana e Lívia sempre presentes desde o primeiro semestre, e às queridas Cris, Liv e Rê.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito de qualidade, aos funcionários pelos auxílios no dia-a-dia e aos professores pelos ensinamentos e dedicação.

À PIBIC/CNPq pela bolsa de iniciação científica.

A toda minha família, cada um tem um lugar especial no meu coração.

À minha irmã Raquel pelo apoio e por me mostrar a universidade logo que entrei, tornando mais fácil essa transição, além de me indicar o Projeto Tuco-tuco onde fiquei na minha formação acadêmica.

Ao Lessandro meu amor, meu melhor amigo, com quem espero ter o prazer de continuar sendo feliz por muito tempo. Obrigada pelo apoio, incentivo, companheirismo e por me ajudar a ser uma pessoa melhor e mais feliz. Te Amo!

Por último, o mais importante, agradecer aos meus pais Élea e Luis, pela educação, amor e apoio incondicionais em todos momentos e por serem exemplos para mim que irão me acompanhar por toda a vida. Não por clichê, mas eu acredito que com certeza eu tenho os melhores pais do mundo. Mãe e pai amo muito vocês!

SUMÁRIO

1. RESUMO	7
2. ABSTRACT	8
3. INTRODUÇÃO.....	9
3.1. Zonas de hibridação.....	9
3.2. Evolução cromossômica.....	11
3.3. Roedores	13
3.4. Roedores Subterrâneos	13
3.5. Gênero <i>Ctenomys</i>	14
3.6. <i>Ctenomys</i> no Rio Grande do Sul	17
3.7. <i>Ctenomys minutus</i>	18
3.8. <i>Ctenomys lami</i>	21
3.9. Zona híbrida interespecífica: <i>Ctenomys minutus</i> e <i>Ctenomys lami</i>	24
4. OBJETIVOS.....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1. Área de estudo	26
5.2. Coleta em campo	26
5.3. Métodos Citogenéticos	27
5.3.1. Obtenção de cromossomos mitóticos	27
5.3.2. Obtenção de cromossomos meióticos.....	28
6. RESULTADOS	29
6.1 Descrição dos cariótipos.....	29
6.1.1. Ponto de coleta 1	29
6.1.2. Ponto de coleta 2	30
6.1.3. Ponto de coleta 3	31
6.2 Meiose	31
7. DISCUSSÃO.....	35
7. 1. Polimorfismo cromossômico e viabilidade da zona híbrida.....	35
7. 2. Meiose, fertilidade dos híbridos e sazonalidade reprodutiva	38
7. 3. Especiação Cromossômica no gênero <i>Ctenomys</i>	39
7. 4. Contato Secundário e Conservação	41
8. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. RESUMO

As espécies *Ctenomys lami* (Freitas, 2001) e *Ctenomys minutus* (Nehring, 1887) são próximas filogeneticamente e ocorrem na planície costeira do sul do Brasil. *Ctenomys minutus* apresenta oito diferentes cariótipos parentais, distribuídos parapatricamente ($2n = 42, 46a, 46b, 48a, 48b, 48c, 50a$ e $50b$), e entre os quais tem-se a formação de seis zonas híbridas intra-específicas: a) $2n = 46a \times 2n = 48a$; b) $2n = 46b \times 2n = 48b$; c) $2n = 42 \times 2n = 48a$; d) $2n = 50b \times 2n = 48b$; e) $2n = 42 \times 2n = 46b$; f) $2n = 48c \times 2n = 50a$. *Ctenomys lami* apresenta cinco diferentes números diplóides ($2n = 54, 55, 56, 57$ e 58), e duas zonas híbridas intra-específicas: a) $2n = 56a$ ou $55a \times 2n = 58$; b) $2n = 54 \times 2n = 56b$. Essas duas espécies possuem uma zona de contato secundário entre populações com cariótipos $2n = 56b$ (*C. lami*) e $2n = 48a$ (*C. minutus*). Para essa zona híbrida já haviam sido descritos os seguintes cariótipos: $2n = 50/NA = 76$; $2n = 51/NA = 76$; $2n = 52/NA = 78$, 80 e $2n = 52/NA = 79$. Neste trabalho foram realizadas coletas em três localidades diferentes na margem sudoeste da Lagoa dos Barros, na região de contato entre as duas espécies. O primeiro ponto de coleta encontra-se mais próximo às populações de *C. lami*, o segundo ponto é intermediário entre populações das duas espécies, e o terceiro ponto de coleta tem maior proximidade com as populações de *C. minutus*. Os três pontos distam entre si em 3 km. Foram coletados 8 espécimes na primeira população com cinco diferentes cariótipos: $2n = 53$ com números de braços autossômicos (NA) igual a 74 (1 indivíduo); $2n = 54, NA = 78$ (1 indivíduo); $2n = 55, NA = 76$ (2 indivíduos); $2n = 56, NA = 78$ (2 indivíduos) e $NA = 80$ (2 indivíduos). Na segunda localidade foram coletados 7 espécimes com seis diferentes cariótipos: $2n = 50, NA = 74$ (1 indivíduo) e $NA = 76$ (1 indivíduo); $2n = 53, NA = 74$ (1 indivíduo) e $NA = 80$ (2 indivíduos); $2n = 54, NA = 78$ (1 indivíduo) e $NA = 80$ (1 indivíduo). Na terceira localidade foram coletados 5 indivíduos com quatro cariótipos distintos: $2n = 48, NA = 76$ (2 indivíduos); $2n = 49, NA = 74$ (1 indivíduo); $2n = 49, NA = 76$ (1 indivíduo); $2n = 50, NA = 76$ (1 indivíduo). A descoberta de novos cariótipos ($2n = 49, 53, 54$ e 55), formados pela combinação de cromossomos das duas espécies e números diplóides intermediários entre $2n = 56b$ (*C. lami*) e $2n = 48a$ (*C. minutus*) demonstra a presença de uma zona de hibridação interespecífica bem estabelecida na zona de contato secundário entre *C. lami* e *C. minutus*.

2. ABSTRACT

The species *Ctenomys lami* (Freitas, 2001) and *Ctenomys minutus* (Nehring, 1887) are phylogenetically close and occurs in the coastal plain of Southern Brazil. *Ctenomys minutus* have eight different parental karyotypes, parapatrically distributed ($2n = 42, 46a, 46b, 48a, 48b, 48c, 50a$ e $50b$), and six intra-specific hybrid zones: a) $2n = 46a \times 2n = 48a$; b) $2n = 46b \times 2n = 48b$; c) $2n = 42 \times 2n = 48a$; d) $2n = 50b \times 2n = 48b$; e) $2n = 42 \times 2n = 46b$; f) $2n = 48c \times 2n = 50a$. *Ctenomys lami* have five different diploid numbers ($2n = 54, 55, 56, 57$ e 58), and two intra-specific hybrid zones: a) $2n = 56a$ ou $55a \times 2n = 58$; b) $2n = 54 \times 2n = 56b$. These two species have a secondary contact between populations with karyotypes $2n=56b$ (*C.lami*) and $2n = 48a$ (*C.mintus*). For this hybrid zone were described, until this moment, the following karyotypes: $2n = 50/NA = 76$; $2n = 51/NA = 76$ 78, 80 e $2n = 52/NA = 79$. In this work, specimens were collected in three different sample sites at the west of Barros Lake, in the contact zone between these two species. The first sample site is closer to the *C. lami* populations, the second site is intermediary between populations of the two species, and the third is near to the *C. minutus* populations. The three sample sites are distant in 3km, for each other. 8 specimens were collected in the first population, with five different karyotypes: $2n = 53$ with autosomal arm number (AN) = 74 (1 specimen); $2n = 54$, AN = 78 (1 specimen); $2n = 55$, AN = 76 (2 specimens); $2n = 56$, AN = 78 (2 specimens) and AN = 80 (2 specimens). In the second sample site were collected 7 specimens with six different karyotypes: $2n = 50$, AN = 74 (1 specimen) and AN = 76 (1 specimen); $2n = 53$, AN = 74 (1 specimen) and AN = 80 (2 specimens); $2n = 54$, AN = 78 (1 specimen) and AN = 80 (1 specimen). In the third site were collected 5 specimens with four different karyotypes: $2n = 48$, AN = 76 (2 specimens); $2n = 49$, AN = 74 (1 specimen); $2n = 49$, AN = 76 (1 specimen); $2n = 50$, AN = 76 (1 specimen). The finding of new karyotypes ($2n= 49, 53, 54$ e 55), formed by the combination of chromosomes from the two species, and intermediary diploid numbers between $2n = 56b$ (*C.lami*) and $2n=48a$ (*C.mintus*) demonstrates the presence of a well established inter-specific hybrid zone in the area of the secondary contact between *C. lami* and *C. minutus* species.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Zonas de hibridação

Hibridização é conhecida, pelo menos, desde os tempos de Linnaeus, e é discutida frequentemente por evolucionistas (Mayr, 1963; Arnold, 1997; Coyne, 2004).

A maioria das mudanças evolutivas ocorre devagar ou esporadicamente, como conseqüência a observação direta destas mudanças ao longo do tempo oferece informações limitadas sobre o processo evolutivo, que é mais comumente estudado através de modelos (Harrison, 1993). Zonas híbridas naturais apresentam surpreendentes padrões de variação e têm atraído a atenção de biólogos evolutivos, sendo consideradas excelentes modelos de estudo podendo oferecer informações sobre características e processos envolvidos na divergência e especiação (Hewitt, 1988; Harrison, 1993). Por isso, são consideradas testemunhas do processo de especiação em ação (Corti *et al.*, 1990).

Segundo Hewitt (1988) e Barton & Hewitt (1989), tais zonas podem ser definidas como regiões estreitas onde populações geneticamente distintas se encontram e produzem híbridos, sendo que as populações envolvidas podem ou não ser da mesma espécie.

A definição da formação de zonas de hibridação envolve os eventos históricos e demográficos e as forças evolutivas que propiciaram a origem destes processos, podendo ser resultado de contato primário ou secundário entre as populações (Hewitt, 1988).

A hibridação interespecífica pode caracterizar-se pela ocorrência de eventos esporádicos entre espécies simpátricas, pela formação de zonas híbridas estreitas entre táxons com efetiva distribuição parapátrica, ou até mesmo por um intenso processo de miscigenação entre as populações parentais (Harrison, 1993).

Frequentemente sugere-se que as zonas híbridas são conseqüências diretas de distúrbios ou mudanças ambientais, as quais podem ser provocadas pelo homem, causando alterações na distribuição geográfica e restringindo o habitat de espécies, subespécies, raças geográficas ou cromossômicas podendo levar a situações de hibridação em zonas de contato. Pela dificuldade em se prever os efeitos da hibridação na divergência destas populações ou espécies, além da viabilidade das mesmas, entender seus processos torna-se fundamental (Gava, 1996). Assim, a investigação de aspectos ecológicos, como seleção devida a condições do ambiente, processos

históricos, como dispersão e expansões populacionais, bem como mudanças ambientais propiciadas por ações humanas são extremamente importantes para a definição da origem de uma zona híbrida (Harrison, 1993; Hewitt, 2001). A avaliação destes eventos pode trazer importantes informações que auxiliarão na definição de uma origem natural ou antropogênica para uma zona de hibridação, o que se apresenta de fundamental importância para conservação das espécies (Allendorf *et al.*, 2001). Esta se torna um problema para a conservação se for ocasionada por mudanças no habitat ou na composição das espécies provocadas por ações humanas, requerendo nestes casos medidas urgentes de manejo para impedir o comprometimento das histórias evolutivas e integridades genéticas das espécies envolvidas (Rhymer & Simberloff, 1996; Huxel, 1999; Allendorf *et al.*, 2001).

A análise de padrões de hibridação entre espécies envolve um amplo espectro de investigações. No entanto, o primeiro e crucial passo na investigação de um evento de hibridação entre organismos reside na adequada identificação dos híbridos para futuros aprofundamentos nos padrões evolutivos envolvidos neste processo (Allendorf *et al.*, 2001). Um dos principais aspectos que deve ser investigado envolve a avaliação da viabilidade dos híbridos e a consequente existência de introgressão genética em uma ou ambas as espécies parentais (Harrison, 1993; Jiggins & Mallet, 2000; Allendorf *et al.*, 2001). A produção de híbridos férteis com diversas possibilidades de cruzamentos e adaptados às condições locais pode levar, após algumas gerações, a uma população na qual essencialmente todos os indivíduos sejam de origem híbrida. Esta população híbrida pode evoluir até o fusionamento total das duas espécies parentais, formando uma única espécie, e eventualmente ocasionar a extinção de um dos táxons parentais, dependendo da direção e intensidade da introgressão, ou até mesmo a uma extrema diferenciação da população híbrida com a evolução de barreiras ao cruzamento e consequente formação de uma espécie distinta (Arnold, 1992; Arnold, 1993; Harrison, 1993; Allendorf *et al.*, 2001). Por outro lado, uma zona híbrida pode apresentar-se estável, sendo mantida por milhares de anos em uma determinada área geográfica, sob a influência de algum processo seletivo, sem afetar profundamente as espécies parentais. Estas zonas geralmente representam situações de equilíbrio mantido pelo balanço entre seleção e dispersão (Barton & Hewitt, 1985).

Este balanço pode envolver seleção contra os híbridos, com uma redução da fertilidade ou viabilidade das formas híbridas (seleção endógena); ou uma seleção habitat-dependente (seleção exógena) onde diferentes combinações genéticas podem ser favorecidas em diferentes ambientes

(Arnold, 1992; Barton, 2001). A desvantagem do heterozigoto tem sido particularmente enfatizada como uma possível força seletiva em zonas híbridas devido à expectativa da redução de fertilidade em cariótipos heterozigotos causada pelo aparecimento de aberrações na meiose (Searle, 1993). Para serem viáveis, cariótipos heterozigotos devem produzir gametas balanceados cromossomicamente, ou seja, segmentos homólogos em cromossomos estruturalmente diferentes devem parear e formar quiasmas na Prófase I, e devem se separar e segregar apropriadamente na Anáfase I.

Barton & Hewitt (1989) acreditam que a maior parte das zonas híbridas seja classificada como zonas de tensão, ou seja, apareçam como clinas mantidas por um balanço entre dispersão ao acaso e seleção contrária ao híbrido.

Zonas híbridas, inicialmente identificadas com base em variações cariotípicas, são de enorme interesse no estudo do controverso papel dos cromossomos na especiação e podem trazer informações sobre frequência de mudanças gênicas inter-raciais (Lugon-Moulin *et al.*, 1996; Balloux *et al.*, 2000).

Em espécies do gênero *Ctenomys*, zonas de hibridação entre diferentes raças cromossômicas e entre espécies foram descritas e analisadas por Freitas, 1997; Marinho & Freitas, 2000; Gava & Freitas, 2002 e 2003; Castilho, 2004; Lopes *et al.* (*in prep.*).

3.2. Evolução cromossômica

A importância citogenética na evolução foi levantada principalmente após a descoberta do efeito de posição, já que a mutação cromossômica pode, por exemplo, alterar relações de ligação dos genes dentro do genótipo, ou ainda, alterar a expressão pelo efeito de posição (Bengtsson, 1980).

Cromossomos são as unidades de herança genética contidas nos núcleos das células dos eucariotos. Os cromossomos podem diferir em tamanho e forma, e também em relação ao seu número. Todas estas alternativas estão sujeitas a alterações evolutivas, podendo variar entre, indivíduos e/ou organismos (Schubert, 2007).

Variações cariotípicas sejam em relação ao número diplóide, à morfologia cromossômica, ou ambos, não são consideradas exceções em diversas espécies de mamíferos. As alterações cromossômicas são principalmente provenientes de rearranjos cromossômicos, que podem ter

diferentes efeitos na evolução cromossômica. Particularmente, alguns rearranjos que possuem heterose negativa podem ter um papel preponderante em processos de cladogênese, principalmente aqueles que causam, ou têm potencial para causar, segregação errada durante a meiose, podendo ter um papel significativo na limitação do fluxo gênico entre as espécies. Entre eles estão: fusões ou fissões Robertsonianas; inversões paracêntricas e pericêntricas; fusões in tandem; e translocações recíprocas. Porém, os rearranjos podem ser considerados neutros ou adaptativos, ou seja, possivelmente, não estão envolvidos na especiação (King, 1993; Noor *et al.*, 2001; Rieseberg, 2001; Navarro & Barton, 2003b). Uma interessante predição desse modelo é que rearranjos cromossômicos poderiam induzir barreiras ou filtros para o fluxo gênico que poderiam ser específicos para algumas partes do genoma (Yannic *et al.*, 2009). Porém, nem sempre os rearranjos cromossômicos e mudanças cromossômicas levam a redução da fertilidade, já que existem alguns mecanismos na meiose, como supressão parcial ou completa da recombinação, que diminuem os problemas de segregação. Além disso, diferentes tipos de rearranjos provocam diferentes efeitos no valor adaptativo (Rieseberg, 2001).

Zonas híbridas entre organismos com divergências cromossômicas comprovam que essas diferenças não necessariamente causam isolamento reprodutivo. Hibridização e introgressão entre espécies são o contrário de isolamento reprodutivo e desafia a “veracidade” do conceito biológico de espécie (Mallet, 2005).

A fixação de rearranjos cromossômicos geralmente está relacionada a pequenos tamanhos populacionais, podendo estes rearranjos ser selecionados negativamente quando em minoria, ou positivamente quando em maioria, ou ainda podem ser fixados por efeito de deriva genética, especificamente em populações fortemente subdivididas com pequenos demes (Lande, 1979). Isso pode ser observado em roedores subterrâneos, que apresentam diferenças cromossômicas intra e interespecíficas, pois o tempo de geração é curto, as populações geralmente são pequenas e apresentam baixo fluxo gênico entre si (Futuyma, 2003).

Considerando a diversidade cromossômica e a descoberta de diferentes cariótipos intra-específicos em roedores, o que tem sugerido a existência de espécies crípticas, a citogenética, como ferramenta, torna-se particularmente útil no estudo desse grupo. Além disso, os roedores apresentam convergências e homoplasias morfológicas que geram inúmeras controvérsias taxonômicas, sendo necessários novos estudos em taxonomia e sistemática dos grupos em questão (Bonvicino *et al.*, 2005).

3.3. Roedores

Os roedores constituem a ordem de mamíferos com o maior número de espécies, contemplando cerca de 42% das 5.419 espécies atuais, com aproximadamente 33 famílias, 480 gêneros e 2.277 espécies (Wilson & Reeder, 2005). Ocorrem em praticamente todos os continentes, ocupando uma grande variedade de habitats. Podem ter hábitos arborícolas, terrestres, adaptações à vida semi-aquática e algumas espécies são especializadas à vida subterrânea (Nowak, 1999).

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

No Brasil, são atualmente reconhecidos 71 gêneros e 235 espécies de roedores, com quase 40% de endemismo (Oliveira & Bonvicino, 2006).

Os roedores podem ser divididos em duas subordens: Sciurognathi e Hystricognathi, que são diferenciadas principalmente pela estrutura e musculatura mandibular e ainda pela dentição (Wilson & Reeder, 2005). Os roedores Hystricognathi incluem os Phiomorpha do Velho Mundo e os Caviomorpha do Novo Mundo. Os últimos estão representados por famílias de roedores endêmicos ao continente Americano, que podem ter se originado e diversificado na América do Sul durante o Oligoceno, aproximadamente há 30 milhões de anos (Vucetich *et al.*, 1999). Os Caviomorfos apresentam uma grande diversidade, representada por 12 famílias atuais, com cerca de 44 gêneros e mais de 170 espécies, dentre as quais aproximadamente 30% pertencem à família Ctenomyidae, constituída por roedores fossoriais e subterrâneos (Wilson & Reeder, 2005).

3.4. Roedores Subterrâneos

Os vertebrados que permanecem maior parte de sua existência no interior de túneis fechados sob o solo e alimentam-se de material vegetal disponível nas proximidades de suas tocas são considerados subterrâneos (Lacey *et al.*, 2000). Três ordens dentro da classe Mammalia possuem representantes com adaptações ao modo de vida subterrânea, são elas: Marsupialia, Insectivora e Rodentia (Nevo, 1991). A ordem Rodentia possui um grande número de espécies escavadoras subterrâneas, distribuídas em todos os continentes com exceção da Austrália e

Antártica (Nevo, 1979; Lacey *et al.*, 2000). As famílias que apresentam espécies fossoriais são: Bathyergidae (região Etiópica); Geomyidae (Neotropical) (Nowak, 1999; Lacey *et al.*, 2000). Os roedores subterrâneos representam um clássico exemplo de convergência adaptativa (Nevo, 1999), apresentando uma série de adaptações ao seu modo de vida que surgiram independentemente em diversos grupos e em diferentes regiões zoogeográficas como reflexo das restrições ambientais a eles impostas (Stein, 2000).

O surgimento da zona ecológica subterrânea ocorreu durante o Cenozóico médio, há aproximadamente 35 milhões de anos, num cenário de mudanças climáticas, ciclos de aridez, formação de montanhas e regressões marinhas. Nessa época, as florestas deram lugar a ambientes abertos como as savanas, estepes, campos e desertos, cenários nos quais aconteceram várias modificações evolutivas. Os roedores subterrâneos, após terem derivado independentemente de formas de superfície, sofreram nova radiação quando da extinção dos grandes ungulados, devido ao aumento da aridez no Plio-Pleistoceno (Reig *et al.*, 1990).

Apesar da grande diversidade de ambientes e áreas geográficas nas quais os roedores subterrâneos são encontrados, considera-se o ambiente subterrâneo como sendo propenso a poucas variações ambientais, o que pode ser comprovado pela convergência adaptativa verificada entre espécies de roedores subterrâneos (Stein, 2000).

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

3.5. Gênero *Ctenomys*

O gênero *Ctenomys* Blainville, 1826 (família Ctenomyidae, subordem Hystricognathi; Woods, 1982), possui cerca de 60 espécies descritas, que correspondem aos animais popularmente conhecidos como tuco-tucos, assim chamados devido à sua vocalização característica (Nowak, 1999; Lacey *et al.*, 2000). O nome científico *Ctenomys* vem do grego, onde “*Ctenus*” significa pente e “*mys*” significa rato.

O gênero *Ctenomys* surgiu provavelmente na província de Buenos Aires – Argentina, onde foram encontrados registros fósseis em formações do Terciário (Formação Chapadmalal, Plioceno Superior), implicando uma antiguidade para o gênero maior do que 3,5 milhões de anos (Contreras *et al.*, 1987; Reig *et al.*, 1990; Lessa & Cook, 1998; Verzi, 2008). A partir de então o gênero passou por uma cladogênese expressiva, e sua especiação é considerada como sendo uma das mais explosivas dentre os gêneros de mamíferos (Reig *et al.*, 1990; Cook & Lessa, 1998; Lessa & Cook, 1998). Tamanha diversificação pode estar associada aos inúmeros rearranjos cromossômicos encontrados entre as diferentes espécies, o que sugere uma importância fundamental na especiação (Reig & Kiblicky, 1969; Lessa & Cook, 1998).

A adaptação ao ambiente subterrâneo possibilitou a irradiação do gênero e a conseqüente ocupação de diversos ambientes. As espécies deste gênero ocorrem desde o altiplano andino (4000 m) até o nível do mar, em todos os países do sul da América do Sul: Peru, Bolívia, Chile, Paraguai, Uruguai, sul e centro-oeste do Brasil e em toda a Argentina, até o extremo sul da região patagônica, sendo seu representante mais austral a espécie *Ctenomys maggelanicus*, na Terra do Fogo (Reig *et al.*, 1990; Lizzaralde *et al.*, 2003).

Os ambientes onde estes roedores vivem geralmente estão associados a áreas abertas. Ocupam tocas individuais que se localizam próximas umas das outras formando o que se conhece por tuqueira (Reig *et al.*, 1990; Nowak, 1999; Lacey *et al.*, 2000). A estrutura do túnel consiste de uma galeria principal e várias ramificações partindo desta, terminando em aberturas ou em um fundo cego. Ao longo das galerias são encontradas câmaras especializadas para o depósito de comida ou defecação (Nevo, 1979; Gallardo & Anrique, 1991; Altuna *et al.*, 1999; Busch *et al.*, 2000). As tocas são mantidas sempre fechadas, a fim de evitar predação e também manter condições mais estáveis que as do meio externo, com menores flutuações de temperatura, alto grau de umidade relativa, concentrações de O₂ entre 15 e 21% e de CO₂ entre 0,5% e 2% (McNab, 1966).

Os indivíduos desse gênero apresentam uma série de adaptações morfológicas ao modo de vida subterrânea, tais como: corpo robusto e cilíndrico, pequeno e fusiforme, cabeça grande com bula auditiva ampliada, pavilhão auricular e olhos reduzidos, embora maiores do que esperado para roedores fossoriais, cauda curta com pêlos esparsos, pescoço e membros curtos e musculosos. A abertura bucal é atrás dos incisivos, que são proeminentes, compridos e têm coloração laranja brilhante. As patas posteriores são geralmente maiores do que as anteriores,

sempre com unhas compridas e rígidas, e apresentam pêlos modificados em cerdas que aumentam a superfície de contato, auxiliando na escavação (Nevo, 1979; Lacey *et al.*, 2000; Wilson & Reeder, 2005).

São animais herbívoros, alimentando-se basicamente de raízes e folhas de gramíneas. Considera-se que eles exerçam forte influência sobre as comunidades de plantas correspondentes à área de ocorrência (Nevo, 1979; Gallardo, 1991; Zenuto & Busch, 1995; Altuna *et al.*, 1999).

As características deste gênero como baixa mobilidade e territorialidade e a formação de pequenas populações isoladas, com baixo fluxo gênico, devem contribuir para o efeito de deriva, que possibilita a fixação ou eliminação de novos rearranjos cromossômicos que possam surgir nas espécies (Patton & Sherwood, 1983; Reig, 1989; Reig *et al.*, 1990; Freitas, 1995; Malizia *et al.*, 1995).

Entre os ctenomídeos a distribuição fragmentada é bastante evidente, determinada por condições ecológicas e barreiras geográficas (Nevo, 1979; Cook *et al.*, 1990; Reig *et al.*, 1990; Steinberg & Patton, 2000). A maioria das espécies apresenta distribuição em parapatría e alopatria (Pearson, 1984; Reig *et al.*, 1990), embora existam casos de simpatria (Contreras & Reig, 1965; Malizia *et al.*, 1991; Comparatore *et al.*, 1995).

O gênero *Ctenomys* é o grupo de mamíferos atuais com maior variação cromossômica, e dado que sua radiação ocorreu durante um curto intervalo de tempo, também se destaca sua alta taxa de troca cromossômica. No gênero os números diplóides variam desde $2n=10$ (*C. steinbach*) a $2n=70$ (*C. pearsoni* e *C. dorbignyi*) (Reig & Kiblicky, 1969; Kiblicky *et al.*, 1977; Freitas & Lessa, 1984; Massarini *et al.*, 1991a,b; Freitas, 1997 e 2001; Slamovits *et al.*, 2001), e os número de braços autossômicos (NA) desde $NA = 16$ a 90 (Reig *et al.*, 1992). Devido a estas características as espécies de ctenomídeos têm sido consideradas modelos relevantes para o estudo dos processos de especiação e sua relação com a variação cromossômica. Vários autores sugerem que a variação cromossômica teve um papel fundamental na alta diversificação deste gênero e na rápida evolução do mesmo (Reig & Kiblicky, 1969; Reig *et al.*, 1990, 1992; Ortells, 1995).

3.6. *Ctenomys* no Rio Grande do Sul

No Estado do Rio Grande do Sul tem-se atualmente quatro espécies do gênero *Ctenomys* descritas (Figura 1). *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830, é a espécie mais amplamente distribuída, habita os campos sulinos, da Depressão Central no Rio Grande do Sul até o norte do Uruguai. Apresenta quatro cariótipos distintos, $2n= 40, 42, 44$ e 46 (Freitas & Lessa, 1984; Freitas, 1995, Fernandes *et al.*, 2009). *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981, habita a primeira linha de dunas da planície costeira, e sua distribuição estende-se desde Arroio Teixeira, ao norte, até a desembocadura do Arroio Chuí, na divisa com o Uruguai, ao sul (Fernández-Stolz *et al.*, 2007). Apresenta um único número diplóide: $2n=48$ (Freitas, 1994). *Ctenomys lami* (Freitas, 2001) e *Ctenomys minutus* (Nehring 1887) são as espécies alvo deste trabalho, e serão comentadas detalhadamente a seguir.

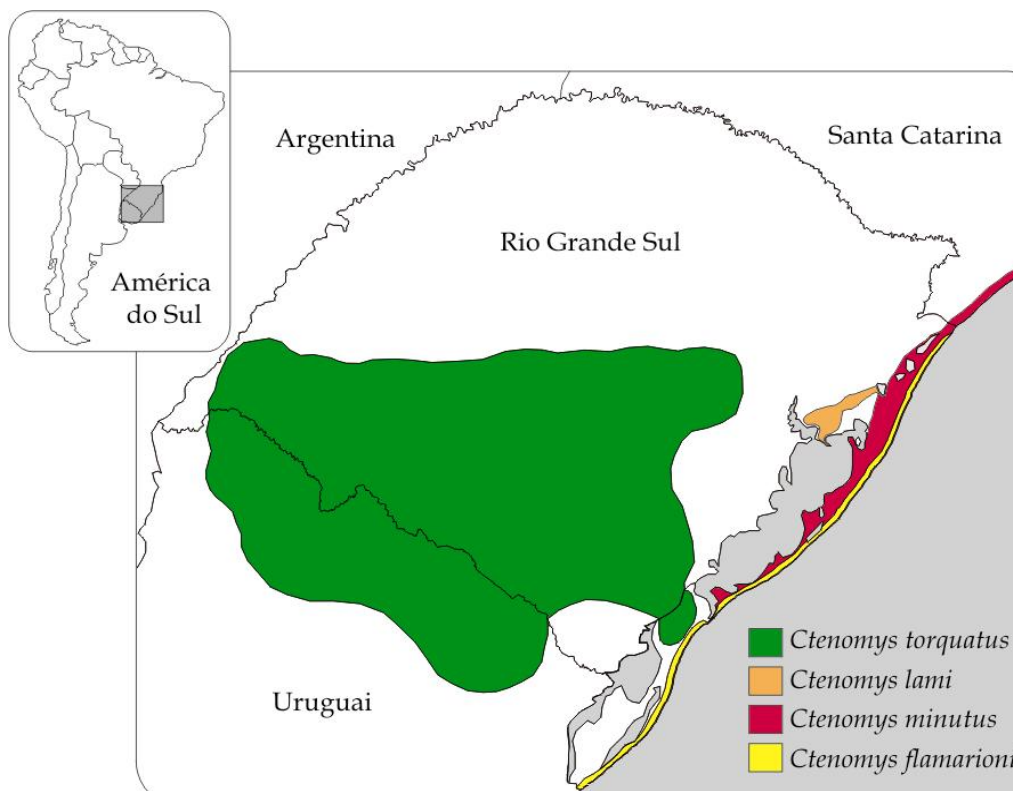


Figura 1: Distribuição geográfica das espécies do gênero *Ctenomys* no Rio Grande do Sul.

3.7. *Ctenomys minutus*

A espécie *Ctenomys minutus* (Figura 2), ocorre na Planície Costeira do Sul do Brasil, desde o Sul do Estado de Santa Catarina, no Farol de Santa Marta, até as proximidades do município de São José do Norte no Estado do Rio Grande do Sul (Freygang *et al.*, 2004, Lopes *et al.*, *in prep*). Dentre todas as espécies do gênero *Ctenomys* que ocorrem na Planície Costeira, *C. minutus* é a mais amplamente distribuída, ocupando uma extensão linear de aproximadamente 500 km (Figura 3). Sendo que ao norte de sua ocorrência habita a primeira linha de dunas e campos arenosos, correspondentes à segunda linha de dunas, e a partir da Lagoa dos Barros, no município de Osório, até o Sul de sua distribuição ocupa apenas áreas de campos arenosos, interiorizando-se cerca de 2 km da costa (Freitas, 1995). O modelo atualmente aceito para descrever a evolução geomorfológica da Planície Costeira propõe a formação de quatro sistemas deposicionais chamados de Laguna-barreira, provenientes de eventos de transgressão-regressão marítima (Tomazelli & Villwock, 2000). A primeira linha de dunas corresponde à quarta barreira, formada no quarto evento deposicional, e a segunda linha de dunas corresponde a terceira e segunda barreiras, todas elas estabelecidas durante a formação da Planície Costeira do Rio Grande do Sul durante o Pleistoceno e Holoceno (Tomazelli & Villwock, 2000).

Ctenomys minutus ocupa ambientes abertos preferencialmente com solos secos, que não sejam compactados e nem alagáveis (Gastal, 1994; Rui & Gastal, 1997).

As populações desta espécie possuem notável variação cariotípica (Gava & Freitas, 2004). Estudos realizados por Freitas (1997), Gava & Freitas (2003), Castilho (2004), Freygang *et al.* (2004) e Lopes *et al.* (*in prep.*) demonstraram a existência de oito cariótipos parentais diferentes, distribuídos parapatricamente ($2n = 42, 46a, 46b, 48a, 48b, 48c, 50a$ e $50b$), entre os quais se tem a formação de seis zonas híbridas intra-específicas que dão origem a inúmeros cariótipos intermediários entre os parentais: a) $2n = 46a \times 2n = 48a$; b) $2n = 46b \times 2n = 48b$; c) $2n = 42 \times 2n = 48a$; d) $2n = 50b \times 2n = 48b$; e) $2n = 42 \times 2n = 46b$; f) $2n = 48c \times 2n = 50a$.

Os polimorfismos cromossômicos encontrados são devidos a rearranjos Robertsonianos e fusões/fissões *in tandem*, e no caso de indivíduos que compartilham o mesmo número diplóide, porém com cariótipos descritos como “a” ou “b”, o que os diferencia são rearranjos em cromossomos distintos (Freitas, 1997; Freygang *et al.*, 2004).

Nos espécimes de cariótipo “a” e “c” ($2n = 46a, 48c, 50a, 42$ e seus respectivos cariótipos híbridos) o par cromossômico 2 encontra-se íntegro, com exceção de $2n = 48a$ que possui o cromossomo 2 fissionado. Por outro lado, em todos os cariomorfos reconhecidos como “b” ($2n = 46b, 47b, 48b, 49b$ e $50b$) o par 2 encontra-se fissionado originando dois cromossomos, correspondentes aos braços 2p e 2q, e o cromossomo correspondente ao braço 2p sofreu uma inversão pericêntrica originando um cromossomo metacêntrico (Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006).

Os rearranjos cromossômicos envolvidos em cada um dos cariótipos foram identificados através da técnica de banda G. Partindo-se do cariótipo $2n = 50a$, encontrado no extremo norte da distribuição de *C. minutus*, pode-se destacar que os cromossomos identificados como 2, 16, 17, 19, 20, 22, 23 e 24 estão envolvidos em alguma forma de rearranjo nos outros cariótipos encontrados para esta espécie (Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006).

Tamanha variabilidade cariotípica demonstra a ocorrência de polimorfismo cromossômico em *C. minutus*, que pode ser reflexo de um isolamento geográfico entre diferentes populações da espécie (Freitas, 1997; Gava & Freitas, 2002, 2003; Freygang *et al.*, 2004; Freitas, 2006).



Figura 2: Exemplar de *Ctenomys minutus* adulto

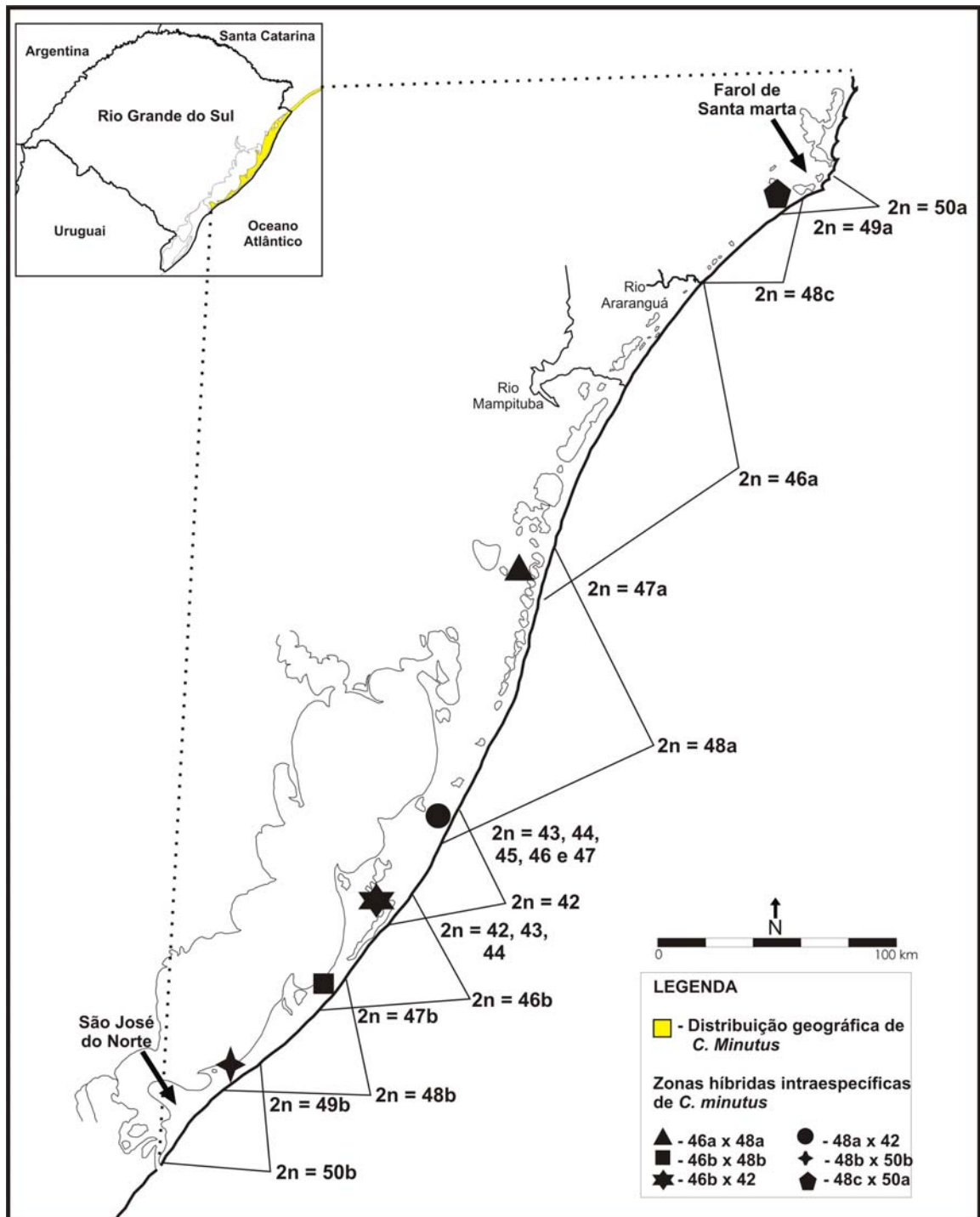


Figura 3: Distribuição geográfica de *Ctenomys minutus* na planície costeira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Os diferentes símbolos representam as zonas híbridas intraespecíficas de *C. minutus*. As regiões de ocorrência dos diferentes cariótipos de *C. minutus* encontram-se destacadas no mapa.

3.8. *Ctenomys lami*

A espécie *Ctenomys lami* (Figura 4) é endêmica do Estado do Rio Grande do Sul, limitada a uma estreita faixa de ocorrência de 78 km x 12 km, em uma região de solo arenoso conhecida como Coxilha das Lombas, estendendo-se do norte do Lago Guaíba até o noroeste da Lagoa dos Barros. Essa região é cercada a noroeste pelo banhado dos Pachecos e a sudeste pelo banhado dos Touros (Figura 5, Freitas, 2001, 2007). Esta área originou-se durante o Pleistoceno Inferior (1,8 milhão de anos atrás) e é resultado do primeiro evento transgressivo – regressivo marinho do Pleistoceno. A Coxilha das Lombas constitui a linha de dunas mais antiga e interiorizada da Província Costeira do Estado (Vilwock, 1989). Atualmente esta área é caracterizada por apresentar pastagens e plantações que ocorre em solos arenosos (Freitas, 1990, 2001).

Esta espécie apresenta a maior variabilidade cariotípica, na menor distribuição geográfica conhecida até então para o gênero *Ctenomys*, com cinco diferentes números diplóides ($2n = 54, 55, 56, 57$ e 58), e 26 diferentes cariótipos descritos em uma área de 936 km^2 (Freitas, 1990; 1997; 2001; 2007). As variações nos cariótipos são devidas a rearranjos Robertsonianos e inversões pericêntricas, e como observadas nos espécimes de *C. minutus*, números diplóides iguais descritos como “a” ou “b” se diferenciam por apresentarem rearranjos em cromossomos distintos (Freitas, 2007).

De acordo com o estudo de Freitas (1990), considerando um transecto sudoeste–nordeste, o par 1 na forma metacêntrica ocorre em três populações contíguas, sendo seguidas de seis populações onde esse par é encontrado fissionado dando origem a quatro acrocêntricos. Continuando o transecto, quatro populações voltam a ter o cromossomo 1 na sua forma metacêntrica, seguidas de três populações com indivíduos possuindo o mesmo fissionado, sendo que heterozigotos foram observados em algumas populações, sempre em baixa frequência. Ao analisar o par 2, o autor observa que o mesmo se distribui de forma semelhante.

Associando as variações dos cromossomos 1 e 2 às mudanças de solo e relevo ao longo da distribuição da espécie, Freitas (1990) propôs uma divisão em quatro blocos populacionais de acordo com a variação cariotípica: bloco A com $2n = 54, 55a$ e $56a$, com indivíduos que possuem a forma metacêntrica dos pares 1 e 2; bloco B com $2n = 57$ e 58 , com populações compostas de indivíduos que possuem os pares 1 e 2 fissionados dando origem a quatro acrocêntricos para cada par, isoladas parcialmente do bloco A por formações graníticas elevadas; bloco C com $2n = 54$ e

55a, onde os indivíduos voltam a ter os cromossomos 1 e 2 em sua forma metacêntrica; e bloco D com $2n = 55b$ e $56b$, onde o cromossomo 1 é encontrado em sua forma fissionada dando origem a quatro acrocêntricos, e o cromossomo 2 apresenta forma metacêntrica.

Entre as populações cromossômicas de *C. lami* há indicação de duas zonas híbridas estreitas. A primeira caracterizada pelo cruzamento entre os cariótipos $2n = 56a$ ou $2n = 55a$ (bloco A) com $2n = 58$ (bloco B), e a segunda formada pela hibridação entre os cariótipos $2n = 54$ (bloco C) com $2n = 56b$ (bloco D) (Freitas, 2007). Os blocos B e C encontram-se separados por uma barreira geográfica formada pela ligação entre os banhados dos Touros e dos Pachecos.



Figura 4: Exemplar de *Ctenomys lami* adulto.

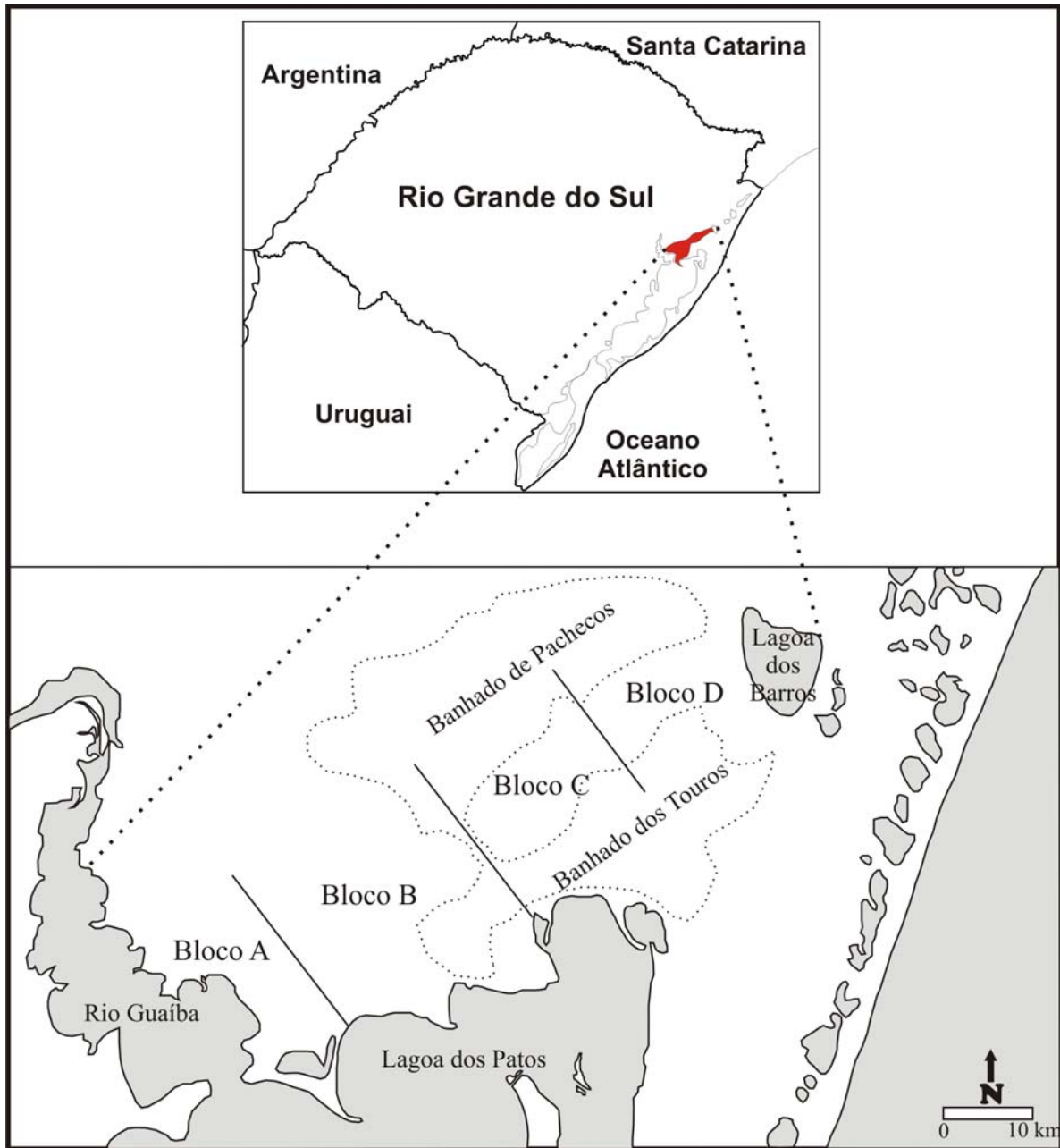


Figura 5: Distribuição geográfica de *Ctenomys lami* na planície costeira do Rio Grande do Sul, destacada em vermelho no mapa. As regiões de ocorrência dos diferentes cariótipos de *C. lami*, bem como as zonas híbridas intra-específicas foram descritas no texto.

3.9. Zona híbrida interespecífica: *Ctenomys minutus* e *Ctenomys lami*

Uma zona de hibridação interespecífica foi descrita entre espécimes de *C. minutus* com $2n=48a$ e espécimes de *C. lami* com $2n = 56b$ (Gava & Freitas, 2003), e estudada através de dados cromossômicos e de *loci* de microssatélites (El Jundi, 2003). Foram encontrados espécimes com números diplóides intermediários entre os cariótipos envolvidos das espécies parentais ($2n = 50, 51$ e 52) (Gava & Freitas, 2003). El Jundi (2003), através dos dados moleculares, encontrou baixos níveis de fluxo gênico entre as populações da zona de hibridação e populações das espécies parentais, atribuído à baixa adaptabilidade do híbrido, também foi sugerida uma possível introgressão de alelos de *C. minutus*, o autor atribuiu a existência desta zona de hibridação a um contato secundário de origem antrópica.

As duas espécies em questão são proximamente relacionadas filogeneticamente, sendo a espécie *C. lami* considerada como a mais semelhante ao ancestral comum entre as duas espécies presente na região (Freitas 1990, 1995; Moreira *et al.*, 1991). As formas cromossômicas de *C. minutus* seriam derivadas de *C. lami* por um processo de especiação baseada em rearranjos cromossômicos (Freitas, 2001). Nesse sentido, o isolamento gerado pelo banhado no entorno da região da Coxilha das Lombas e entre a Coxilha das Lombas e a Lagoa dos Barros (Arienti, 1986) teria sido o responsável pela criação de uma barreira geográfica efetiva isolando populações e permitindo que as mesmas seguissem caminhos evolutivos diferentes. Recentemente, na década de 1950, a ocupação humana e o desenvolvimento de culturas de arroz na região têm drenado constantemente a Lagoa causando a redução de seu volume expondo uma região arenosa possibilitando a invasão desse espaço por parte das duas espécies e seu conseqüente contato (El Jundi, 2003).

Resultados mais conclusivos sobre esta zona híbrida são necessários e exigem análises de amostras representativas, e um estudo aprofundado, incluindo a análise dos cromossomos envolvidos e sua associação com os marcadores moleculares, os cariótipos que são formados, a viabilidade dos híbridos, a existência de gerações a partir da F1 e retrocruzamentos, e estudos ecológicos que permitam, tanto um conhecimento maior do hábitat das duas espécies, da área geográfica envolvida, o delineamento da extensão da área descrita, e os impactos que esta zona híbrida pode ter sobre as espécies parentais envolvidas (El Jundi, 2003).

4. OBJETIVOS

O corpo de conhecimento obtido até então sobre a zona híbrida interespecífica entre *Ctenomys minutus* e *Ctenomys lami* era insuficiente para o esclarecimento de uma série de questões relacionadas a esta zona híbrida, tais como: quais cariótipos são formados a partir dos cruzamentos entre os parentais? Qual a viabilidade dos híbridos? Existem gerações a partir da F1 e retrocruzamentos? Quais os impactos que esta zona híbrida pode ter sobre as espécies parentais?

Tendo em vista que questões levantadas através do estudo de zonas híbridas têm um grande potencial em revelar padrões para inferir processos evolutivos, este trabalho tem por objetivos:

- Analisar e descrever os cariótipos de indivíduos coletados na margem sudoeste da Lagoa dos Barros, área correspondente à zona de contato entre as espécies *C. minutus* e *C. lami*;
- Verificar a frequência dos diferentes cariótipos encontrados;
- Verificar a regularidade dos números cromossômicos na meiose dos híbridos existentes nesta zona de hibridação interespecífica;
- Colaborar com o conhecimento sobre a variabilidade cromossômica e como este mecanismo de diferenciação pode atuar em processos de especiação nos ctenomídeos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Área de estudo

O estudo foi realizado na área de contato entre as populações de *Ctenomys minutus* com $2n = 48a$ e as populações de *Ctenomys lami* com $2n = 56b$, na margem sudoeste da Lagoa dos Barros, no município de Osório, na planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 6).

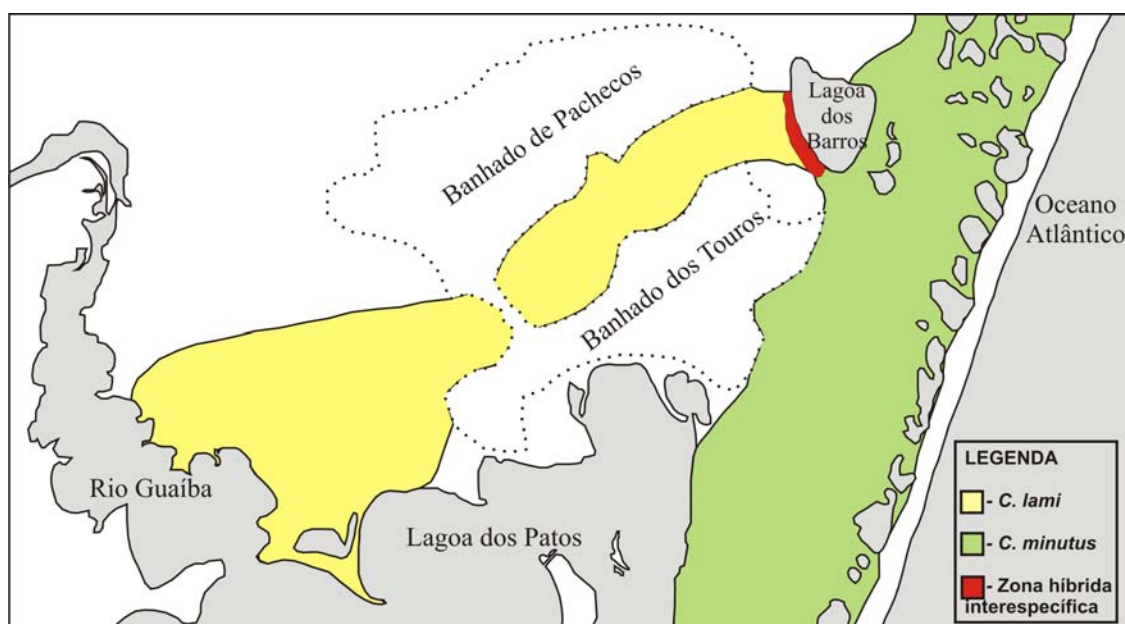


Figura 6. Figura esquemática representando a área de contato e hibridação entre as espécies *C. lami* e *C. minutus* a oeste da Lagoa dos Barros, na planície costeira do Rio Grande do Sul

5.2. Coleta em campo

Foram definidos três pontos de coleta ao longo da área de estudo, o primeiro ponto de coleta encontra-se mais próximo às populações de *C. lami* (29°54'31.7"S 50°25'31.7"W), a coleta nesse ponto foi realizada no início do mês de Maio de 2009. O segundo ponto é intermediário entre as populações das duas espécies (29°55'53.1"S 50°25'25.7"W), a coleta nesse ponto foi realizada no fim do mês de Junho de 2009. O terceiro ponto de coleta tem maior proximidade com as populações de *C. minutus* (29°57'41.5"S 50°24'26.7"W), a coleta nesse

ponto ocorreu em Outubro de 2009. Os pontos distam entre si em 3 Km (Figura 7). Em cada ponto de captura são registradas as coordenadas geográficas com a utilização de GPS (*Global Positioning System*).

Os animais foram coletados vivos com armadilhas especiais para roedores fossoriais do tipo Oneida Victor nº0, colocadas após a abertura da entrada dos túneis, e fixadas externamente através de estacas de madeira com bandeiras numeradas. Cada armadilha é revisada com intervalos que variam entre 10 e 15 minutos. Depois dos indivíduos serem capturados e anestesiados com Zoletil, são anotadas suas características bionômicas, como peso, sexo, tamanho do corpo, tamanho da cauda, incisivo, pé posterior com unha, pé posterior sem unha.

As coletas foram realizadas com autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos Hídricos), conforme licença permanente nº 14690-2/2008. As peles e esqueletos dos espécimes foram preparados e depositados na coleção de mamíferos do Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5.3. Métodos Citogenéticos

5.3.1. Obtenção de cromossomos mitóticos

As preparações cromossômicas foram realizadas seguindo os protocolos propostos por Ford & Hamerton (1956), com adaptações. Cada animal foi pesado e, para cada 100g de peso, foi injetado 1ml de uma solução de colchicina a 0,1%. Após uma hora da injeção, cada roedor foi sacrificado e em seguida os dois fêmures foram retirados, as epífises cortadas e, com auxílio de uma seringa com agulha, a medula óssea foi transferida para um tubo falcon (de centrífuga), contendo solução hipotônica (KCl:0,075M), em seguida o conteúdo do tubo foi homogeneizado. Após 20 minutos da obtenção da medula óssea, o material foi centrifugado por 5 minutos a 800rpm. Posteriormente a fixação foi realizada em solução composta por três partes de metanol para cada parte de ácido acético. Após o mínimo de 24 horas, o fixador era trocado pelo menos três vezes antes da fixação de células em suspensão em lâminas resfriadas em álcool e coradas com Giemsa 4% tamponado (tampão fosfato, pH = 6,8), durante 10 minutos.

Para cada animal foi realizada a análise de no mínimo 10 células metafásicas para o estabelecimento do número diplóide, e posterior fotografia das melhores células e montagem dos cariótipos. Os pareamentos foram feitos segundo a classificação dos cromossomos quanto à forma, sendo posteriormente colocados em ordem decrescente de tamanho, e foi estabelecido o número de braços autossômico (NA).

5.3.2. Obtenção de cromossomos meióticos

Para obtenção de cromossomos meióticos utilizou-se a técnica de Ford & Evans (1969), com modificações. Retiraram-se os testículos e em seguida os túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos foram cortados e rompidos, através de uma seringa sem agulha e transferido para um tubo falcon. Foram acrescentados 5 mL de KCl (0,075M), ressuspendendo fortemente. O tubo foi completado com mais 5 mL de KCl, e após 20 minutos o material foi centrifugado por 5 minutos a 800rpm. O sobrenadante foi retirado e a fixação foi realizada em solução composta por três partes de metanol para cada parte de ácido acético. Após o mínimo de 24 horas, o fixador era trocado pelo menos três vezes antes da fixação de células em suspensão em lâminas resfriadas em álcool e coradas com Giemsa 4% tamponado (tampão fosfato, pH = 6,8), durante 10 minutos.

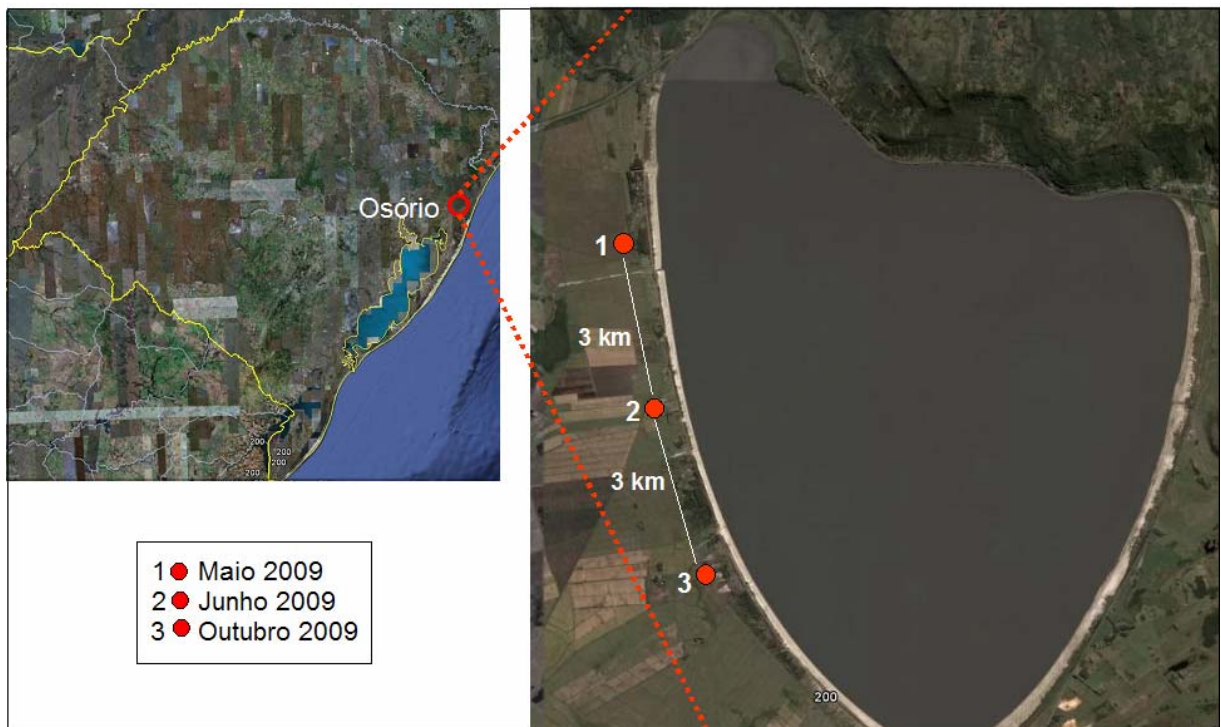


Figura 7: Pontos de coleta do presente trabalho na margem Sudoeste da lagoa dos Barros, localizada no município de Osório, Rio Grande do Sul. A época de coleta em cada um dos pontos encontra-se representada.

6. RESULTADOS

Foram analisados no total 20 indivíduos, distribuídos em três pontos de coleta distintos na zona híbrida entre *Ctenomys lami* e *Ctenomys minutus* (Figura 7).

Foram encontrados 12 cariótipos e sete números diplóides ($2n$): $2n = 48$ com número de braços autossômicos (NA) igual a 76; $2n = 49$, NA = 74,76; $2n = 50$, NA = 74,76; $2n = 53$, NA = 74,80; $2n = 54$, NA = 78,80; $2n = 55$, NA = 76; $2n = 56$, NA = 78, 80 (Figuras 8 e 9). Em todos cariótipos o par sexual é formado por X sub-metacêntrico e Y acrocêntrico.

6.1 Descrição dos cariótipos

6.1.1. Ponto de coleta 1

Nesse ponto foram coletados 8 indivíduos (5 fêmeas e 3 machos). Foram encontrados cinco cariótipos: $2n = 53$, NA = 74 (1 fêmea) com 23 cromossomos autossômicos

metacêntrico/sub-metacêntrico e 28 cromossomos autossômicos acrocêntricos, sendo o par 3 heterozigoto; **2n = 54, NA = 78** (1 fêmea) formado por 26 cromossomos autossômicos biarmados e 26 autossômicos acrocêntricos; **2n = 55, NA = 76** (2 fêmeas) apresenta 23 cromossomos autossômicos metacêntrico/sub-metacêntrico e 30 cromossomos autossômicos acrocêntricos, sendo o par 2 heterozigoto; **2n = 56, NA = 78** (2 machos), formado por 24 cromossomos autossômicos metacêntrico/sub-metacêntrico e 30 cromossomos autossômicos acrocêntricos; **2n = 56/NA = 80** (1 fêmea e 1 macho), com 26 cromossomos autossômicos biarmados e 28 autossômicos acrocêntricos.

Neste ponto de coleta, mais próximo às populações do parental *Ctenomys lami*, os cariótipos encontrados apresentam números diplóides mais próximos à $2n=56$.

6.1.2. Ponto de coleta 2

Foram analisados 7 indivíduos (5 fêmeas e 2 machos) provenientes dessa localidade de coleta. Encontraram-se seis cariótipos distintos: **2n = 50, NA = 74** (1 macho) formado por 26 cromossomos autossômicos metacêntrico/sub-metacêntrico e 22 cromossomos autossômicos acrocêntricos; **2n = 50, NA = 76** (1 fêmea) com 28 cromossomos autossômicos biarmados e 20 autossômicos acrocêntricos; **2n = 53, NA = 74** (1 fêmea) apresenta 23 cromossomos autossômicos metacêntrico/sub-metacêntrico e 28 autossômicos acrocêntricos, com o par 3 heterozigoto; **2n = 53, NA = 80** (1 fêmea e 1 macho) formado por 27 cromossomos autossômicos biarmados e 24 cromossomos autossômicos acrocêntricos, sendo o par 3 heterozigoto; **2n = 54, NA = 78** (1 fêmea) com 26 cromossomos autossômicos metacêntrico/sub-metacêntrico e 26 autossômicos acrocêntricos; **2n = 54, NA = 80** (1 fêmea) formado por 28 cromossomos autossômicos biarmados e 24 autossômicos acrocêntricos.

Esse ponto de coleta possui localização intermediária entre às populações das duas espécies, por isso os cariótipos encontrados apresentam números diplóides intermediários entre $2n = 48$ (*C.minutus*) e $2n = 56$ (*C.lami*).

6.1.3. Ponto de coleta 3

Neste ponto foram analisados 5 indivíduos (4 fêmeas e 1 macho). Encontrou-se 4 cariótipos: $2n = 48$, $NA = 76$ (1 fêmea e 1 macho) formado por 30 cromossomos autossômicos metacêntrico/sub-metacêntrico e 16 cromossomos autossômicos acrocêntricos; $2n = 49$, $NA = 74$ (1 fêmea) apresenta 27 cromossomos autossômicos biarmados e 20 autossômicos acrocêntricos, com o par 1 heterozigoto; $2n = 49$, $NA = 76$ (1 fêmea) formado por 29 cromossomos autossômicos metacêntrico/sub-metacêntrico e 18 autossômicos acrocêntricos, sendo o par 1 heterozigoto; $2n = 50$, $NA = 76$ (1 fêmea) apresenta 28 cromossomos autossômicos biarmados e 20 cromossomos autossômicos acrocêntricos, o par 1 é heterozigoto.

Esse ponto de coleta é mais próximo às populações do parental *Ctenomys minutus*, por isso os cariótipos encontrados apresentam números diplóides próximos à $2n=48$.

6.2 Meiose

Para verificar a regularidade dos números cromossômicos na meiose dos híbridos existentes nesta zona de hibridação interespecífica, e com a finalidade de analisar o comportamento dos híbridos para rearranjos robertsonianos durante a meiose, foram analisadas lâminas para observação do pareamento cromossômico durante a diacinese dos machos.

Os machos coletados nos pontos 2 e 3 apresentaram meiose com comportamento normal, com segregação correta dos cromossomos, formando gametas viáveis. No ponto 2 foram analisadas meioses de dois machos, um com $2n = 50/ NA = 74$, que apresentou 25 bivalentes e o outro com $2n = 53/ NA = 80$, que apresentou células com $n = 27$ e $n = 26$. No ponto 3 foi verificada a meiose de um macho com $2n = 48/NA = 76$, que apresentou 24 bivalentes.

No ponto 1 foram realizadas meiose de dois machos, só que não foram observadas células em espermatigênese, e esses machos apresentaram testículos pequenos e pouco esperma. Possivelmente esse resultado seja devido a sazonalidade reprodutiva no gênero *Ctenomys*, e não por uma possível infertilidade dos indivíduos.

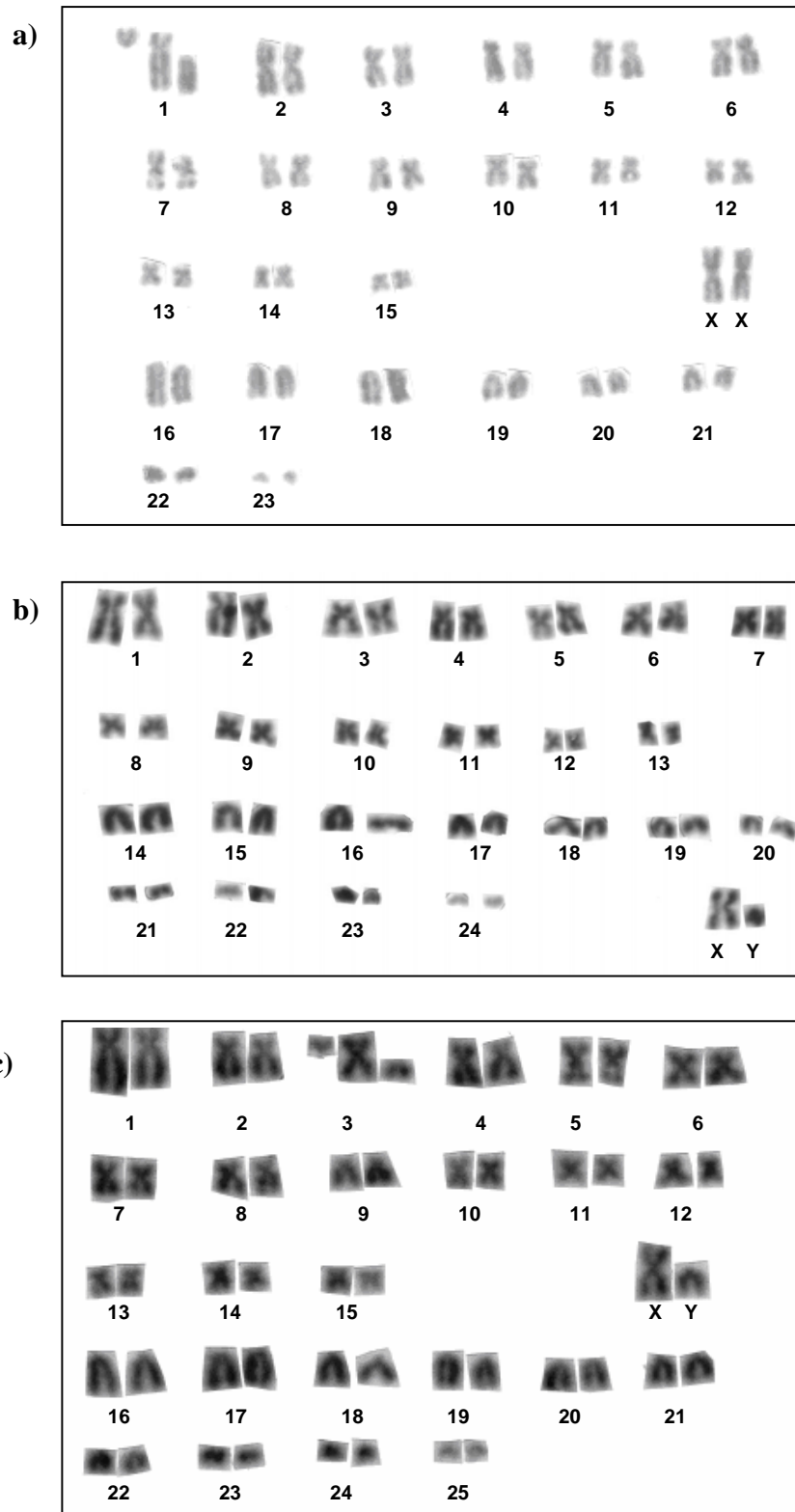


Figura 8: Cariótipos em coloração convencional: a) $2n = 49/NA = 76$; b) $2n = 50/NA = 74$; c) $2n = 53/NA = 80$.

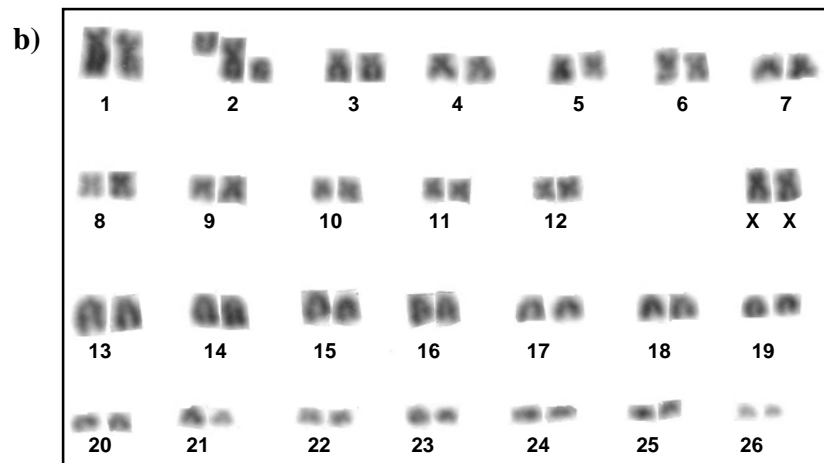
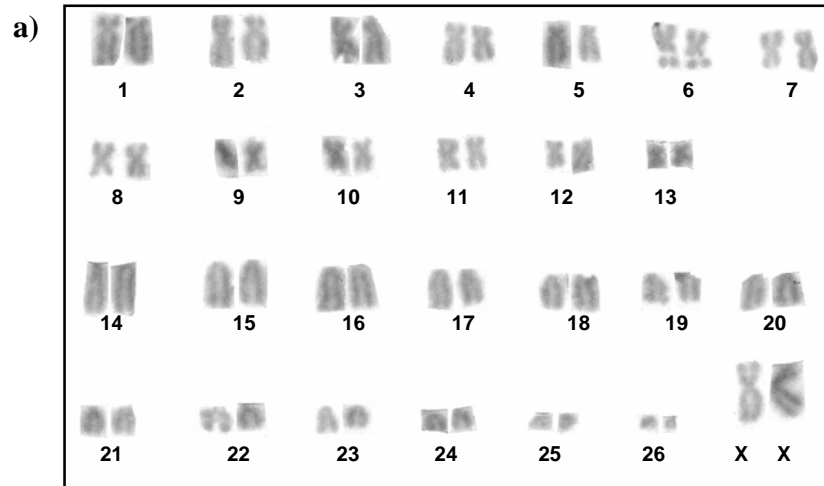


Figura 9: Cariótipos em coloração convencional: a) $2n = 54/NA = 78$; b) $2n = 55/NA = 76$.

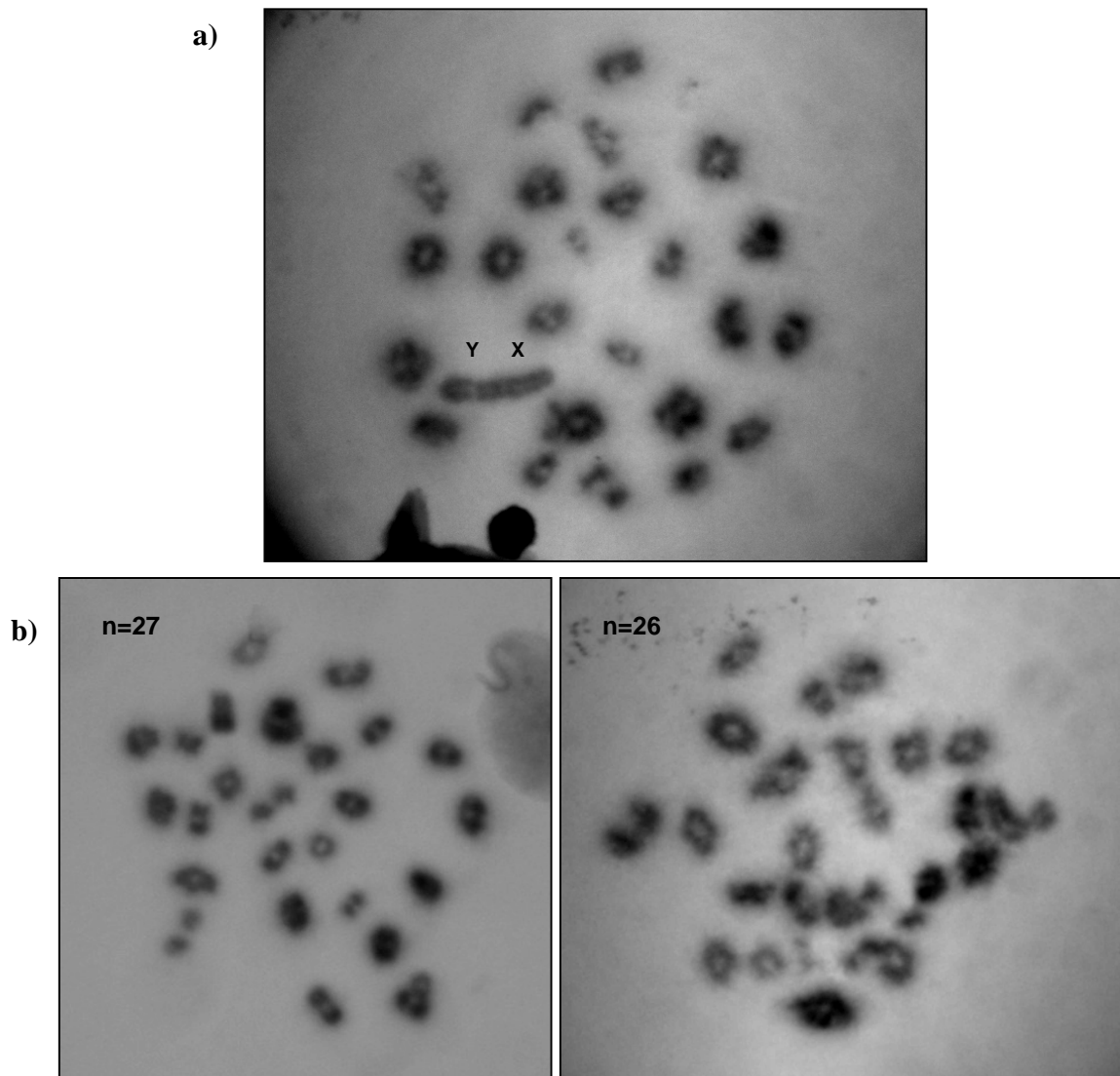


Figura 10: Diacinese (meiose I) de dois machos híbridos coletados no ponto 2: **a)** $2n = 50/NA = 74$, com destaque para os cromossomos sexuais X e Y. **b)** $2n = 53/ NA = 80$, células com $n = 27$ e $n = 26$.

7. DISCUSSÃO

7. 1. Polimorfismo cromossômico e viabilidade da zona híbrida

Considerando o presente trabalho e o estudo realizado por Gava & Freitas (2003) foram cariotipados 25 indivíduos ao total nesta zona de hibridação. Foram obtidos 16 cariótipos diferentes, com número diplóide variando de $2n = 48$ a 56 e $NA = 74$ a 80 (Figura 11). Dos animais analisados 28% dos híbridos não são heterozigotos, apresentando $2n$ par e NA par, 44% são heterozigotos, apresentando $2n$ ímpar e NA par, e 1 indivíduo (4%) é heterozigoto, apresentando $2n$ par e NA ímpar, 16% dos indivíduos são do tipo parental com $2n=56$ (*C.lami*) e 8% do tipo parental com $2n = 48a$ (*C. minutus*).

No cruzamento entre os parentais com $2n = 56b$ (*C.lami*) e com $2n=48a$ (*C. minutus*) espera-se que os espécimes da F1 apresentem citótipos com $2n=52$. No presente trabalho não foram encontrados espécimes com cariótipo $2n = 52$, porém no estudo realizado por Gava & Freita (2003) um indivíduo apresentou número diplóide esperado para F1. Apesar disso, foram observados diferentes números diplóides e diferentes cariomorfos intermediários aos parentais, demonstrando que estas formas híbridas são provenientes de retrocruzamentos e cruzamentos entre híbridos muito além da F1. Estes resultados demonstram que esta zona de hibridação é viável e bem estabelecida, e que apesar das diferenças cariotípicas entre os parentais, os híbridos são viáveis e férteis podendo reproduzirem-se entre si, o que demonstra que para esta zona híbrida não há redução da adaptabilidade do heterozigoto. O mesmo resultado foi encontrado por Searle (1993) que propôs que os polimorfismos podem ser considerados variações neutras, mas em casos onde haja um excesso de heterozigotos em uma população deve ser considerada a hipótese da manutenção do polimorfismo por vantagem do heterozigoto.

Van der Brusse *et al.* (1993) consideram que uma zona híbrida pode ser mantida pelo modelo de equilíbrio dinâmico se houver um número maior de indivíduos resultantes do cruzamento direto dos parentais em relação a outros tipos de híbridos, este não parece ser o caso desta zona entre *C. minutus* e *C. lami*, pois apenas um dos indivíduos tinha o número cromossômico $2n=52$, que é esperado na F1, a partir do cruzamento dos parentais. Segundo os mesmos autores, o modelo de superioridade híbrida se aplicará às zonas híbridas se o número de indivíduos com citótipos híbridos alternativos for maior do que indivíduos com citótipos

parentais ou híbridos resultantes do cruzamento dos parentais. Foram observados 16% de indivíduos do tipo parental $2n=56b$ (*C. lami*) e 8% de indivíduo do outro tipo parental $2n=48a$ (*C. minutus*), um indivíduo (4%) com o citótipo esperado como cruzamento dos parentais foi encontrado, e os demais indivíduos estudados (72%) apresentaram citótipos híbridos diversos variando de $2n=49$ a 55 e $NF=74$ a 80 , assim, o modelo da superioridade híbrida parece ser o que mais se ajusta à manutenção desta zona híbrida interespecífica.

Isso pode ser observado na tabela 1, onde são mostrados os possíveis cariótipos a serem formados na zona híbrida considerando cruzamentos de todos os gametas entre $2n=48a$ (*C. minutus*) e $2n=56b$ (*C. lami*), e quais citótipos foram encontrados nessa zona de hibridação interespecífica. A maioria dos cariótipos foi representada por híbridos intermediários provenientes de retrocruzamentos e cruzamentos entre híbridos, e apenas um cariótipo da F1 foi encontrado. Segundo Mallet (2005) híbridos da F1 são geralmente menos viáveis e férteis (mesmo determinando algum vigor híbrido).

No entanto não se pode descartar a hipótese de que nenhum destes dois modelos possa explicar esta zona de hibridação, estudos envolvendo uma amostragem maior, com mais pontos, mais intervalos de coleta, marcadores moleculares e cromossômicos seriam necessários para um melhor entendimento da manutenção desta zona híbrida.

E em relação à extensão da zona híbrida, segundo Searle & Wojcik (1998) a largura absoluta de uma zona híbrida pode ser definida como a distância mínima entre uma raça e outra, sendo, no entanto, melhor considerar apenas as áreas de maior densidade de híbridos.

Como foram coletados tanto indivíduos com cariótipo parental de *C. lami* em uma extremidade da área de coleta e indivíduos com cariótipo parental de *C. minutus* na outra extremidade, podemos concluir que essa zona híbrida apresenta pelo menos 6Km de comprimento. Porém, mais coletas são necessárias na direção da Coxilha das Lombas para sabermos qual a largura da zona de hibridação.

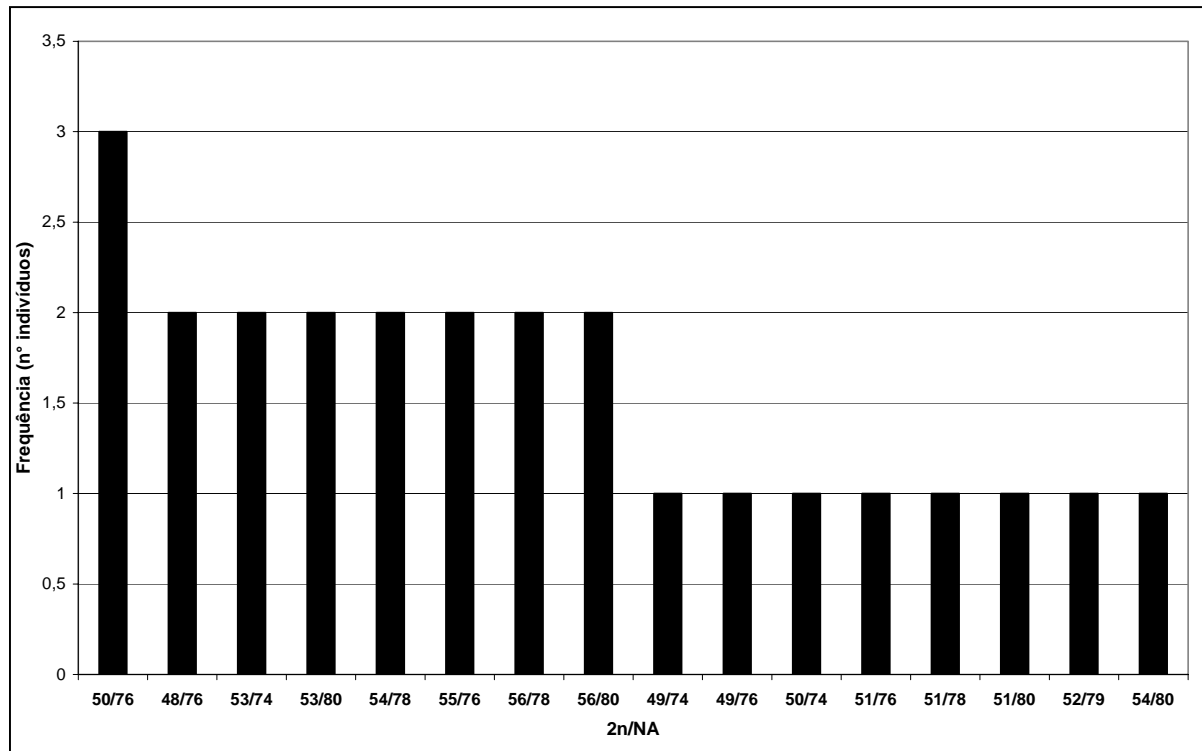


Figura 11: Frequência dos cariótipos dentro da zona híbrida.

Tabela 1: Possíveis cariótipos a serem formados na zona híbrida considerando cruzamento entre todos os gametas (em cinza) desde $2n = 48a$ (*C.minutus*) a $2n = 56b$ (*C.lami*). Em destaque, em verde, cariótipos encontrados somente no presente trabalho, em amarelo cariótipos encontrados somente por Gava & Freitas (2003), e em laranja cariótipo encontrado nos dois estudos.

	24	25	26	27	28
24	48	49	50	51	52
25	49	50	51	52	53
26	50	51	52	53	54
27	51	52	53	54	55
28	52	53	54	55	56

7. 2. Meiose, fertilidade dos híbridos e sazonalidade reprodutiva

Paralelamente aos estudos dos cromossomos mitóticos, a meiose tem importância para a análise da segregação cromossômica. Isto é particularmente relevante quando encontramos organismos com características intermediárias entre duas populações geograficamente contíguas, porém cariotipicamente diferentes (Almeida *et al.*, 2001).

Diferentes tipos de rearranjos cromossômicos variam em seus efeitos sobre a adaptabilidade do híbrido, mas muitos estudos têm demonstrado que, apesar dos problemas que podem surgir na meiose, aparentemente em alguns casos, a fertilidade do híbrido não é afetada. Rogatcheva *et al.* (1997) em um estudo com *Suncus murinus* demonstrou que com a hibridação de dois citótipos distintos dessa espécie a fertilidade da F1 não foi alterada. Hafner *et al.* (1983) estudaram uma zona híbrida em *Thomomys bottae* através de cromossomos, análise de proteínas, e morfologia, os resultados para todas as análises são similares. Os números diplóides encontrados variaram de $2n=76$ a 88, e os animais heterozigotos desta zona híbrida não parecem ter baixa adaptabilidade.

Rieseberg (2001) observa que heterozigotos para rearranjos cromossômicos que não tem sua adaptabilidade reduzida desenvolveram mecanismos que previnem segregações prejudicadas na meiose, como por exemplo, supressão parcial ou total da recombinação, este mecanismo pode reduzir o fluxo gênico, mas não parece reduzir a adaptabilidade ou fertilidade.

Em indivíduos heterozigotos de *Peromyscus sitkeansis* observou-se todos os gametas balanceados, e isto foi atribuído à supressão da recombinação (Searle, 1993).

Segundo Searle (1993) em alguns casos nos Eutheria, heterozigotos podem ser tão adaptados quanto os homozigotos, por que aberrações meióticas são particularmente raras, e devido ao efeito das aberrações ser minimizado pela compensação reprodutiva.

Gava & Freitas (2003) observaram a formação de trivalentes em híbridos de *Ctenomys minutus*, entre $2n=46a$ e $48a$, além disso, cortes histológicos das gônadas de um indivíduo híbrido constataram a presença de espermatozóides na luz dos túbulos testiculares, o que indica que não houve aparente mudança no processo de espermatogênese.

O sucesso reprodutivo depende do sincronismo das atividades dos organismos com as condições ambientais, determinando a evolução do mecanismo e controlando o comportamento reprodutivo (Tassino & Passos, 2009). Em zonas temperadas, os mamíferos exibem sazonalidade

reprodutiva devido aos custos com termorregulação impostos pelas baixas temperaturas no inverno e baixa viabilidade alimentar (Bronson 1989; Fournier *et al.*, 1999). Portanto, condições ambientais como fotoperíodo, temperatura e precipitação, além da disponibilidade de alimento influenciam o início e duração da estação reprodutiva (Bronson, 1989; Ims, 1990; Fanjul *et al.*, 2006). Segundo Tassino & Passos (2009). Essa sazonalidade reprodutiva é observada no gênero *Ctenomys*, os autores demonstraram que a atividade reprodutiva no gênero inicia no começo do inverno, no mês de Junho, para que os nascimentos ocorram na primavera quando as condições ambientais são mais favoráveis. Os autores demonstraram que de Dezembro a Maio os indivíduos estavam inativos reprodutivamente. Como a coleta no ponto 1 ocorreu em Maio, provavelmente esses indivíduos estavam inativos reprodutivamente, por isso não foi possível observar a meiose dos indivíduos coletados nesse ponto.

Corroborando com os estudos discutidos, observamos que os espécimes da zona híbrida interespecífica entre *Ctenomys minutus* e *Ctenomys lami*, analisados no presente estudo, não apresentam problemas em relação a fertilidade. Isso pode ser observado na segregação regular dos cromossomos na meiose dos híbridos, e devido a presença de diferentes cariótipos intermediários aos parentais, que demonstram a existência de retrocruzamentos e cruzamentos entre híbridos. E em relação ao período reprodutivo em tuco-tucos o resultado observado vai ao encontro com os resultados obtidos por Tassino & Passos (2009).

7. 3. Especiação Cromossômica no gênero *Ctenomys*

A variação cromossômica tem sido considerada como o principal fator associado ao explosivo processo de especiação verificado no gênero *Ctenomys*. Esta afirmação baseia-se principalmente na morfologia dos cariótipos, o que se tornou possível a partir da utilização de técnicas de bandeamento, mas também devido à distribuição geográfica das espécies, e devido ao padrão de variação cromossômica espécie-específica geralmente apresentado pelos tuco-tucos. Ainda, a medida em que foi aumentando o número de estudos citogenéticos com *Ctenomys*, os polimorfismos foram sendo demonstrados como eventos comuns em diversas populações deste gênero (Reig *et al.*, 1992).

A observação de que as espécies de tuco-tucos possuem especificidade cariotípica inicialmente sugeriu um papel de barreira reprodutiva para a diversidade cromossômica. Só que o

papel da variabilidade cromossômica como uma barreira reprodutiva e, portanto como a principal causa na especiação do gênero é ainda controverso.

Alguns autores que defendem o modelo de especiação cromossômica para o gênero *Ctenomys* consideram que a variação cromossômica em roedores subterrâneos poderia ser interpretada como proveniente de fatores demográficos, tais como estrutura populacional, associado a processos de extinção, recolonização, e adaptações ecológicas (Massarini *et al.*, 2002). Principalmente levando em consideração aspectos relativos a reprodução em diferentes espécies do gênero tem sido demonstrados indivíduos com baixa mobilidade, estratégias reprodutivas associadas a alto investimento com pequeno número de filhotes por ninhada, bem como reprodução sazonal e maturidade sexual rápida (Busch *et al.*, 2000).

Por outro lado, alguns autores sugerem que a estrutura populacional não se enquadra como explicação exclusiva para originar rearranjos cromossômicos, pois não há evidências diretas de que exista relação entre os dois eventos (Villar *et al.*, 2005). A proposta de que haja ausência de relação entre fatores demográficos e polimorfismos cromossômicos procura ser justificada pela redução dos efeitos da subdivisão populacional em função das migrações entre grupos populacionais, considerando uma provável curta distância entre eles e a baixa densidade populacional (Novello & Altuna, 2002). Villar *et al.*, 2005 defende que para procurar entender a evolução cromossômica entre estes roedores subterrâneos não podem ser descartadas as ocorrências de eventos tais como deriva genética e seleção natural.

Considerando os diferentes pontos de vista dos diversos autores, a evolução cromossômica em *Ctenomys* é um processo complexo, que pode ser produto de uma ação integrada de eventos estocásticos e/ou seleção, visto que a estrutura populacional pode apresentar ampla variação, desde pequenas tuqueiras, ou populações isoladas geograficamente, até colônias ou populações maiores, inclusive com migrações.

O que se deve dar muita importância, também, são as interações de populações divergentes em zonas híbridas, as quais demonstram que cariótipos distintos parecem não agir como barreira para algumas espécies de *Ctenomys*, como no caso do presente estudo.

Gava & Freitas (2003) observaram que é possível que os polimorfismos cromossômicos descritos para *C. minutus* sejam neutros e atuem como um polimorfismo transitório nas populações. Lopes, *et. al.* (*in prep*) sugerem que a variabilidade cromossômica não age como barreira reprodutiva para a espécie.

A existência de hibridação interespecífica, em uma área de parapatría entre as espécies *C. minutus* e *C. lami*, contribuem para o entendimento do papel dos cromossomos em processos de especiação e/ou variação dentro de populações. Comprova que mesmo com uma grande variação cromossômica entre os cariótipos parentais envolvidos na zona híbrida, essa diferenciação cariotípica não age como barreira reprodutiva para as duas espécies.

Ctenomys lami e *C. minutus* são consideradas espécies filogeneticamente irmãs e o tempo de separação entre elas pode não ter sido suficiente para promover o completo isolamento.

Segundo Clark & Wall (1996) as diferenças no cariótipo entre espécies podem ser consideradas como diferenças em sequências de DNA não condificantes. Isso é o que pode ter acontecido em relação aos polimorfismos cromossômicos entre essas duas espécies de tuco-tuco, os quais podem não estar alterando as relações de ligação dos genes dentro do genótipo, e a expressão pelo efeito de posição.

Em relação à diversidade das espécies da planície costeira do Rio Grande do Sul os processos geográficos vicariantes podem ter sido cruciais, assim como a sua estrutura populacional, é provável que mecanismos moleculares que promovem a diversificação cromossômica tenham agido nessas populações (Slamovits *et al.*, 2001).

Para um melhor entendimento da especiação cromossômica desse gênero são necessários estudos sobre processos genômicos que fundamentam as alterações cromossômicas e o controle genético da meiose.

Yannic *et al.* (2009) demonstrou a utilidade da análise de locos mapeados, que podem fornecer evidências de reduzido fluxo gênico em algumas partes específicas do genoma (ou seja, entre os cromossomos rearranjados).

7. 4. Contato Secundário e Conservação

Mudanças ambientais como a eliminação ou redução de barreiras geográficas ao fluxo gênico e expansões populacionais, levando a um contato secundário entre espécies, têm sido as principais causas sugeridas para a formação de zonas híbridas entre espécies selvagens (Harrison, 1993; Barton, 2001).

Segundo dados históricos e mapas do exército da região da Lagoa dos Barros e Coxilha das Lombas as espécies *C. lami* e *C. minutus* eram isoladas por um banhado entre a Coxilha das

Lombas e a Lagoa dos Barros (Arienti, 1986). Na década de 1950 com o desenvolvimento de culturas de arroz nessa região o banhado secou devido a drenagem para essas plantações. Isso pode ser observado atualmente com a extração de água da lagoa dos Barros para irrigação das inúmeras plantações de arroz, expondo áreas com solo arenoso.

Com esses dados podemos concluir que essa zona de contato secundário foi causada por atividade humana, o que se apresenta de fundamental importância para conservação das espécies. Frequentemente sugere-se que as zonas híbridas são conseqüências diretas de distúrbios ou mudanças ambientais, muitas vezes provocadas pelo homem (Allendorf *et al.*, 2001). Com isso, existe o risco de perder a identidade específica das espécies, com a sobreposição das mesmas. Segundo Anttila *et al.* (1998), é também possível que, caso uma espécie tenha sucesso reprodutivo mais elevado do que a outra, a hibridização pode ameaçar esta última com a extinção.

A espécie *Ctenomys lami* é endêmica, possui uma área de distribuição restrita e ocorre em uma região com constante impacto e descaracterização ambiental devido a plantações e contaminação por agrotóxicos. Mesmo com tantos problemas de conservação essa espécie não está presente em nenhuma lista de espécies ameaçadas. Além disso, com a ocorrência dessa zona de hibridação interespecífica pode haver introgressão, e com isso as espécies podem se homogenizar e *C.lami* pode perder sua identidade específica e desaparecer.

8. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Este estudo colaborou com a compreensão da variabilidade cromossômica e a viabilidade dos híbridos nessa área de contato entre as duas espécies. Além disso, demonstrou que a diferenciação cromossômica não é suficiente para o isolamento entre *Ctenomys lami* e *Ctenomys minutus*, não sendo o principal fator de especiação neste caso;

- Foram encontrados diferentes cariótipos intermediários aos parentais, o que demonstra a existência de retrocruzamentos e cruzamentos entre híbridos, comprovando a viabilidade dessa zona híbrida interespecífica;

- Os híbridos possuem capacidade de produzir gametas viáveis, pois a segregação dos cromossomos na meiose é regular. E o alto polimorfismo cariotípico encontrado nessa zona híbrida, com cariótipos provenientes de diversos tipos de cruzamentos evidenciam que não há redução da adaptabilidade dos híbridos heterozigotos;

- Considerando os modelos de manutenção de zonas híbridas, segundo Van der Brusse *et al.* (1993), o modelo de superioridade dos híbridos é o que melhor se aplica para essa zona híbrida, pois o número de indivíduos com citótipos híbridos alternativos foi maior do que indivíduos com citótipos parentais ou híbridos resultantes do cruzamento dos parentais (F1).

- Diferenças cariotípicas não agem como barreiras efetivas para reprodução entre *C. minutus* e *C. lami*;

- As duas espécies em questão são filogeneticamente irmãs, e o tempo de separação entre elas pode não ter sido suficiente para promover o completo isolamento;

- O contato secundário entre essas duas espécies de ctenomídeos é recente, e possivelmente foi causado por distúrbios ambientais provocados pelo homem. Existe o risco da perda da identidade específica das duas espécies, e a possível sobreposição das mesmas;

- Estudos envolvendo uma amostra maior, mais pontos, e intervalos de coleta, marcadores moleculares e cromossômicos seriam necessários para um melhor entendimento da manutenção desta zona híbrida.

- Futuros estudos sobre processos genômicos que fundamentam as alterações cromossômicas, o controle genético da meiose, e a localização dos genes nos cromossomos podem fornecer melhores explicações sobre a especiação desse gênero.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P & Wenburg JK (2001) The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16 (11): 613-622.
- Almeida CAS, Bonvicino CR, Lachtermacher M, Moreira MAM, Olício R & Seuánez HN (2001) Técnicas da avaliação da diversidade genética. In: Garay I & Dias B (eds) *Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais*. Editora Vozes, Petrópolis, 430 pp.
- Altuna CA (1991) Microclima de cuevas y comportamientos de homeostasis en una población del grupo *Ctenomys pearsoni* (Rodentia: Octodontidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 2º época, 6: 35-46.
- Altuna CA, Francescoli G, Tassino B & Izquierdo GE (1999) Ecoteología y conservación de mamíferos subteraneos de distribución restringida: el caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontinae) en el Uruguay. *Teología*, 7:47-54.
- Anttila C, Daehler C, Rank N, Strong D (1998) Greater male fitness of a rare invader (*Spartina alterniflora*, Poaceae) threatens a common native (*Spartina foliosa*) with hybridization. *Am J Bot* 85: 1597–1601.
- Arienti, ML (1986) *Evolução Paleogeográfica da Bacia do Rio Gravataí*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de mestrado.
- Arnold ML (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *Annu Rev Ecol Syst* 23: 237-261
- Arnold J (1993) Cytonuclear disequilibria in hybrid zones. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 521-554.
- Balloux F, Lugon-Moulin N & Hausser J (2000) Estimating gene flow across hybrid zones: how reliable are microsatellites? *Acta Theriologica* 40: 93-101.
- Barton, N H & Hewitt G M (1985) Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Syst* 16: 113-148.
- Barton, N H & Hewitt G M (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* 341: 497-503.
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10:551-568
- Bengtsson BO (1980) Rates of karyotype evolution in placental mammals. *Hereditas* 92: 37-47.
- Bonvicino CR, Otazú IB, & Vilela JF (2005) Karyologic and molecular analysis of *Proechimys* Allen, 1899 (Rodentia, Echimyidae) from the Amazonian region. *Arquivos do museu Nacional do Rio de Janeiro* 63 (1): 191-200.
- Bronson F (1989) *Mammalian Reproductive Biology*. Editora: University Chicago, Chicago.

- Buggs RJA (2007) Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity* 99: 301–312.
- Bush GL, Case SM, Wilson AC, Patton JL (1977) Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3942-46.
- Busch C, Antinuchi CD, dell Valle JC, Kittlein MJ, Malizia AI, Vassalo AI & Zenuto RR (2000) Population ecology of subterranean rodents. In: Lacey, E. A., Patton J. L. & Cameron, G. N. (eds.) *Life Underground – The Biology of Subterranean Rodents*. Editora The University of Chicago, Chicago, pp. 183-226.
- Castilho CS (2004) Análise cromossômica e de microssatélites em uma zona de hibridação intra-específica de *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Clark MS & Wall WJ (1996) *Chromosomes: The complex code*. Editora: Chaoman & Hall, Londres, 345 pp.
- Comparatore VM, Maceira N & Busch C (1995) Habitat relationship in *Ctenomys talarum* (Caviomorpha, Octodontidae) In *A Natural Grassland*. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 56: 112-28.
- Contreras JR & Reig OA (1965) Datos Sobre La Distribución Del Género *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) En La Zona Costera De La Provincia De Buenos Aires Compreendida Entre Necochea Y Bahía Blanca. *Physis* 25:169-186.
- Contreras LC, Torres-Mura JC & Yáñez JL (1987) Biogeography of Octodontid Rodents an Eco-Evolutionary Hypothesis. *Fieldiana Zool* 39:401-411.
- Cook JA, Anderson S & Yates A (1990) Notes on Bolivian mammals 6. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the highlands. *American Museum Novitates*, 2980: 1-27.
- Cook JA & Lessa EP (1998) Are rates of diversification in subterranean South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) unusually high? *Evolution* 52(5):1521–1527.
- Corti M & Ciabatti CM (1990) The structure of a chromosomal hybrid zone of house mice (*Mus domesticus*) in central Italy. *Z. Zool. Syst. Evolut.* 28: 277-288.
- El Jundi TARJ (2003) Estudo da variabilidade cromossômica em *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae) ao longo de sua distribuição geográfica através de marcadores moleculares. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.
- Fanjul MS, Zenuto R & Busch C (2006) Seasonality of breeding in wild tuco-tucos *Ctenomys talarum* in relation to climate and food availability. *Acta Theriol* 51: 283–293.
- Fernades FA (2008) Filogeografia de *Ctenomys torquatus* (Rodentia:Ctenomyidae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.

Fernandes FA, Gonçalves GL, Ximenes, SSF & Freitas TRO (2009) Karyotypic and molecular polymorphisms in *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae): taxonomic considerations. *Genetica* 136:449–459.

Fernández-Stolz GP (2007) Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia - Ctenomyidae), através de marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.

Ford CE & Hamerton JL (1956) A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain. Technol.*, 31: 247-251.

Ford CE & Evans EP (1969) Meiotic preparation from mammalian testes. *Comparative mammalian cytogenetics*, Berlin, Springer-verlag. P. 461-464.

Fornel R (2005) Estudo da variação morfológica craniana entre quatro blocos populacionais de *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae) através de morfometria geométrica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.

Fournier F, Thomas DW & Garland T (1999) A test of two hypotheses explaining the seasonality of reproduction in temperate mammals. *Funct. Ecol.* 13: 523–529.

Freitas TRO & Lessa EP (1984) Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia-Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 65: 637-642.

Freitas TRO (1990) Estudos citogenéticos e craniométricos em três espécies do gênero *Ctenomys*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Tese de Doutorado.

Freitas TRO (1994) Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia – Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 67: 193–198.

Freitas TRO (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 30: 53-59.

Freitas TRO (1997) Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). *Rev Bras Genet* 20:1-7.

Freitas TRO (2001) Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in southern Brazil: *Ctenomys lami* spec. nov separated from *C. minutus*. *Stud Neotrop Fauna* 36:1–8.

Freitas TRO (2006) Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. *Genetica* 126:227-235.

Freitas TRO (2007) *Ctenomys lami*: the highest chromosomal variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system. *Acta Theriol* 52:(2)171-180.

Freygang CC, Marinho JR and Freitas TRO (2004) New karyotypes and some considerations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the coastal plain of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. *Genetica* 121:125-132.

Futuyna DJ (2003) *Biología evolutiva*. 2ª edição. Editora Sene, Ribeirão Preto, 451pp.

Gallardo MH & Anrique JA (1991) Population parameters and burrow systems in *Ctenomys maulinus brunneus* (Rodentia: Ctenomyidae). *Medio Ambiente*, 11(2): 48-53.

Gastal ML (1994) Sistema de túneis e área de vida de *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae) *Inheringia*, 77:5-44.

Gava A (1996) Uma zona de hibridação em *Ctenomys minutus* (Rodentia, Octodontidae): Abordagem citogenética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.

Gava A (2001) Estudos citogenéticos e sua relação com marcadores moleculares em tuco-tucos (*Ctenomys minutus*) (Rodentia, Ctenomyidae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.

Gava A & Freitas TRO (2002) Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia; Ctenomyidae). *J Mammal* 83:843-851.

Gava A & Freitas TRO (2003) Inter and intra-specific hybridization in tuco-tuco (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomidae). *Genetica* 119:11-17.

Gava A & Freitas TRO (2004) Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southeastern Brazil (Rodentia; Ctenomyidae). *J Mammal* 85(6):1201-1206.

Hafner JC, Hafner DJ, Patton JL & Smith MF (1983) Contact zones and the genetics of differentiation in the pocket gopher *Thomomys bottae* (Rodentia: Geomyidae). *Syst. Zool.* 32: 1-20.

Harrison RG (1993) Hybrids and hybrid zones: historical perspective. In: Harrison RG (Ed) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Editora Oxford University, New York, pp. 364

Hewitt GM (1988) Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution* 3: 158-167.

Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Mol Ecol* 10: 536-549.

Huxel GR (1999) Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biol Conserv* 89: 143-152.

Ims RA (1990) The ecology and evolution of reproductive synchrony. *Trends Ecol. Evol.* 5, 135–140.

Jiggins CD & Mallet J (2000) Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 250-255.

Kiblicky P, Brum-Zorrilla N, Perez G & Saez FA (1977) Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). *Mendeliana* 2: 85-93.

King, M (1993) *Species evolution*. Editora Cambridge University, 336 pp.

Lacey EA, Patton JL & Cameron GN (2000) *Life underground: the biology of subterranean rodents*. Editora University of Chicago, Chicago, 449 pg.

Lande R (1979) Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. *Evolution* 33: 234-251.

Lauria de Cidre MS (1974) Estudio histológico del riñon de *Ctenomys talarum* (Rodentia-Ctenomyidae). *Physis (C)* 33: 157-162.

Lessa EP & Cook JA (1998) The Molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Mol Phylogenet Evol*, 9: 88-99.

Lizarralde M, Bolzan A & Bianchi M (2003) Karyotype evolution in South American subterranean rodents *Ctenomys magellanicus* (Rodentia: Octodontidae): chromosome rearrangements and (TTAGGG)_n telomeric sequence localization in 2n=34 and 2n=36 chromosomal forms. *Hereditas*, 139: 13 – 17.

Lopes CM (2007) *Filogeografía de Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Mestrado.

Lugon-Moulin N, Wyttenbach A, Brüner H, Goudet J & Hausser J (1996) Study of gene flow through a hybrid zone in the common shrew (*Sorex araneus*) using microsatellites. *Hereditas* 125: 159-168.

Malizia AI, Vassallo IA & Busch C (1991) Population and habitat characteristics of two sympatric species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Acta Theriol* 36:87-94.

Malizia AI, Zenuto RR & Busch C (1995) Demographic and reproductive attributes of dispersers in 2 populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Tuco-Tuco), *Canadian Journal of Zoology* 73: 732-738.

Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and*

Evolution 20, 229-236.

Marinho JR & Freitas TRO (2000) Intraspecific craniometric variation in a chromosome hybrid zone of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi). *Int J Mammal Biol* 65:226–231.

Maruyama T, Imai HT (1981) Evolutionary rate of the mammalian karyotype. *J. Theor. Biol.* 90:111-21.

Massarini AI, Barros MA, Ortellis MO & Reig OA (1991a) Evolutionary biology of fossorial Ctenomyne rodents (Caviomorph: Octodontidae). I. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in Central Argentinian populations of tuco-tucos. *Genetica* 83: 131-144.

Massarini AI, Barros MA, Ortellis MO & Reig OA (1991b) Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina. *Genetics* 83: 131-144.

Massarini AI, Mizrahi D, Tiranti S, Luna F & Schleich CE (2002) Extensive chromosomal variation in *Ctenomys talarum* talarum from the atlantic coast of Buenos Aires province, Argentina (Rodentia Octodontidae). *Journal of Neotropical Mammalogy* 9: 199–207.

Mayr E (1963) *Animal species and evolution*. Editora Harvard University, Massachusetts.

McNab BK (1966) The metabolism of fossorial rodents: a study of convergence. *Ecology* 45:712-733.

Moreira DM, Franco MHL P, Freitas TRO and Weimer TA (1991) Biochemical polymorphism and phenetic relationships in rodents of the genus *Ctenomys* from Brazil. *Biochem Genet* 29:601-615.

Navarro A & Barton NH (2003b) Chromosomal speciation and molecular divergence—accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science* 300: 321–324.

Nevo E (1979) Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annu Rev Ecol Syst* 10:269-308.

Nevo E (1991) Evolutionary theory and process of active speciation and adaptive radiation in Subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies, in Israel. *Evolutionary Biology*, 25: 1-125.

Nevo E (1999) *Mosaic evolution of subterranean mammals: regression, progression and global convergence*. Editora Oxford University, 413 pp.

Noor MAF, Grams KL, Bertucci LA & Reiland J (2001) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12084–12088.

Nowak RM (1999) Walkers mammals of the world. 6ª edição . Editora The Johns Hopkins University, Baltimore and London, 1936pp.

Oliveira JA & Bonvicino CR (2006) Ordem Rodentia. In: Mamíferos do Brasil. Reis N, Peracchi AL, Pedro WA & Lima IP (eds). 347-399 pp.

Ortells MO (1995) Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. Biol. J. Linn. Soc. 54, 43-70.

Novello A & Altuna CA (2002) Cytogenetics and distribution of two new karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia, Octodontidae) from southern Uruguay. Zeitschrift für Säugetierkunde, 67: 188–192.

Patton JL & Sherwood SW (1983) Chromosome evolution and speciation in rodents. Annual Review of Ecology and Systematics, 14: 139-158.

Pearson OP (1984) Taxonomy and Natural History Of Some Fossorial Rodents Of Patagonia, Southern Argentina J Zool Lond 202:225-237.

Pough FH, Heiser JB & MacFarland WN (2003) A vida dos vertebrados. Editora Atheneu, São Paulo, 834 pp.

Reig OA & Kiblicky P (1969) Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia:Octodontidae). Chromosoma 28: 211-244.

Reig OA (1989) Karyotypic repatterning as one triggering factor in cases of explosive speciation. In: Evolutionary biology of transient unstable populations. Editora Fontdevila Springer-Verlag, New York: 246-289.

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

Reig OA, Massarini AI, Ortells MO, Barros M, Tiranti SI & Dyzenchouz FJ (1992) New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. Mammalia 56, 603-623.

Rieseberg, L (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. Trends in Ecology and Evolution 16, 351-358.

Rhymer JM & Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. Annu Rev Ecol Syst 27:83-109.

Rogatcheva MB, Borodin PM, Oda SI & Searle JB (1997) Robertsonian chromosomal variation in the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora: Soricidae) and the colonization history of the species. *Genome* 40: 18-24.

Rui AM & Gastal MLA (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, p. 33-44.

Schubert I (2007) Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 109-115.

Searle JB (1993) Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. In: Harrison RG (ed) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Editora Oxford University, New York, pp 309-353.

Searle JB & Wójcik JM (1998) Chromosomal evolution; The case of *Sorex araneus* In: Wójcik JM & Wolsan M (eds) *Evolution of Shrew*. Editora Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences, Białowieża.

Silva CEF (2008) Citogenética de pequenos mamíferos não voadores de três localidades na Amazônia Central. Universidade Federal do Amazonas, Manaus. Tese de mestrado.

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.

Stein BR (2000) Morphology of subterranean rodents. In: *Life underground*: Lacey EA, Patton JL, & Cameron GN (eds.) The biology of subterranean rodents, Editora The University of Chicago, Chicago, pp. 19–61.

Steinberg EK & Patton JM (2000) Genetic structure of subterranean rodents. In: Lacey EA, Patton JL & Cameron GN (eds). *Life Underground – The Biology of Subterranean Rodents*. Editora The University of Chicago, Chicago and London, pp. 301–331.

Sumner AT (2003) *Chromosomes: Organization and Function*. Editora: Blackwell, 287 pp.

Tassino B & Passos CA (2009) Reproductive biology of Río Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae).

Tomazelli L J & J A Villwock (2000) O Cenozóico no Rio Grande do Sul Geologia da Planície Costeira. In: M Holz and L F De Ros (eds) *Geologia do Rio Grande do Sul*. CIGO/UFRGS, Porto Alegre, pp 375-406

Trigo TC (2008) Hibridação e introgressão entre espécies de felídeos neotropicais (Mammalia, Carnivora). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Tese de Doutorado.

Van der Bussche RA, Chesser RK, Hamilton MJ, Bradley RD, Porter CA & Baker RJ (1993) Maintenance of a narrow hybrid zone in *Peromyscus leucopus*: a test of alternative models. *Journal of Mammalogy* 74: 832-845.

Verzi DH (2008) Phylogeny and adaptive diversity of rodents of the family Ctenomyidae (Caviomorpha): delimiting lineages and genera in the fossil record. *Journal of Zoology*, 274(4): 386-394.

Villar S, Martínez-López W, Folle G & Novello A (2005) Cytogenetic analysis of different *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) species from Uruguay using G-banding. *Mammalian Biology*, 70(4): 255-260.

Vilwock JA (1989) A summary of the geology of the coastal province of Rio Grande do Sul. *Proceedings of the International Symposium on Utilization of Coastal Ecosystems: planning, pollution and productivity*, 2: 471-484.

Vucetich MG, Verzi DH & Hartenberger JL (1999) Review and analysis of the radiation of the South American Hystricognathi (Mammalia, Rodentia). *Académie des Sciences*, 329: 763-769.

Wilson DE & Reeder DM (eds) (2005) *Mammal Species of the World*. Editora Johns Hopkins University, 2142 pp.

Zenuto R & Busch C (1998) Population biology of the rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a coastal dunefield in Argentina. *International Journal of Mammalian Biology*, 63: 357-367.

Yannic G, Basset P & Hausser J (2009) Chromosomal rearrangements and gene flow over time in an inter-specific hybrid zone of the *Sorex araneus* group. *Heredity*, 1–10.