

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Instituto de Biociências**

**Departamento de Genética**

**Trabalho de Conclusão de Curso:**

**Análise de microssatélites em roedores Sul americanos, tuco-tucos (Rodentia:  
*Ctenomyidae*) no Centro-oeste e Norte do Brasil.**

**Leonardo Trindade Leipnitz**

Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas

Co-orientador: José F. B. Stolz

Porto Alegre, Dezembro de 2011.

*Aos meus amados pais, por toda a dedicação e apoio nesses cinco anos de universidade. Aos queridos colegas e professores, pelas lições e pela maravilhosa convivência.*

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS:**

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e contou com a colaboração financeira 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.

## AGRADECIMENTOS:

Agradeço principalmente ao apoio dos meus pais, que não mediram esforços para que eu estivesse concluindo o curso e que durante toda minha vida me deram todo o carinho e atenção que precisei e me ensinaram os valores que eu levarei comigo por toda a minha vida.

Ao professor Thales de Freitas pela oportunidade de estágio no Laboratório de Citogenética e Evolução, onde passei metade do curso de graduação e aprendi boa parte do conteúdo teórico e prático que sei hoje e que levarei para a vida profissional e por todo o apoio e parceria durante este trabalho, mas também por valiosas lições de camaradagem, cooperação e momentos alegres junto de meus colegas de laboratório. Por isso agradeço aos colegas Paula, Livia, Tati, Carla, Darli, José, Camila, Jorge, Patrícia, Claiton, Gislene, Diego, Mayara, Fernando, Grazi, Bruno, Daniel, Fabrício, Ana, Dalila e Samara, pela convivência nesses anos de estágio. Peço desculpas se esqueci alguém, pois vocês são muitos. Mas agradeço a todos.

Cabe aqui um agradecimento especial aos colegas José, Paula, Tati, Livia e Carla, por todo o apoio na discussão, revisão e crítica deste trabalho, que tornaram possível a redação do mesmo. Ainda cabe agradecimento a Loreci Lima, por toda a ajuda nas saídas de campo.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de excelência, em especial ao Departamento de Genética por suas disciplinas eletivas, que me inspiraram e instigaram a seguir uma pós-graduação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, na forma de bolsa de iniciação científica.

Este trabalho está formatado nas normas de submissão para a revista *Journal of Mammalogy*.

## **Análise de microssatélites em roedores Sul americanos, tuco-tucos (*Ctenomyidae*: Rodentia) no Centro-oeste e Norte do Brasil.**

Leonardo T. Leipnitz\*, José F. B. Stolz and Thales R. O. de Freitas

*Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Prédio 43323, P.O. Box 15053, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil (JFBS, TROF)*  
*Departamento de Genética, Prédio 43323, P.O. Box 15053, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Rio Grande do Sul, Brazil (LTL, JFBS, TROF)*

Cinco populações de tuco-tucos, roedores do gênero *Ctenomys*, dos estados do Mato Grosso (MT) e de Rondônia (RO) foram analisadas com marcadores microssatélites para avaliar estes indivíduos num contexto populacional. 50 indivíduos foram genotipados para 14 loci de microssatélites. Os resultados indicam forte estruturação genética, que é devida em parte ao isolamento por distância – como os resultados de Teste de Mantel – e, possivelmente, outras barreiras geográficas como serras e rios, e barreiras genéticas como um evento de especiação rápida ocorrido no início da história do gênero. Este estudo ainda demonstra que o uso do índice  $R_{ST}$  é mais adequado que o  $F_{ST}$  quando analisa-se dados de populações estruturadas – com baixa taxa de migrantes – e tamanho efetivo de população baixo, corroborando com simulações calculadas por estudos anteriores. Maior amostragem é necessária para estimar efetivamente os padrões e grau de migração entre populações, já que o número amostral é bastante reduzido.

\* Correspondente: [lleipnitz@gmail.com](mailto:lleipnitz@gmail.com)

*Ctenomys* Blainville, 1826 é um dos mais diversos gêneros de roedor e o mais diverso entre os fossoriais (Lacey *et al.*, 2000), compreendendo aproximadamente 56 espécies herbívoras, conhecidos popularmente como “tuco-tucos” – que habitam áreas de dunas e campos na metade sul do Neotrópico (Fig. 1a). Exceto *C. sociabilis*, uma espécie social, as demais são solitárias e territorialistas, sendo que as fêmeas dividem suas tocas apenas com a prole (Lacey *et al.*, 2000). No Brasil existem 4 espécies de tuco-tucos descritas (*C. torquatus*, *C. minutus*, *C. lami* e *C. flamarioni*) todas localizadas no estado do Rio Grande do Sul, na região Sul (Fernandes *et al.*, 2007). Recentemente, novas populações de *Ctenomys* foram encontradas nos estados do Mato Grosso (MT) e Rondônia (RO), localizados nas regiões Centro-oeste e Norte (Fig. 1b), respectivamente, que pertencem ao grupamento boliviano dos tuco-tucos. Até o momento, 2 espécies foram descritas no MT e em RO. Miranda Ribeiro (1914) descreveu *Ctenomys bicolor* nas redondezas da localidade de Pimenta Bueno – RO, como é argumentado em revisão por Bidau *et al.* (2009). Além disso, Cáceres – MT é a localidade tipo para *Ctenomys nattereri* Wagner, 1848. Ambas as localidades tipo foram amostradas neste estudo.

O gênero *Ctenomys* é caracterizado pelo baixo fluxo gênico entre populações, o que estrutura os indivíduos em subpopulações – também chamadas “demes” (Lacey *et al.*, 2000), com pouco à nenhuma troca genética entre demes distantes. Isso ocorre

devido principalmente à baixa mobilidade, hábitos fossoriais, territorialismo e, até certo ponto, por conta da perda de habitat para agricultura e, presumivelmente, expansão urbana.

Devido a essas características as populações de roedores fossoriais tendem a conservar apenas parte da variabilidade genética da espécie na população em questão, possivelmente eliminando ou fixando alelos através de deriva gênica. Esse isolamento de outras populações pode contribuir para os processos de especiação, considerando que migrações entre populações e processos estocásticos não tenham ocorrido em um passado recente; por outro lado, pequenas populações estão mais suscetíveis a depressão endogâmica devido a falta de cruzamentos aleatórios, de modo a reduzir a diversidade genética e possivelmente afetando o valor adaptativo da população, levando a extinção local em casos extremos (Lacey *et al.*, 2000).

Stolz *et al.* (2011a, em prep.) avaliaram o cariótipo e a morfologia de crânio das populações amostradas em Pontes e Lacerda (PL) e Cáceres (CA), as quais foram classificadas como *C. nattereri* ( $2n = 36$ ), Nova Olímpia (NO) e Nova Ubitatã (NU) como uma nova espécie *C. sp.* ( $2n = 34$ ) e Pimenta Bueno (PB) como *C. bicolor* ( $2n = 40$ ) (Figura 1). Padrões de morfologia de crânio resultaram no mesmo padrão de estruturação, separando as populações de *C. nattereri*, *C. sp.* e *C. bicolor* (Anexo I – Fig. 3). Outro estudo (Stolz *et al.*, 2011b, em prep.), baseado em dados de DNA mitocondrial revelou, através de uma abordagem de máxima verossimilhança, uma árvore filogenética na qual os indivíduos de NO e NU (*C. sp.*) divergiram em um passado recente dos indivíduos de PB (*C. bicolor*), enquanto aqueles de PL e CA (*C. nattereri*) estão bastante próximos da espécie *C. boliviensis* (Anexo II – Fig.4). Deste modo, vamos considerar as populações amostradas como pertencentes às espécies conforme ditas nestes 2 estudos.

Tendo em vista que não existem análises sob o ponto de vista genético com populações de *Ctenomys* nessas regiões e há uma possível espécie nova, um estudo de genética de populações é essencial para caracterizar esses indivíduos em nível de população, em especial sob três aspectos: (1) através da estimativa de diversidade alélica, (2) fluxo gênico entre populações e estruturação populacional.

Nesse estudo, foram empregados marcadores microssatélites com o objetivo de avaliar esses pontos-chaves da genética de populações, já que a taxa de mutação desses marcadores nucleares neutros é alta o suficiente para fornecer informação em nível de populações. Além disso, esse trabalho testará a resolução dos microssatélites em situação de baixa amostragem e baixo fluxo gênico, interpretando os resultados obtidos através de índices de fixação distintos –  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  – e testar se os dados de microssatélites corroboram com os obtidos através de diferentes abordagens nos artigos de Stolz *et al.* (2011a; 2011b, em prep.).

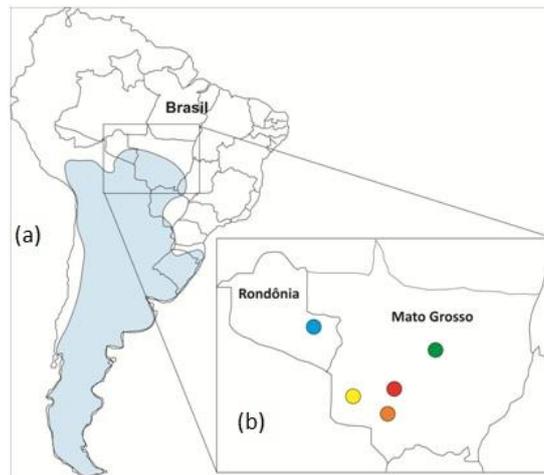


Figura 1: (a) A metade sul da Região Neotropical (azul claro). (b) No detalhe, os estados do Mato Grosso (MT) e Rondônia (RO) e as populações Pontes e Lacerda (PL) - em amarelo, Cáceres (CA) - em laranja, Nova Olímpia (NO) - em vermelho e Nova Ubiratã (NU) - em verde, no Mato Grosso e Pimenta Bueno - em azul, (PB) em Rondônia.

## Material e Métodos

**Amostragem** – Foram coletados 50 indivíduos distribuídos em 5 populações. Do estado do Mato Grosso foram amostradas 4 populações de *Ctenomys*, sendo 2 de *C. nattereri*: Pontes e Lacerda (PL), n = 10; Cáceres (CA), n = 10 e outras duas de *C.sp.*: Nova Olímpia (NO), n = 11; Nova Ubiratã (NU), n = 9. Em Rondônia apenas uma população de *C. bicolor* foi coletada: Pimenta Bueno (PB), n = 10 (Fig. 1b). As amostragens foram divididas em 5 expedições para essas regiões do Brasil entre os anos de 2007 e 2010, em uma média de 14 à 20 dias de duração cada. Os animais foram capturados vivos com armadilhas Oneida-Victor nº 0, com proteção de borracha para evitar lesão (Zenuto & Busch, 1998). Indivíduos capturados foram então sedados e sacrificados; todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as regras do Comitê de Uso e Cuidados Animais da Sociedade Americana de Mastozoologistas (*Animal Care and Use Committee – American Society of Mammalogists*, 1998). Tecidos do fígado, músculo esquelético e cardíaco, crânio e medula óssea foram coletados. Tecidos e corpos foram armazenados em etanol 70gl e as peles foram taxidermizadas. Ambas as peles e crânios foram depositados na coleção do Laboratório de Citogenética e Evolução da UFRGS.

**Extração de DNA** – O DNA foi extraído de tecido de fígado através do método de extração com sal, segundo Medrano *et al.* (1990). Foram amplificados 14 loci de microssatélites (Tabela 1) – 13 dinucleotídeos e 1 trinucleotídeo, isolados para as espécies *C. haigi* (n = 8; Lacey *et al.*, 1999) e *C. sociabilis* (n = 6; Lacey, 2001) para todos os indivíduos. Esses loci são sabidamente polimórficos e utilizados em diversos estudos para variadas espécies do gênero *Ctenomys* (Gava & Freitas, 2004; Cutrera *et al.* 2005; Fernández-Stolz *et al.* 2007; Gonçalves & Freitas, 2009; Mora *et al.* 2010); Reações de PCR foram conduzidas utilizando 8,2µl de água destilada, 2,0µl de tampão para PCR 1X, 0,6µl de co-fator MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,2µl DNTPs 10uM, 0,4µl de cada primer 10uM (consenso e complementar) e 0,2µl de Taq Polimerase 1U, totalizando um mix de 12µl, adicionado a 30ng de DNA por amostra, num volume total de

20µl/amostra; as seqüências de consenso (“*forward*”) para cada lócus foram marcadas com fluorescência FAM (para primers Hai) e HEX (para primers Soc) para genotipagem. As condições de amplificação foram as seguintes: as amostras foram desnaturadas por 5 min. à 94°C, seguido de 35 ciclos: desnaturação por 30 seg. à 49°C, anelamento dos primers entre 55-62°C dependendo do primer (veja a Tabela 1) e alongamento por 45 seg. à 72°C, terminando com um alongamento final de 5 min. à 72°C.

*Genotipagem e análises* – os produtos de PCR obtidos foram genotipados por seqüenciador automático, contabilizando 700 produtos de PCR para serem interpretados manualmente, com auxílio do programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems). No entanto, já que existe apenas uma população de *C. bicolor* (Pimenta Bueno – RO) esta foi removida das análises de  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$ , AMOVA, Teste de Mantel e estruturação populacional; portanto, 40 indivíduos foram testados, totalizando 560 produtos de PCR. Uma vez interpretados manualmente, os resultados foram utilizados para gerar um arquivo de entrada no programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) para avaliar fluxo gênico através de frequência alélica, índices de fixação –  $F_{ST}$  de Weir e Cockerham (Weir & Cockerham, 1984) e  $R_{ST}$  de Slatkin (Slatkin, 1995) – e número médio de migrantes por geração, para testar os indivíduos para desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e Desequilíbrio de Ligação (LD); teste de Mantel foi calculado no programa AIS (Miller, 2005) para testar correlação entre as distâncias genética e geográfica; o programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para inferir estruturação populacional, baseado no modelo de *admixture* com frequências alélicas correlacionadas.

Tabela 1: Características dos loci de microssatélites utilizados no estudo, isolados das espécies *C. haigi* (Lacey *et al.*, 1999) e *C. sociabilis* (Lacey, 2001): N° de repetições, n° médio de alelos, n° total de alelos e temperatura de anelamento.

Lócus	N° de Repetições	N° Méd. alelos	N° Total Alelos	Temp. Anelamento (°C)
Soc1	(CA) <sub>128-133</sub>	2,6	6	55
Soc2	(CA) <sub>72-79</sub>	3,6	8	59
Soc3	(CA) <sub>57-67</sub>	5,0	11	60
Soc4	(CA) <sub>193-197</sub>	3,0	5	55
Soc5	(CA) <sub>125-139</sub>	3,6	10	60
Soc6	(CA) <sub>104-105</sub>	1,6	2	62
Hai2	(CA) <sub>87-98</sub>	4,4	11	55
Hai3	(CA) <sub>69-85</sub>	5,0	12	60
Hai4	(CA) <sub>77-90</sub>	4,8	12	58
Hai5	(CA) <sub>97-106</sub>	3,8	9	55
Hai6	(CA) <sub>54-55</sub>	1,8	2	55
Hai9	(CA) <sub>106-112</sub>	3,4	7	59
Hai10	(CA) <sub>150-157</sub>	4,2	8	62
Hai12	(ATT) <sub>42-47</sub>	3,2	6	55

## Resultados

Para as quatro populações incluídas nas análises, o número médio de alelos (NMA) variou de 3.0 em NU a 4.42 em PL (Tabela 2). Após aplicar correção de Bonferroni (Rice, 1989), nenhum locus apresentou Desequilíbrio de Ligação (LD) e apenas 3 desviaram significativamente do HWE: Hai6 ( $P = 0,0004$ ) e Hai12 ( $P = 0,0031$ ) para a população de Cáceres e Soc3 ( $P = 0,0008$ ), para a população de Nova Olímpia após correção ( $P = 0.0035$ ). Valores médios de HWE não variam significativamente em quaisquer comparações. A diversidade alélica indica maior polimorfismo nas populações de Pontes e Lacerda (12 alelos exclusivos); valores intermediários foram encontrados para as populações de Cáceres (7 alelos exclusivos) e Nova Olímpia (8 alelos exclusivos); a população de Nova Ubiratã apresentou a menor diversidade alélica (5 alelos exclusivos). Além disso, Cáceres e Nova Ubiratã apresentaram um locus monomórfico cada.

Estimativas calculadas através do  $F_{ST}$  de Weir e Cockerham (1984) demonstram estruturação significativa entre as populações ( $P < 0,0001$ ). Entre PL e CA *C. nattereri*, valores de  $F_{ST}$  são bastante significativos ( $F_{ST} = 0,228$ ) e o número médio de migrantes por geração é de 0,842; entre NO e NU *C. sp.* os valores de  $F_{ST}$  também demonstram estruturação significativa ( $F_{ST} = 0,345$ ) e o número médio de migrantes por geração ( $M^{(F_{ST})}$  foi de 0,473 (Tabela 3).

Tabela 2: Número Médio de Alelos (NMA), Heterozigosidade média observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) para cada população do estudo, baseado em 14 loci de microssatélites.

	NMA	$H_O$	$H_E$
PL	4.429	0.4071	0.6030
CA	3.286	0.5846	0.5534
NO	4.071	0.4026	0.5748
NU	3.000	0.4273	0.5274

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseados em  $F_{ST}$  revelam estruturação genética significativa nos dois grupos analisados (*C. nattereri*:  $F_{ST} = 0,175$ ;  $V_a = 17,51\%$ ;  $P = 0,0004$ , d.p. 0,00019. *C. sp.*:  $F_{ST} = 0,3364$ ;  $V_a = 33,64\%$ ;  $P < 0,0001$ ), explicando aproximadamente 17,51 e 33,64 % da variação molecular observada em *C. nattereri* e *C.sp.*, respectivamente; os resultados de AMOVA ainda revelam que a maior parte da variância molecular obtida por  $F_{ST}$  é encontrada entre indivíduos ao contrário de entre populações (*C. nattereri*:  $F_{IT} = 0,3400$ ;  $V_c = 66,00\%$ ;  $P < 0,0001$ . *C.sp.*:  $F_{IT} = 0,5124$ ;  $V_c = 48,76\%$ ;  $P < 0,0001$ ). Finalmente, o índice  $F_{IS}$  também foi estatisticamente significativo (*C. nattereri*:  $F_{IS} = 0,1999$ ;  $V_b = 16,50\%$ ;  $P = 0,0004$ , d.p. 0,00019. *C.sp.*:  $F_{IS} = 0,2651$ ;  $V_b = 17,60\%$ ;  $P < 0,0001$ ) sugerindo endocruzamento.

O  $R_{ST}$  de Slatkin (1995) é um índice  $F_{ST}$  corrigido que captura mais informação obtida com microssatélites já que é independente da taxa de mutação quando dentro de

um modelo generalizado de mutação “passo-a-passo” (*stepwise mutation model*) (Balloux & Goudet, 2002) desde que exista uma quantidade suficiente de indivíduos amostrados e loci amplificados para cada população (Slatkin, 1995). Os resultados de  $R_{ST}$  demonstram, assim como os de  $F_{ST}$ , estruturação significativa entre populações ( $P < 0,0001$ ) em ambos os casos (*C. nattereri*:  $R_{ST} = 0,3729$ . *C.sp.*:  $R_{ST} = 0,4965$ ); os números médios de migrantes por geração ( $M^{\wedge}(R_{ST})$  são 0,4203 e 0,2534, para *C.nattereri* e para *C.sp.*, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3: Comparações entre grupos de espécies (*C. nattereri*: PL e CA; *C.sp.*: NO e NU) de acordo com o índice  $F_{ST}$ .  $M^{\wedge}(F_{ST})$  – Nº médio de migrantes por geração; d (Km) – distância em quilômetros entre as populações.

	<i>C. nattereri</i>	<i>C. sp.</i>
$F_{ST}$	0,228	0,345
$M^{\wedge}(F_{ST})$	0,842	0,473
<b>d (Km)</b>	193,7	334,9

Tabela 4: Comparações entre grupos de espécies (*C. nattereri*: PL e CA; *C.sp.*: NO e NU) de acordo com o índice  $R_{ST}$ .  $M^{\wedge}(R_{ST})$  – Nº médio de migrantes por geração; d (Km) – distância em quilômetros entre as populações.

	<i>C. nattereri</i>	<i>C. sp.</i>
$R_{ST}$	0,372	0,496
$M^{\wedge}(R_{ST})$	0,420	0,253
<b>d (Km)</b>	193,7	334,9

Os resultados de AMOVA baseados em  $R_{ST}$  também demonstram estruturação genética significativa entre os grupos de populações de cada espécie (*C. nattereri*:  $F_{ST} = 0,2962$ ;  $V_a = 29,63\%$ ;  $P = 0,0002$ , d.p. 0,00014. *C.sp.*:  $F_{ST} = 0,4866$ ;  $V_a = 48,66\%$ ;  $P < 0,0001$ ) explicando aproximadamente 29,63 e 48,66 por cento da variação molecular observada em *C. nattereri* e *C.sp.*, respectivamente; a variância molecular entre indivíduos também foi significativa em ambas as comparações (*C. nattereri*:  $F_{IT} = 0,4657$ ;  $V_c = 53,43\%$ ;  $P = 0,0001$ , d.p. 0,0001. *C.sp.*:  $F_{IT} = 0,6750$ ;  $V_c = 32,50\%$ ;  $P = 0,00455$ , d.p. 0,00065). Finalmente, o índice  $F_{IS}$  também foi significativa (*C. nattereri*:  $F_{IS} = 0,2407$ ;  $V_b = 16,94\%$ ;  $P = 0,01208$ , d.p. 0,00114. *C.sp.*:  $F_{IS} = 0,3699$ ;  $V_b = 18,84\%$ ;  $P < 0,0001$ ), indicando mais uma vez que há tendência ao endocruzamento nas populações.

Análises no programa STRUCTURE revelam 4 populações geneticamente distintas ( $k = 4$ ), baseando-se no índice  $F_{ST}$ . O gráfico em barra mostra claramente essa divisão, bem como a presença de dois indivíduos na população de NO que aparentemente compartilham ancestralidade com as populações de PL e NU,

respectivamente. Neste caso em específico, a análise foi rodada considerando uma única espécie, justamente para testar se existe estruturação entre as populações do Mato Grosso.

O programa Alleles in Space – AIS permite calcular a correlação entre distância genética e distância geográfica, mesmo para poucas e esparsas populações, através do teste de Mantel. Em ambos os grupos, houve correlação positiva significativa (*C. nattereri*:  $r = 0,7088$ ;  $P = 0,0009$ ;  $d_{(PL-CA)} = 193,7$  Km). *C.sp.*:  $r = 0,7911$ ;  $P = 0,0009$ ;  $d_{(NO-NU)} = 334,9$  Km) sugerindo que o isolamento por distância contribui para a estruturação das populações.

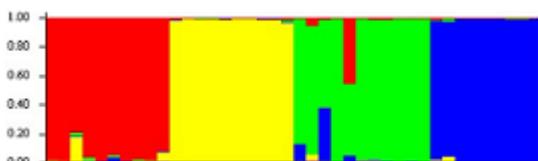


Figura 2: Estruturação populacional num modelo *admixture* com frequências alélicas correlacionadas. Observa-se 4 populações geneticamente distintas: Pontes e Lacerda (vermelho), Cáceres (amarelo), Nova Olímpia (verde) e Nova Ubiratã (azul).

## Discussão

Marcadores moleculares neutros são os mais adequados marcadores disponíveis quando o objetivo é obter informação sobre indivíduos em um contexto populacional. No entanto, existem diferenças quando se usa diferentes estatísticas  $F$  para avaliar esses dados. O índice  $F_{ST}$  não está ajustado para a taxa de mutação das seqüências nucleares neutras e dessa forma pode subestimar os valores de estruturação genética entre um grupo de populações, enquanto superestima o número médio de migrantes por geração. Alternativamente, o índice  $R_{ST}$  leva em consideração uma taxa mutacional maior, adaptada aos microssatélites, de forma que maximiza os valores para estruturação populacional, enquanto minimiza a estimativa de migrantes. De fato, é este o caso deste estudo, como se pode observar claramente ao comparar os resultados para ambos os índices.

Esses resultados corroboram com o proposto por Balloux e Goudet (2002), que apresenta simulações utilizando o índice  $R_{ST}$  num modelo de ilha finito com populações estruturadas, baixo número de migrantes e pequeno número efetivo apresentam menos variação nos resultados do que o índice  $F_{ST}$  nessas condições. Alternativamente, quando há alto fluxo gênico o índice  $F_{ST}$  tende a ser mais estável. Portanto, consideraremos o índice  $R_{ST}$  para o propósito de análise dos dados, exceto para resultados obtidos no programa STRUCTURE e no teste de Mantel, os quais são calculados em  $F_{ST}$ .

As populações amostradas neste estudo são estruturadas genética e geograficamente, como indica o teste de Mantel. Porém, essa correlação não é completa ( $r < 1$ ). Logo, deve haver outros fatores que contribuem para esses valores de estruturação genética encontrados neste trabalho e nos estudos de Stolz *et al* (2011a; 2011b). Tais fatores podem ser diferentes barreiras físicas – tais como serras, planaltos e

chapadas e/ou fatores históricos, como um evento de “especiação rápida” (Lessa & Cook, 1998; Parada *et al.* 2011). Essas barreiras físicas podem ser, por exemplo, a Chapada dos Parecis e o Rio Paraguai, localizadas no estado do Mato Grosso. A Chapada dos Parecis se estende do centro ao sudoeste do MT e pode restringir ou interromper o fluxo gênico entre populações que habitam essa região do estado (*C. nattereri*). O Rio Paraná é formado por uma série de braços ao longo do sul do Mato Grosso e causam uma série de inundações locais, que podem afetar a habilidade de locomoção de animais de pequeno porte, restringindo o fluxo gênico. Por exemplo, próximo ao ponto de coleta de Cáceres – MT encontram-se aproximadamente 10 vazões do rio em um trecho de poucos quilômetros, o que pode isolar essa população de outras populações próximas. Além disso, os indivíduos da população de Nova Ubiratã foram encontrados em áreas de recente desmatamento na floresta Amazônica, havendo a presença de tocas também em áreas de mata nativa.

Fatores genéticos e históricos também podem contribuir para os padrões de estruturação observados. Por exemplo, Lessa e Cook (1998) e Parada *et al.* (2011) estimaram, baseando-se em análises de seqüências de citocromo b, que o gênero *Ctenomys* sofreu um processo de especiação rápida no início da história do gênero. Parada *et al.* (2011) também estabeleceram um relógio molecular, estimando que essa especiação rápida ocorreu há cerca de 3 milhões de anos atrás. Logo, pode haver uma estruturação genética alta que é inerente ao gênero *Ctenomys* e que estrutura os tucotucos em subpopulações – os chamados “demes” – mas que permite viabilidade às populações mesmo na presença de baixo fluxo gênico; na verdade, o  $R_{ST}$  entre as populações de mesma espécie parece bastante alto ( $R_{ST (PL-CA)} = 0,3729$ ;  $R_{ST (NO-NU)} = 0,4965$ ).

A estruturação populacional encontrada através do programa STRUCTURE revela 4 populações bastante estruturadas, o que sugere pertencerem a duas espécies distintas (segundo dados de Stolz *et al.*, 2011a, 2011b); os indivíduos que aparentemente compartilham ancestralidade com NO (veja Figura 2) são mais provavelmente reflexos da homoplasia dos *loci*, ou seja, convergência de diferentes loci para um tamanho idêntico através de acúmulo de mutações neutras; considerando que 13 dos 14 loci são repetições dinucleotídicas, a DNA polimerase está mais sujeita ao fenômeno de *slippage*, aumentando a probabilidade de acúmulo de mutações que não forem reparadas pela célula nas regiões de microssatélite. De fato, se não fosse explicado por homoplasia, haveria um aparente fluxo gênico entre populações de espécies diferentes (Figura 2). Além disso, a distância entre as populações amostradas é muito grande para que haja um possível fluxo real entre estas; a maioria dos roedores fossoriais migra poucos quilômetros durante sua vida (Lacey *et al.*, 2000) e aqui a menor distância entre populações (PL-CA) é de 193.7 quilômetros.

No entanto, apesar da estruturação genética evidente, deve-se notar que o tamanho amostral é bastante reduzido para poder comprovar presença ou ausência de migração e direção desta entre as populações de uma mesma espécie. Na verdade, os pontos de amostragem são poucos e esparsos e compreendem poucos indivíduos, apesar

do esforço amostral ter sido bastante alto. Esses indivíduos (juntamente com outros 10 da população de Rondônia, não incluídos nas análises) são os únicos que já foram coletados nessas regiões e abrangem a grande maioria das populações no Centro-oeste e Norte do Brasil.

Finalmente, maior amostragem é necessária entre as populações conhecidas, em especial entre PL e CA (*C. nattereri*) e NO e NU (*C. sp.*) e ao entorno de PB (*C. bicolor*) em intervalos geográficos menores para poder estimar com maior precisão a migração e estruturação das espécies presentes nessa região do país, como por exemplo estimar qual a distância máxima na qual o fluxo gênico entre duas populações próximas começa a cessar e se a direção do fluxo gênico é uni ou bidirecional. Desse modo, será possível também testar a presença ou ausência de barreiras geográficas além da distância geográfica e dar maior suporte ao papel do isolamento por distância nessas espécies do gênero *Ctenomys*.

#### Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a toda equipe do Laboratório de Citogenética e Evolução por todo seu apoio e críticas construtivas que tornaram possível esse trabalho. Ainda a Loreci Lima por seu grande apoio em campo.

#### ABSTRACT

Five populations of tuco-tucos rodents (genus *Ctenomys*) from the Brazilian states of Mato Grosso (MT) and Rondônia (RO) were analyzed with microsatellite markers in order to evaluate the individuals in a population context. Results indicate strong population structure, which is due in part to isolation by distance – as indicated by Mantel Test results - and, possibly, to other geographic barriers such as ridges and rivers, and genetic barriers such as an event of burst speciation early in the genus history. This study also shows that usage of the  $R_{ST}$  index is more adequate than the  $F_{ST}$  when analyzing data from strongly structured populations – low migration levels - with small effective sample size, corroborating with simulations calculated by previous studies. Further sampling is required to effectively estimate patterns and degree of migration between populations, since the sampling size is rather small.

#### Referências

Balloux F., and Goudet J. 2002. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology* 11, 771–783.

Bidau C. J., and Avila-Pires F. D. 2009. On the type locality of *Ctenomys bicolor* Miranda Ribeiro, 1914 (Rodentia: Ctenomyidae). *Mastozool. neotrop.* v.16 n.2.

Cutrera A. P., Lacey E. A., and Busch C. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology* 14, 2511–2523.

- Cutrera A. P., Lacey E. A., and Busch C. 2006. Intraspecific variation in effective population size in Talar Tuco-tucos (*Ctenomys talarum*): the role of demography. *Journal of Mammalogy* 87(1):108–116.
- Fernandes F. A., Fernández-Stolz G. P., Lopes C. M., and Freitas T. R. O. 2007. The conservation status of the tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Ctenomyidae: Rodentia), in southern Brazil. *Braz. J. Biol.*, 67(4, Suppl.): 839-847.
- Fernández-Stolz G. P., Stolz J. F. B., and Freitas T. R. O. 2007. Bottlenecks and Dispersal in the Tuco-Tuco das Dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88(4):935-945.
- Gava A., and Freitas T. R. O. 2004. Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from Southern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 85(6):1201–1206.
- Gonçalves G. L., and Freitas T. R. O. 2009. Intraspecific variation and genetic differentiation of the collared Tuco-tuco (*Ctenomys torquatus*) in Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 90(4):1020–1031.
- Lacey E. A., Patton J. L., and Cameron G. N. 2000. *Life Underground: the biology of subterranean rodents*. The University of Chicago Press, Chicago and London, 449 pp.
- Lacey E. A., Maldonado J. E., Clabaugh J. P., and Matocq M. D. 1999. *Molecular Ecology*. 8(10); 1754 – 1756.
- Lacey E. A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity*. 86, 628 – 637.
- Lessa E. P., and Cook J. A. 1998. The Molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 9, No. 1, February, pp. 88–99.
- Medrano J.F., Aasen E., and Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated blood cells. *BioTechniques*. 8(1):43.
- Miller M. P. 2005. Alleles In Space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Heredity*. 96(6):722–724.
- Mora M. S., Mapelli F. J., Gaggiotti O. E., Kittlein E. J., and Lessa E. P. 2010. Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC Genetics* 2010, 11:9
- Parada A., D'Elia G., Bidau C. J., and Lessa E. P. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, 92(3):671–682, 2011

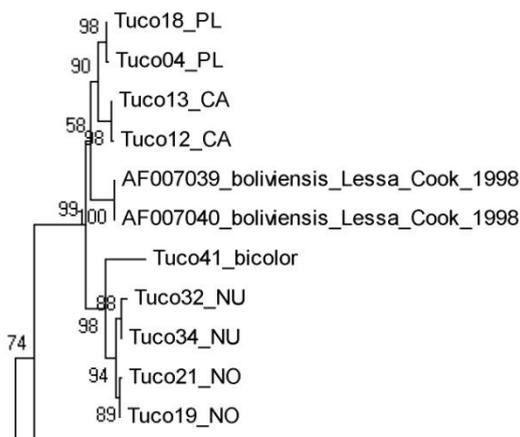
Rice W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223–225.

Slatkin M., A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics*, 139(1): 457 – 462, 1995

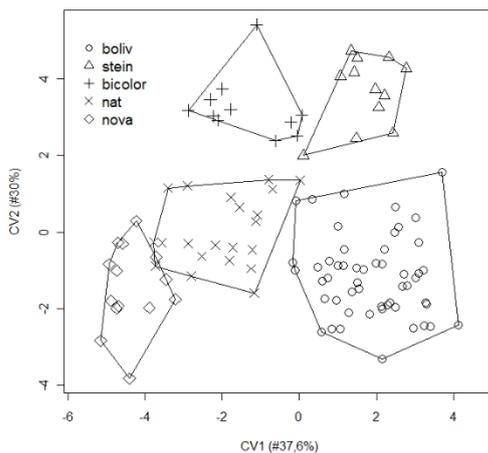
Stolz et al (2011a, em prep.; 2011b, em prep.)

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

Zenuto R. R., and Busch C. 1998. Population biology of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a coastal dunefield in Argentina. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 63:357–367.



Anexo I – Fig. 3: Detalhe da árvore de Máxima Verossimilhança (ML) para as populações estudadas, mostrando a relação entre as espécies encontradas.



Anexo II – Fig. 4: Gráfico ilustrando as relações obtidas entre populações amostradas, segundo morfometria craniana. boliv – grupo externo de *C. boliviensis*; stein – *C. steinbachi*; bicolor – *C. bicolor* (Pimenta Bueno – RO); nat – *C. nattereri* (PL e CA); nova – *C. sp.* (NO e NU).