

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ANÁLISE DE MICROSSATÉLITE EM DUAS ZONAS DE
HIBRIDAÇÃO E A EFETIVIDADE DE UMA BARREIRA GEOGRÁFICA
NA DISTRIBUIÇÃO DE *Ctenomys lami* (RODENTIA-OCTODONTIDAE)



CAMILA SCHLIEPER DE CASTILHO

Orientador: Prof. Dr. Thales R. O. de Freitas

Co-orientador: Tarik A. R. J. El Jundi

Relatório submetido ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Porto Alegre, Julho 2001

FRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

0315389

AGRADECIMENTOS

Ao professor Thales, pela orientação, oportunidade de trabalho, confiança, amizade e incentivo.

Ao Tarik pela paciência, confiança, orientação, bom humor, e principalmente por estar sempre disponível para uma conversa amigável ou para um dia de trabalho.

À Juliana da Silva pelo interesse, carinho e incentivo em todas as horas, e pela disponibilidade de avaliar este trabalho.

À professora Margarete S. Mattevi pela disponibilidade de ler e avaliar este trabalho.

À Camila Rocha de Moraes pela amizade, pela ajuda nas técnicas de laboratório, por compartilhar prazos apertados, e pelos desabafos no bar.

Aos amigos Tatiane, Leandro, Adriana Gava, Vanina, Cristina Freygang, Lucas, Vanessa, Gabriela, Elise, Lígia, e todos os demais colegas do laboratório de Citogenética e Evolução de Vertebrados, por todo o interesse, conversas e cafés que tornaram os dias de trabalho mais alegres.

Ao professor Gilson Moreira pelos primeiros ensinamentos de pesquisa, pelo carinho, incentivo e compreensão, mas acima de tudo, pelo seu contagiante amor à pesquisa.

À Fapergs pelo fornecimento da bolsa.

À minha família que pela participação em todos os momentos deste trabalho e pelo incentivo a seguir em frente e superar as dificuldades, especialmente à minha mãe pela incansável paciência e carinho.

Ao meu pai, pelo exemplo de força, determinação e coragem, tanto na vida pessoal quanto na profissional.

Às amigas Priscila e Patrícia Diehl, pelo carinho, interesse e incentivo em todas as ocasiões.

Aos demais amigos, colegas e pessoas especiais que participaram da minha vida durante este período de trabalho, deixando uma parte sua em mim, e que me tornaram alguém melhor pessoal e profissionalmente.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO

I.1. Gênero <i>Ctenomys</i>	4
I.1.1. <i>Ctenomys lami</i>	5
I.1.2. Coxilha das Lombas.....	7
I.2. Marcadores Moleculares.....	8
I.2.1. Microsatélites.....	8
I.3. Zonas de Híbridaçã.....	9
II. OBJETIVOS.....	11
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
IV. RESULTADOS.....	17
V. DISCUSSÃO.....	19
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

I. INTRODUÇÃO

I.1. GÊNERO *Ctenomys*

O gênero *Ctenomys* é representado até o momento, por 48 espécies descritas, amplamente distribuídas na região neotropical (Woods, 1993), ocupam a região da Patagônia desde a Terra do Fogo, até o sul do Peru e Bolívia. Estes roedores fossoriais são caracterizados por um corpo robusto e cilíndrico com uma cabeça larga e cauda curta. Possuem dentes e unhas bastante desenvolvidos, pavilhões auditivos reduzidos, vivendo a maior parte de suas vidas sob a terra em sistemas de túneis (Nowak, 1991). Observou-se territorialidade, pouco deslocamento, e grande diversidade cariotípica, com cariótipos variando de $2n=10$ a 70 (Reig e Kiblisky, 1969; Kiblisky e cols., 1977; Freitas e Lessa, 1984; Massarini e cols., 1991a,b).

A especiação no gênero *Ctenomys* pode ter sido uma das mais explosivas entre os gêneros de mamíferos (Lessa & Cook, 1998) dada sua rapidez, atingindo um número de 48 espécies (Woods, 1993) desde o seu surgimento no início do Pleistoceno. Pode-se associar isto à sugestão de que os rearranjos cromossômicos tiveram uma importância fundamental, originando uma variação cromossômica de $2n=10$ a 70 (Lessa & Cook, 1998).

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 que possam surgir na espécie (Reig, 1989).

No Rio Grande do Sul, conforme Freitas (1995), são encontradas quatro espécies deste gênero, *Ctenomys minutus*; distribui-se nos campos arenosos, atrás da primeira linha de dunas, indo do Farol de Santa Marta (SC) até o município de Tavares (RS). Nesta espécie foram descritos sete números diplóides distribuídos em oito cariótipos. *Ctenomys flamarioni*; ocupa o longo da costa, habitando a primeira linha de dunas, desde a praia do Hermenegildo

(RS) até o município de Arroio Teixeira (RS), observando-se o número diplóide $2n=48$. *Ctenomys torquatus*; ocorre nas terras baixas do centro e região pampeana do Rio Grande do Sul, com número diplóide de $2n=44$ e 46 . *Ctenomys lami*; é o que tem a distribuição mais restrita, ocupando a região da Coxilha das Lombas. Vai desde a região nordeste do Rio Guaíba até a margem sudoeste da Lagoa dos Barros no estado do Rio Grande do Sul. Foram descritos cinco números diplóides distribuídos em sete cariótipos, $2n=54$, $55a$, $55b$, $56a$, $56b$, 57 e 58 .

1.1.1. *Ctenomys lami*

A espécie *C. lami* (Figura 1), descrita por Freitas (2001), baseado em estudos craniométricos e citogenéticos, se caracteriza principalmente pela sua alta diversidade cariotípica em uma restrita região. Em um estudo feito por Freitas (1990), foram coletados 115 animais distribuídos em 16 pontos de coleta ao longo da Coxilha das Lombas- RS (Figura 2). A análise citogenética realizada nestes indivíduos evidenciou cinco números diplóides que variam de $2n=54$ a $2n=58$. Considerando-se o cariótipo mais frequente ($2n=54$) como padrão, observa-se os pares 1 e 2 formados por cromossomos grandes metacêntricos. O citótipo $2n=55$ é a forma heterozigota, onde um cromossomo do par 1 ou do par 2 sofre fissão ($2n=55b$ ou $55a$, respectivamente). No citótipo $2n=56$, os dois homólogos do par 1 ou do par 2 sofrem fissão, originando quatro acrocêntricos ($2n=56b$ ou $56a$, respectivamente). Na forma $2n=57$ foi observado o par 1 heterozigoto e o par 2 sofrendo fissão nos dois cromossomos homólogos. Finalmente, no citótipo $2n=58$ observa-se a fissão dos dois homólogos do par 1 e 2 dando origem a oito acrocêntricos. Segundo o autor, a distribuição geográfica dos diferentes citótipos indica a separação em quatro blocos populacionais ao longo dos 78km da Coxilha das Lombas. Assim, em um transecto sudoeste-nordeste, identificam-se os blocos A, com $2n=54$, $55a$ e $56a$; bloco B, com $2n=57$ e 58 ; o bloco C, com $2n=54$ e $55a$ e, finalmente, o bloco D com $2n=55b$ e $56b$ (Figura 3).

A distribuição restrita da espécie *C. lami*, limitada à Coxilha das Lombas, destaca a importância da análise da evolução desta espécie associada à formação da região.



Figura 1- *Ctenomys lami*.



Figura 2- Distribuição geográfica de *C. lami*, a área azul representa a Coxilha das Lombas (Freitas, 1995).

I.1.2. COXILHA DAS LOMBAS

A Barreira das Lombas (Figura 2) é definida por Villwock (1983) como um dos cinco compartimentos morfológicos da Província Costeira do RS, representada a nordeste e sudeste da cidade de Porto Alegre, sendo uma faixa arenosa alongada, constituindo a linha de dunas mais antiga e interiorizada da Província Costeira do Estado.

A formação da Coxilha das Lombas está associada à formação de toda a costa do RS, constituída pela sucessão de eventos de transgressão e regressão marinhas e depósito eólicos marinhos.

Após a grande transgressão do Mioceno, seguiram-se outros eventos semelhantes que originaram o sistema de barreiras que dá origem à formação geográfica atual. Durante a regressão do final do Plioceno, formou-se uma região de depósitos clásticos, permeada por um sistema de canais em direção ao mar. Após o primeiro ciclo de transgressão-regressão do Pleistoceno, formou-se a Barreira das Lombas, que isolou o sistema de lagunas Guaíba-Gravataí. Após o segundo ciclo de transgressão-regressão do Pleistoceno, iniciou-se a construção do sistema de Barreira Múltipla que começou a isolar o sistema de lagunas Patos-Mirim. Após o terceiro ciclo, o crescimento da Barreira Múltipla continuou adicionando uma segunda barreira e terminando de formar o sistema de lagunas Patos-Mirim. Finalmente, após o ciclo de transgressão-regressão Holocênica, foi adicionada uma quarta barreira, dando origem à região costeira atual.

A Barreira das Lombas é descrita como um conjunto de colinas convexas formadas por areias quartzosas, com quantidades variáveis de silte e argila, com uma cor predominantemente avermelhada e castanho-amarelada. As alturas variam de 20 a 158m, possuindo uma extensão de 78km e largura máxima de 12km (Arienti, 1986).

Observa-se em decorrência do fechamento da Barreira das Lombas a formação do Rio Gravataí, onde durante a regressão holocênica leva a formação de um ambiente paludal na região da laguna onde se acumulam os depósitos turfáceos que irão dar origem ao Banhado dos Pachecos.

Atualmente a Coxilha das Lombas compreende uma região que se inicia ao norte do Rio Guaíba e se prolonga por 78km até nordeste da Lagoa dos Barros. Esta região é costeada por dois banhados, um do lado noroeste (Banhado dos Pachecos), e outro do lado sudeste (Banhado dos Touros) que se encontram conectados aproximadamente no meio da Coxilha.

I.2. MARCADORES MOLECULARES

Atualmente, observa-se um aumento na utilização de marcadores moleculares nos estudos de genética de populações e filogeografia comparada. Dentre as ferramentas utilizadas, destaca-se a descrita a seguir, o DNA microssatélite, que foi utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

I.2.1. MICROSSATÉLITES

Os microssatélites estão incluídos dentro das sequências de DNA nuclear denominadas de SSRs “Simple Sequence Repeats” (Kashi *e cols.*, 1997) ou VNTRs “Variable Number of Tandem Repeats” (Murray, 1996). São sequências altamente repetitivas dispersas pelo genoma de eucariotos, formadas de repetições “in tandem” de 1 a 6 pares de bases. Formam conjuntos de cinco até centenas de repetições por loco, podendo variar em tamanho e possuindo um caráter altamente polimórfico (Tautz, 1993).

As mutações que ocorrem nos microssatélites são mudanças no número de repetições, causadas por erros de pareamento devido ao deslizamento das fitas no momento da replicação. Esses erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições que conferem o caráter polimórfico destes locos (Schlotterer, 1998).

Os microssatélites, por apresentarem alelos menores do que 1Kb, permitem a utilização de DNA altamente fragmentado ou em pequenas quantidades, inclusive obtido a partir de amostras antigas (Bruford & Wayne, 1993).

Sua utilização em estudos vem aumentando bastante, tais como: identificação de indivíduos ou espécies (Ernest, *e cols.*, 2000), comparação da

variedade genética entre espécies e populações (Menotti-Raymond *e cols.*, 1995; Johnson *e cols.*, 1999), grau de estrutura das populações e migração (Simonsen *e cols.*, 1998; Ciofi & Bruford, 1999; Waits *e cols.*, 2000), determinação de parentesco e estrutura social (Morin *e cols.*, 1994; Nesje *e cols.*, 2000) e estudos em zonas de hibridação (Moulin *e cols.*, 1996).

1.3. ZONAS DE HIBRIDAÇÃO

Casos de hibridação natural e de zonas de hibridação estreitas apresentam padrões surpreendentes de variação e tem chamado a atenção de biólogos evolutivos. Ao longo de sua distribuição as espécies geralmente são subdivididas formando um mosaico de populações. Nestes casos, as zonas de hibridação podem aparecer como abruptas discontinuidades, ou ainda como clinas suaves entre estes grupos de populações.

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

Freitas em 1990, observou em *C. lami* os números cromossômicos mais frequentes $2n=54$, $56b$ e 58 . O cariótipo $2n=57$ foi considerado pelo autor um produto de hibridação entre $2n=56a$ e $2n=58$ (Freitas, *in prep.*), sendo observado entre indivíduos do Bloco A e do Bloco B, na chamada Zona de Hibridação 1. O cariótipo $2n=55b$, foi considerado pelo autor um produto de hibridação entre $2n=56b$ e $55a$ (Freitas, *in prep.*), sendo observado entre indivíduos do Bloco C e do Bloco D, na chamada Zona de Hibridação 2 (Figura 3).

Zonas de hibridação podem ser classificadas como primárias e secundárias: primárias se as populações estiverem distribuídas em clina quanto às suas diferenças, e secundária, se ocorre entre duas populações que estiverem separadas geograficamente.

As zonas de hibridação ou contato são frequentemente reconhecidas por meio da morfologia, por diferenças cromossômicas, etológicas e

moleculares, ou ainda, por meio da combinação destes aspectos (Hewitt,1988).

No gênero *Ctenomys* também foi demonstrada a existência de uma zona de hibridação. Gava (1996), descreve uma zona entre duas formas cromossômicas distintas da espécie *C. minutus* ($2n=46$ e $2n=48$). Este estudo mostrou que as formas híbridas não divergiam através da morfologia externa, mas sim em relação a morfologia craniana (Marinho & Freitas, 2000), e com a formação de um cariótipo intermediário ($2n=47$) (Gava, 1996).

II. OBJETIVOS

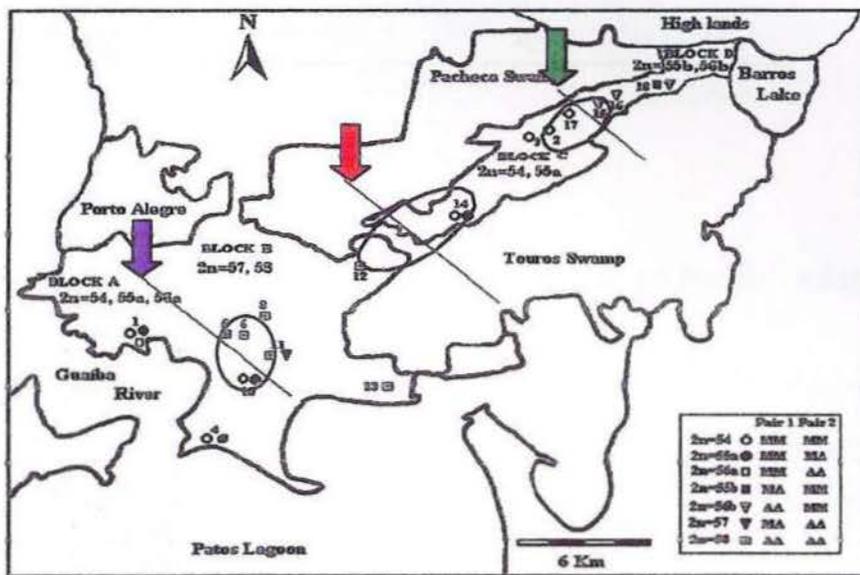
Baseado no que foi descrito anteriormente, os objetivos do presente trabalho são:

1. Analisar a variabilidade genética utilizando três locos de microssatélite em nove populações de *C. lami* ao longo de sua distribuição.
2. Verificar a presença ou não de fluxo gênico entre os Blocos populacionais A+B e C+D (Freitas, 1990) utilizando DNA microssatélites.
3. Determinar a presença de duas Zonas de Hibridação entre os Blocos populacionais A e B, e entre os Blocos C e D, utilizando DNA microssatélites.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 43 indivíduos de *C. lami*, coletados em nove populações ao longo da distribuição da espécie (Tabela 1). Para este estudo foram utilizadas amostras preferencialmente de rim, quando não estava disponível foi utilizado músculo cardíaco ou fígado. Todos os animais foram coletados por Freitas em 1985, utilizando armadilhas especiais para roedores fossoriais do tipo Oneida nº 0. As amostras foram conservadas em álcool 70% a -4°C.

Em uma das Zonas de Hibridação (ZH1), entre os Blocos A e B, foram estudados 12 animais, distribuídos em quatro populações, na outra Zona de Hibridação (ZH2), entre os Blocos C e D, foram estudados 20 espécimes, distribuídos em três populações. As 11 amostras restantes foram obtidas na Barreira (BAR), entre os Blocos B e C, em duas populações (Figura 3).



➔ ZH1
 ➔ BAR
 ➔ ZH2

Figura 3- Distribuição das amostras coletadas. As populações circuladas foram as utilizadas para o presente estudo.

Tabela 1- Procedência das amostras obtidas de *C. lami* para as Zonas de Hibridação e Barreira Geográfica na Coxilha das Lombas-RS.

Zona	População	N	2n
ZH1	10	3	54/55
	5	4	58
	6	1	58
	11	4	58
ZH2	2	5	54
	17	4	54
	15	11	56
BAR	12	4	58
	14	7	54/55
Total		43	

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo adaptado de Medrano *e cols.* (1990).

Para a amplificação dos locos foram escolhidos três “primers” de DNA microssatélites descritos para o gênero *Ctenomys* por Lacey *e cols.* (1999): Hai-2, Hai-3 e Hai-5. São repetições de sequências dinucleotídeas, ou seja, com repetições de dois pares de bases.

As reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Palumbi, 1996) realizadas para a amplificação dos locos continham um volume de 20 μ l, consistindo de:

- cerca de 50 ng de DNA genômico;

- 1x Tampão PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl);
- 1,5 mM de MgCl₂;
- 0,8 Unidades de Taq DNA Polimerase;
- 0,4 mM de dNTPs;
- 0,4 μM de solução contendo cada par de primers;
- Água Miliq para completar o volume.

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores, a amplificação foi executada da seguinte forma: após uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, foram realizados 31 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 61°C ou 58°C (a temperatura de anelamento variou de acordo com o primer utilizado, ver Tabela 2) e 1 minuto a 72°C, respectivamente. A extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos, e posteriormente as amostras foram resfriadas a 4°C.

O resultado das amplificações foi verificado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x, corado com Brometo de Etídio e visualizado em translumidor de luz Ultra Violeta.

Tabela 2- Condições de amplificação por PCR para os primers utilizados.

Primer	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração de MgCl ₂ (mM)
Hai-2	61	1,5
Hai-3	58	1,5
Hai-5	61	1,5

Uma alíquota dos produtos da amplificação foi misturado ao dobro da quantidade de tampão contendo 0.25% de xileno cianol, 0.25% de azul de bromofenol e 50% de sacarose, diluído em TBE 1x, uma parte desta solução foi misturada à três partes de formamida, e submetida a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante 8% (Figura 4), a fim de determinar o genótipo de cada indivíduo. O tamanho dos alelos foi determinado pela comparação com dois tipos de marcadores moleculares: marcador de 25 pares de base e marcador tipo “Escada Alélica”, o qual foi construído com os próprios alelos encontrados em cada “primer”.

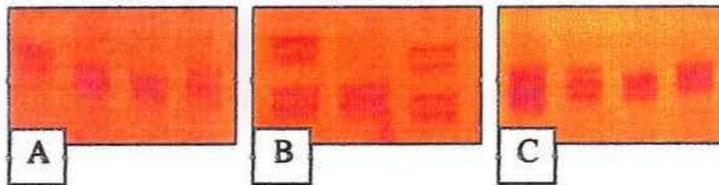


Figura 4- Géis de Poliacrilamida 8% desnaturante. Gel A- Fragmentos gerados pela amplificação com “primer” Hai-2. Gel B- Fragmentos gerados pela amplificação com o “primer” Hai-3. Gel C- Fragmentos gerados pela amplificação com o “primer” Hai-5.

A eletroforese dos géis de poliacrilamida foi realizada em cuba vertical com tampão TBE 1x por quatro horas a uma potência constante de 20 miliampères.

O gel de poliacrilamida foi corado com Nitrato de Prata, seguindo o protocolo descrito por Tegelstrom (1992).

A diversidade genética encontrada nos locos analisados foi medida pela heterozigose observada (H_o) a partir das frequências alélicas supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos locos.

A proporção de desvios a partir do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada através do Programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et cols.*, <http://anthro.unige.ch/arlequin>).

O teste de estrutura genética foi também realizado através do Programa Arlequin ver. 2000, no qual foram realizadas análises da variância molecular (AMOVA) dentro e entre as populações através do índice F_{st} (método de distância pelo número de alelos diferentes) (Weir & Cockerham, 1984). O número de migrantes por geração (Nm) foi estimado através do Programa Arlequin ver. 2000 a partir do F_{st} calculado (Slatkin, 1995).

Conforme Murray (1996), se nenhuma ou pouca migração ocorrer entre as populações, eventualmente alelos alternados irão se fixar por endocruzamento ou deriva genética, e assim os índices de F_{st} alcançariam valores próximos de 1. Alternativamente, se existir fluxo gênico entre as populações dentro de cada zona, as frequências alélicas permaneceriam homogêneas e os índices alcançariam valores próximos ou igual a zero, assim quanto menor o valor de F_{st} , maior será o número de migrantes por geração.

IV. RESULTADOS

Os três locos analisados apresentaram-se polimórficos totalizando 18 alelos diferentes. O número de alelos por loco (A), o tamanho dos fragmentos encontrados, a heterozigosidade observada (Ho), a heterozigosidade esperada (He) e os valores exatos de p estão também relacionados abaixo (Tabela 3). Foram encontrados desvios significativos entre a proporção de heterozigotos observada e a esperada de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$) para os locos Hai-3 e Hai-5.

Tabela 3- Tamanho dos fragmentos maiores e menores gerados por amplificação por PCR em pares de bases (pb), número de alelos por locos (A), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) para as frequências alélicas supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Locos	Tamanho fragmento (pb)	A	Ho	He	Valores de p
Hai-2	169-175	4	0.476	0.516	0.735
Hai-3	154-170	8	0.525	0.665	0.001
Hai-5	180-190	6	0.575	0.748	0.033

O loco Hai-3 foi o mais polimórfico com oito alelos, seguido de Hai-5 com seis alelos, e Hai-2 com quatro alelos distribuídos entre as populações estudadas. O loco Hai-5 teve a maior heterozigosidade observada dos três locos estudados, seguido de Hai-3 e Hai-2.

Na Tabela 4 pode-se observar para os resultados da AMOVA um $F_{st} = 0.038$ na Zona Híbrida 1, e um $F_{st} = 0.076$ para a Barreira, ambos não diferiram significativamente de zero ($p > 0.05$). Na Zona Híbrida 2 foi obtido um F_{st} de 0.150, que diferiu significativamente de zero ($p < 0.05$).

Tabela 4- Valor de F_{st} encontrado, resultado da variância molecular (AMOVA).

Zona	F_{st}	p	Porcentagem Variação Genética Total (%)	
			Intrapopulacional	Interpopulacional
ZH1	0.038	0.252	96.19	3.81
ZH2	0.150	0.048	85.01	14.99
BAR	0.076	0.088	92.45	7.55

Podemos observar em todas as populações estudadas de cada zona ou barreira considerada, uma porcentagem de variação intrapopulacional maior do que a porcentagem de variação interpopulacional. Entretanto na Barreira esta diferença diminui, aumentando a porcentagem de variação interpopulacional.

V. DISCUSSÃO

Os resultados observados quando todas as populações são analisadas juntas, em relação aos três locos de microssatélite, indicam um *déficit* de heterozigidade para dois dos locos estudados (Hai-3 e Hai-5). O que provavelmente foi causado pelo Efeito Wahlund, pois não há perturbações no equilíbrio de Hardy-Weinberg quando consideramos as populações par a par em relação a seus cariótipos. Por outro lado, quando analisadas par a par as populações de indivíduos com diferentes cariótipos, obtiveram-se índices de F_{st} significativamente altos, indicando uma diferenciação entre as populações. Da mesma forma, Goossens *e cols.* (2001), estudando marmotas, obteve resultados semelhantes e atribuiu o fato ao Efeito Wahlund.

A heterozigidade observada foi similar à encontrada em diferentes mamíferos, como gato-do-mato-pequeno (Trigo, 2000) e marmotas (Goossens *e cols.*, 2001), podendo ser considerada alta.

As análises com DNA microssatélite realizadas no presente trabalho confirmam a presença de uma zona localizada entre os Blocos A e B (ZH1), o F_{st} encontrado entre as populações desta zona foi de 0.038, e não diferiu significativamente de zero, sendo considerado baixo, segundo descreve Nei (1978), que considera um $F_{st} < 0.05$, baixo; $0.05 < F_{st} < 0.15$, médio e $F_{st} > 0.15$, alto.

O número de migrantes por geração estimado a partir dos índices de F_{st} calculados entre as populações desta zona quando analisadas as populações par a par ($-0.224 < F_{st} < 0.158$) foi um valor mínimo de 1.326 e máximo de infinito. Estes valores são maiores do que o mínimo necessário para evitar divergência nas frequências alélicas por deriva genética ($Nm > 1$) (Mills & Allendorf, 1996). Isto indica que existe um alto fluxo gênico entre estas populações, possibilitando a existência da Zona de Hibridação 1. Podemos observar que a maior porcentagem de variabilidade é atribuída a

diferenciação intrapopulacional quando comparada com a porcentagem de variação interpopulacional, ou seja, as populações diferem pouco entre si.

Moulin *e cols.* (1996) estudando zonas de hibridação de *Sorex araneus* através de DNA microssatélite, encontrou para todos os locos estudados exceto um, o valor baixo de F_{st} não diferenciado significativamente de zero ($p > 0.05$), o que indica a existência de uma zona híbrida e fluxo gênico entre as populações.

Os resultados obtidos também concordam com os encontrados por Moreira *e cols.* (1991), onde estudos com proteínas mostraram uma baixa diferenciação entre estas populações. Demonstrando, assim como Arranz *e cols.* (1996) que realizou um estudo em populações de gado, comparando análises de DNA microssatélite e proteínas, resultados semelhantes para ambas as análises.

Os dados de Freitas (*in prep.*) indicam a existência de outra Zona de Hibridação, localizada entre os Blocos C e D (ZH2), o F_{st} encontrado para análises de locos de microssatélite entre as populações desta zona foi 0.150, este valor diferiu significativamente de zero ($p < 0.05$), sendo um valor considerado alto, indicando diferenciação entre as populações. Ao analisarmos as populações desta zona par a par obtivemos valores de F_{st} ($-0.020 < F_{st} < 0.202$), a partir dos quais foi estimado o número de migrantes por geração, obtendo o valor mínimo de 0.982 e o máximo de infinito. Os valores baixos de F_{st} foram obtidos quando comparadas populações dentro do mesmo bloco. Por outro lado, ao comparar as populações interblocos, obtiveram-se valores de F_{st} significativamente altos. Estes resultados indicam que existe diferenciação entre as populações de Blocos distintos. Podemos observar também o aumento da porcentagem de variação interpopulacional quando comparada à porcentagem de variação intrapopulacional, reforçando que as populações diferem entre si.

Freitas (*in prep.*) sugere a existência desta zona utilizando cromossomos. Uma das possíveis razões para o alto valor de F_{st} e baixo fluxo gênico, quando estudada com marcadores moleculares, é o baixo *fitness* do

híbrido, ou seja, há o cruzamento entre os indivíduos de populações diferentes, mas este híbrido não retrocruza, bloqueando o fluxo gênico.

Ao analisarmos a Barreira Geográfica descrita por Freitas (1990) cromossomicamente e por Moreira *e cols.* (1991) utilizando proteínas, localizada entre os Blocos B e C, obtivemos um F_{st} de 0.076, não diferindo significativamente de zero ($p>0.05$). O número de migrantes por geração estimado a partir deste valor foi de 3.06. Este valor é considerado alto pois excede o mínimo necessário para evitar a divergência das populações. Estes resultados indicam alto número de migrantes por geração e baixo F_{st} , entre as populações, e negam a efetividade da Barreira ao fluxo gênico. Outro ponto a ser observado é a maior porcentagem de variação intrapopulacional quando comparada com porcentagem de variação interpopulacional, reforçando que as populações não diferem, ou diferem pouco entre si.

Estes resultados poderiam ser considerados consequência do baixo número de populações (e/ou indivíduos) estudadas nesta área, mas quando analisamos as populações dos Bloco A e B somadas, e comparamos com as populações dos Blocos C e D também reunidas, encontramos um F_{st} ainda mais baixo ($F_{st}=0.017$), que não difere significativamente de zero, indicando um alto fluxo gênico entre as populações, e uma não diferenciação das mesmas.

Também Moulin *e cols.* (1996) em estudos utilizando locos de microssatélite com *Sorex araneus* esperava encontrar baixo fluxo gênico entre populações separadas por um rio, mas os resultados indicaram a presença de fluxo entre as populações, indicando a não efetividade do rio como barreira ao fluxo gênico.

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam a importância da utilização de diferentes ferramentas ao se realizar estudos populacionais. As análises cromossômicas, de proteínas e marcadores moleculares, como

microssatélites, se complementam possibilitando uma visão mais completa da espécie estudada.

Finalmente, mais análises são necessárias para aprofundar as diversas questões surgidas pelas diferenças de resultados encontrados no presente trabalho quando comparados com os de Freitas (1990) e Moreira *e cols.* (1991), possibilitando uma melhor compreensão dos processos evolutivos e da dinâmica das populações desta espécie e, conseqüentemente, gerando dados que auxiliem na conservação da mesma.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRANZ, J.J.; BAYÓN, Y. & SAN PRIMITIVO, F. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. **Animal Genetics**, v. 27, p. 415-419, 1996.
- ARIENTI, M.L. Evolução paleográfica da Bacia do Rio Gravataí. **UFRGS-CPG em Geociências**, 1986. (Tese de mestrado).
- BARTON, N.H. & HEWITT, G.M. Adaptation, speciation and hybrid zones. **Nature**, v. 341, p. 497-503, 1989.
- BRUFORD, M.W. & WAYNE, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Curr. Opinion Genet. Develop.** v. 3, p. 939-943, 1993.
- CIOFI C. & BRUFORD, M.W. Genetics structure and gene flow among Komodo Dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. **Molecular Ecology**, v. 8, Suppl.: S17-S30, 1999.
- ERNEST, H.B., PENEDO, C.T., MAY, B.P., SYVANEN, M. & BOYCE. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 433-441, 2000.
- FREITAS T.R.O.; LESSA, E.P. Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia-Octodontidae). **Journal of mammalogy**, v.65, p. 637-642, 1984.
- FREITAS, T.R.O. Estudo de citogenéticos e craniométricos em três espécies do gênero *Ctenomys*. **Curso de pós-graduação em genética UFRGS: Porto Alegre**, 1990 (Tese de doutorado).
- FREITAS, T.R.O. Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.30, p. 53-59, 1995.
- FREITAS, T.R.O. Tuco-tucos (Rodentia, octodontidae) in Southern Brazil: *Ctenomys lami* spec. nov separated from *C. minutus*. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, 36: (1), p. 1-8, 2001.

- GAVA, A. Uma zona de hibridação em *Ctenomys minutus* (Rodentia-octodontidae): Abordagem citogenética. **Curso de pós-graduação em genética e Biologia Molecular, UFRGS: Porto Alegre, 1996, 102p.** (Dissertação de mestrado).
- GOOSSENS, B.; CHIKHI, L.; TABERLET, P.; WAITS, L.P. & ALLAINÉ, D. Microsatellite analysis of genetic variation among and within Alpine marmot populations in the French Alps. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 41-52, 2001.
- HEWITT, G.M., Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. **TREE**, v. 3, p. 158-167, 1988.
- JOHNSON, W.E; PECON-SLATTERY, J.; EIZIRIK, E.; KIM, J.H.; MENOTTI-RAYMOND, M.; BONACIC, C.; CAMBRE, R.; CRAWSHAW, P.; NUNES, A.; SEUÁNEZ, H.N.; MOREIRA, M.A.M.; SEYMOUR, K.L.; SIMON, F.; SWANSON, W. & O'BRIEN, S.J. Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. **Molecular Ecology**, v.8, Suppl.: S79-S92, 1999.
- KASHI, Y.; KING, D. & SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **TIG**, 13 (2), p. 74-77, 1997.
- KIBLISKY, P.; BRUM-ZORRILLA, N.; PEREZ, G.; SAEZ, F.A. Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). **Mendeliana**, v.2, p.85-93, 1977.
- LACEY, E.A.; MALDONADO, J.E.; CLABAUGH, J.P. & MATOCQ, M.D. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). **Ecology**, v. 8, p.1754-1756, 1999.
- LESSA, E.P.; COOK, J.A. The molecular phylogenetics of Tuco-tucos (*Genus Ctenomys*, Rodentia-Octodontidae) suggests an early burst of speciation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 9, p. 88-99, 1998.
- MARINHO, J.R.; FREITAS, T.R.O. Intraspecific craniometric variation in a chromosome hybrid zone of *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi) **International Journal of mammalian Biology**, 65, p. 226-231, 2000.

- MASSIRINI, A.I.; BARROS, M.A.; ORTELLIS, M.O.; REIG, O.A., Evolutionary biology of fossorial *Ctenomyne* rodents (Caviomorph: Octodontidae). I. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in Central Argentinian populations of tuco-tucos. **Genetica**, v. 83, p. 131-144, 1991a.
- MASSIRINI, A.I.; BARROS, M.A.; ORTELLIS, M.O.; REIG, O.A., Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina. **Genetics**, v. 83, p. 131-144, 1991b.
- MEDRANO, J.F.; AASEN, E. & SHARROW, L., DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, 8, 1990.
- MENOTTI-RAYMOND, M.M.; DAVID, V.A.; LYONS, L.A.; SCHAFFER, A.A.; TOMLIN, J.F.; HUTTON, M.K. & O'BRIEN, S.J. A genetic linkage map of microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). **Genomics**, 57, p. 9-23, 1995.
- MILLS, L.S. & ALLENDORF, F.W. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. **Conservation Biology**, v. 10, p. 1509-1518, 1996.
- MOREIRA, D.M.; FRANCO, M.H.; FREITAS, T.R.O.; WEIMER, T.A. Biochemical polymorphism and phenetic relationships in rodents of the genus *Ctenomys* from southern Brazil. **Biochemical genetics**, v. 9, p. 601-615, 1991.
- MORIN, P.A.; MOORE, J.J.; CHAKRABORTY, R.; JIN, L.; GOODALL, J. & WOODRUFF, D.S. Kin selection, social structure, gene flow and the evolution of chimpanzees. **Science**, v. 265, p.1193-1201, 1994.
- MOULIN, N.L.; WYTENBACH, A.; BRUNNER, H.; GOUDET, J. & HAUSSER, J. Study of gene flow through a hybrid zone in the common shrew (*Sorex araneus*) using microsatellites. **Hereditas**, 125, p. 159-168, 1996.
- MURRAY, B.W. 1996, The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. <http://helix.biology.mcmaster.ca//brent>.

- NOVAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. Ed. Johns Hopkins University Press. Londres, 5^a ed., p. 939-941, 1991.
- NEI, M., Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. **Genetics**, 89, p. 583-590, 1978.
- NESJE, M.; ROED, K.H.; LIFJELD, J.T.; LINDBERG, P. & STEENS, O.F. Genetic relationships in the falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 9; p. 53-60, 2000.
- PALUMBI, S.R., Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. p.205-247. Ed. HILLIS, D.M.; MORITZ, C. & MABLE, B.K. **Molecular Systematics**. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA, 1996.
- REIG, O.A.; KIBLISKY, P. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia:Octodontidae). **Chromosoma (Berl.)**, v.28, p.211-244, 1969.
- REIG, O.A. Karyotypic repatterning as one triggering factor in cases of explosive speciation. In: **Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations**. Ed. A. Fontdevila, p. 246-289, 1989.
- SCHLÖTHERER, C. Microsatellites. p. 237-261. Ed. HOELZEL, A.R. **Molecular genetic analysis of populations: a practical Approach**. 2nd ed. Oxford University Press Inc., New York, 1998.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. **Genetic and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland.
<http://anthro.unige.ch/arlequin>
- SLATKIN, M.; A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, 139, p. 457-462, 1995.
- SIMONSEN, T.; SIEGISMUND, H.R. & ARCTANDER, P. Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 225-237, 1998.

- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: **DNA Fingerprinting: State of the science**. Ed. PENA, S.D.J.; CHAKRABORTY, R.; EPPLIN, J.T.; JEFREYS, A.J., p. 21-28, 1993.
- TEGELSTROM, H. Detection of mitochondrial DNA fragments. p.89-113 Ed. HOELZEL, A.R., **Molecular Genetics Analysis of Populations**. IRL Press, Oxford, 1992.
- TRIGO, T. Análise da variabilidade e estrutura genética de Leopardo tigrinus (Carnívora-felidae) utilizando microssatélites. **Curso de Ciências Biológicas, graduação, UFRGS: Porto Alegre**, 2000, 27p. (Dissertação de bacharelado).
- VILLWOCK, J.A. Geological aspects of the Coastal Province of RS. A synthesis. **Pesquisas**, Instituto de Geociências, UFRGS, v. 16, p. 5-49, 1983.
- WAITS, L.; TABERLET, P.; SWENSON, J.E.; SANDEGREN, F. & FRANZEN, R. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctus*). **Molecular Ecology**, v. 9, p. 421-431, 2000.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 6, p. 1358-1370, 1984.
- WOODS, C. A., Suborder Hystricognathi. In: **Mammals species of the world**. Ed. WILSON, D.E. and REEDER, D.M. Smithsonian Institute Press. 1207p, 1993.