

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

**História evolutiva e modelagem de nicho ecológico de
Ctenomys flamarioni e *Ctenomys australis*
(Rodentia: Ctenomyidae)**

Marcelo Merten Cruz

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena De Freitas

Porto Alegre, Abril de 2017.

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

**História evolutiva e modelagem de nicho ecológico de
Ctenomys flamarioni e *Ctenomys australis*
(Rodentia: Ctenomyidae)**

Marcelo Merten Cruz

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena De Freitas

Porto Alegre, Abril de 2017.

Agradecimentos

Ainda no início do meu mestrado eu brincava que em dois anos formaria-me Mestre Jedi. Eu estava apenas ingenuamente usando um jogo de palavras a meu favor, entretanto reconheço hoje que era uma brincadeira muito pretensiosa.

Passados os dois anos e mais perto do título de Mestre encaro o meu mestrado de outra forma: como uma verdadeira aula de vida, de resiliência, resistência e de humildade.

Tudo que eu aprendi eu gostaria de agradecer, primeiramente, ao meu orientador (esse sim é Jedi) que mesmo em um dos momentos mais críticos da ciência no Brasil se mostrou forte e criativo para contornarmos as crises. Além do seu bom humor e ensinamentos

Agradeço também a todos meus colegas de Laboratório pela união, ensinamentos e risadas. Principalmente à Mayara e ao Daniel que participaram ativamente desta dissertação e ao William e à Luiza por tudo que apanhamos dos programas, mas sem perder a alegria.

À Lúcia e ao Luciano pela ajuda.

Agradeço, e muito, ao Elmo. Uma das pessoas mais competentes que já conheci, que além de exercer magnificamente sua função também atua como um amigo e tranquilizador para qualquer problema burocrático que eu levava e ainda levo quase que semanalmente a ele.

Meu obrigado também aos professores e colegas do PPGBM.

À Paloma, que na verdade foi minha co-orientadora nessa dissertação, por tantos conselhos, por opinar em todos os meus textos e e-mails, me incentivar a participar de eventos longínquos e me ajudar na apresentação

Por fim, mas não menos importante: família e amigos. Esses que sempre estiveram ao meu lado e sempre estarão sobrepondo minhas fraquezas e estarão torcendo para que eu consiga um dia chegar a Jedi.

Sei que não será agora, mas a primeira lição eu já aprendi: ainda levará muito tempo e o caminho é quase uma Galáxia muito muito distante. Orgulhosamente eu sigo Padawan, digo, aprendiz.

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
1.1 Biologia da Conservação e Especiação.....	7
1.2 Ordem Rodentia.....	8
1.3 Roedores Subterrâneos.....	8
1.4 Gênero <i>Ctenomys</i>	10
1.5 <i>Ctenomys flamarioni</i> , Travi, 1981.....	12
1.6 <i>Ctenomys australis</i> , Rusconi, 1934.....	13
1.7 História evolutiva e habitat.....	14
1.8 Filogeografia.....	16
1.9 Modelagem de nicho.....	18
Objetivos	19
Capítulo I - Evolutionary history and niche modelling of <i>Ctenomys flamarioni</i> and <i>Ctenomys australis</i> (Rodentia: Ctenomyidae).....	20
Discussão Geral.....	48
Referencias Bibliográficas.....	53

Resumo

Ctenomys flamarioni e *Ctenomys australis* são dois roedores subterrâneos da América do Sul listados como em perigo na IUCN *Red List of Threatened Species*. Eles pertencem ao grupo mendocinus do gênero *Ctenomys* e conseqüentemente algumas características são comuns, por exemplo, cariótipo com $2n=48$, a grande quantidade de heterocromatina e a forma assimétrica dos espermatozoides. Além disso, *Ctenomys flamarioni* e *Ctenomys australis* ocorrem em restritos e similares habitats: a primeira linha de dunas. O primeiro, no Rio Grande do Sul, extremo sul do Brasil, e o segundo em Buenos Aires, uma província no nordeste da Argentina. Durante o Último Máximo Glacial, estas duas costas eram geograficamente unidas e conseqüentemente o Rio da Prata não havia sido formado ainda, portanto não atuava como uma barreira reprodutiva. Um estudo sobre especiação alopátrica foi conduzido na presente dissertação, usando modelagem de nicho ecológico para identificar áreas de alta adequabilidade para essas espécies durante o Último Máximo Glacial, Holoceno e o Presente. Além de análises moleculares de sequências da Região Controladora do DNA mitocondrial (mtDNA) Região que foram usadas para identificar padrões filogeográficos e uma estimativa do tempo de divergência das espécies. Nossas análises suportam a hipótese que o surgimento do Rio da Prata durante o período de deglaciação entre o último Máximo Glacial e o Holoceno bloqueou o fluxo gênico e permitiu o processo de especiação entre *Ctenomys australis* e *Ctenomys flamarioni*.

Abstract

Ctenomys flamarioni and *Ctenomys australis* are two South American rodents listed as endangered on IUCN Red List of Threatened Species. They belong to the mendocinus group of the genus *Ctenomys* and consequently some characteristics are common, such as the karyotype with $2n=48$, the large amount of heterochromatin and the simple asymmetrical form of the spermatozoa. Furthermore, *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis* occurs at restrict and similar habitats: the first line of sand dunes. The first one is in Rio Grande do Sul, the extreme south of Brazil, and the second one is in Buenos Ayres, the northeastern province of Argentina. During the Last Glacial Maximum, these two coastlines were geographically linked, hence de La Plata River had not been formed yet as a reproductive barrier. A study of allopatric speciation was conducted at the present dissertation, using ecological niche models to identify areas of high suitability of these species during the Last Glacial Maximum, Holocene and Present. Also, Molecular analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) control region (D-loop) sequences was used to clarify phylogeographic patterns and divergence time estimation of these species. Our analysis supports the hypothesis that the rising of De La Plata River during the deglaciation period between the Last Glacial Maximum and the Holocene blocked the gene flow and allowed the speciation process among *Ctenomys australis* and *Ctenomys flamarioni*.

1. Introdução

1.1 Biologia da Conservação e Especiação

Comunidades biológicas que levaram milhões de anos para se desenvolver vêm sendo devastadas em toda Terra. A lista de transformações de sistemas naturais que estão diretamente ou indiretamente relacionadas a atividades humanas é longa. Inúmeras espécies diminuíram rapidamente, algumas até o ponto de extinção, em consequência da caça predatória, destruição de habitat e a ação de novos predadores e competidores. Ciclos naturais, hidrológicos e químicos vêm sendo perturbados pela devastação de terras (Primack; Rodrigues, 2001).

Diretamente relacionado com as problemáticas da conservação estão os estudos de processos de especiação. Processos de especiação envolvem a separação de populações em unidades evolutivas diferentes. Podem ser desencadeados por alterações geográficas, ecológicas, morfológicas ou comportamentais, sendo os mecanismos evolutivos mais atuantes a seleção natural e a deriva genética (Stearns e Hoekstra 2000). Há quatro formas principais de especiação: alopátrica, simpátrica, parapátrica e peripátrica (Ridley 2006). Os modelos de especiação a serem explorados neste trabalho são alopátrica e simpátrica.

Especiação alopátrica é quando uma barreira física ou a distância reduzem o fluxo gênico entre as populações. Esta barreira pode aparecer por mudanças geológicas e geomorfológicas (rios, cadeias de montanhas, deriva continental, formação de desertos) ou por eventos de dispersão (deslocamento de populações para locais distantes, dispersão provocada pelo vento ou correntes marítimas) (Futuyama 2009). Através da deriva genética e da seleção natural, pode haver divergência genética e a eventual evolução de barreiras reprodutivas intrínsecas que impeçam o fluxo gênico (Stearns e Hoekstra 2000).

A especiação simpátrica é uma barreira biológica para a troca de genes surdisse dentro dos limites de uma população panmítica (acasalando aleatoriamente) sem nenhuma segregação espacial de espécies incipientes. Isto é, se a especiação ocorreu apesar do alto fluxo gênico inicial. A especiação simpátrica é um dos assuntos mais controversos da biologia evolutiva, a dificuldade que qualquer modelo de especiação simpátrica tem que

derrotar é como reduzir a frequência do genótipo que iria atuar como um condutor para troca gênica (Futuyama 2009)

1.2. Ordem Rodentia

Popularmente representada por ratos e camundongos, capivaras e esquilos, os roedores são considerados o grupo mais abundante e diverso dentre a classe dos mamíferos. Estes animais compreendem 2.277 espécies descritas, distribuídas em 481 gêneros de 34 famílias (Honeycutt, 2009). Os roedores, por sua grande diversidade, apresentam um vasto conjunto de adaptações que permitem explorarem uma ampla variedade de formas de vida e ocuparem uma grande variedade de habitats: podendo ser terrestres, especializados na vida arborícola, saltadores, semi-aquáticos, subterrâneos e até mesmo os que são capazes de planar em vôos curtos. Eles são distribuídos por praticamente todos os continentes do planeta, excluindo a Antártida, e são os únicos mamíferos placentários que colonizaram a Austrália e a Nova Guiné, sendo posteriormente introduzidos, indiretamente por ação humana, em outras ilhas oceânicas (Nowak, 1999).

1.3. Roedores Subterrâneos

São denominados fossoriais, os roedores que dentre os terrestres, têm a necessidade de em algum momento de sua vida utilizar túneis ou escavações abaixo da superfície do solo para realizar alguma atividade vital e exibem adaptações morfológicas voltadas à atividade de escavação. Os grupos que, além de possuírem tais adaptações, conduzem a maioria de suas atividades de vida em galerias abaixo da superfície terrestre são denominados subterrâneos (Lacey *et al.*, 2000).

Entre os mamíferos, a ordem Rodentia é a que possui o maior número de representantes escavadores, ocorrendo em quase todos os continentes, com exceção da Oceania e da Antártica (Hildebrand, 1985; Lacey *et al.*, 2000).

As famílias que apresentam espécies com esse hábito de vida são: Bathyergidae (África), Geomyidae (América do Norte), Muridae (Ásia, Europa e África), Octodontidae e Ctenomyidae (América do Sul) (Nowak 1999; Lacey *et al.*, 2000). A maioria habita campos, estepes, savanas ou desertos. Algumas espécies podem ocorrer em florestas ou mata arbustiva densa, e não têm o costume de habitar solos saturados de água ou permanentemente congelados (Lacey *et al.*, 2000).

Apesar da diversidade de áreas geográficas e de habitats nos quais ocorrem esses roedores, de maneira geral, o nicho subterrâneo é relativamente pouco variável, devido à baixa luminosidade, alta umidade relativa do ar, baixa amplitude térmica e altos níveis de concentração de dióxido de carbono que caracterizam o sistema de túneis (Reig *et al.*, 1990; Lacey *et al.*, 2000).

As condições do solo podem limitar a distribuição geográfica desses animais quanto a escavação de túneis, o que pode resultar em uma distribuição fragmentada das populações. Essa distribuição pode representar restrições à dispersão e ao fluxo gênico, criando assim novas oportunidades para diversificação evolutiva (Lacey *et al.*, 2000).

Os mamíferos subterrâneos herbívoros de diferentes famílias e gêneros de todo o mundo são em estrutura e tamanho semelhantes, e apesar de possuírem métodos diferentes de escavação, suas construções de sistemas de túneis são similares. As semelhanças entre características físicas e comportamentais indicam uma evolução convergente na adaptação a este modo de vida. Estes animais possuem, de maneira geral, uma variação de peso corporal de 50 a 100 gramas, independente da sua dieta ou origem evolutiva. Isto indica que para animais que extrapolam este tamanho (tanto para menos quanto para mais) a construção de túneis torna-se uma atividade muito dispendiosa do ponto de vista energético (Lacey *et al.*, 2000).

Na América do Sul os roedores subterrâneos estão representados por duas famílias: Octodontidae, que são denominados popularmente de coruros, e representados por uma única espécie (*Octodondegus*), que ocorre na parte central do Chile; e, Ctenomyidae (Gênero *Ctenomys*), sendo os representantes desta família conhecidos popularmente como Tuco-Tucos (Lacey *et al.*, 2000).

1.4. Gênero *Ctenomys*

A família Ctenomyidae constitui o grupo com maior número de espécies de roedores subterrâneos atuais, com aproximadamente 70 espécies descritas (Bidau 2015, Freitas 2016). Considerando a sua origem biológica extremamente recente, de aproximadamente 3 milhões de anos, na época do Piloceno. O gênero apresenta além de uma das maiores taxas de especiação e evolução cromossômica dentre a classe dos mamíferos, uma ampla distribuição na região Neotropical (sub-região Patagônica) sendo registrada desde o sul da Bolívia e Peru (norte do continente) até a Terra de Fogo, em território argentino (extremo sul do continente), e desde o nível do mar até mais de 4.000 metros de altitude nos Andes peruanos (Pearson 1959).

Normalmente são encontrados em ambientes abertos, tais como desertos, campos naturais, dunas costeiras e montanhas, muito embora, algumas espécies sejam registradas em ambientes florestais. A versatilidade de habitats em que ocorrem estes roedores é, de fato, consequência da estabilidade conferida pelo tipo de vida subterrâneo. Contudo, estudos mais detalhados de sua distribuição, mostram que os Tuco-Tucos apresentam uma tendência a viver em solos arenosos ou, no mínimo, bem arejados (Contreras, 1973). Esta limitação além de estar diretamente relacionada com restrições impostas às atividades escavatórias que realizam, também se deve a aspectos metabólicos do animal, como a manutenção do calor e a troca de gases com o meio externo (Contreras e McNab, 1990).

O sistema de túneis, característico deste gênero, apresenta na natureza construções realizadas por um ou por vários indivíduos, que podem apresentar hábito solitário, semi-sociável ou sociável (Lacey *et al.*, 1998; Lacey, 2000). A estrutura destes sistemas 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 depósito de comida ou defecação (Busch *et al.*, 2000). Os túneis são mantidos fechados, o que proporciona não só proteção contra os predadores, mas também condições mais estáveis do que as do meio externo: menores flutuações de temperatura, alto grau de umidade relativa e concentrações de O₂ de 15 a 21% e de CO₂ de 0,5 a 2% (McNab, 1966).

Devido ao seu hábito subterrâneo os Tuco-Tucos apresentam adaptações morfológicas, como redução da cauda e pavilhões auditivos, corpo robusto e cilíndrico, um maior desenvolvimento da musculatura (principalmente dos membros anteriores) e das unhas, e uma abertura bucal atrás dos incisivos que ficam expostos para fora da boca (Nevo 1979; Reig *et al.* 1990; Nowak 1999). São herbívoros e apresentam uma alimentação preferencial por gramíneas, sendo generalistas na maioria dos casos e influenciam diretamente na comunidade de plantas da região e na modificação das condições do solo, por meio do revolvimento e aeração do mesmo (Zenuto e Busch 1995; Rosi *et al.* 2000; Del Valle *et al.* 2001; Lopes 2013; Freitas *et al.*, 2012). Os indivíduos do gênero se caracterizam por distribuir-se em manchas, pela sua alta territorialidade e apresentarem uma baixa dispersão (Busch *et al.* 2000).

O gênero apresenta uma grande diversidade cariotípica, com números cromossômicos que variam entre $2n = 10$ e $2n = 70$ (Anderson *et al.*, 1987; Reig *et al.*, 1990). Devido ao grande número de espécies no gênero, e à diversidade cariotípica, em um gênero tão recente, tem sido sugerido que esta pode ser a especiação mais explosiva dentro dos gêneros de mamíferos atuais e que rearranjos cromossômicos podem ter desempenhado um papel fundamental na sua diversificação. As altas taxas de evolução cromossômica têm sido sugeridas para explicar a alta diversidade de *Ctenomys*, tornando o grupo um excelente modelo evolutivo para o estudo de eventos de especiação rápida (Reig *et al.*, 1990; Lacey *et al.*, 2000; Parada *et al.*, 2011).

No Brasil, são descritos oito espécies de Tuco-Tucos. Três deles distribuem-se no estado de Mato Grosso: *C. rondoni*, Miranda Ribeiro, 1914; *C. bicolor*, Miranda Ribeiro, 1914; e *C. nattereri*, Wagner, 1848. As outras cinco espécies apresentam distribuição para o estado do Rio Grande do Sul, sendo três endêmicas do estado: *C. flamarioni*, Travi, 1981; *C. lami*, Freitas, 2001; e *C. ibicuiensi*, Freitas, Fernandes, Fornel e Roratto 2012. as outras duas espécies apresentam parte de sua distribuição no Estado de Santa Catarina e no Uruguai, respectivamente (Freitas e Lessa 1984; Freitas 1995, 1997) : *C. minutus*, Nehring, 1887 e *C. torquatus*, Lichtenstein, 1830.

Dentro do gênero *Ctenomys* encontra-se o sub-grupo de espécies denominado mendocinus, em que estão presentes: *Ctenomys australis*, Rusconi, 1934; *Ctenomys azarae*, Thomas, 1903; *Ctenomys mendocinus*,

Philippi, 1869; *Ctenomys porteousi*, Thomas, 1916 e *Ctenomys rionegrensis*, Langguth e Abella, 1970 e *C.flamarioni*, Travi, 1981. Estas espécies estão agrupadas por uma associação entre características cariotípicas, mesmo número diploide ($2n=48$), espermatozoides assimétricos e morfologia do crânio similar e por formarem um grupo monofilético por DNAmt (Massarini *et al.* 1991, Parada *et al.* 2011) .

1.5. *Ctenomys flamarioni*, Travi, 1981

Ctenomys flamarioni popularmente chamado de tuco-tuco-das-dunas , é uma espécie endêmica do Estado do Rio Grande do Sul (RS) que habita a primeira linha de dunas dos mais recentes depósitos eólicos e marinhos da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Freitas, 1995). Sua distribuição atual estende-se desde o extremo norte em Arroio Teixeira até o extremo sul do RS em Arroio Chuí na divisa com Uruguai, . O ambiente em que vive apresenta um alto grau de salinidade e baixa riqueza e biomassa de espécies vegetais (Bretschneider 1987).

Estudos recentes utilizando tanto marcadores moleculares mitocondriais (região controladora e citocromo-b) quanto nucleares (microssatélites) mostraram de um modo geral, baixa variabilidade genética para a *C. flamarioni* (Fernández-Stolz *et al.*, 2007). Em um estudo comparativo duas populações do norte da distribuição, que ocorrem nos locais com maior impacto antrópico, e para uma do centro da distribuição, foram detectadas reduções populacionais recentes (gargalos-de-garrafa). Por outro lado, para as populações do sul, que ocupam uma região geográfica com menor impacto da ação humana, a perda significativa da variabilidade genética foi atribuída a fatores de instabilidade ambiental (Fernández-Stolz *et al.*, 2007).

Os tuco-tucos-das-dunas possuem uma coloração clara e são morfologicamente mais robustos que as demais espécies de Tuco-Tucos do sul do Brasil isto está relacionado diretamente com a área de ocorrência da espécie, tendo em vista que habita área de dunas costeiras, onde o solo é frouxo e arejado (Contreras e MacNab 1990; Rocha-Barbosa *et al.*, 2013). Os indivíduos de *C. flamarioni* apresentam hábitos solitários, sendo que o compartilhamento de túneis entre indivíduos fica limitado a fêmeas e seus filhotes (Bretschneider 1987; Fernández 2002). A espécie apresenta um único período de acasalamento (Fernández 2002) com aproximadamente seis meses

de duração, entre maio e setembro, com os nascimentos entre setembro e fevereiro (Bretschneider 1987). A espécie está classificada como em perigo, segundo a IUCN Red List of Threatened Species 2016. Fernández-Stolz *et al.* (2007) sugerem que o desenvolvimento urbano em ambientes costeiros é o principal fator na profunda redução no tamanho populacional e na perda na variabilidade genética da espécie.

1.6. *Ctenomys australis*, Rusconi, 1934

Ctenomys australis é uma espécie *Ctenomys* endêmica da província de Buenos Aires (Argentina), ocorre na primeira linha de dunas da região sudoeste da costa Atlântica da província, sua distribuição atual restringe-se aos 100 Km que ligam Necochea e Bahía Blanca (Mora *et al.* 2006). Região caracterizada por possuir areias com gramíneas, por ser vulnerável a erosão hídrica e eólica e ser uma região restrita e fragmentada (Zenutto e Busch 1995).

A espécie possui hábitos solitários, é altamente territorial e especula-se que tenha comportamento poligâmico (Zenutto e Busch 1998). *Ctenomys australis* é uma das maiores espécies dentro do seu gênero, podendo pesar de 250 g até 500 g, o que restringe a disponibilidade de habitat adequado para a espécie, devido o extremo gasto energético que exigem suas atividades, principalmente o hábito de cavar (Mora *et al.* 2010).

A capacidade desta espécie para remover o solo diminui drasticamente em substratos mais resistentes (Zenutto e Busch 1995). E, por ter seu habitat heterogêneo, recorrentemente interrompido por pastagens, que possuem solos mais difíceis para a atividade escavatória do animal, a espécie encontra numerosas potenciais barreiras ao fluxo gênico que resulta em vários núcleos isolados de indivíduos ao longo da costa (Mora *et al.* 2010).

O habitat de dunas de *C. australis* está sendo perdido para o desenvolvimento urbano, a silvicultura e o avanço progressivo das pastagens. As principais ameaças a esta espécie são o desenvolvimento de *resorts* de turismo de praia e o estabelecimento de plantações de pinheiro, os quais levam à perda significativa de habitat (IUCN 2016). Assim, a sobrevivência desta espécie está também relacionada com a preservação do ecossistema areia-duna inteiro (Mora *et al.* 2006). *Ctenomys australis* está, atualmente, classificado como em perigo, segundo a IUCN Red List of Threatened Species 2016.

1.7. História evolutiva e habitat

A origem de *C. flamarioni* e *C. australis* foi sugerida por (Freitas, 1994) e (Massarini e Freitas, 2005), a partir de uma forma ancestral proveniente da Argentina, por migração, isolamento, e diferenciação posterior. Esta migração teria acontecido durante o Pleistoceno, quando a Planície Costeira era aproximadamente 100 Km mais ampla do que no presente e se encontrava sob condições de aridez nas quais o Rio da Prata possuía pouca vazão (Corrêa *et al.*, 1992), não representando uma barreira geográfica para a dispersão das espécies. Devido aos movimentos de transgressão marítima, e o aumento do nível do mar e do Rio da Prata (Corrêa *et al.*, 1992), essa forma foi isolada, iniciando o processo de especiação que deu origem a *C. flamarioni* e *C. australis* (Massarini e Freitas, 2005). Ambientes costeiros conhecidos como praias são contíguos aos mares, oceanos e estuários. São compostos basicamente de material mineral inconsolidado, principalmente areias, contudo é possível encontrar praia de lodo, cascalhos, pedras raladas, seixos, calhaus, conchas de moluscos, restos de corais e algas calcárias. A dinâmica costeira condiciona diretamente a construção geomorfológica da linha da costa (Silva 2007)

Ctenomys flamarioni encontra-se atualmente na Planície Costeira (PC), pertencente ao pacote sedimentar Cenozóico do Rio Grande do Sul representado pela Bacia de Pelotas, estende-se através de uma área de aproximadamente 33.000 Km² e alcança em alguns setores uma largura de mais de 100 Km. A atual linha da costa, praticamente retilínea, possui uma orientação NE-SW e se estende por uma distância de aproximadamente 620 km, desde Torres, no extremo norte (paralelo 29° S), até a desembocadura do Arroio Chuí, no extremo Sul (paralelo 34° S). Ao longo desta distância, a costa, de característica baixa arenosa, é interrompida de forma permanente em dois locais: as desembocaduras da Laguna de Tramandaí e da Laguna dos Patos. O clima da região é definido como temperado, úmido, e com uma distribuição de chuvas homogênea ao longo do ano (aproximadamente 1.300 mm anuais) (Tomazelli *et al.*, 2000). No que se refere ao regime hidrodinâmico, o transporte e deposição de sedimentos na Planície Costeira estão determinados principalmente pela ação de ondas de longo período proveniente do sudeste e

por vagas locais provenientes principalmente do leste-nordente (Tomazelli e Villwock, 1992).

O habitat ocupado por *Ctenomys australis* é praticamente todo linear e contínuo, mas possui algumas importantes barreiras como rios, florestas e a urbanização pode ser verificada dentro da distribuição. O habitat de dunas costeiras está gradualmente recuando devido a progressiva urbanização e florestamento da área costeira da região (Mora *et al.* 2006)

A costa argentina é caracterizada por ser uma plataforma larga e rasa, banhada por águas subantárticas, sendo diretamente influenciada pela corrente das Malvinas, entretanto são modificadas pelos ciclos de temperatura e prevalência de ventos locais. Foi fortemente afetada pelos eventos de transgressão marinhas, especialmente após o Último Máximo Glacial, há cerca de vinte e dois mil anos (Silva 2007). A região de dunas costeiras de Buenos Aires, dentro da Macrorregião costeira pampeana, é uma planície onde se destaca a ausência de crescimento natural de árvores e a presença de pastos abundantes. Nela predomina o clima tépido sem estação seca, possui ventos predominantes provenientes do sudoeste-oeste denominado “pampero” e as tormentas provém do sudeste. Isto somado a brisa marinha são os principais responsáveis pela formação de dunas. A amplitude térmica vai desde 7 °C no período mais frio (Julho) até 22°C no período mais quente (Janeiro). A precipitação total anual varia entre 1000 mm entre o extremo NE a 500 mm no extremo SO (Burgos 1968). Três rios atravessam os campos de dunas, ambos em sua zona austral: o Rio Quequén Grande, o Rio Quequén Salado e o Rio Sauce Grande (Monserrat e Codignotto 2013)

Ambas espécies são endêmicas de regiões costeiras, caracterizadas por serem dinâmicas e altamente instáveis, moldados pelos ciclos de transgressão e regressão do nível do mar e regime de ventos. Tais fenômenos além de ter papel crucial na morfogênese costeira, determinam a dinâmica de formação e erosão de dunas, e é o fator básico que modula a hidrodinâmica, tanto oceânica quanto dos corpos lagunares, da região (Fernández-Stolz *et al.*, 2007).

Outro fator considerado importante na problemática da conservação da biodiversidade dos ambientes costeiros é o aquecimento global e, como consequência, o aumento do nível do mar, com efeitos adversos sobre várias

espécies da fauna e da flora (Church, 2001). O aumento do nível do mar na região litorânea do Sul da América do Sul teria efeitos dramáticos sobre as populações de Tuco-Tucos, que ocupam a primeira linha de dunas litorâneas, constituindo mais um fator de instabilidade e de incerteza do destino evolutivo para *C. flamarioni* e *C. australis* (Fernandes *et al.*, 2007).

1.8. Filogeografia

A filogeografia, como definida por Avise (2000), é o campo de estudo dos princípios e processos responsáveis pela distribuição geográfica de linhagens genéticas intra-específicas ou entre espécies proximamente relacionadas. Visando analisar e interpretar a forma como as diferentes linhagens se distribuem no ambiente, estudos filogeográficos requerem a integração entre diversas disciplinas que vão desde os processos microevolutivos (mutação, deriva genética, seleção, rearranjos cromossômicos) que operam dentro das espécies, extrapolados de forma a explicar as diferenças macroevolutivas entre espécies e táxons mais elevados, através da utilização de dados de genética de populações, etologia, demografia, paleontologia, filogenia, morfologia, geomorfologia, entre outras (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000). Em particular, a filogeografia proporciona uma ligação empírica e conceitual entre as tradicionalmente não relacionadas disciplinas de biologia filogenética e genética de populações (Avise *et al.*, 1987).

Um método de definir espécies filogeograficamente é a morfometria geométrica que é baseada no uso de coordenadas cartesianas de marcos anatômicos e métodos de superposição para analisar a variação de forma entre espécies (Slice 2007). A diferenciação entre populações e a variação de forma e tamanho em relação às variações ambientais ao longo da distribuição geográfica de uma espécie podem ser explorados com a utilização desta técnica. Matrizes de dados ambientais podem ser relacionados com variação de tamanho e forma da espécie estudada (Gonçalves 2008).

Outra variável filogeográfica é o caminho percorrido por uma determinada variante genética no tempo e espaço. O que é influenciado pela biologia do organismo e por circunstâncias pelas quais este passará, incluindo seu sucesso reprodutivo, tamanho populacional, seleção natural, deriva e eventos históricos. Os modelos de genética de populações investigam as relações entre esses fatores demográficos e a distribuição das variantes

genéticas, através do uso de marcadores moleculares com características apropriadas para acessar informações sobre o processo evolutivo no qual aquele indivíduo está inserido (Sunnucks, 2000). Neste sentido, selecionar marcadores moleculares e análises genéticas adequados para cada tipo de problemática é essencial para o sucesso de um estudo (Anne, 2006).

Um sistema molecular ideal deve: ser distintivo e presente nos mais diferentes organismos; ser fácil de isolar e analisar; ter uma estrutura genética simples; exibir um modo de transmissão genética preferencialmente direto, sem recombinações ou outros rearranjos; apresentar um série de estados de caracteres qualitativos, através dos quais as interações possam ser inferidas; e evoluir rapidamente (Avice *et al.*, 1987). Os marcadores precisam, também, ter sua variabilidade descrita em uma população teste, antes da aplicação em várias populações maiores (Medeiros, 2014) Dentro deste contexto os marcadores de DNA mitocondrial (mtDNA) são principalmente utilizados nas análises dos padrões filogeográficos de espécies animais, e os marcadores de loci de microssatélites (STR) são amplamente aplicados em estudos populacionais.

O mtDNA possui uma estrutura simples e um tamanho compacto. O único grande fragmento não codificante (aproximadamente 1000 pb) é a região controladora, CR, que possui uma função regulatória na dinâmica da molécula e é predominantemente rica em bases AT (Brown, 1985). Comumente essa região é referida como D-loop (Displacement-loop) em vertebrados. Devido a sua rápida evolução, o mtDNA torna-se um bom marcador para o estudo de diferenciações genéticas recentes. mtDNA acumula substituições de base, inserções e deleções com uma taxa média de cinco a dez vezes mais rápido que o DNA nuclear de cópia simples (Brown *et al.* 1979)

O principal avanço da aplicação da filogeografia tem-se dado em três áreas, cada uma delas vinculada a diferentes aspectos testáveis de “concordância genealógica” (Avice 1996; 1998): (1) concordância na partilha genealógica ao longo de vários loci não ligados dentro dos limites da espécie; (2) concordância na posição geográfica das partições das árvores de genes ao longo de múltiplas espécies co-distribuídas, ajudando na determinação dos principais fatores biogeográficos históricos que modularam as filogenias intra-específicas; e (3) concordância entre partições nas árvores de genes e os

limites geográficos entre regiões biogeográficas conhecidas, ou separadas por barreiras históricas ao fluxo gênico. Isto levou a melhor compreensão de biogeografias regionais e áreas de endemismo, auxiliando na elaboração de propostas prioritárias para a conservação das biodiversidades taxonômicas e locais (da Silva & Patton, 1998; Firestone *et al.*, 1999).

1.9. Modelagem de nicho

O nicho ecológico é definido como o conjunto de condições e recursos necessários para indivíduos de uma espécie serem capazes de sobreviver, crescer e reproduzir. O estudo de nicho ecológico pode ser importante para prever os locais de ocorrência de uma espécie, a partir do conhecimento das condições e recursos necessários para tal (Peterson 2001)

Modelos de nicho ecológicos, baseados no uso de múltiplas estratégias em planos de conservação são uma importante ferramenta para determinar a distribuição de espécies ameaçadas de extinção para poder elaborar propostas de conservação (De Marco e Siqueira 2009). Funcionalmente modelos de nicho ecológico podem ser considerados para fornecer uma especificação das relações entre os pontos de ocorrência das espécies e uma série de dados ambientais multivariados (Phillips *et al.* 2006), tais modelos extrapolam pontos conhecidos de ocorrência da espécie para áreas desconhecidas (Lopes *et al.* 2007). Em casos de distribuição restrita ou de populações espaçadas de espécies raras ou ameaçadas de extinção, o uso de Modelos de nicho ecológico pode ser necessário para identificar áreas para proteção. Modelos de nicho ecológico podem ser usados em estudos de: distribuição geográfica de espécies, efeitos da variação climática na distribuição de espécies, seleção de habitat, desenhos de reservas para espécies raras e endêmicas e priorização de áreas de conservação (Guisan e Zimmermann 2000)

A conservação de pequenos mamíferos requer conhecimento genético e ecológico de como as espécies respondem a modificação do habitat. O entendimento de tal informação é importante porque pequenos mamíferos representam um grande conjunto de espécies que ocupam os mais variados ambientes (Galiano *et al.* 2014)

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Descrever história evolutiva e o processo de especiação de *C. flamarioni* e *C. australis*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Investigar, a partir de Modelagem de Nicho Ecológico, o conhecimento da distribuição geográfica atual e passado das espécies.

2.2.2. Determinar os limites de distribuição geográfica de *C. flamarioni* e *C. australis*, examinar a concordância entre padrões filogenéticos achados a partir dos dados moleculares e as barreiras geográficas existentes, analisando a efetividade das barreiras geográficas na diferenciação filogenética;

2.2.3. Contribuir com a caracterização genética das espécies;

Capítulo I

Evolutionary history and niche modelling of *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis* (Rodentia: Ctenomyidae)

Marcelo Merten Cruz, Mayara D. Medeiros, Daniel Galiano, Gabriela
Paula Fernandez-Stolz, Thales R. O de Freitas

Introduction:

The order Rodentia is considered the most successful, abundant and diverse mammal group: more than 2277 described species scattered in 481 genera and 34 families (Honeycutt, 2009). Subterranean rodents form a very large group which is morphologically and physiologically adapted towards burrow habits. These animals occur in a vast diversity of geographic areas, occupying almost all continents, except New Zealand and Antarctica (Lacey *et al.*, 2000).

In South America there are two different Family of subterranean rodents: Octodontidae and Ctenomyidae (Lacey *et al.*, 2000). The family Ctenomyidae, popularly known as Tuco-tucos, is highlighted, by cause of constituting almost 70 species, the most speciose among subterranean rodents (Bidau, 2015, Freitas, 2016). The origin of the genus is dated 3.5 million years ago, according to the fossil record located in Jujuy Province in Argentina (Verzi *et al.*, 2010). Nowadays, the range distribution of *Ctenomys* is from Tierra del Fuego, extreme south of South America extending to the north of the continent in Peru (Pearson 1959). Some of their peculiarities such as low rates of adult dispersal (Busch *et al.*, 2000) and an impressive chromosomal variation, since $2n=10$ to $2n=70$ (Anderson *et al.*, 1987; Reig *et al.*, 1990), caused a high diversification and adaptative radiation, making the genus a model to evolution research. Studies suggest that the genus presents the most rampant speciation rate among mammals (Reig *et al.*, 1990; Lacey *et al.*, 2000; Parada *et al.*, 2011).

Among the species of the genus *Ctenomys*, some of those belonging to the mendocinus group: *Ctenomys australis*, Rusconi, 1934; *Ctenomys azarae*, Thomas, 1903; *Ctenomys mendocinus*, Philippi, 1869; *Ctenomys porteusi*, Thomas, 1916 e *Ctenomys rionegrensis*, Langguth and Abella, 1970 and *Ctenomys flamarioni*, Travi 1981. These species are very similar in aspects, for example, they are grouped as monophyletic by mitochondrial DNA, Cytogenetic characters with $2n=48$, large amount of heterochromatin, similar patterns of G and C bands, asymmetrical form of the spermatozoa and similar skull morphology (Freitas *et al.*, 1994, Massarini *et al.* 1991, Parada *et al.* 2011).

Ctenomys flamarioni, Travi 1981 is endemic of the state of Rio Grande do Sul, south of Brazil, and occupies around 600 Km of the most recent line of sand-dunes of all state coast line (Freitas, 1995). It is characterized by white

pelage, solitary habits and by having morphology patterns more robust than others *Ctenomys* of south Brazil (Contreras and MacNab 1990; Bretschneider 1987; Fernández 2002; Rocha-Barbosa *et al.*, 2013). According to IUCN Red List of Threatened Species, *Ctenomys flamarioni* is considered endangered, mainly due to anthropological influence.

Ctenomys australis, Rusconi 1934 is endemic of Buenos Aires Province (Argentina) and occurs in the first line of sand dunes of 100 Km coast line southwest region (Mora *et al.* 2006). Territorial, solitary, one of the largest of the genus, *Ctenomys australis* is classified as endangered by IUCN. The main cause is a gradual receding of coastal dune habitat due to the progressive urbanization and forestation of coastal areas in the region (Mora *et al.* 2010).

Investigating Geological and geomorphologic changes, in addition to dispersal events during the evolutionary history of species, can lead to an increased understanding of how past climatic events and evolution have shaped the current pattern of diversity (Hewitt, 2000; Futuyama 2009; Duminil *et al.*, 2010). Miocene and Pliocene geological events also Pleistocene climatic changes shaped a complex pattern of phylogeographic events that impacted the overall diversity of South America (Rull, 2008) as a main diversification force in multiple temperate and tropical regions of the world (Williams & Pearson 1997; Hewitt 1999). Due to the fact that during the Last Glacial Maximum (22 000 years ago) the coastal plan was 100 Km broader than currently, some reproductive barriers had not been formed yet (Hewitt 1996; Carnaval *et al.*, 2014).

Ecological Niche Modeling (ENM) is an important tool in the studies of coastal changes dynamics and phylogeography (Mendonza-Gonzalez *et al.*, 2013). The general idea behind past models of ENM is to predict a species' distribution model based on the suitability of niche over evolutionary time scales (Peterson *et al.*, 1999). The characterized niche can be projected to identify potential areas of species environmental presence under past, current and future conditions (Peterson *et al.*, 2011)

In the present study, in order to test the hypothesis of allopatric speciation, we applied bioclimatic-based ecological niche models to identify areas of high suitability of these species over the Last Glacial Maximum and the Holocene epochs, integrated with phylogeographic patterns of mitochondrial

DNA (mtDNA) Control Region (D-loop) sequences of *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis*.

Materials and Methods:

Samples:

Samples of *Ctenomys flamarioni* were collected throughout its distribution on the coastline of Rio Grande do Sul, south of Brazil by researchers of Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular (LACEM/UFRGS). The total number of samples was 90 across 9 localities. The Control Region of mitochondrial DNA of these samples was already sequenced by Fernandez Stolz *et al.* (2007). 70 samples of Control Region of mitochondrial DNA of *C. australis* along 8 localities of coastal region of province Buenos Aires, Argentina were downloaded from Genbank and incorporated in the analysis (Mora *et al.*, 2006). Samples of Control Region of *Ctenomys porteousi*, (Mapelli *et al.*, 2012), *Ctenomys azarae* (Mora *et al.*, 2016 and Roratto *et al.* 2012), *Ctenomys mendocinus* (Mora *et al.*, 2016) and *Ctenomys rionegrensis* (Roratto *et al.* 2012 and Tomasco and Lessa 2007) were used to construct the Phylogenetic tree of mendocinus group.

Phylogeographic Analysis:

Sequences were visually inspected using Chromas 2.6 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), and aligned using CLUSTAL W algorithm (Thompson *et al.* 1997), with default options, implemented in MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2016). Then, all sequences were manually corrected and ambiguous sites for subsequent analysis were excluded.

Measures of mitochondrial DNA Standard diversity, including definitions of Haplotypes (H), Nucleotide: pi (Nei and Li, 1979) and haplotype: Hd (Nei, 1987) diversities were performed at DNAsp software (Librado and Rozas 2009). In order to check the Genealogical relationship between haplotypes, a network was constructed based on a concatenated median-joining haplotype in Network 4.6 (Bandelt;Forster; Rohl, 1999).

Divergence Time Estimation:

Analysis of divergence time estimation was performed using a Bayesian approach, as implemented in a StarBEAST2 package of BEAST 2.4.5 (Drummond *et al.*, 2017) with samples of *Ctenomys australis*, *Ctenomys flamarioni*, *Ctenomys azarae*, *Ctenomys porteousi*, *Ctenomys mendocinus* and *Ctenomys rionegrensis*. Runs of 3000000 chains were performed, recorded at every 5000 generations. The parameters used included a Yule tree prior with speciation rate (called by “Birth Diff Rate”) to 180.0 (Heled and Drummond 2012), GTR substitutions and strict molecular clock. The substitution model was selected by Akaike information criterion (AIC) implemented in jModelTest 2.1.1 (Posada, 2008). We applied a strict molecular clock with the substitution rates of 0.0296 (95% confidence interval: 0.0165–0.0442) substitutions per site per million years, which is an estimated rate of Control Region of mtDNA for the genus *Ctenomys* develop by Roratto *et al.* (2012). The branch of *Ctenomys australis* of the tree was calibrated with 9000 years offset, age of the oldest fossilized remains, comprises an incomplete mandible fragment (Pardinas 2001). The convergence of the Markov chain Monte Carlo (MCMC) was checked and effective sample sizes (ESS > 200) confirmed in Tracer 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014). After the first 10% of generations had been discounted as burn-in we estimated a Maximum-clade-credibility tree using the program TreeAnnotator, which is also part of the BEAST 2.4.5 package. Graphical files of the trees were generated at the software FigTree 1.4.2 (Rambaut 2014). Statistical support for the clades was determined by assessing Bayesian posterior probabilities.

Demographic History:

To infer the occurrence of past events of demographic stability, a mismatch distribution analysis in DNAsp was employed (Librado e Rozas 2009), and two neutrality tests based on the infinite-site model without recombination using the software Arlequin (Excoffier e Lischer 2010): Tajima’s D (Tajima, 1989) test and Fu’s Fs (Fu, 1997).

In addition, we used Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) analysis implementation in BEAST v. 2.4.5 (Heled and Drummond, 2017) to reconstruct the demographic changes over time for each species based on Bayesian probability. The prior selected for each of the gene trees was Coalescent Extended Bayesian Skyline. To reach an effective sample size (EES) to the convergence of the Markov Chain Monte Carlo, it was necessary to increase the chains of run to 43000000 for *C. flamarioni* and 63328000 for *C. australis*. Values of others priors of this approach were the same as those used in the divergence time estimation, as previously described. Computation of EBSP and convergence checking were performed in Tracer 1.6. Graphical analysis was generated plotting the product files of EBSPAnalyzer tool into R software (R Development Core Team 2009) following the script developed by Heled and Drummond (2008).

Environmental Niche Models:

To generate highly accurate maps of potential distribution of species we reviewed scientific collections and literature to include geographic information of occurrence points not previously included in our dataset (<http://www.gbif.org/>, IUCN Red List and Handbook of the Mammals of the World). Besides, we used 19 worldclim bioclimatic variables obtained through interpolated data from derived rainfall and temperature of the Last Glacial Maximum (22 000 years ago) and the Holocene (6 000 years ago) with three different Global Climate Models: CCSM4, MIROC-ESM and MPI-ESM-P at a resolution of 2.5 arc-minutes (5 kilometers) obtained from dataset Worldclim version 1.4 (<http://www.worldclim.org/bioclim>). The layers representing the bioclimatic variables of current conditions (interpolations of observed data, representative of 1960-1990) were downloaded of Worldclim as ESRI grids with 30 seconds of resolution. We used ArcGIS 10.0 to reproject the environmental layers in a more adequate map for the species distribution geographic range.

Environmental Niche Models were constructed using Maxent 3.3.3k (Phillips, Anderson and Schapire, 2006; Phillips and Dudik, 2008). Maxent is machine-learning algorithm which estimates the ecological niche of a species by determining the distribution of maximum entropy. To conduct spatially

independent evaluations and estimate optimal model complexity of parameters for Maxent ecological niche models, we applied an R package called ENMeval (Muscarella *et al.*, 2014). To select the appropriate regularization multiplier setting, the algorithm calculated the best model into a range from 0.5 to 6.0 in increments of 0.5, and for the parameter called “features” three feature classes were tested: linear (L); quadratic (Q) and hinge (H) or their combinations. The models were validated by calculating the area under the curve (AUC) from a receiver operating characteristic curve (ROC). The relative importance of the variables was assessed with Maxent's built-in Jackknife functionality.

Results:

Demographic history:

From 391 bp of the Control Region each species, in sample of 70 individuals of *Ctenomys australis* resulting in a total of 23 haplotypes (fig. 1) and of 90 individuals of *Ctenomys flamarioni* resulting in a total of 7 haplotypes (fig. 2).

In *Ctenomys australis* the topology of haplotypes in a median-joining network indicates a scenario of recent demographic expansion with few haplotypes shared between several populations and a star-like arrangement.

The genealogical relationships between haplotypes from *Ctenomys flamarioni* revealed a strong probability of one haplotype of northern distribution representing the most ancient form of the specie because of their central position in a network configuration, and they differ from some other derived haplotypes by only one or a few nucleotide changes. Despite the observed low phylogeographic structure, a group of populations belonging to southern region constituted an evolutionary independent group.

Corroborating with the hypothesis of demographic expansion of *Ctenomys australis*, all neutrality tests for the Control Region of mtDNA were negative; however only the most sensitive Fu's F_s test resulted in negative and significant value, although the value of Tajima's D test tangentialized the significance (Table1). Additionally, evidence of a recent history of population expansion comes from the analysis of mismatch distribution that showed a

typical unimodal distribution under the exponential population expansion model (fig. 3) and a moderate to high number of Haplotype diversity (0.832) and low number of Nucleotide diversity (0.0055)(Table.3).

On the other hand, even negative Tajima's D and Fu's F_s values for *Ctenomys flamarioni* were not significant. Therefore, these tests did not confirm any demographic expansion for *Ctenomys flamarioni* (Table 2). Mismatch distribution analysis (fig. 4) and a moderate to high number of Haplotype diversity (0.788) and low number of Nucleotide diversity (0.0323)(Table 3), on the contrary, supported the recent demographic expansion hypothesis.

Under a scenario of recent demographic expansion, the Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) supported this increase for *Ctenomys australis* (Fig. 5). Nevertheless, a constant effective population size was shown during all evolutionary history for *Ctenomys flamarioni* (Fig. 6)

Divergence time estimation:

The unroot Bayesian Tree for Control Region of species of mendocinus group and associated Posterior Probability (PP) revealed that divergence between *Ctenomys flamarioni* and the Uruguayan and Argentinean *Ctenomys* took place about 14700 years ago (fig. 7).

Moreover, the StarBEAST analysis showed *Ctenomys flamarioni* a more ancient specie than others mendocinus Tuco-Tucos. The Phylogenetic Tree is not completely resolved. However the clade that separated *Ctenomys flamarioni* of other mendocinus Tuco-Tucos is strongly supported (Posterior Probability 100%)(Fig. 8).

Environmental Niche Models:

16 and 27 geographical coordinates were obtained and refined to *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis*, respectively, representing reliable points for the complete range of species.

The models constructed with Maxent produced distributional predictions for each species (figure 9). The maps of Ecological Niche Models (ENMs) indicate that the de La Plata River was an important barrier to speciation process of *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis*. Under the Last Glacial Maximum (22 000 years ago) bioclimates conditions, when de La Plata River had not been formed yet, the suitability of niche models showed both species

distribution occurring where today De la Plata River is placed. In some geographic areas we found an intersection of the species suitable distribution demonstrating the ancestor form of *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis* were, probably, not separated yet.

During Mid-Holocene (6 000 years ago) the Palaeo-distribution modelling indicates suitable environments for the occurrence of species in similar scenario which presently occurs: *Ctenomys flamarioni* in the north of De la Plata River and *Ctenomys australis* in the south.

Discussion:

In the introduction section of this article, we suggested that *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis* were formed by allopatric speciation. Then, we investigated this hypothesis studying the phylogeography patterns and demographic history of species and now we will discuss how Environmental Niche Models and the study of geomorphology history support this inference.

We used Environmental Niche Models (Franklin 2009) to verify where the most probable distribution of the species during different evolutionary epochs was and how the species reacted to the geomorphologic changes. Our maps to current distribution were also important to validate the method, since both species are endemic and the maps confirm their exact present distribution.

Our analysis showed that these two species are currently well established and separated by haplotype network with a considerable number of mutational steps between haplotypes lineages, without any shared haplotype. We searched signals of recent population expansion in our analysis, because it is biologically expected that during the speciation process a demographic expansion after the event of separation of species occurs (Harpending et al. 1998; Slatkin and Hudson 1991).

Ctenomys australis confirmed this pattern, showing a star-like topology among haplotypes, indicating expansion (Slatkin and Hudson 1991). The specie showed low nucleotide diversity and high haplotype diversity. It can be interpreted as a small historical effective population size and followed by expansion (Grant and Bowen 1998) and confirmed by mismatch distribution analysis (fig. 3), Extended Bayesian Skyline Plot (fig 5) and the sensitive Fu's Fs Test.

Even though *Ctenomys flamarioni* showed some weak patterns of demographic expansion as low nucleotide diversity and high haplotype diversity confirmed by graphic of mismatch distribution (fig. 4), the most robust group of analysis did not confirm the expansion, as we showed in the stabilized curve of Extended Bayesian Skyline Plot (fig 6) and not significative P-value in the neutrality tests (Table 2). Probably the successive instability episodes that formed Coastal Plain of Rio Grande do Sul did not permit the growth of populations of this specie as described by Villwock *et al* (1986); Tomazelli and Villock (1996, 2000); Villwock and Tomazelli (1998) and Tomazelli *et al* (2000).

The current configuration of Rio Grande do Sul's Coastal Plain is a result of two main depositional systems, both formed during Quaternary glacio-fluctuations in sea level: the alluvial fan deposits in the west, and the barrier-lagoon system in the east (Villwock *et al* 1986). Altogether, there are four barrier-lagoon systems, resulted by four successive transgression-regression cycles, and preserved by subsequent regression of the shoreline. The latest interglacial sea-level event was responsible for the formation of the most recent barrier-lagoon system about 5000 years ago (Fernandez *et al.*, 2007)

Rio Grande do Sul's shoreline is one of the longest sand beach coastline in the world, 620 Km long with only two permanent discontinuities (the Tramandai Lagoon and Patos Lagoon inlets). In the last 5000 years coastal geomorphology of Rio Grande do Sul has been mainly controlled by alongshore gradients of wave energy (Esteves *et al* 2002). Nowadays *Ctenomys flamarioni* revealed sensitivity to Coastal changes. The north distribution population is in a process of differentiation of the south distribution population caused mainly by anthropogenic changes in sand-dune areas (Fernandez *et al.*, 2007). Currently, both can be considered two different Evolutionary Significant Units (ESUs), which is defined by Moritz *et al* (1994) as a historically isolated set of populations based in a qualitative criterion of the distribution of alleles in relation to their phylogeny (Fernandez, 2007). Additionally, if our premise that *Ctenomys flamarioni* originated before *Ctenomys australis* is true, the patterns of demographic expansion are, in fact, weaker in the Brazilian species.

As reported by Tonni *et al.* (1999), Mapelli *et al.* (2012), and Mora *et al.* (2013), the extreme climatic changes inferred from the Quaternary period,

specifically Late Pleistocene/Early Holocene, combined with the large variations in rainfalls throughout the Holocene, have affected the dynamics of occupation of Tuco-Tucos and many other small mammals of the southern part of South America.

In an inter-specific level, the fluctuations of Coastal Plain of South America drive speciation episodes as pointed out by Mayr (1942), in which a physical barrier restricts the gene flow and leading to allopatric speciation. The process of formation of de La Plata River permitted the gene flow between subterranean species when the sea level was lower and blocked it when the sea level was higher in our hypothesis.

The last Pleistocene glaciations made the level of the Atlantic Ocean drop and the Pampean Sand Sea rise (Iriondo 1999), which is a large sandy cover shaped by the latter desert and semi-desert climatic episodes (Iriondo, 1999 and Quattrocchio *et al.*, 2008). During the Last Glacial Maximum (22,000 years ago) Pampean region was totally covered by desert vegetation, sand dunes and loess fields. Nowadays we called it palaeo-dunes or Quaternary dunes (Prieto, 2000 and Zárate and Tripaldi, 2012). Thus, some geographic barriers like the de La Plata River had not been formed yet, the Coastal Plain was around 100 Km larger and the sand-dunes landscape covered the south of Brazil, Uruguay entirely and North of Argentina. A propitious scenario to the ancient form of *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis* was revealed by our Environmental Niche Models. Our maps showed an overlap distribution of species and an arrangement next to de La Plata River with very close areas of potential distribution of these species, where the gene flow was likely (fig. 7).

During the Mid-Holocene (6000 years ago), more than the rise of the ocean level, the climatic phases changed with the increase of humidity and temperature, as well as the Central-Pampean sand-dunes were moved to seashore zone (Iriondo, 1999). Our maps of potential distribution of species in Holocene corroborate to the idea that the formation of de La Plata River led to an allopatric speciation process of *Ctenomys flamarioni* and *Ctenomys australis*, adding further support to the hypothesis showing a separated potential distribution of species, in a habitat more similar with to the current scenario.

Even the result of the StarBEAST divergence time estimation is a phylogenetic tree that is not completely resolved, perhaps because the species of mendocinus group are very related (Freitas et al., 1994, Massarini et al. 1991, Parada et al. 2011), the Posterior Probability of the clade that separated *C. flamarioni* of others mendocinus Tuco-Tucos is 100%.

So, the StarBEAST analysis indicates that the hypothesis of allopatric speciation around 14700 years ago, a period between the Last Glacial Maximum and the Holocene, is plausible.

According to Clark et al. (2009) after a maximum glaciation period around 22000 years ago (Last Glacial Maximum), throughout 15000 years ago the deglaciation period and consequently the rising of sea levels demonstrate abrupt advance, exactly at the divergence estimation point. During the Holocene, 6000 years ago, Lambeck et al. (2009) showed that the ocean level reached its maximum. This period was important to establish the speciation process and block the gene flow between species.

Our study with Control Region of mtDNA clarified the speciation process of *Ctenomys australis* and *Ctenomys flamarioni*, but led us to a new question: the origin of the mendocinus group. The phylogeny proposed by Parada et al (2011) based on sequences of cytochrome B of mtDNA suggests that one population of *Ctenomys mendocinus* located in Tupungato, an Andean locality in Mendoza, Argentina, is the ancient mendocinus Tuco-Tuco. However, in the same article the author admitted that the specimen collected at Tupungato might represent a distinct specie of *C. mendocinus*, as *Ctenomys pontifex* or *Ctenomys coludo* that might belong to this group and have not been included in any phylogenetic studies. Moreover, other studies do not include Tupungato in a range distribution of *Ctenomys mendocinus*. The original distribution range occurs in northern and central Mendoza Province of Argentina and from Andean Pre-cordillera eastward across arid sub-Andean regions (Rosi et al. 2002). Our analysis corroborate the Parada et al.'s findings (2011) in pointing the haplotypes of *Ctenomys mendocinus* next to Mendonza localization as evolutionary more recent than *Ctenomys flamarioni*.

In conclusion, our analysis supports the hypothesis that the rising of de La Plata River during the deglaciation period between the Last Glacial Maximum and the Holocene blocked the gene flow and allowed the speciation

process among *Ctenomys australis* and *Ctenomys flamarioni*. However, more studies with others molecular markers and covering all distribution of the complete mendocinus group are necessary to clarify the evolutionary origin of the group.

References

Anderson S, Yates TL, Cook JA (1987) Notes on Bolivian mammals 4. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern lowlands. *American Museum Novitates* 2891: 1-20.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.

Bidau, C. J. (2015) Family Ctenomyidae Lesson, 1842. Pp. 818–877 in *Mammals of South America. 2. Rodents* (J. L. Patton, U.F.L. Pardiñas, and G. D'elia, eds.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois and London, United Kingdom.

Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C-H., Xie, D., Suchard, MA., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2017). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537.

Bretschneider, D.S. (1987) Alguns aspectos da biologia e ecologia de *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981 (Rodentia: Ctenomyidae). M.S. dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Busch, C., Antinuchi, J.C. Del Valle, M.J. Kittlein, A.I. Malizia, A.I. Vassallo, and R.R. Zenuto. (2000) Population ecology of subterranean rodents. Pp. 183-226 in: Lacey, E.A., J.L. Patton, and G.N. Cameron, eds.) *The University of Chicago Press, Chicago, Illinois*.

Carnaval, A. C., Waltari, E., Rodrigues, M. T., Rosauer, D., VanDerWal, J., Damasceno, R., Moritz, C. (2014). Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1792), 20141461.

Clark, P., Arthur S. Dyke, Jeremy D. Shakun, Anders E. Carlson, Jorie Clark, Barbara Wohlfarth, Jerry X. Mitrovica, Steven W. Hostetler, A. Marshall McCabe (2009) *The Last Glacial Maximum Science* 325: 710-714

Contreras, L.C., and B.K. McNab. (1990) Thermoregulation and energetics in subterranean mammals. Pp. 231-250 in *Biology of subterranean mammals at*

the organismal and molecular levels (E. Nevo and O.A. Reig, eds.). New York, Wiley-Liss.

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

Duminil J, Heuertz M, Doucet JL, Bourland N, Cruaud C, Gavory F, Doumenge C, Navascu_es M, Hardy OJ. (2010). CpDNA-based species identification and phylogeography: application to African tropical tree species. *Molecular Ecology* 19: 5469–5483.

ESRI (2011). ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.

Esteves Ls, Toldo Jr. Ee, Dillenburg Sr And Tomazelli Lj. (2002). Long- And Short-Term Coastal Erosion In Southern Brazil. *J Coast Res Si* 36: 273-282.

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

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

Fernández, G.P. (2002) Análise da estrutura populacional e da variabilidade genética em três populações de *Ctenomys flamarioni* (Rodentia – Ctenomyidae) através de loci de microssatélites. M.S. dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Fernández-Stolz G P (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. PhD thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Franklin, J. (2009) Mapping species distributions: spatial inference and prediction. Cambridge: Cambridge University Press. p. 340.

Freitas, T.R.O. (1995) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in Spothern Brasil. Studies on Neotraopical Fauna and Environment 30: 53-59.

Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147(2), 915-925.

Futuyama, Douglas J. (2009) Biologia Evolutiva 3 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora. 830 p.

Grant WS, BW Bowen. (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J. Hered. 89: 415-426

Gutiérrez, E. E., Maldonado, J. E., Radosavljevic, A., Molinari, J., Patterson, B. D., Martínez-C., J. M., ... Helgen, K. M. (2015). The Taxonomic Status of *Mazama bricenii* and the Significance of the Táchira Depression for Mammalian Endemism in the Cordillera de Mérida, Venezuela. *PLoS ONE*, 10(6), e0129113

Harpending, H. C., Batzer, M. A., Gurven, M., Jorde, L. B., Rogers, A. R., & Sherry, S. T. (1998). Genetic traces of ancient demography. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(4), 1961–1967.

Hewitt, G. (1999) Postglacial recolonization of European Biota. Biol. J. Linnean Soc. 68: 87–112.

Hewitt, G. M. (2000). The Genetic Legacy Of The Quaternary Ice Ages. Nature 405:907–913.

Ibrahim KM, Nichols RA and Hewitt (1996) Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. Heredity 77: 282-291

Iriondo, M. (1999) Climatic changes in the South American plains: records of a continent-scale oscillation *Quatern. Int.*, 57/58 , pp. 93–112

IUCN - International Union for Conservation of Nature, 2016. <http://www.iucnredlist.org/>. (accessed in January 20th, 2016)

Lacey, E.A., J.L. Patton, And G.N. Cameron. (2000) *Life Underground*. The University of Chicago Press, Chicago Illinois.

Librado, P Rozas, J. (2009); DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* ; 25 (11): 1451-1452.

Lopes, C. M., Ximenes, S. S. F., Gava, A., & de Freitas, T. R. O. (2013). The Role Of Chromosomal Rearrangements And Geographical Barriers In The Divergence Of Lineages In A South American Subterranean Rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity*, 111(4), 293–305.

Mapelli, F. J., Mora, M. S., Mirol, P. M. and Kittlein, M. J. (2012), Effects of Quaternary climatic changes on the phylogeography and historical demography of the subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. *Journal of Zoology*, 286: 48–57.

Mapelli, F.J. Mora, M.S. Mirol, P.M. Kittlein, M.J. (2012) Population structure and landscape genetics in the endangered subterranean rodent *Ctenomys porteousi* *Conserv. Genet.*, 13 , pp. 165–181

Massarini, A. I., M. A. Barros, M. O. Ortells, And O. A. Reig. (1991) Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica* 83:131–144.

Mayr, E. (1942[1999]): *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia Univ. Press, New York. [Reprint version: Harvard University Press, 1999]

Mendoza-González, G., Martínez, M. L., Rojas-Soto, O. R., Vázquez, G. and Gallego-Fernández, J. B. (2013), *Ecological Niche Modeling Of Coastal Dune*

Plants And Future Potential Distribution In Response To Climate Change And Sea Level Rise. *Glob Change Biol*, 19: 2524–2535.

Mora MS, Lessa EP, Kittlein MJ, Vassallo AI (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *J Mammal* 87(6):1192-1203.

Mora MS, Mapelli FJ, Gaggiotti OE, Kittlein MJ, Lessa EP (2010) Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC Genetics* 1471-2156-11-9

Mora, M.S. Cutrera, A.P. Lessa, A.I. Vassallo, A. D'Anatro, F.J. Mapelli (2013) Phylogeography and population genetic structure of the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): integrating demographic and habitat histories *J. Mammal.*, 94 (2013), pp. 459–476

Mora, M.S., Mapelli, F.J., Lopez, A., Fernandez, M.J.G., Mirol, P.M. and Kittlein, M.J. (2016) Population genetic structure and historical dispersal patterns in the subterranean rodent *Ctenomys "chasiquensis"* from the southeastern Pampas region, Argentina, *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, Volume 81, Issue 3 314-325

Moritz, C. (1994) Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. v.9. 10: 373-375.

Muscarella, R., Galante, P. J., Soley-Guardia, M., Boria, R. A., Kass, J. M., Uriarte, M. and Anderson, R. P. (2014), ENMeval: An R package for conducting spatially independent evaluations and estimating optimal model complexity for Maxent ecological niche models. *Methods Ecol Evol*, 5: 1198–1205. doi:10.1111/2041-210X.12261

Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273.

Parada, A. et al. (2011) Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, v. 92, n. 3, p. 671–682, 9.

Pardinas, U. F. J. (2001). Condiciones áridas durante el Holoceno temprano en el sudoeste de la Provincia de Buenos Aires (Argentina): vertebrados y tafonomía. *Ameghiniana* 38:227–236.

Pearson, O.P. (1959) Biology of subterranean rodents, *Ctenomys* in Peru. *Memorias del Museo de Historia Natural —Javier Pradoll* 9: 1-56.

Peterson AT, Soberón J, Pearson RG, Anderson RP, Martínez-Meyer E, Nakamura M, Araújo MB (2011) *Ecological Niches and Geographic Distributions*. Princeton University Press, USA.

Peterson, A. T., Soberón, J. & Sánchez-Cordero, V. (1999) Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science*. 285, 1265–1267.

Peterson AT, Soberón J, Pearson RG, Anderson RP, Martínez-Meyer E, Nakamura M, Araújo MB (2011) *Ecological Niches and Geographic Distributions*. Princeton University Press, USA.

Peterson, A. T., Soberón, J. & Sánchez-Cordero, V. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science*. 285, 1265–1267 (1999).

Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.

Phillips SJ, Dudík M, Schapire RE. (2008). A maximum entropy approach to species distribution modeling. *Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning*, 655–662.

Posada, D. (2008); jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol*; 25 (7): 1253-1256.

Prieto A.R. (2000) Vegetational history of the late glacial-Holocene transition in the grassland of eastern Argentina *Palaeogeogr. Palaeoclimatol., 157*, pp. 167–188

Quattrocchio, M.E. A.B. Borromei, C.M. Deschamps, S.C. Grill, C.A. Zavala (2008) Landscape Evolution And Climate Changes In The Late Pleistocene-Holocene, Southern Pampa (Argentina): Evidence From Palynology, Mammals And Sedimentology *Quatern. Int.*, 181, pp. 123–138

R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

Rambaut A, Suchard MA, Xie D & Drummond AJ (2014) Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>

Reig OA, Busch C, Ortells MO, Contreras JR (1990) An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. In: Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels. Alan R. Liss, pp 71-96.

Rocha-Barbosa, O. et al. (2013) Penial morphology in three species of Brazilian Tuco-tucos, *Ctenomys torquatus*, *C. minutus*, and *C. flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae). Brazilian Journal of Biology, v. 73, n. 1, p. 201–209.

Roratto PA (2012). Tuco-Tucos do Pampa Rio-Grandense: a Filogeografia de *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae) e a Descrição de uma Nova Espécie. PhD thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rull, V. (2008) Speciation, Timing And Neotropical Biodiversity: The Tertiary-Quaternary Debate In The Light Of Molecular Phylogenetic Evidence. Mol ECOL 17, 2722-2729.

Saitou N & Nei M (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method For Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology And Evolution 4:406-425.

Slatkin, M. And Hudson, R (1991) Pairwise Comparisons Of Mitochondrial DNA Sequences In Stable And Exponentially Growing Populations. GENETICS Vol. 129 No. 2 555-562

Sudhir Kumar, Glen Stecher, Koichiro Tamura (2016); MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 2016; 33 (7): 1870-1874.

Tajima, F. (1989) Statistical Method For Testing The Neutral Mutation Hypothesis By DNA Polymorphism. GENETICS Vol. 123 No. 3 585-595

Thomé, M. T. C., Zamudio, K. R., Haddad, C. F. B. and Alexandrino, J. (2014), Barriers, rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Ecol*, 23: 6152–6164.

Thompson, J.D. Et Al. (1994) CLUSTAL W: Improving The Sensitivity Of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties And Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680.

Tomasco, I.H. And Lessa, E.P. (2007) Phylogeography Of The Tuco-Tuco: Mtdna Variation And Its Implication For Chromosomal Differentiation. *The Quintessential Naturalist: Honoring The Life And Legacy Of Oliver P. Pearson: University Of California Publications In Zoology, CA, USA: 859-882;*

Tomazzeli LJ, Dillenburg SR and Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain southern Brazil. *Rev Bras Geociências* 30:474-476.

Tonni, E.P. Cione, A.L. Figini A.J. (1999) Predominance of arid climates indicated by mammals in the pampas of Argentina during the Late Pleistocene and Holocene *Palaeogeogr. Palaeoclimatol., 147* , pp. 257–281

Turchetto-Zolet, Andreia C. Salgueiro, F Turchetto, C. Cruz, F Nicole M. Veto, Michel J. F. Barros, Ana L. A. Segatto, Loreta B. Freitas, Rogério Margis (2016); Phylogeography and ecological niche modelling in *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) suggest distinct vegetational responses to climate change between the southern and the northern Atlantic Forest. *Bot J Linn Soc* 2016; 182 (3): 670-688.

Verzi D. H. Olivares I. Morgan C. C. (2010) The Oldest South American Tuco-Tuco (Late Pliocene, Northwestern Argentina) And The Boundaries Of The Genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) *Mammalian Biology* 75: 243–252.

Villwock, J. A. & Tomazelli, L. J. (1995). *Geologia Costeira do Rio Grande do Sul. Notas Técnicas, Centro de Estudos de Geologia Costeira e Oceânica, UFRGS. Porto Alegre, 8:1-45.*

Villwock, J. A. & Tomazelli, L. J. (1998). Holocene Coastal Evolution in Rio Grande do Sul, Brazil. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*. A. A. Balkema, Rotterdam. 11:283-296.

Villwock, J. A.; Tomazelli, L. J.; Loss, E. L.; Dehnhardt, E. A.; Horn, N. O. ; Bachi, F. A. & Dehnhardt, B. A. (1986). Geology of the Rio Grande do Sul Coastal Province. In: Rabassa, J. ed. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*. A. A. Balkema, Rotterdam. 4:79-97

Williams SE, Pearson RG (1997) Historical rainforest contractions, localized extinctions and patterns of vertebrate endemism in the rainforests of Australia's wet tropics. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 264, 709–716.

Wlasiuk, G., Garza, J. C. and Lessa, E. P. (2003), Genetic And Geographic Differentiation In The Rio Negro Tuco-Tuco (*Ctenomys Rionegrensis*): Inferring The Roles Of Migration And Drift From Multiple Genetic Markers. *Evolution*, 57: 913–926.

Zárate, M.A. Tripaldi A. (2012) The aeolian system of central Argentina *Earth*, 3 , pp. 401–417

Tables:

Table 1. Neutrality Tests D's Tajima and Fu's Fs to *Ctenomys australis*. Data are based on 391 bp sequences from a control-region fragment:

<i>C. australis</i>	Result	Prob
Tajima's D	-1.324	0.073
Fs Fu	-15.098	0.000*

Table 2. Neutrality Tests D's Tajima and Fu's Fs to *Ctenomys flamarioni*. Data are based on 391 bp sequences from a control-region fragment:

<i>C. flamarioni</i>	Result	Prob
Tajima's D	0.157	0.613
Fs Fu	-0.513	0.434

Table 3. Phylogeography Analysis of *Ctenomys australis* and *Ctenomys flamarioni*, number of Haplotypes (H), Haplotypes diversity (Hd) and nucleotide diversity (pi). Data are based on 391 bp sequences from a Control-Region fragment:

	H	Hd	Pi
<i>C.australis</i>	23	0.832	0.0055
<i>C.flamarioni</i>	7	0.788	0.0323

Figures:

Figure 1: Genealogical relationship between haplotypes of *Ctenomys australis*, based on a concatenated median-joining haplotype

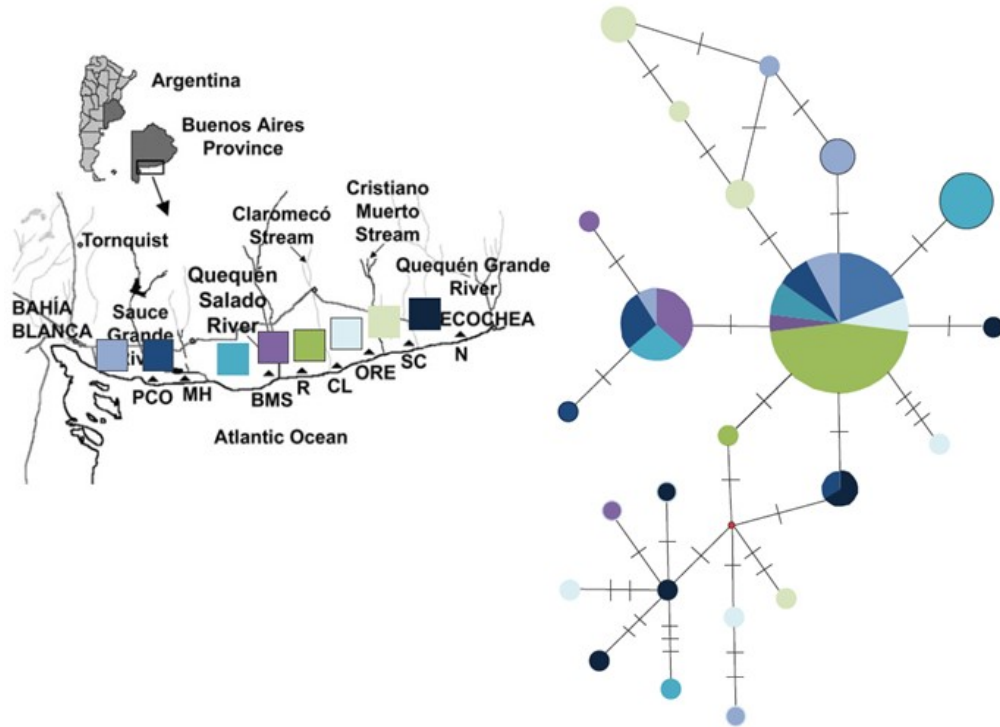


Figure 2: Genealogical relationship between haplotypes of *Ctenomys flamarioni*, based on a concatenated median-joining haplotype

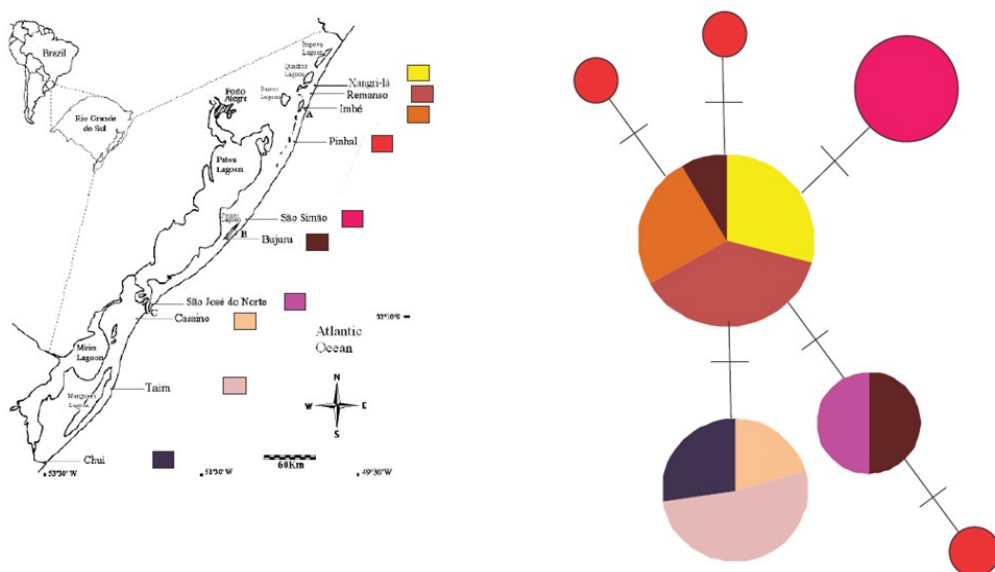


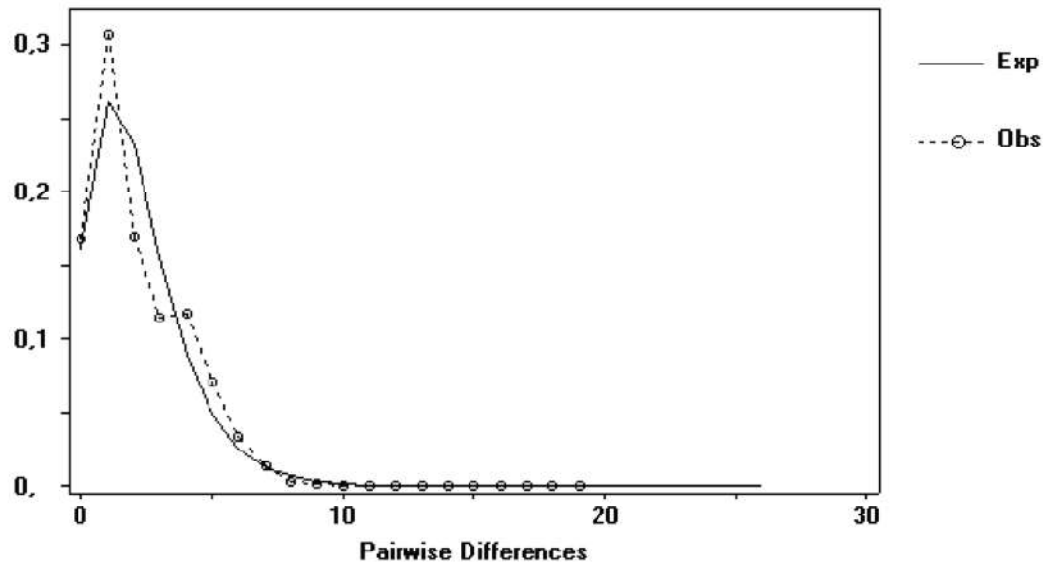
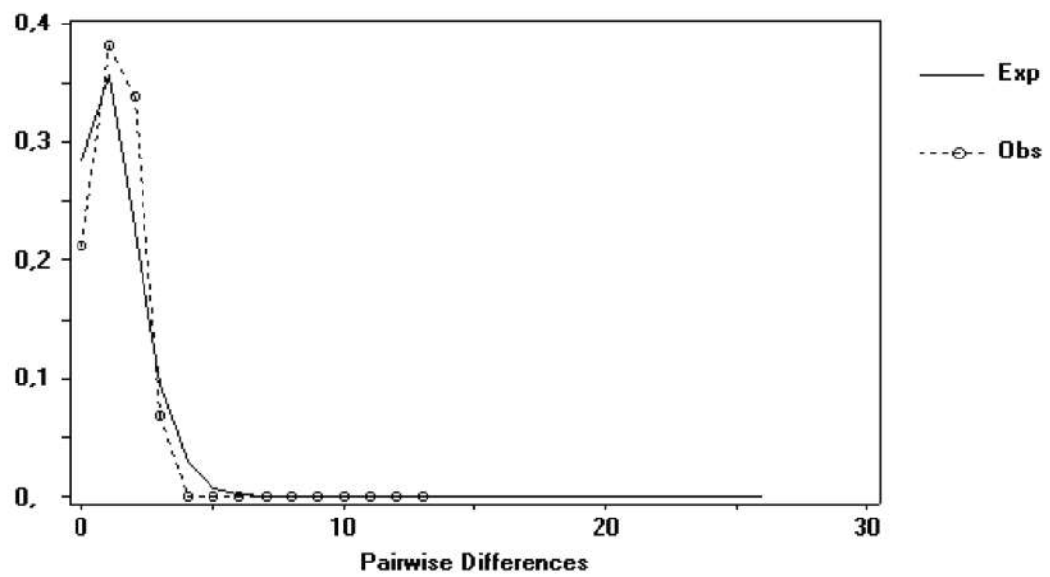
Figure 3: Graphic Mismatch distribution of *Ctenomys australis*:Figure 4: Graphic Mismatch distribution of *Ctenomys flamarioni*:

Figure 5: Extended Bayesian skyline plot (EBSP) of control-region of mtDNA data of *C. australis*

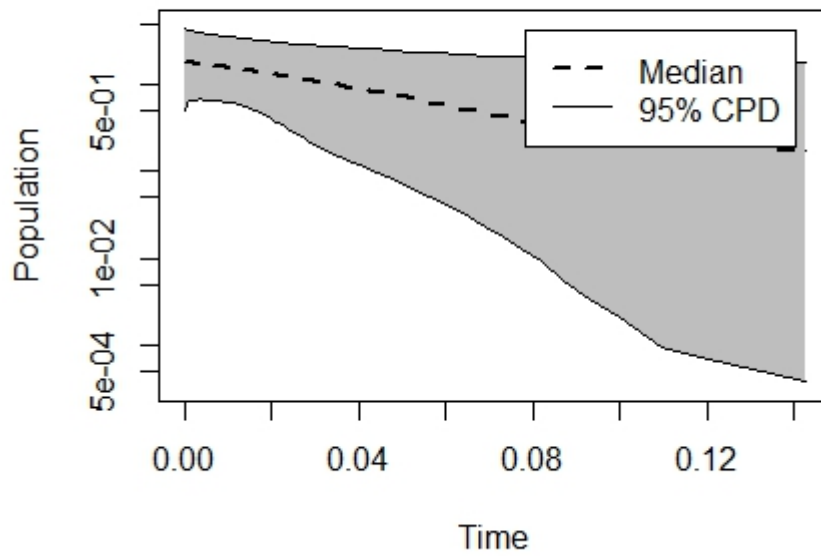


Figure 5: Extended Bayesian skyline plot (EBSP) of control-region of mtDNA data of *C. flamarioni*

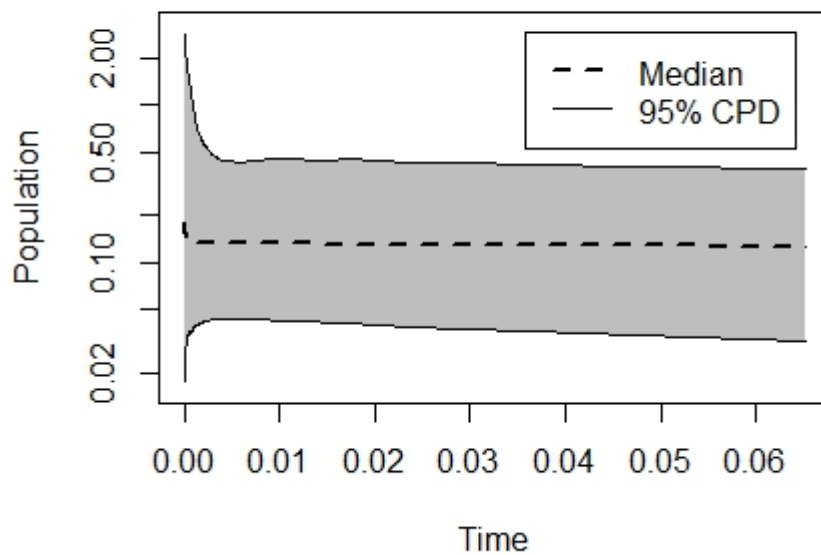


Figure 7: Graphic divergence time estimation between species of mendocinus group in a Maximum-Clade-Credibility Tree The time scale is in millions of years (Myr).

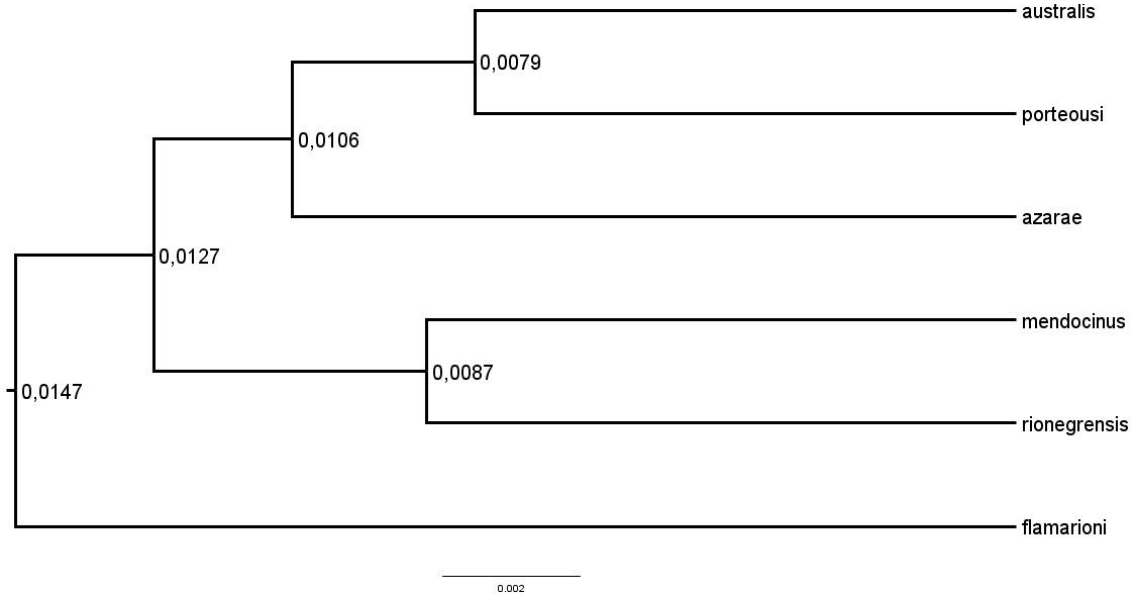


Figure 8. Posterior Probability of each clade of species of mendocinus group

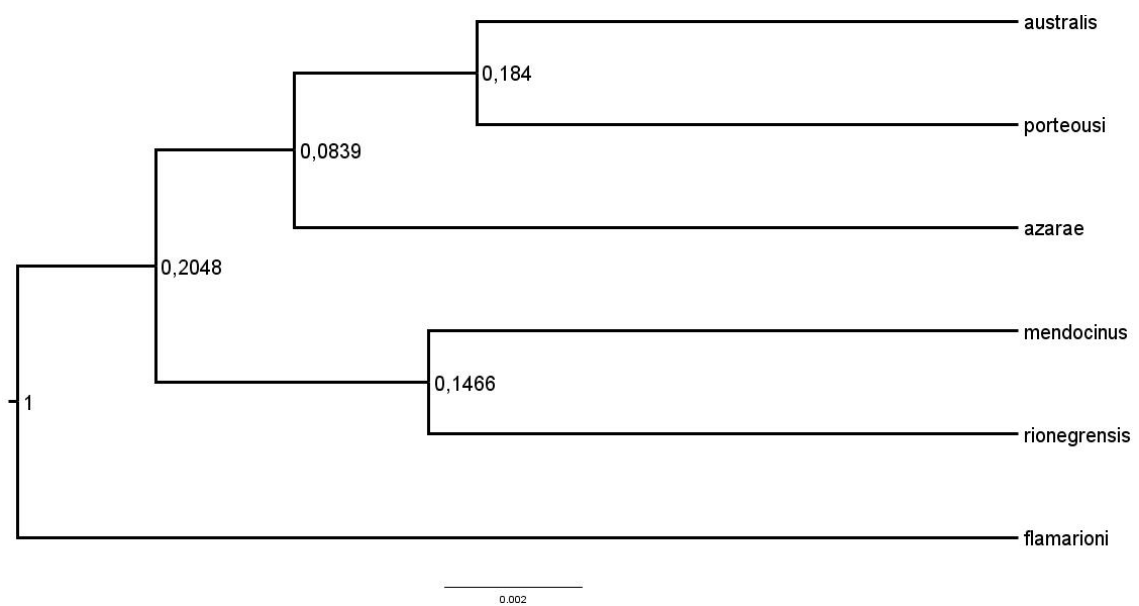
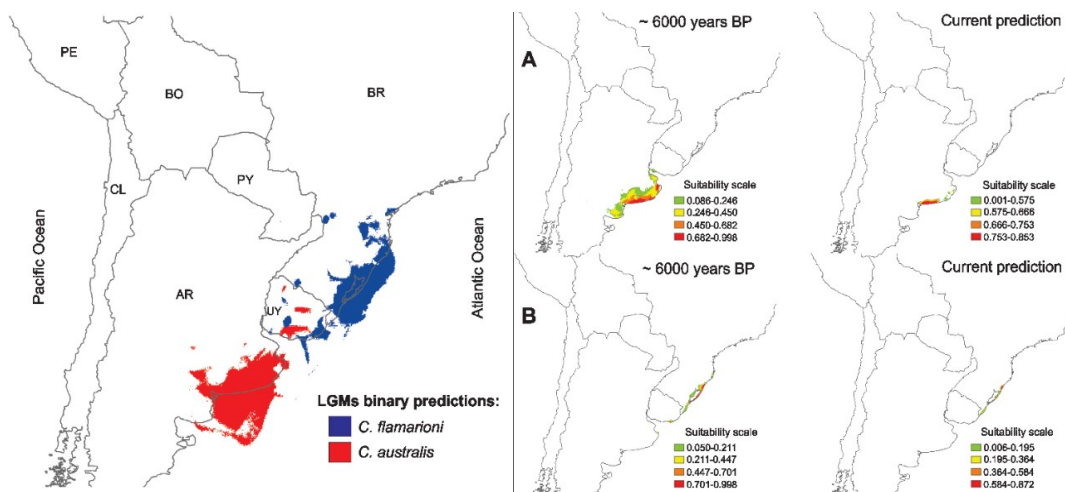


Figure 9. Ecological niche models (ENM) predictions for (A) *C. australis* and (B) *C. flamarioni*: Predictions for the present climate and past climatic conditions (Holocene: 6000 years ago; Last Glacial Maximum LGM 22 000 years ago)



Discussão Geral:

A presente dissertação discorreu sobre a hipótese de que *Ctenomys flamarioni* e *Ctenomys australis* foram formados por especiação alopátrica. A partir de então foram investigados os padrões filogeográficos e a história demográfica das espécies. Nessa sessão irei discutir como a Modelagem de Nicho Ecológico e o estudo da história geomorfológica da Planície Costeira da América do Sul suportam essa inferência.

Foi utilizada a abordagem de Modelagem de Nicho Ecológico (Franklin 2009) para verificar onde foi a mais provável distribuição das espécies durante diferentes épocas evolutivas e como as espécies reagiram às mudanças geomorfológicas. Os mapas de distribuição presente foram importantes para validar o método, uma vez que ambas as espécies são endêmicas e os mapas confirmam com precisão e acérrica a presente distribuição das mesmas.

As análises mostraram que as duas espécies estão bem estabelecidas e separadas pela distribuição de haplótipos com um considerável número de passos mutacionais entre as linhagens de haplótipos, sem nenhum haplótipo compartilhado. Foram procurados sinais de recente expansão populacional nas análises, pois é biologicamente esperado que durante o processo de especiação ocorra uma expansão demográfica após o evento de separação das espécies (Harpending *et al.* 1998; Slatkin e Hudson 1991).

Ctenomys australis confirma esse padrão em diferentes testes, inclusive nos mais robustos. Mostrando uma topologia de haplótipos em forma de estrela, indicando expansão (Slatkin e Hudson 1991). A espécie mostrou baixa diversidade nucleotídica e alta diversidade haplotípica. Isso pode ser interpretado como uma população efetiva histórica pequena e seguido por expansão (Grant and Bowen 1998). Expansão confirmada pela análise de distribuição mismatch (fig. 3), Extended Bayesian Skyline Plot (fig 5) e o sensível teste de F_s de F_u .

Ctenomys flamarioni, ainda que tenha apresentado alguns padrões fracos de expansão demográfica como baixa diversidade nucleotídica e alta diversidade haplotípica, confirmado pelo gráfico de distribuição mismatch (fig. 4), as análises mais robustas não confirmaram a expansão, como mostrado na curva estável do Extended Bayesian Skyline Plot (fig 6) e os valores não

significantes de P nos testes de neutralidade (Table 2). Provavelmente os sucessivos episódios de instabilidade que formaram a Planície Costeira do Rio Grande do Sul não permitiram o crescimento das populações desta espécie como descrito em (Villwock *et al* 1986; Tomazelli and Villock 1996, 2000; Villwock and Tomazelli 1998; Tomazello *et al* 2000).

A configuração presente da Planície costeira do Rio Grande do Sul é o resultado de dois principais sistemas de depósito. Ambos formados durante as flutuações glaciais do quaternário no nível do mar: os depósitos aluviais formados por ventos no oeste e o sistema de lagoas barreiras no leste (Villwock *et al* 1986). Juntamente, são quatro sistemas de lagoas barreiras, resultantes de quatro sucessivos ciclos de transgressão-regressão, e preservados pela subsequente regressão da costa. O último evento interglacial no nível do mar foi responsável para a formação do mais recente sistema de lagoa barreira há cerca de 5000 anos atrás (Fernandez *et al.*, 2007).

O estado do Rio Grande do Sul possui uma das mais longas costa contínua do mundo, 620 Km com apenas duas discontinuidades (Lagoa Tramandaí e a e a desembocadura da Laguna dos Patos. Nos últimos 5000 anos a geomorfologia da costa do Rio Grande do Sul vem sendo modulada por gradientes de energia das ondas (Esteves *et al* 2002). Hoje em dia *Ctenomys flamarioni* ainda revela uma sensibilidade às mudanças da costa. As populações localizadas no litoral norte está em processo de diferenciação das populações, devido às mudanças nas dunas causadas, principalmente, pela ação antrópica (Fernandez *et al.*, 2007). Atualmente, ambas podem ser consideradas duas diferentes ESUs (*Evolutionary Significant Unit*) definido por (Moritz *et al* 1994) como conjunto de populações historicamente isoladas que baseados em critérios qualitativos da distribuição dos alelos em relação à sua filogenia são classificados assim. Adicionalmente, se nossa premissa que *Ctenomys flamarioni* foi originado antes que *Ctenomys australis* for verdadeira, os padrões de expansão demográfica são, de fato, mais fracos na espécie brasileira.

Como reportado por (Tonni *et al.* 1999, Mapelli *et al.* 2012, and Mora *et al.* 2013), o extremo das mudanças climáticas inferidas durante o período Quaternário, especificamente o Pleistoceno tardio e o Holoceno, combinados

com a variação nas chuvas durante o Holoceno afetou a dinâmica da ocupação dos tuco-tucos e muitos outros pequenos mamíferos na América do Sul.

Em um nível inter-específico, as flutuações na Planície costeira da América do Sul direcionou episódios de especiação como aqueles pontuados por (Mayr 1942), em que uma barreira física restringe o fluxo gênico e isso acarreta em especiação alopátrica. O processo de formação do Rio da Prata permitiu o fluxo gênico entre espécies subterrâneas quando o nível do mar estava baixo e bloqueou-o quando o nível do mar estava alto em nossa hipótese.

A última glaciação do Pleistoceno baixou o nível do Oceano Atlântico e ergueu o Mar de Areia Pampeano (Iriondo 1999), que é um vasto campo arenoso moldado por episódios desérticos e semi-desérticos (Iriondo, 1999 and Quattrocchio *et al.*, 2008). Durante o Último Máximo Glacial (22 000 anos atrás) a região pampeana foi totalmente encoberta por vegetação desértica, dunas de areia e campos arenosos, hoje chamados de paleo-dunas ou dunas do Quaternário (Prieto, 2000 and Zárate and Tripaldi, 2012). Então, algumas barreiras geográficas como o Rio da Prata não eram formadas ainda, a Planície Costeira era cerca de 100 Km mais larga e dunas cobriam o sul do Brasil, todo o Uruguai e o norte da Argentina. Um cenário propício para a forma ancestral de *Ctenomys flamarioni* e *Ctenomys australis* como revelado pelos mapas de Modelagem de Nicho Ambiental com distribuição sobreposta das espécies para a época (fig. 9).

Durante o Holoceno (6000 anos atrás), além do nível do Oceano ter aumentado, as fases climáticas mudaram com o aumento da umidade e temperatura, da mesma forma que as dunas que estavam na parte central da região pampeana passaram a ocupar a zona costeira (Iriondo, 1999). Os mapas de distribuição potencial das espécies do Holoceno corroboraram para a idéia que a formação do Rio da Prata levou *Ctenomys flamarioni* e *Ctenomys australis* a uma especiação alopátrica, mostrando a potencial separação das espécies, em um habitat já mais similar com o atual.

Mesmo que o resultado da estimativa de tempo de divergência do StarBEAST seja uma árvore filogenética não completamente resolvida, talvez devido ao fato de as espécies do grupo mendocinus sejam proximamente relacionadas (Freitas *et al.*, 1994, Massarini *et al.* 1991, Parada *et al.* 2011), a

Probabilidade Posterior (PP) do clado que separou *C. flamarioni* de outros Tuco-Tucos do grupo mendocinus é 100%.

Sendo assim, a análise do StarBEAST indica que a hipótese de especiação alopátrica por volta de 14700 anos atrás, um período entre o Último Máximo Glacial e o Holoceno, é plausível.

De acordo com (Clark et al., 2009) depois de atingir um máximo de glaciação há 22000 atrás (Último Máximo Glacial), há cerca de 15000 anos o período de deglaciação e conseqüentemente a ascensão do nível do mar demonstrou um abrupto avanço, o que culminou na consolidação do Rio da Prata, exatamente no ponto de estimacão da divergência. Durante o Holoceno, 6000 anos atrás, (Lambeck et al. 2009) mostrou que o nível do Oceano atingiu seu máximo. Este período foi importante para estabelecer o processo de especiação e bloquear o fluxo gênico entre as espécies.

Nosso estudo com a Região Controladora do DNA mitocondrial clarificou o processo de especiação de *Ctenomys australis* e *Ctenomys flamarioni*, mas levou-nos a uma nova questão: a origem do grupo mendocinus. A filogenia proposta por (Parada et al 2011) baseadas nas sequências do Citocromo-B do mtDNA sugere que uma população de *Ctenomys mendocinus* localizado em Tupungato, uma localidade Andeana em Mendoza, Argentina, como o mais antigo Tuco-Tuco do grupo mendocinus. Entretanto, no mesmo artigo, o autor admite que a specimen coletada em Tupungato pode representar uma espécie distinta de *C. mendocinus* como *Ctenomys pontifex* ou *Ctenomys coludo* que provavelmente pertence a este grupo e não tem sido incluído em nenhum estudo filogenético. Ademais, outros estudos não incluíram Tupungato na extensão da distribuição de *Ctenomys mendocinus*. A distribuição original da espécie ocorre no norte e centro da Província de Mendoza e da região leste da pré-cordilheira dos Andes através das regiões sub-andinas áridas (Rosi et al. 2002). Nossas análises confirmam (Parada et al., 2011) em apontar os haplótipos de *Ctenomys mendocinus* próximos à Mendoza como evolutivamente mais recentes que *Ctenomys flamarioni*.

Concluindo, nossas análises suportam a hipótese que o surgimento do Rio da Prata durante o período de deglaciação entre o Último Máximo Glacial e o Holoceno bloqueou o fluxo gênico e permitiu o processo de especiação entre *Ctenomys australis* e *Ctenomys flamarioni*. Contudo mais estudos com outros

marcadores moleculares e que cubram toda distribuição do grupo mendocinus completo são necessários para entendermos a origem evolutiva do grupo.

Referências Bibliográficas

- Anderson S, Yates TL, Cook JA (1987) Notes on Bolivian mammals 4. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern lowlands. *American Museum Novitates* 2891: 1-20.
- Anne C (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetic* 127:101-120.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Avise JC, Arnold J, Ball Jr RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Ree CA and Saunders NC (1987a) Intra-specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Baird, N. A. et al. (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One*, v. 3, n. 10, p. e3376.
- Barbault, R. (2011) 2010: A new beginning for biodiversity? *Comptes Rendus Biologies*, v. 334, n. 5-6, p. 483–488
- Bretschneider, D.S. (1987) Alguns aspectos da biologia e ecologia de *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981 (Rodentia: Ctenomyidae). M.S. dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Busch, C., C.D. Antinuchi, J.C. Del Valle, M.J. Kittlein, A.I. Malizia, A.I. Vassallo, and R.R. Zenuto. (2000) Population ecology of subterranean rodents. Pp. 183-226 in: Lacey, E.A., J.L. Patton, and G.N. Cameron, eds.) *The University of Chicago Press*, Chicago, Illinois.
- Catchen, J. et al. (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 11, p. 3124–3140.
- Church JA (2001) How Fast Are Sea Levels Rising? *Science* 294: 802-803.
- Contreras, L.C. (1973) El tuco-tuco y sus relaciones con los problemas del suelo en Argentina. *Idia* 24: 14-36.

Contreras, L.C., And B.K. McNab. (1990) Thermoregulation and energetics in subterranean mammals. Pp. 231-250 in *Biology of subterranean mammals at the organismal and molecular levels* (E. Nevo and O.A. Reig, eds.). New York, Wiley-Liss.

Corrêa, I.C.S., R. Baitelli, J.M. Ketzer, And R. Martins. (1992) Translação horizontal e vertical do nível do mar sobre a plataforma continental do Rio Grande do Sul nos últimos 17.500 BP. *Anais ABEQUA*, III, 225-240.

Cruaud, A. et al. (2014) Empirical assessment of RAD sequencing for interspecific phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, v. 31, n. 5, p. 1272–1274.

De Marco Junior P, Siqueira MF (2009) Como determinar a distribuição potencial de espécies sob uma abordagem conservacionista? *Megadiversidade* 5:65–76

Emerson, K. J. et al. (2010) Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 37, p. 16196–16200.

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

Fernández, G.P. (2002) Análise da estrutura populacional e da variabilidade genética em três populações de *Ctenomys flamarioni* (Rodentia – Ctenomyidae) através de loci de microssatélites. M.S. dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

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. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Fernández-Stolz, GP., J.F.B. Stolz, And T.R.O. Freitas. (2007) Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88(4): 935-945.
- Fontana, C. S., G.A. Bencke, And R.E. Reis. (2003) Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- Freitas, T.R.O. (1994) Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Octodontidae) and its cytogenetic relationship with other species of the genus. *Cytogenetics and Cell Genetics* 67: 193-198.
- Freitas, T.R.O. (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, T.R.O. (1997) Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). *Revista Brasileira de Genética* 20: 1-7.
- Freitas, T.R.O. (2001) Tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae) in southern Brazil: *Ctenomys lami* Spec. Nov. Separated from *C. minutus* Nehring, 1887. *Studies Neotropical Fauna Environment* 36: 1-8.
- Freitas, T.R.O., And E.P. Lessa. (1984) Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 65:637-642.
- Freitas, T.R.O., Fernandes, F.A., Fornel R., And Roratto P.A. (2012) A new endemic species of tuco-tuco, genus (Rodentia: Ctenomyidae), with a restricted geographic distribution in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 93:1355-1367.
- Futuyama, Douglas J. (2009) *Biologia Evolutiva* 3 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora. 830 p.
- Galiano D, Bernardo-Silva J, Freitas TRO (2014) Genetic Pool Information Reflects Highly Suitable Areas: The Case of Two Parapatric Endangered Species of Tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *PlosOne* 9: e97301

Gonçalves GL, Freitas TRO (2009) Intraspecific variation and genetic differentiation of the collared tuco-tuco (*Ctenomys torquatus*) in southern Brazil. *J Mammal* 90:1020-1031.

Gonçalves, R. G. Filogeografia, morfometria e distribuição geográfica potencial de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil. 2008. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Guisan, A. e Zimmermann, N.E. (2000) Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling*, 135: 147- 186.

Hansen MM, Ruzzante DE, Nielsen EE, Mensberg KD (2000) Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Mol Ecol* 9:383-594.

Hare MP (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends EcolEvol* 16:700-706.

Hildebrand M (1985) Digging of quadrupeds, p. 90-108. In Hildebrand M, Bramble DM, Liem KF and Wake DB (eds.), *Functional Vertebrate Morphology*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge, Massachusetts.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2015. www.ibama.gov.br. (acessado em 10 de março de 2015).

IUCN - International Union for Conservation of Nature, 2016. <http://www.iucnredlist.org/>. (acessado em 20 de janeiro de 2016)

Lacey, E.A., S.H. Braude, And J.R. Wieczorek. (1998) Solitary burrow use by adult patagonian tuco-tucos (*Ctenomys haigi*). *Journal of Mammalogy* 79(3): 986-991.

Lacey, E.A., J.L. Patton, And G.N. Cameron. (2000) *Life Underground*. The University of Chicago Press, Chicago Illinois.

Langmead, B. et al. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, v. 10, n. 3, p. R25, 4 mar. 2009.

- Lichtenstein, H. (1830) Darstellung neuer order wenig bekannter Säugethiere in Abbildungen und Beschreibungen von Fünf und Sechzig Arten auf funfzig colorirten steindrucktafeln nach den Originalen des Zoologischen Museums der Universität zu Berlin. Berlin: C. G. Lüderitz
- Lopes, C. M.; De Freitas, T. R. O. (2012) Human impact in naturally patched small populations: genetic structure and conservation of the burrowing rodent, tuco-tuco (*Ctenomys lami*). *The Journal of Heredity*, v. 103, n. 5, p. 672–681.
- Lopes, T. S. , Leite, V. R. e Leite, G. R. (2007) Modelagem de Nicho Ecológico e Conservação de *Dalbergia nigra*, Espécie Ameaçada de Extinção. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 438-440
- Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*; 27:209–220.
- Marivaux L.J.L., Welcomme M and J.J. Jaeger (2002) The role of Asia in the origin and diversification of hystericognathous rodents. *Zoologica Scripta* 31: 225-239.
- Massarini, A.I., And T.R.O. Freitas. (2005) Morphological and cytogenetics comparison in species of the mendocinus – group (genus: *Ctenomys*) with emphasis in *C. australis* and *C. flamarini* (Rodentia-Ctenomyidae)
- McNab, K. (1966) The metabolism of fossorial rodents: a study of convergence. *Ecology* 45: 712-733.
- Medeiros, M. D. (2014) Desenvolvimento de marcadores microssatélites e sua aplicação em populações de *Melanophryniscus dorsalis* (Anura: Bufonidae).
- Mijangos, J. L. et al. (2015) Contribution of genetics to ecological restoration. *Molecular Ecology*, v. 24, n. 1, p. 22–37.
- Miranda-Ribeiro, A. (1914) *Historia Natural. Zoologia*. Comissão de Linhas telegraphicas estratégicas de Matto- Grosso ao Amazonas.
- Mirol P, Giménez MD, Searle JB, Bidau CJ, Faulkes CG (2010) Population and species boundaries in the South American subterranean rodent *Ctenomys* in a dynamic environment. *Biol J Linn Soc* 100:368-383.

- Montserrat A.L. e Codignotto J.O. (2013) Geodiversidad pampeana: Geomorfología y conservación de los paisajes de dunas costeras. *Comunicações Geológicas* 100, 1, 21-32
- Mora MS, Lessa EP, Kittlein MJ, Vassallo AI (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *J Mammal* 87(6):1192-1203.
- Mora MS, Mapelli FJ, Gaggiotti OE, Kittlein MJ, Lessa EP (2010) Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC Genetics* 1471-2156-11-9
- Myers, N (1987). The extinction spasm impending: Synergisms at work. *Conservation Biology* 1:14-21
- Naeem, S.; Duffy, J. E.; Zavaleta, E. (2012) The functions of biological diversity in an age of extinction. *Science* (New York, N.Y.), v. 336, n. 6087, p. 1401–1406.
- Nowak RM (1999) Walker's Mammals of the World. Vol. 2. 6^a ed. Baltimore and London, Johns Hopkins University Press, pp 1243-1681.
- Openmodeller (2015) The open source fundamental niche modeling project <http://openmodeller.sourceforge.net/>
- Parada, A. et al. (2011) Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, v. 92, n. 3, p. 671–682, 9.
- Pearson, O.P. (1959) Biology of subterranean rodents, *Ctenomys* in Peru. *Memorias del Museo de Historia Natural —Javier Pradoll* 9: 1-56.
- Peterson, A.T. (2001) Predicting species' geographic distributions based on ecological niche modeling. *Condor* 103: 599-605.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *EcolModel* 190:231–259.

- Primack, Richard B (2001) *Biologia da Conservação* / Richard B. Primack, Efraim Rodrigues.- Londrina : E. Rodrigues. VIII, 328p. : il. ; 23 cm
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945–959.
- Reig OA, Busch C, Ortells MO, Contreras JR (1990) An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. In: *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels*. Alan R. Liss, pp 71-96.
- Ridley, M.(2006) *Evolução*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed,. 752p.
- Rocha-Barbosa, O. et al. (2013) Penial morphology in three species of Brazilian Tuco-tucos, *Ctenomys torquatus*, *C. minutus*, and *C. flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 73, n. 1, p. 201–209.
- Rubin, B. E. R.; Ree, R. H.; Moreau, C. S. (2012) Inferring phylogenies from RAD sequence data. *PloSOne*, v. 7, n. 4, p. e33394.
- Schlötterer C (1998) Microsatellites. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Silva. Fernanda Britto da (2007) *Filogeografia Comparada e História Evolutiva da Planície Costeira do Sudeste e Sul do Brasil*. 0 f. Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- Slice D. E. (2007) Geometric Morphometrics. *Annu. Rev. Anthropol.* 36:261–81
- Soulé, M. (1985) What is conservation biology? *BioScience* 35: 724-734
- Stamatakis, A. (2014) RAxMLversion 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 30, n. 9, p. 1312–1313.
- Stearns SC, Hoekstra RF (2005) *Evolution: An Introduction*. London: Oxford University Press

Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends EcolEvol* 15:199-203.

Tamura, K. et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731–2739.

Tomazzeli LJ, Dillenburg SR and Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain southern Brazil. *Rev Bras Geociências* 30:474-476.

Zenuto RR, Busch C (1995) Influence of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a sand-dune grassland. *Z Säugetierkunde*, 60:277-285.

Zenuto RR, Busch C (1998) Population biology of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a coastal dune-field in Argentina. *Z Säugetierkunde*, 63:357-367.