

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Variabilidade genética em genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade
(DRB e DQA) em populações de *Ctenomys flamarioni* (Rodentia – Ctenomyidae),
implicações em conservação**

Tatiane Noviski Fornel

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas

Co-orientadora: Gabriela Paula Fernández

Porto Alegre
Abril de 2013

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

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

- Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).



© 1999 NEA, INC. All Rights Reserved

Àquele que está ao meu lado desde antes de eu resolver cursar biologia, que é, em parte, responsável pelo meu amor a essa ciência, que me ajudou durante a graduação e me apoiou quando resolvi fazer o mestrado longe dele, meu querido marido Rodrigo Fornel, dedico.

AGRADECIMENTOS

Depois de alguns anos no Laboratório de Citogenética e Evolução, a aprendizagem com os colegas e amigos foi muito grande. Muitas pessoas passaram pela minha vida ao longo desse tempo e de todos certamente levarei algo comigo. Obrigada a todos que de alguma forma me ajudam, seja com o trabalho no lab, seja nas conversas sobre biologia e assuntos aleatórios, seja na construção da pessoa que sou hoje, porque muitos desses colegas foram a minha família no tempo que passei em Porto Alegre. Por tudo isso tenho muito a agradecer e algumas pessoas em especial:

Thales, meu querido orientador e amigo, que aceitou a responsabilidade de me orientar e proporcionou todas as ferramentas necessárias para a realização desse trabalho. Obrigada por cada história contada, muitas vezes foram nas ilustrações das tuas histórias que consegui enxergar as resoluções para os problemas.

Gabriela (Gabi, Gabinha, Gabriêla, maninha) nunca teria palavras suficientes para agradecer tudo que fez por mim, esteve comigo desde o início da graduação, me ensinou tudo sobre DNA, microssatélites, géis de poliacrilamida e sequenciamento, foi minha amiga, confidente, colega de bancada, me ajudou de diversas formas em diversos momentos da minha vida, foi a idealizadora desse projeto e minha co-orientadora. Só tenho a te agradecer por tudo e dizer que sempre estará no meu coração.

Darli, uma das pessoas com o coração mais generoso que conheço, foi minha amiga e confidente desde o dia que chegou no lab. Me recebeu, junto com o Caetano, na sua casa como se eu fosse da família (e eu considero uma irmã). Obrigada por tudo minha querida amiga, obrigada pelas conversas intermináveis quando reclamávamos da vida e nos consolávamos ou quando ríamos até chorar, obrigada por toda a paciência de me escutar quando eu “desatava a falar”. Obrigada por me ajudar com as análises, com a dissertação e o mais importante, me manter calma, pois todas as conversas que tive contigo, ao vivo ou pela internet, me ajudaram a manter o foco e a determinação.

Benhur e Alice obrigada por me receberem em sua casa, compartilharem o amor pela biologia, fotografia, cinema, livros e gatos comigo. Alice, minha querida amiga, obrigada pelas conversas, comidinhas boas, momentos tranquilos e todos os Harry Potters que poderíamos ter visto juntas.

Jorge, obrigada pelas discussões filosóficas, pseudo-científicas e ficcionais, vou sentir “muita saudade” da tinta que você preparava depois do almoço ou que me fazia preparar, depois de “ganhar” um jogo de papel-tesoura-lagarto-Spock (porque até hoje ele ainda não sabe as regras, ou cria as suas próprias, já que é inexorável quando formula suas opiniões), que você tenha uma vida longa e próspera e que a força esteja com você.

Mayara, que me cedeu um quarto no seu apartamento, o tempo foi curto, mas foi suficiente para nos tornarmos grandes amigas. Darli, Gisele, Gislene, May e Paula pela ajuda com as análises, pela paciência em me ajudar e pelas dicas e correções nas primeiras versões da dissertação. Paula, obrigada, por ter me apresentado as “queridas” *E. coli*, ter me ensinado a fazer clonagem e ter me ajudado com todas as dúvidas até na hora de escrever. Bruno e Dani obrigada pelas coletas, caronas, risadas, conselhos e tragos.

Fran pela ajuda no laboratório e pela oportunidade de eu poder passar adiante um pouco do que sei sobre genética e a “arte” da clonagem.

A todos os amigos de laboratório que passaram pela sala 103, tucólogos e agregados, que fizeram dos meus dias mais alegres e proveitosos, obrigada por todo ensinamento: Ana, Binha, Camila, Carol, Claiton, Dani Casali, Dalila, Diego, Fabiano, Fábíola, Fabrício, Felipe, Fernando, Grazi, Guilherme, Isa, José, Josmael, Léo, Laura, Lígia, Lívia, Nice, Pati, Pedro, Samara, Simone, Tati Trigo e Tati Rech.

Ao Elmo, a Lucinha e ao Luciano que foram imprescindíveis na realização desse trabalho, resolvendo todo tipo de burocracia e fornecendo todo o necessário para o bom funcionamento do laboratório, meu muito obrigada!

Minha querida família, principalmente pai, mãe, mana e sobrinha, que mesmo de longe sempre me mandaram todo o apoio e amor que poderiam, que me mantiveram firme no meu caminho e sempre são a minha fortaleza.

Ao meu querido marido Rodrigo que sempre esteve presente, desde que decidi fazer biologia, sempre me apoiou nas minhas escolhas, sempre me ajudou em tudo o que precisei, me aguentou nos momentos de estresse, de rabugisse e pânico. Está sempre do meu lado, tendo um carinho pra me dar, um colo quando eu preciso e topou essa loucura de “casamento à distância” durante o mestrado. Amor da minha vida, obrigada por tudo, sabe que devo muito a ti e a minha vida é tão maravilhosa e perfeita porque você faz parte dela.

Ao projeto Tuco-tuco e à Mamíferos-RS que me oportunizaram a aprendizagem na organização de eventos, na elaboração de material e na divulgação da ciência.

SUMÁRIO

1	RESUMO	9
2	ABSTRACT	11
3	INTRODUÇÃO.....	13
3.1	Roedores	13
3.1.1	Ordem Rodentia.....	13
3.1.2	Roedores subterrâneos.....	13
3.2	Gênero <i>Ctenomys</i>	14
3.2.1	<i>Ctenomys flamarioni</i>	16
3.3	A instabilidade do Sistema Costeiro.....	18
3.4	Ferramenta molecular: o Complexo principal de histocompatibilidade.....	19
4	OBJETIVOS	23
4.1	Objetivo geral	23
4.2	Objetivos específicos	23
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1	Área de estudo e populações amostradas	24
5.2	Extração e amplificação do DNA.....	25
5.3	Análises Estatísticas	26
5.3.1	Variabilidade genética e estrutura populacional.....	26
5.3.2	Detectando seleção	27
5.3.2.1	Seleção ao nível populacional	27
5.3.2.2	Seleção ao nível molecular	28
5.3.3	Análises filogenéticas	28
6	RESULTADOS	29
6.1	<i>Locus DRB</i>	29
6.1.1	Variabilidade genética	29
6.1.2	Estrutura populacional.....	31
6.1.3	Detectando seleção	32
6.1.3.1	Seleção ao nível populacional	32
6.1.3.2	Seleção ao nível molecular	32
6.1.4	Análises filogenéticas	33

6.2 <i>Locus DQA</i>	37
7 DISCUSSÃO	38
7.1 Diversidade genética estruturação populacional	38
7.2 Detectando seleção	45
7.2.1 Seleção ao nível populacional	45
7.2.2 Seleção ao nível molecular	46
7.3 Análises filogenéticas	47
8 CONCLUSÃO.....	49
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 RESUMO

Ctenomys flamarioni é um roedor subterrâneo endêmico do litoral do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Devido à sua distribuição restrita ao ambiente costeiro, que está em constante mudança, e à fragmentação e destruição do habitat, devido à ação humana, essa espécie está nas listas de fauna ameaçadas de extinção. Estudos anteriores, com marcadores microssatélites e DNA mitocondrial, identificaram a baixa variabilidade genética na espécie, por outro lado, o estudo de *loci* que se esperam estar sob seleção seria uma ferramenta importante para identificar a relação dos indivíduos com o ambiente e os processos que moldaram a variabilidade genética da espécie ao longo da história. O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) é composto por um grupo de genes estreitamente ligados que constituem o componente genético mais importante do sistema imunológico dos mamíferos. Dois principais mecanismos têm sido descritos como responsáveis pela manutenção da diversidade do MHC e estão relacionados com o combate de parasitas e com mecanismos reprodutivos, que evitam o endocruzamento. Nesse estudo investigamos a variabilidade genética dos *loci DRB* e *DQA* do MHC e comparamos os índices de diversidades com os valores encontrados em estudos com outros ctenomídeos e com os encontrados para *loci* neutros da mesma espécie. A diversidade genética para o *locus DRB* de *C. flamarioni* foi menor do que a encontrada em estudos para o mesmo *locus* em outras espécies do gênero e também foi menor do que a encontrada em estudos para a mesma espécie, com marcadores neutros, inclusive para populações que passaram por reduções recentes (gargalos-de-garrafa). Os resultados indicam que a seleção balanceadora não foi suficiente para manter a diversidade genética nas populações estudadas e que as reduções populacionais, identificadas através dos *loci* neutros, devem ter sido bastante drásticas, por afetarem também a diversidade de um *locus* conhecido bastante variável (*DRB* de MHC). Não pudemos avaliar a diversidade do *locus DQA* devido a alta incidência de sequências muito divergentes encontradas, possivelmente pseudogenes. O estado de conservação de *Ctenomys flamarioni* é considerado crítico, por todos os fatores que afetam a espécie, como a instabilidade do ambiente em que ocorrem, a fragmentação e destruição do habitat pela ação humana e pela sua baixa diversidade genética, especialmente em um *locus* importante do sistema imunológico. A perda da diversidade no *locus* de MHC poderia estar relacionada à

diminuição do número de indivíduos por população, que aumenta o risco de endogamia, que por sua vez pode levar à perda da aptidão reprodutiva, expressão de alelos recessivos deletérios e perda da flexibilidade adaptativa. Além disso, a perda da diversidade em um *locus* importante para a defesa do organismo contra parasitas aumenta a suscetibilidade dos indivíduos a doenças, e todos esses fatores elevam o risco de extinções locais, colocando em perigo o futuro da espécie.

2 ABSTRACT

Ctenomys flamarioni is a subterranean rodent, endemic to the coastline of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Due to its strict distribution to the coastal environment, which is constantly changing, and to habitat fragmentation and destruction caused by human actions, this species appears in lists of threatened fauna. Previous studies, using microsatellite markers and mitochondrial DNA, identified the low genetic variability in this species. On the other hand, the study of *loci* that are expected to be under balancing selection would be an important tool to identify the relation between individuals and their environment and processes which have molded the genetic variability of this species throughout history. The Major Histocompatibility Complex (MHC) is comprised by a closely connected group of genes that constitute the most important genetic component of the immune system of mammals. Two main mechanisms have been described as responsible for maintaining MHC diversity and are associated with parasite combat and reproductive mechanisms for inbreeding avoidance. In this study we investigated the genetic variability of the *DRB* and *DQA* *loci* of the MHC and compared these diversity indices with values found in studies about other ctenomyids and with values found for neutral *loci* in this species. The genetic diversity for the *DRB* *locus* in *C. flamarioni* was lower than what is found for the same *locus* in other species of the same genus and it was also lower than what was found in studies with this species using neutral markers, especially in populations which have gone through recent size reductions (bottlenecks). The results indicate that the balancing selection was not sufficient to maintain the genetic diversity in the studied populations and that population size reductions, identified through neutral *loci*, must have been very drastic, since they also affected the diversity of a *loci* which is known to be highly variable (*DRB* of the MHC). We could not evaluate the diversity for the *DQA* *loci* due to high incidence of very divergent sequences, possibly pseudogenes. The status of conservation of this species is considered critical due to all the factors that affect the species, such as the instability of the environment on which it occurs, habitat fragmentation and destruction caused by human actions, and its low genetic diversity, especially in an important *locus* of the immune system. The loss of diversity in the MHC *locus* could be associated to the decrease in number of individuals per population, which increases the risk of endogamy which, in turn, can lead to the loss of

reproductive fitness, expression of deleterious recessive alleles and loss of adaptive flexibility. Moreover, the loss of diversity in a *locus* which is important in the defense of the organism against parasites increases the susceptibility of the individuals to diseases, and all these factors raise the risk of local extinctions, endangering the future of the species.

3 INTRODUÇÃO

3.1 Roedores

3.1.1 Ordem Rodentia

Considerado o grupo mais diverso entre os mamíferos, os roedores compreendem 2.277 espécies, distribuídas em 481 gêneros de 34 famílias (Honeycutt, 2009). A ordem Rodentia está dividida em três subordens: Sciuromorpha, Myomorpha e Hystricomorpha, classificação baseada na musculatura da mandíbula e em estruturas associadas ao crânio. Apesar desses três termos ainda serem usados, novos estudos mostram que a sistemática dessa Ordem é mais complexa e reconhecem apenas duas subordens: Sciurognathi e Hystricognathi, distinguidas basicamente pela estrutura da mandíbula (Nowak, 1999; Marivaux *et al.*, 2002).

Os fósseis mais antigos desse grupo foram encontrados na Ásia central e sua origem mais provável data do Paleoceno tardio, há cerca de 60 milhões de anos, quando divergiram da linhagem Lagomorpha (Nowak, 1999; Marivaux *et al.*, 2002).

Os roedores ocupam uma grande variedade de habitats: podendo ser terrestres, especializados na vida arborícola, saltadores, semi-aquáticos, subterrâneos e existem até os que são capazes de planar em vôos curtos. Eles estão distribuídos por praticamente todos os continentes, com exceção da Antártica, são os únicos mamíferos placentários que colonizaram a Austrália e a Nova Guiné, sendo posteriormente introduzidos, indiretamente pelo homem, em outras ilhas oceânicas (Nowak, 1999).

3.1.2 Roedores subterrâneos

São considerados subterrâneos os vertebrados que vivem em tocas e que conduzem a grande maioria de suas atividades de vida abaixo da superfície do solo (Lacey *et al.*, 2000). Muitos desses animais constroem túneis, sendo também chamados de escavadores. Outros vertebrados são ativos na superfície, mesmo sendo aptos para cavar em busca de alimento ou abrigo. Todos esses são descritos como fossoriais (Hildebrand, 1985; 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 Austrália e Antártica (Hildebrand, 1985; Lacey *et al.*, 2000).

As famílias que apresentam espécies fossoriais são: Bathyergidae (África), Geomyidae (América do Norte), Muridae (Ásia, leste europeu e África), Octodontidae (América do Sul) e Ctenomyidae (América do Sul) (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 à 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).

3.2 Gênero *Ctenomys*

A Família Ctenomyidae, subordem Hystricognathi, constitui o grupo com maior número de espécies de roedores subterrâneos atuais, com aproximadamente 60 espécies descritas e um único gênero: *Ctenomys* Blainville, 1826 (Lacey *et al.*, 2000). Esses roedores, popularmente conhecidos como tuco-tucos, habitam galerias escavadas no solo e possuem adaptações morfológicas para esse modo de vida, tais como: corpo e cabeça robustos, cauda relativamente curta, olhos e pavilhões auditivos reduzidos, os pelos das patas modificados em cerdas, além de garras e incisivos fortes e proeminentes que são usados na escavação dos túneis (Reig *et al.*, 1990; Nowak, 1999; Lacey *et al.*, 2000). São na grande maioria solitários, de distribuição fragmentada, territoriais e apresentam baixa taxa de dispersão. São herbívoros, ocupam regiões arenosas, campos abertos, pradarias e estepes. Ocorrem desde planícies úmidas até desertos ou semi-desertos, desde áreas abertas até matas subtropicais, essa versatilidade de habitats é certamente um reflexo da estabilidade conferida pela vida subterrânea. Como a toca permanece fechada a maior parte do tempo, isso assegura um microclima dentro dela, com condições de temperatura e umidade independentes das condições externas (Reig *et al.*, 1990).

Até recentemente a origem mais provável desse gênero era estimada para o Plioceno tardio - Pleistoceno (há cerca de 1,8 milhão de anos), segundo o registro fóssil de sítios paleontológicos na Argentina e Bolívia (Azurduy, 2005). Em 2010, Verzi *et al.* descreveram um fóssil de Ctenomyidae datado em torno de 3,5 milhões de anos, encontrado na Formação Uquía no noroeste da Argentina. Atualmente as espécies de *Ctenomys* se distribuem na metade sul da América do Sul, desde a Terra do Fogo, na Argentina, até o sul da Bolívia e Peru (Reig *et al.*, 1990) (Fig. 1A).

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).

Filogenias moleculares baseadas em análises de sequências de íntrons (Castillo *et al.*, 2005) e citocromo-*b* (Lessa e Cook, 1998; D'Elía *et al.*, 1999; Mascheretti *et al.*, 2000; Slamovits *et al.*, 2001; Parada *et al.*, 2011) vêm sendo utilizadas para ajudar a esclarecer as relações evolutivas entre as espécies de *Ctenomys*. Muitas das filogenias resultantes, utilizando o marcador citocromo-*b*, revelam uma politomia basal, que seria resultado da cladogênese recente e explosiva atribuída à evolução desse gênero (Lessa e Cook 1998; D'Elía *et al.*, 1999; Mascheretti *et al.*, 2000). O estudo filogenético mais recente para o gênero (Parada *et al.*, 2011) utilizou 38 espécies e 12 formas ainda não descritas com uma ampla distribuição geográfica, resultando no reconhecimento de oito clados bem suportados, compondo oito grupos de espécies de tuco-tucos: *opimus*, *mendocinus*, *talarum*, *torquatus*, *magellanicus*, *tucumanus*, *boliviensis* e *frater*. Algumas espécies não puderam ser classificadas dentro desses grupos por não terem suas relações bem resolvidas na base da filogenia (Parada *et al.*, 2011).

Para o Estado do Rio Grande do Sul, no extremo sul do Brasil, são descritas cinco espécies de ctenomídeos: (1) *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830 que tem a distribuição

mais ampla dentre elas, ocorrendo desde o centro do Uruguai até o centro do Rio Grande Sul ocupando os Campos Sulinos de leste a oeste do Estado (Freitas, 1995a; Fernandes *et al.*, 2009); (2) *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 que se distribui desde o sul do Estado de Santa Catarina, próximo a praia de Jaguaruna, até São José do Norte, ao sul do Rio Grande do Sul, ocupando uma extensão linear de aproximadamente 500 km (Freygang *et al.*, 2004); (3) *Ctenomys lami* Freitas, 2001 que é uma espécie endêmica do Estado do Rio Grande do Sul, de distribuição restrita, habita uma região de dunas próxima a Porto Alegre denominada Coxilha das Lombas (Freitas, 2001; Freitas, 2007). Essas três espécies foram classificadas como pertencentes ao mesmo grupo filogenético, *torquatus*, por Parada *et al.*, (2011). (4) *Ctenomys ibicuiensis* Freitas *et al.*, 2012 que ocorre somente em uma localidade no oeste do Rio Grande do Sul, possui a distribuição mais restrita dentre as espécies de ctenomídeos conhecidas para o Estado. Análises moleculares também a classificaram como pertencente ao grupo *torquatus* (Freitas *et al.*, 2012). (5) *Ctenomys flamarioni* Travi, 1981, objeto desse estudo, será descrito detalhadamente a seguir.

3.2.1 *Ctenomys flamarioni*

O tuco-tuco-das-dunas (Fig. 2) é um roedor endêmico do litoral do Estado do Rio Grande do Sul. Sua distribuição atual (Fig. 1B) se estende desde a localidade de Arroio Teixeira no município de Capão da Canoa (Freitas, 1995a), até a desembocadura do rio Chuí, na fronteira com o Uruguai (Fernández-Stolz *et al.*, 2007). Por ter uma distribuição restrita ao ambiente de dunas costeiras, um habitat em constante mudança, por ação dos ventos e das marés e o avanço da ocupação humana, essa espécie consta no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul na categoria “vulnerável” e na Lista da IUCN como “em perigo” (Fontana *et al.*, 2003; Catzefflis *et al.*, 2011).

Massarini e Freitas (2005) sugerem que a origem mais provável para essa espécie tenha ocorrido a partir de uma forma ancestral que migrou da Argentina durante o Pleistoceno, quando a Planície Costeira era mais ampla e o Rio da Prata possuía pouca vazão (Ab'sáber, 1990), 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).

Em vista disso, diferentemente das outras espécies que ocorrem no Estado do Rio Grande do Sul, pertencentes ao grupo *torquatus*, *C. flamarioni* é filogeneticamente relacionada às espécies Argentinas e Uruguaias pertencentes ao grupo *mendocinus* (*C. mendocinus*, *C. azarae*, *C. porteusi*, *C. australis* e *C. rionegrensis*), com as quais compartilha o mesmo número cromossômico ($2n = 48$) e um tipo de espermatozóide denominado simples assimétrico (Freitas, 1994, 1995b; Massarini e Freitas, 2005; Parada *et al.*, 2011).

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 espécie (Fernández-Stolz, 2007). Para 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). Para as populações do sul, que ocupam uma região geográfica com menor impacto antrópico, a perda significativa da variabilidade genética foi atribuída a fatores de instabilidade ambiental (Fernández-Stolz, 2007; Fernández-Stolz *et al.*, 2007).

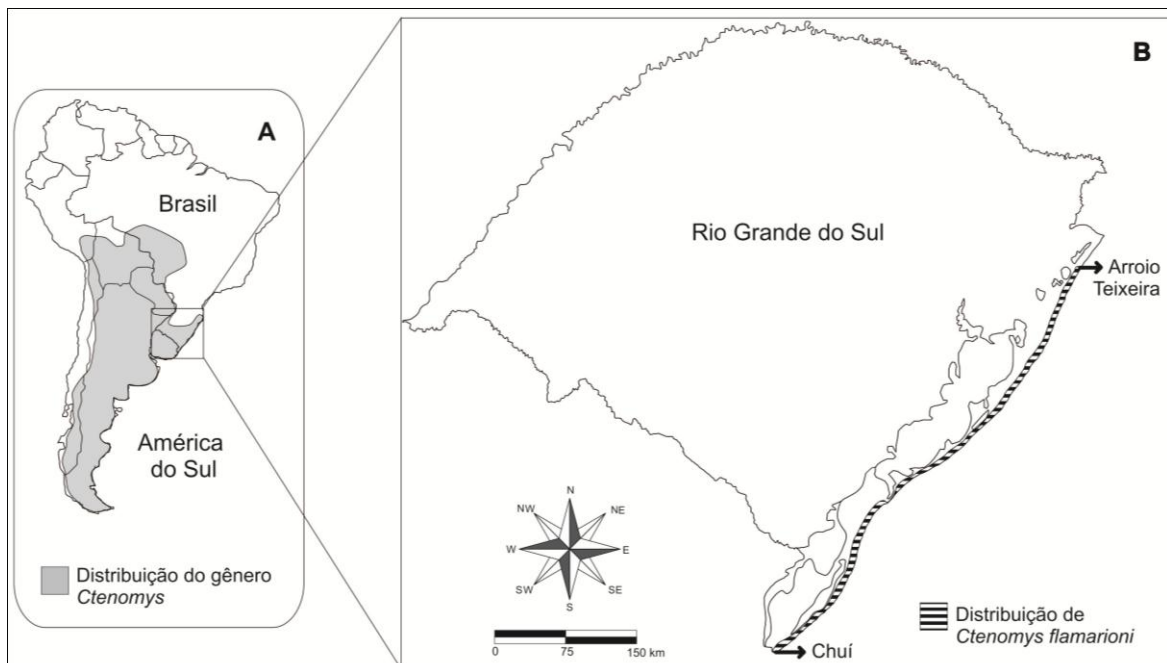


Figura 1. A) Mapa da América do Sul com a distribuição do gênero *Ctenomys*. B) Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com a distribuição geográfica de *Ctenomys flamarioni*.



Figura 2. Tuco-tuco-das-dunas (*Ctenomys flamarioni*), praia de Xangri-lá. (Foto: Tatiane Noviski Fornel).

3.3 A instabilidade do Sistema Costeiro

O ambiente costeiro é dinâmico e altamente instável. A história de instabilidade da Planície Costeira do Rio Grande do Sul começa com os processos envolvidos na evolução das suas facções geomorfológicas como os ciclos de transgressão e regressão do nível do mar (Fernández-Stolz, 2007). O regime de ventos tem um papel fundamental na morfogênese da Planície Costeira que, além de determinar a dinâmica de formação e erosão de dunas, é o fator básico que modula a hidrodinâmica, tanto oceânica quanto dos corpos lagunares, da região. Quanto 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).

Outros fatores considerados importantes na problemática da conservação da biodiversidade dos ambientes costeiros são 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 Planície Costeira do Rio Grande 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* (Fernandes *et al.*, 2007).

3.4 Ferramenta molecular: o Complexo principal de histocompatibilidade

Estudos genéticos com animais silvestres muitas vezes empregam marcadores neutros, tais como DNA mitocondrial (mtDNA), polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) ou microssatélites para estimar a quantidade de variação presente nos indivíduos e nas populações. Embora esses marcadores sejam muito informativos para as reconstruções filogenéticas, para investigar histórias populacionais, examinar padrões de dispersão dos indivíduos ou classificar indivíduos por parentesco, a variação em *loci* neutros não pode fornecer informações diretas sobre os processos seletivos que envolvem a interação dos indivíduos com seu ambiente (Blouin *et al.*, 1996; Van Tienderen *et al.*, 2002; Lukas *et al.*, 2004; Morin *et al.*, 2004; Sommer, 2005). No entanto, estas são questões de particular relevância na evolução, ecologia e conservação das espécies. Ao contrário dos marcadores neutros, a variabilidade do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) reflete processos evolutivos relevantes, dentro e entre as populações, e é muito adequado para investigar uma ampla gama de questões no que diz respeito à ecologia evolutiva e conservação (Lukas *et al.*, 2004).

O MHC é composto por um grupo de genes estreitamente ligados que constituem o componente genético mais importante do sistema imunológico dos mamíferos. Os genes que compõem este complexo codificam glicoproteínas receptoras de membrana responsáveis pela apresentação de peptídeos às células T, se algum peptídeo é reconhecido como não próprio então é iniciada a cascata de resposta imune específica (Ploegh e Watts, 1998). Existem dois subgrupos principais de MHC que possuem diferentes funções imunológicas: MHC de Classe I e MHC de Classe II. O MHC de Classe I é responsável pela apresentação de antígenos intracelulares para as células-T CD8+, estas moléculas estão presentes em todas as células somáticas nucleadas e tem um papel essencial na defesa contra patógenos intracelulares, principalmente derivados de proteínas virais e células cancerígenas. As moléculas de MHC de Classe II apresentam antígenos extracelulares às células-T CD4+. Sob condições normais, as moléculas de MHC Classe II estão presentes na superfície de células específicas apresentadoras de antígenos, como as dendríticas e os macrófagos e apresentam principalmente peptídeos derivados de parasitas, bactérias, nematóides e cestóides (Ackerman e Cresswell, 2004; Dengjel *et al.*, 2005; Sommer, 2005; Jensen, 2007). Acredita-se que essa função seja a causa da alta diversidade observada para estes genes, os mais polimórficos descritos para vertebrados, sendo os principais sítios

variáveis aqueles relacionados com resíduos envolvidos na união aos peptídeos exógenos (Garrigan e Hedrick, 2003).

Dois principais mecanismos têm sido descritos como responsáveis por manter o nível elevado de polimorfismo nos genes de MHC: um baseado na relação com o hospedeiro e o outro nos mecanismos reprodutivos. O primeiro está baseado em modelos de seleção balanceadora decorrentes da co-evolução dos hospedeiros com seus patógenos e parasitas. Em uma população exposta a uma matriz de patógenos, os indivíduos heterozigotos são favorecidos por serem capazes de apresentar uma gama mais ampla de peptídeos e, portanto, reconhecer e resistir a uma gama mais ampla de patógenos (Doherty and Zinkernagel, 1975; Hughes e Nei, 1988; Bernatchez e Landry, 2003). O segundo diz respeito aos benefícios genéticos da seleção sexual. O acasalamento preferencial negativo poderia aumentar a aptidão dos indivíduos, já que um número maior de descendentes teria elevados níveis de MHC heterozigotos. Além de aumentar a heterozigosidade esse tipo de seleção ajuda a evitar acasalamentos parentais e as consequências negativas de endogamia, como a expressão recessiva de mutações deletérias. As preferências de acasalamento poderiam fornecer, também, um mecanismo para manter a “corrida armamentista” molecular da co-evolução com o parasita, um cenário conhecido como alvo móvel (Penn e Potts, 1999; Bernatchez e Landry, 2003).

A alta diversidade para esse marcador tem sido comprovada em vários estudos com populações naturais (Hedrick *et al.*, 2002; Westerdahl *et al.*, 2004; Alcaide, 2010). A diversidade em *loci* de MHC foi mantida mesmo em espécies que passaram por severas reduções populacionais e perderam variabilidade em *loci* neutros (Hambuch e Lacey, 2002; Aguilar *et al.*, 2004; Oliver e Piertney, 2011; Hawley e Fleischer, 2012).

Espécies que passaram por reduções severas nos tamanhos populacionais (gargalos-de-garrafa) costumam apresentar baixa variabilidade genética em *loci* neutros, o mesmo pode acontecer para *loci* codificantes, a menos que a seleção balanceadora seja forte o suficiente para conter os efeitos da deriva. Quando o tamanho efetivo se torna muito pequeno, o coeficiente de seleção se torna tão baixo que passa a se comportar de maneira neutra (Maruyama e Nei, 1981; Kimura, 1983).

Estudos com espécies que passaram por severas reduções populacionais, tais como: falcão-de-galápagos (Bollmer *et al.*, 2011), bisão-europeu (Babik *et al.*, 2012), castor-

européu (Babik *et al.*, 2005), vison (Becker *et al.*, 2009), diabo-da-tasmania (Cheng *et al.*, 2012), tetraz-das-pradarias (Bollmer *et al.*, 2011; Eimes *et al.*, 2011), tuatara (Miller *et al.*, 2010), tordo-da-Nova-Zelandia (Miller *et al.*, 2004), pinguim-de-galápagos (Bollmer *et al.*, 2007) e cervídeo-canadense (Taylor *et al.*, 2012) têm documentado reduzida diversidade tanto para *loci* neutros como para os de MHC, levando a concluir que a deriva genética tem sido mais importante que a seleção balanceadora, nesses casos.

Uma recente meta-análise sugere que genes de MHC podem perder até 15% mais variação do que os *loci* neutros durante declínios populacionais, provavelmente pela perda de alelos raros durante o processo de gargalo-de-garrafa (Sutton *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012). A perda da variabilidade genética pode aumentar o risco de extinção devido à diminuição da aptidão dos indivíduos, a perda da flexibilidade adaptativa e o aumento da suscetibilidade a doenças (Allendorf e Luikart, 2007). Apesar disso, o polimorfismo limitado observado no castor-europeu (Ellegren *et al.*, 1993), no alce (Mikko e Andersson, 1995) e no boi-almiscarado (Mikko *et al.*, 1999), aparentemente não impediram as expansões que se seguiram após reduções populacionais nessas espécies.

Apesar da controvérsia existente a respeito da viabilidade de populações com limitada diversidade para genes do MHC, estudos recentes sugerem que a seleção pode reter a diversidade, mesmo quando reduções severas do tamanho populacional (gargalos-de-garrafa) levem a perda de variabilidade em outros *loci* do genoma (Aguilar *et al.*, 2004). Dessa forma os genes de MHC constituem uma ferramenta eficiente para examinar o impacto dos fatores demográficos, tanto históricos quanto contemporâneos, sobre a seleção e os padrões de variação genética (Bernatchez e Landry, 2003).

A utilização desses genes em espécies de ctenomídeos tem contribuído com a caracterização das interações entre estrutura genética populacional, demografia, comportamento, seleção e diversidade genética em quatro espécies de tuco-tucos argentinas: *C. australis*, *C. sociabilis*, *C. haigi* e *C. talarum*. Para *C. sociabilis* e *C. haigi* Hambuch e Lacey (2002) comparam padrões de diversidade para um gene do sistema MHC classe II (*locus* DQB) e os obtidos para 15 *loci* de microssatélites demonstrando que a seleção balanceadora sobre o *locus* de MHC é significativamente maior na espécie social (*C. sociabilis*) que na espécie solitária (*C. haigi*). Já com um enfoque populacional, para a espécie *C. talarum*, foram estudados dois *loci* do sistema MHC classe II (*DRB* e *DQA*)

para duas populações com diferentes características demográficas (densidade populacional) e comportamentais (estrutura de grupo) (Cutrera e Lacey, 2006). Estas autoras verificaram que as estimativas de intensidade de seleção balanceadora foram maiores para a população de maior densidade e maiores índices de endogamia. No trabalho de 2010, Cutrera *et al.* compararam a variabilidade de MHC em duas espécies simpátricas: *C. australis* e *C. talarum*, que possuem diferentes histórias demográficas, e encontraram um indicativo de que a história pode influenciar substancialmente na estrutura genética das espécies e nos complexos padrões para diversidade de MHC.

Estudos examinando variação genética em genes do sistema MHC, levando em consideração populações que atravessaram gargalos-de-garrafa-populacionais ou algum tipo de impacto antrópico são frequentes na bibliografia (Hedrick *et al.*, 1999, 2000; Hoelzel *et al.*, 1999; Smulders *et al.*, 2003; Lukas *et al.*, 2004; Babik *et al.*, 2005; Radwan *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2009) mas não existem para espécies do gênero *Ctenomys*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar os padrões de variabilidade para os *loci DRB* e *DQA* do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em populações do tuco-tuco-das-dunas, *Ctenomys flamarioni*, e comparar com marcadores neutros, a fim de entender como as forças evolutivas agiram nesses *loci*, principalmente em populações que sofreram reduções severas do tamanho populacional (gargalos-de-garrafa).

4.2 Objetivos específicos

- Estabelecer comparações entre os valores dos índices de variabilidade obtidos para os genes de MHC (*DRB* e *DQA*) e os obtidos a partir de *loci* neutros (de estudos anteriores) com a finalidade de determinar a importância da seleção, ou fatores seletivamente neutros, nos polimorfismos encontrados para MHC;

- Comparar os valores de diversidade das populações com reduções populacionais recentes (gargalos-de-garrafa) com as populações não impactadas, para identificar se o impacto das reduções foi diferente para marcadores neutros e sob seleção, em populações que tiveram histórias demográficas diferentes;

- Testar seleção em nível molecular para identificar se a seleção foi suficiente para manter a diversidade nos *loci* estudados, mesmo depois de reduções populacionais recentes.

- Contribuir com a caracterização genética da espécie, estritamente necessária para a avaliação do estado de conservação e a geração de estratégias de manejo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Área de estudo e populações amostradas

As amostras foram coletadas ao longo de toda a distribuição da espécie, abrangendo o litoral do Estado do Rio Grande do Sul. O período de amostragem foi de março de 1999 a março de 2001 (como parte do trabalho de doutorado de Fernández-Stolz, 2007). Foram coletados 86 indivíduos das seguintes localidades: Xangri-lá (XA; 29°47'S, 50°01'W; $n = 11$), Remanso (RE; 29°49'S, 50°02'W; $n = 12$), Pinhal (PI; 30°18'S, 50°15'W; $n = 10$), São Simão (SS; 30°58'S, 50°40'W; $n = 11$), Bujurú (BJ; 31°39'S, 51°22'W; $n = 8$), São José do Norte (SJ; 32°03'S, 51°59'W; $n = 10$), Cassino (CA; 32°09'S, 52°06'W; $n = 7$), Taim (TA; 32°43'S, 52°26'W; $n = 10$) e Chuí (CH; 33°44'S, 53°22'W; $n = 7$) (Fig. 3).

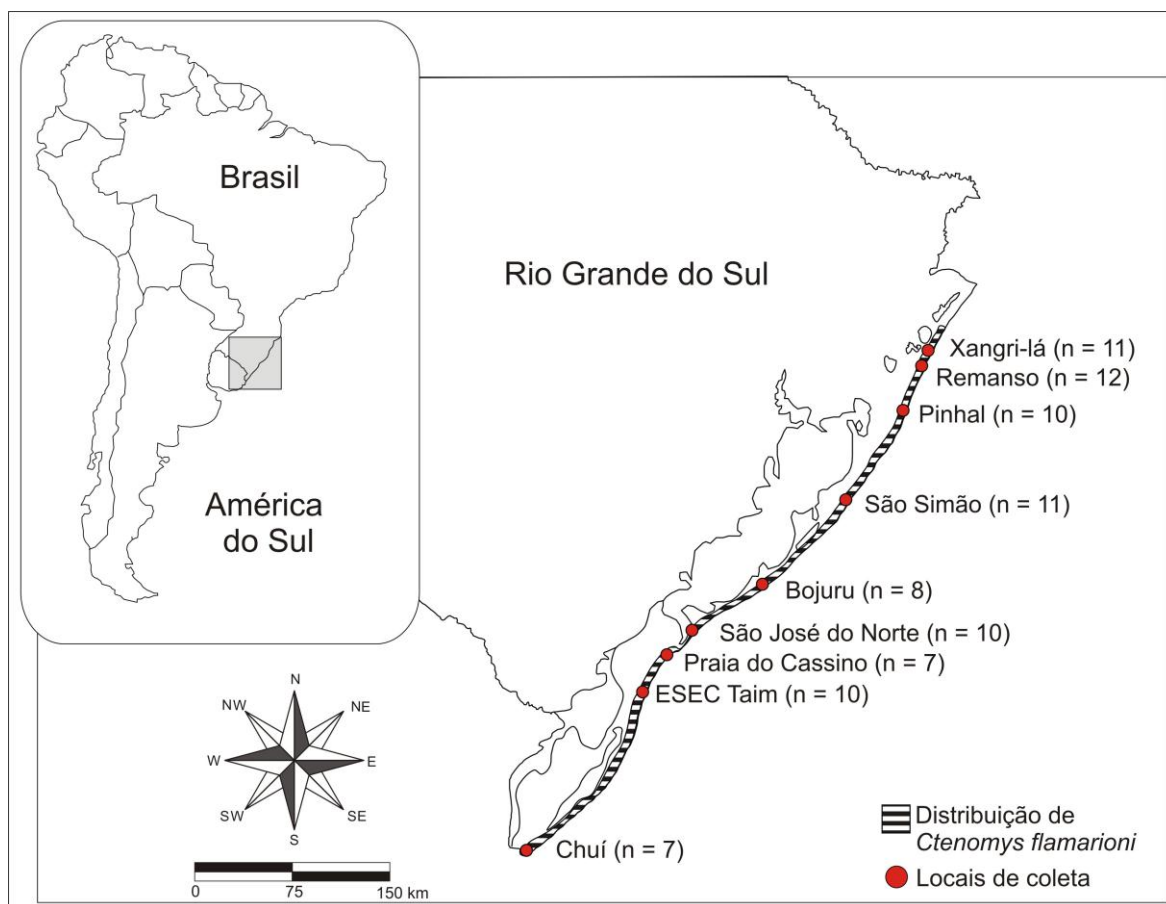


Figura 3. Mapa da distribuição de *Ctenomys flamarioni* com a identificação dos locais de coleta e o tamanho amostral para cada local.

As capturas foram feitas utilizando armadilhas do tipo trampa, Oneida Victor número 0, com proteção de borracha, para evitar injúrias aos indivíduos. Cada animal capturado foi anestesiado e teve um pedaço de tecido da orelha, ou da cauda, retirado e preservado em etanol absoluto. Passado o efeito da anestesia, os indivíduos foram devolvidos aos locais de captura.

As amostras de tecido, assim como do DNA extraído para cada uma delas, encontram-se depositados no Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular (LACEM) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5.2 Extração e amplificação do DNA

O DNA genômico total foi extraído utilizando o protocolo de Medrano *et al.*, (1990). Os produtos obtidos foram verificados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corados com Brometo de Etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV).

A amplificação de um fragmento de 270 pares de bases (pb) para o éxon 2 do gene *DRB* foi realizado a partir dos *primers* GH46 (5' CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCAGCA CG 3', Scharf *et al.*, 1988) e GH50 (5' CTCCCCAACCCCGTAGTTGTGTCTGCA 3', Scharf *et al.*, 1988). Para o *locus DQA* foi amplificado um fragmento de aproximadamente 600 pb formado pelo éxon 2, o íntron 2, e um fragmento do éxon 3, utilizando os *primers* DQA1 (5' CCGGATCCCAGTACACCCATGAATTTGATGG 3', Slade *et al.*, 1993) e DQA2 (5' CCGGATCCCCAGTGCTCCACCTTGCAGTC 3', Slade *et al.*, 1994). Esses *loci* foram escolhidos por codificarem as regiões de ligação com os peptídeos nas moléculas de MHC e por isso são as porções desses genes mais sujeitas à seleção balanceadora (Hughes e Hughes, 1995).

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 20µl contendo: 10µl de DNA (25-50 ng/µl), 4 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1x tampão, 0,6 mM de MgCl₂, 1,25 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram as seguintes: uma desnaturação inicial de 94°C (5 minutos) seguida de 38 ciclos de: 94°C (1 minuto) / 57°C (30 segundos) / 72°C (1 minuto) e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os

produtos de amplificação foram verificados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corados com Brometo de Etídio e visualizados em transluminador de luz UV.

Os produtos de PCR foram clonados em vetor plasmidial pJET1.2/blunt (Kit de Clonagem CloneJET, Thermo Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante, e transferidas para células competentes de *Escherichia coli* pelo método CaCl_2 (Sambrook e Russel, 2002). De 10 a 15 colônias de cada placa foram coletadas em 30 μl de água ultrapura, colocadas em termociclador por 10 minutos a 95°C para o rompimento das células bacterianas e liberação do DNA. O DNA bacteriano obtido foi então utilizado em uma nova reação de PCR, com as mesmas condições e *primers* descritos anteriormente, para verificar quais as colônias continham o inserto de interesse. Os produtos das amplificações foram novamente verificados em gel de agarose 1% e visualizados em transluminador de luz UV.

Para cada indivíduo foram selecionadas de 8 a 12 colônias verdadeiras cujos produtos de PCR foram analisados com o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) da empresa Macrogen (Coréia do Sul). As amostras foram sequenciadas em ambas as direções (*forward* e *reverse*) e uma nova variante foi considerada um novo alelo somente quando ele apareceu no mínimo em dois PCRs independentes ou em dois ou mais indivíduos, seguindo os critérios definidos pelo comitê de nomenclatura e definição de novos alelos para MHC (Marsh *et al.*, 2001, 2002).

5.3 Análises Estatísticas

5.3.1 Variabilidade genética e estrutura populacional

Os eletroferogramas foram revisados e editados utilizando-se o programa Chromas 2.33 (<http://www.thecnelysium.com.au/chromas.html>) e alinhados no programa Clustal W, algoritmos implementados no programa Mega 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). O software DnaSP 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2003; Librado e Rozas, 2009) foi utilizado para definir os haplótipos (H) bem como para estimar a diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (*Hd*) de acordo com o descrito por Nei (1987). A diversidade genética dentro de cada população foi mensurada, ainda, pelo número de alelos por população (riqueza alélica, A), heterozigosidade observada (*Ho*) e a heterozigosidade esperada (*He*; Nei, 1987) de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW). Para isso foram utilizados os programas

Genepop 4.2 (Raymond e Rousset, 1995; <http://genepop.curtin.edu.au>) e Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier e Schneider, 2005). As relações entre os haplótipos foram estimadas utilizando-se a abordagem por *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999), implementada no programa Network 4.6.1.1 (www.fluxusengineering.com).

A estatística F de Wright (Wright, 1951) foi utilizada para analisar a estrutura populacional através do parâmetro F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984). Para verificar se a variabilidade genética encontrada dentro e entre as populações era significativa foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992). Estas análises foram implementadas no programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier e Schneider, 2005).

5.3.2 Detectando seleção

5.3.2.1 Seleção ao nível populacional

Para detectar seleção ao nível populacional foi utilizado, inicialmente, o teste de Hardy-Weinberg com a finalidade de identificar se a heterozigosidade observada foi significativamente diferente da esperada, baseada nas frequências alélicas dentro de cada população estudada.

A existência de seleção ao nível populacional também foi testada através dos cálculos de D de Tajima e de F_s de Fu para inferir desvios da neutralidade. O teste D de Tajima utiliza a diferença normalizada entre θ (estimada a partir do número de sítios segregantes [S]) e a média do número de diferenças de pares de bases entre as sequências (K) para determinar se alelos com frequência intermediária se encontram mais representados nas populações estudadas, como esperado sob seleção balanceadora (Tajima, 1989). Já o teste F_s de Fu leva em conta a polaridade das mutações e estima o θ baseado nos alelos derivados de mutações únicas (*singletons*) (Fu, 1997; Ramos-Onsins e Rojas, 2002). Valores negativos para essas estatísticas podem ser atribuídos à seleção purificadora ou à expansão populacional recente, enquanto que valores positivos são atribuídos à seleção balanceadora. Esses testes foram executados utilizando o programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier e Schneider, 2005)

5.3.2.2 Seleção ao nível molecular

Para detectar evidências de seleção ao nível molecular foram analisadas as taxas de substituição não sinônimas (d_N) por sítio não sinônimos, versus taxas de substituições sinônimas (d_S) por sítios sinônimos, códon-a-códon, utilizando o método de máxima verossimilhança, através do algoritmo codeml no programa PAML 4.2 (Yang, 1997; Yang, 2007). Utilizou-se modelos de seleção neutra versus seleção positiva, sendo eles M0 (taxa única) vs M3 (discreto), M1 (neutro) vs M2 (seleção positiva), M7 (beta) vs M8 (beta e omega). Diferenças estatísticas entre os modelos foram comparadas utilizando o método *likelihood ratio test* (LRT) no programa HyPhy. A proporção dos aminoácidos sob seleção em cada classe de omega foi inferido através da abordagem *Bayes Empirical Bayes* (BEB).

Mutações não sinônimas levam a mudanças na sequência de aminoácidos, portanto, esta taxa de substituição (d_N) representa a pressão de seleção sobre a proteína. Mutações sinônimas não mudam a sequência de aminoácidos, assim, sua taxa de substituição (d_S) é neutra no que diz respeito à pressão de seleção. A relação entre essas duas taxas (d_N/d_S) é uma medida da pressão de seleção, intitulado omega (ω) (Bielawski e Yang, 2005).

O esperado para regiões neutras é que acumulem ambos os tipos de substituições (sinônimas e não sinônimas) em uma taxa similar. Sendo assim, um excesso significativo de substituições não sinônimas ($\omega > 1,0$) é consistente com seleção positiva, enquanto um excesso significativo de substituições sinônimas ($\omega < 1,0$) é consistente com a ação de seleção negativa, ou purificadora, e quando as duas taxas de substituição são muito próximas entre si (ω próximo a 1,0) é considerada a evolução neutra (Hughes e Nei, 1988).

5.3.3 Análises filogenéticas

As relações filogenéticas entre os haplótipos foram inferidas utilizando o programa Mega 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) para as análises de *Neighbor-Joining* (NJ) e critérios de Máxima Verossimilhança (MV), incorporando o modelo de evolução molecular ao que melhor se ajustaram os dados. Para determinar o modelo apropriado de evolução de sequências nucleotídicas foi utilizado o critério de informação de Akaike (*Akaike Information Criterion*; AIC) implementado no programa jModelTest 0.1.1 (Posada e Crandall, 1998; Posada, 2008; Guindon e Gascuel, 2003). Para avaliar o suporte dos nós foram utilizadas 1000 replicações (*bootstrap*).

6 RESULTADOS

6.1 Locus DRB

6.1.1 Variabilidade genética

Nove populações, ao longo de toda a distribuição de *Ctenomys flamarioni*, foram amostradas, entre sete e doze indivíduos de cada população foram coletados, totalizando 86 indivíduos utilizados nesse estudo. Cada indivíduo teve de 8 a 12 sequências analisadas (270pb para o éxon 2 do locus DRB), gerando 727 sequências para cada primer (*forward* e *reverse*).

Após o critério de seleção para novos alelos (conforme Marsh *et al.*, 2001, 2002) foram identificados 12 haplótipos/alelos únicos, resultado de 12 sítios polimórficos. A diversidade haplotípica (Hd) foi 0,367 e a nucleotídica (π) de 0,001. Nenhum *indel* (inserção-deleção) foi encontrado entre as sequências e foram observadas 12 substituições (8 transições e 4 transversões, sendo 6 substituições sinônimas e 6 não sinônimas).

O alelo mais frequente (H2) foi compartilhado por todas as populações, o segundo mais frequente (H1) foi compartilhado entre as populações de Remanso, Bojuru, São José do Norte e Cassino. As populações de Xangri-lá e Remanso compartilharam um alelo (H9), assim como as de Remanso e Pinhal (H3), Xangri-lá e Bojuru (H6) e Remanso e São Simão (H5). As populações de Pinhal, São Simão, São José do Norte e Cassino tiveram um alelo exclusivo cada (H10, H4, H7 e H8, respectivamente), a população do Taim teve dois alelos exclusivos (H11 e H12) e a população do Chuí foi monomórfica para esse marcador. As relações entre os alelos estão representadas na figura 4.

A menor diversidade nucleotídica foi encontrada na população de Xangri-lá ($\pi = 0,0006$) e a maior na do Cassino ($\pi = 0,0037$), o mesmo padrão encontrado para diversidade haplotípica (em Xangri-lá: $Hd = 0,1775$ e em Cassino: $Hd = 0,6484$). Todas as populações apresentaram valores de heterozigosidade observada menor do que a esperada, mas o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) só foi significativo para déficit de heterozigotos nas populações do Taim e de São Simão. A menor heterozigosidade observada foi para a população do Taim, que não apresentou nenhum indivíduo heterozigoto, apesar de possuir dois alelos exclusivos, e a maior foi para a população do Cassino ($Ho = 0,429$) (Tab. 1).

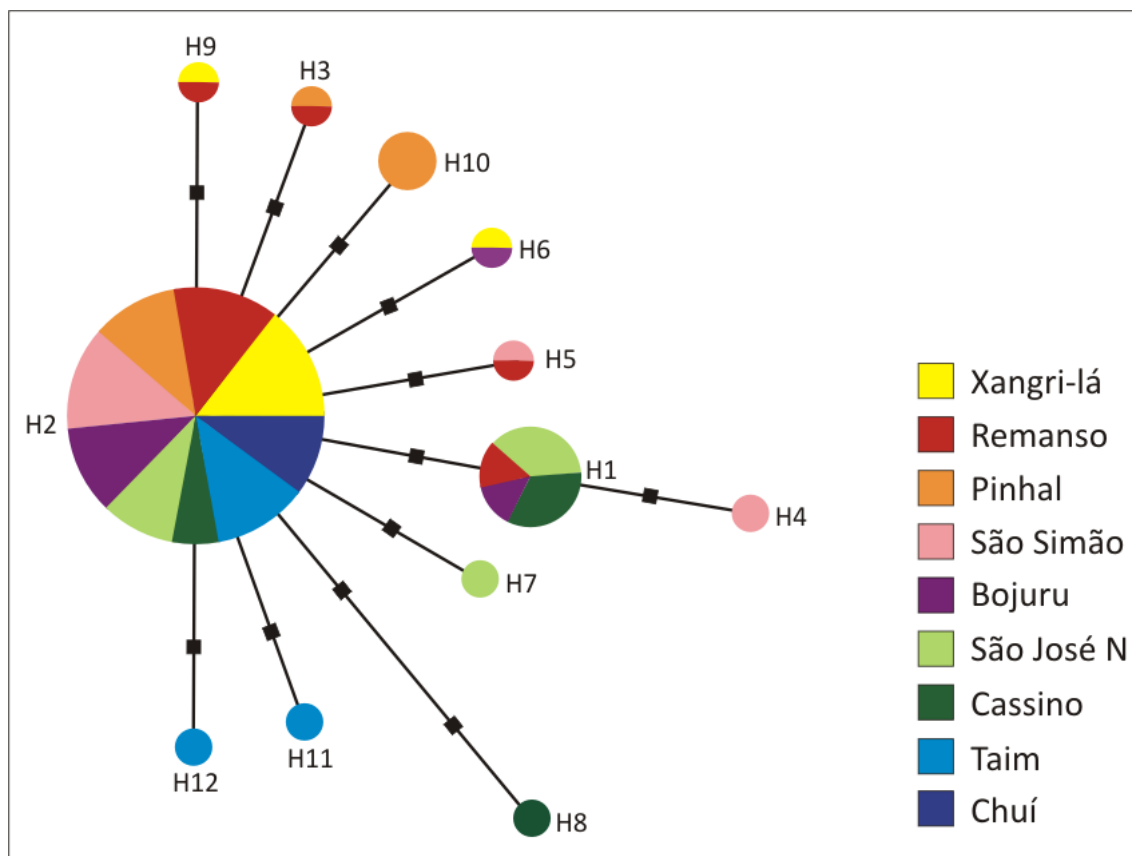


Figura 4. Relações entre os alelos observados para as seqüências do éxon 2 do *locus DRB* (MHC) para as populações de *Ctenomys flamarioni*, amostradas ao longo de sua distribuição geográfica. O tamanho dos círculos representa a frequência do alelo e os quadrados pretos uma mutação cada.

Tabela 1. Diversidade para o éxon 2 do *locus DRB* (MHC) nas populações de *Ctenomys flamarioni*: Xangri-lá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bojuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA) e Chuí (CH). Dados para: tamanho amostral (n), riqueza alélica (A), sítios polimórficos (sp), diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (Hd), heterozigiosidade observada (H_o) e esperada (H_e).

Pop	n	A	sp	$\pi \pm dp$	$Hd \pm dp$	H_o	H_e
XA	11	3	2	0,0006 \pm 0,001	0,1775 \pm 0,106	0,182	0,177
RE	12	5	4	0,0015 \pm 0,001	0,3768 \pm 0,122	0,250	0,377
PI	10	3	2	0,0013 \pm 0,001	0,3526 \pm 0,122	0,200	0,353
SS	11	3	3	0,0016 \pm 0,001	0,2554 \pm 0,116	0,091*	0,255
BU	8	3	2	0,0013 \pm 0,001	0,3417 \pm 0,140	0,250	0,342
SJ	10	3	2	0,0023 \pm 0,002	0,5684 \pm 0,086	0,300	0,595
CA	7	3	3	0,0037 \pm 0,003	0,6484 \pm 0,081	0,429	0,648
TA	10	3	2	0,0014 \pm 0,001	0,3579 \pm 0,126	0,000*	0,358
CH	7	1	0	0	0	0	-

*Valores significativos para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em negrito ($p < 0,05$).

6.1.2 Estrutura populacional

As estimativas de diferenciação genética, mensuradas pelo F_{ST} , indicam moderada estruturação genética ($F_{ST} = 0,093$) das populações estudadas. As estimativas pareadas indicam maior diferenciação entre a população do Cassino e as demais. As populações de Xangri-lá e Remanso tiveram o menor valor de F_{ST} (-0,002). Já Xangri-lá e Cassino apresentaram evidência de maior diferenciação genética ($F_{ST} = 0,221$). As diferenças par-a-par entre todas as populações são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Índices de fixação (F_{ST}) entre as populações de *Ctenomys flamarioni* para o éxon 2 do locus *DRB* (MHC). Populações: Xangri-lá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bojuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA) e Chuí (CH).

	XA	RE	PI	SS	BU	SJ	CA	TA	CH
XA	-								
RE	-0,002	-							
PI	0,056	0,037	-						
SS	0,027	-0,015	0,056*	-					
BU	0,016	-0,024	0,062	-0,016	-				
SJ	0,177*	0,070	0,166*	0,068	0,030	-			
CA	0,221*	0,119*	0,196*	0,112*	0,075	0,008	-		
TA	0,038*	0,034*	0,065	0,044	0,048	0,157*	0,189*	-	
CH	-0,002	-0,010	0,051	0,010	0,034	0,170*	0,205*	0,027	-

*Valores significativos de índice de fixação (F_{ST}) em negrito ($p < 0,05$)

A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para estimar a distribuição da variação genética entre e dentro dessas populações, os valores encontrados foram 9,38% e 90,62%, respectivamente, mostrando uma diferença genética significativa ($p < 0,01$). A maior parte da variação total correspondeu a diferenças entre os indivíduos e somente uma pequena parcela é resultante de diferenças entre as populações.

6.1.3 Detectando seleção

6.1.3.1 Seleção ao nível populacional

O teste de Hardy-Weinberg para o éxon 2 do *locus DRB* (MHC) apresentou heterozigiosidade observada (H_o) menor do que a esperada (H_e) em todas as populações estudadas e déficit de heterozigotos significativo para Taim e São Simão (Tab. 1).

Os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu foram negativos e significativos para as populações de Xangri-lá e Remanso. Para as outras populações nenhum resultado foi significativo e os testes não foram efetuados para a população do Chuí, já que essa população foi monomórfica para esse *locus* (Tab. 3).

Tabela 3. Valores dos testes D de Tajima e F_s de Fu para o éxon 2 do *locus DRB* (MHC) nas populações de *Ctenomys flamarioni*: Xangri-lá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bojuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA) e Taim (TA).

População	D de Tajima	p	F_s de Fu	P
XA	-1,514	0,041*	-1,974	0,003*
RE	-1,690	0,026*	-3,344	0,001*
PI	-0,812	0,227	-0,775	0,189
SS	-1,212	0,087	-0,398	0,238
BU	-1,038	0,216	-0,979	0,081
SJ	0,282	0,655	0,237	0,490
CA	0,255	0,597	0,900	0,676
TA	-0,769	0,225	-0,724	0,190

*Valores significativos indicados em negrito ($p < 0,05$)

6.1.3.2 Seleção ao nível molecular

Os resultados para as taxas de substituição (d_N/d_S), comparando os modelos neutros ou discretos com os de seleção positiva, não apresentaram diferenças estatísticas significativas, indicando que a maior parte dos códons do éxon 2 do *locus DRB* está sob evolução neutra (Tab. 4). Os testes indicaram uma tendência para as substituições sinônimas, onde 99% dos sítios apresentou $\omega < 1,0$. Apenas 1% dos sítios indicaram estar sob seleção positiva ($\omega = 24$) evidenciado nos modelos M3 e M2 para o aminoácido Arginina na posição 32, embora a probabilidade posterior bayesiana seja $> 0,05$ (Tab. 4).

Table 4. Parâmetros estimados, em diferentes modelos de substituição de códons, para o éxon 2 do gene *DRB* (MHC) em *Ctenomys flamarioni*: ω = taxa d_N/d_S ; p = proporção de códons em cada classe ω ; M0-M3: χ^2 df=4; M1-M2: χ^2 df=2; M7-M8: χ^2 df=2.

Modelo	ω^a	Est. dos parâmetros ^b	l	p	Sítios selec. ^c
M0: one-ratio	0,59	$\omega=0,59$	-441,88		
M3: discreto	0,77	$p_0=0,00001$, $p_1=0,98$ ($p_2=0,0138$), $\omega_0=0,45$ $\omega_1=0,45$, $\omega_2=24,01$	-440,86	0,72	Não
M1: neutro	0,49	$p_0=0,50$, ($p_1=0,49778$) ($\omega_0=0,0000$), ($\omega_1=1$)	-441,46		
M2: seleção	0,77	$p_0=0,98$, $p_1=0,000$ ($p_2=0,013$) ($\omega_0=0,452$) ($\omega_1=1$), $\omega_2=24,02$	-440,86	0,54	32 R
M7: beta	0,50	$p=0,005$, $q=0,005$	-441,46		
M8: beta e ω	0,79	$p_0=0,98$, ($p_1=0,0136$) $p=86,24$, $q=99,0$, $\omega=24,60$	-440,87	0,55	32 R

^a d_N/d_S taxa média ao longo dos códons; ^b Estimativas dos parâmetros, parênteses indicam parâmetros fixados; ^c Sítios selecionados, probabilidades posteriores dos sítios selecionados positivamente <0,05.

6.1.4 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram feitas comparando nossos dados com os obtidos em estudos anteriores, com outras espécies de ctenomídeos, para o mesmo *locus* (Cutrera e Lacey, 2006, 2007; Cutrera *et al.*, 2010; Cutrera *et al.*, 2011). As sequências foram obtidas no GenBank para as seguintes espécies e seus respectivos números de acesso: *Ctenomys argentinus* (EU035199 / EU035200), *C. australis* (EU035205 / GQ497462 / GQ497463 / GQ497464 / GQ497465 / GQ497466 / GQ497467 / GQ497468 / GQ497469 / GQ497470), *C. boliviensis* (EU035179), *C. conoveri* (EU035201), *C. frater* (EU035180 / EU035181), *C. goodfellowi* (EU035186), *C. haigi* (EU035206 / EU035207), *C. maulinus* (EU035208), *C. mendocinus* (EU035202), *C. opimus* (EU035183 / EU035184), *C. pearsoni* (EU035185 / EU035187 / EU035188 / EU035189), *C. porteousi* (EU035190), *C. rionegrensis* (EU035191 / EU035203), *C. sociabilis* (EU035204), *C. steinbachi* (EU035182), *C. talarum* (DQ380431 / DQ380432 / DQ380433 / DQ380434 / DQ380435 / DQ380436 /

DQ380437 / DQ380438 / DQ380439 / DQ380440 / DQ380441 / DQ380442 / DQ380443 / DQ380444 / DQ380445 / DQ380446 / DQ380447 / DQ380448 / DQ380449 / JF799108 / JF799109 / JF799110 / JF799111 / JF799112 / JF799113 / JF799114 / JF799115 / JF799116 / JQ317129 / JQ317130) e *C. torquatus* (EU035192 / EU035193 / EU035194 / EU035195 / EU035196 / EU035197 / EU035199). Para grupo externo foi utilizada uma sequência de *Octodon* sp. (EU035178).

O modelo de evolução de sequências nucleotídicas ao que melhor se ajustaram nossos dados foi o TPM+I+G, utilizado para as análises de Máxima verossimilhança (MV) e Neighbor-joining (NJ). As árvores geradas nas duas análises recuperaram os mesmos grupos e os valores de suporte dos ramos foram semelhantes, por isso apresentamos somente a árvore gerada a partir da análise de Neighbor-joining (Figs. 5a e 5b). Foram realizadas 1000 replicações (*bootstrap*) para avaliar o suporte dos ramos e no geral nenhuma das análises proveu bons suportes para os clados propostos.

Apesar disso, todas as amostras de *C. flamarioni* ficaram no mesmo subclado, junto com as espécies do grupo *mendocinus*, um indivíduo de *C. conoveri* e um de *C. argentinus* (Fig. 5b). Apenas um indivíduo de *C. australis* e um de *C. rionegrensis* ficaram fora do agrupamento *mendocinus*. Os três indivíduos que representam o grupo *boliviensis* (*C. boliviensis*, *C. goodfellowi* e *C. steinbachi*) ficaram no mesmo subclado (Fig. 5a). Os outros grupos não foram recuperados através do marcador de MHC ou a amostra foi pequena para qualquer avaliação.

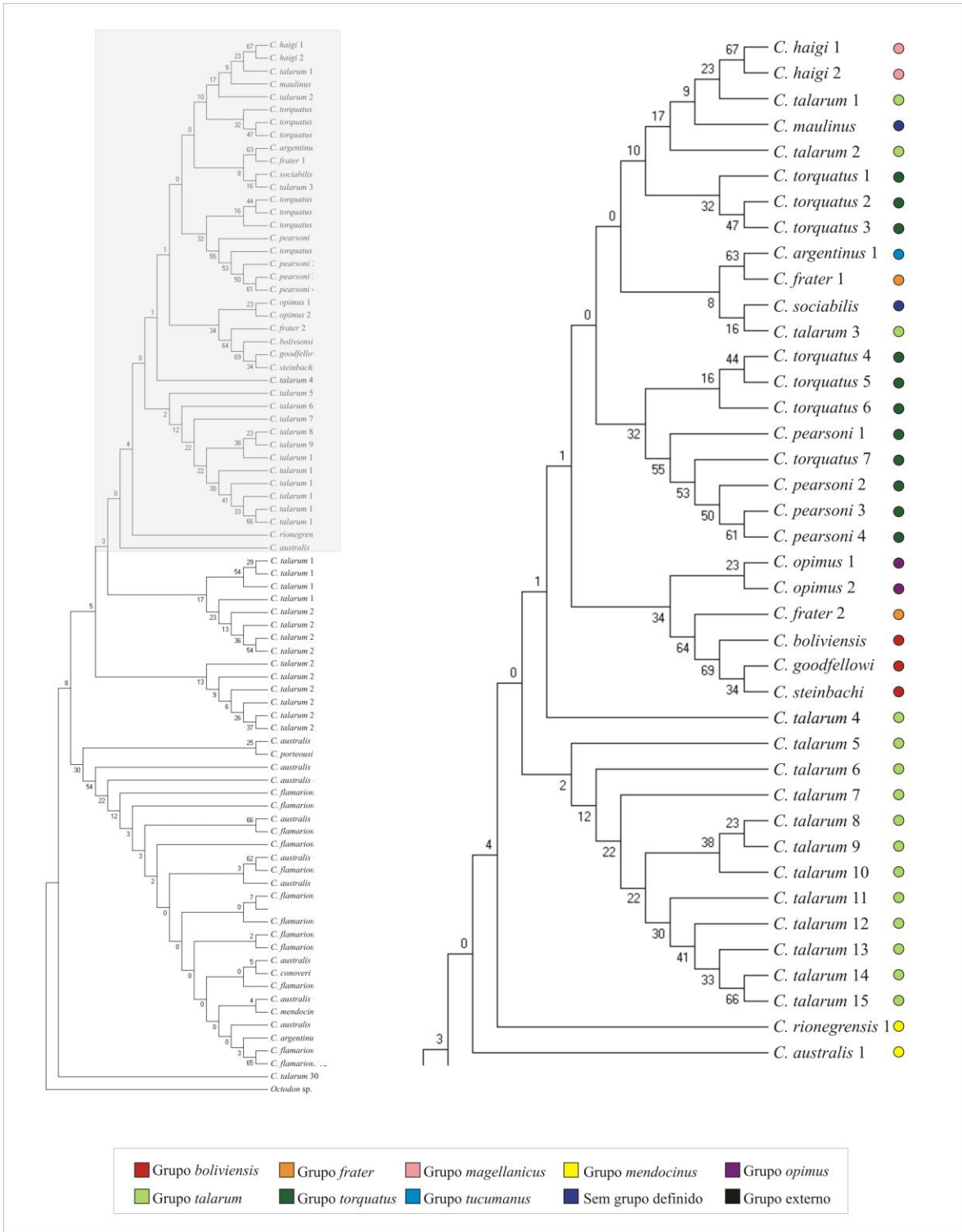


Figura 5a. Árvore filogenética de Neighbor-joining com base em 270pb para o éxon 2 do locus DRB (MHC) para *Ctenomys flamarioni* e demais ctenomídeos (detalhe superior).

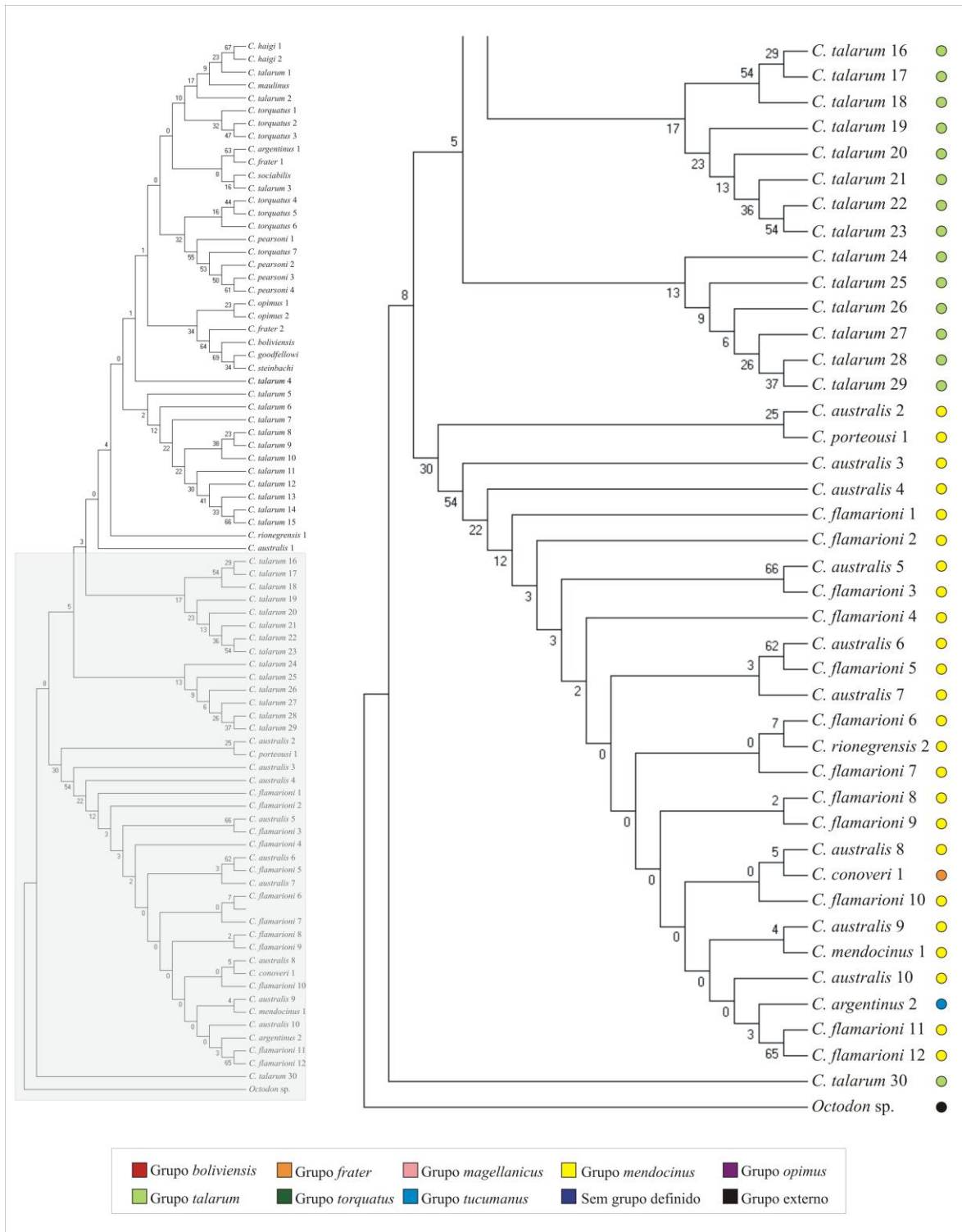


Figura 5b. Árvore filogenética de Neighbor-joining com base em 270pb para o éxon 2 do *locus DRB* (MHC) para *Ctenomys flamarioni* e demais ctenomídeos (detalhe inferior).

6.2 Locus *DQA*

Para o *locus DQA* foram analisados 26 indivíduos, com uma média de oito a doze sequências para cada um, totalizando 253 sequências. Dessas, 182 foram muito divergentes entre si e também quando comparadas com as encontradas para outras espécies de ctenomídeos, levando-nos a acreditar que sejam pseudogenes. As outras 71 sequências são semelhantes às encontradas em outros ctenomídeos e foram todas iguais entre si. O número de sequências por indivíduo, descartando as que consideramos como possíveis pseudogenes, foi inferior a cinco, não atendendo ao critério de identificação para novos alelos (conforme Marsh *et al.*, 2001, 2002) e por isso não seriam confiáveis para a continuação do trabalho. Devido ao baixo número de sequências para cada indivíduo, e por serem todas iguais, não utilizamos esse *locus* nas análises.

7 DISCUSSÃO

7.1 Diversidade genética estruturação populacional

As diversidades haplotípica e nucleotídica encontradas nesse estudo, para o *locus DRB* (éxon 2) de *C. flamarioni*, foram consideradas de moderadas a baixas ($Hd = 0,367$ e $\pi = 0,001$), num total de 12 haplótipos/alelos em 86 indivíduos. Em estudo anterior com a mesma espécie, utilizando a Região Controladora (mtDNA), também foi encontrado um padrão de baixa variabilidade: um total de sete haplótipos em 89 indivíduos estudados, com a maioria das populações apresentando diversidade haplotípica $Hd = 0,00$ e a população com maior diversidade teve $Hd = 0,682$ (Fernández-Stolz, 2007).

Quando comparamos esses valores com os encontrados em outros estudos com ctenomídeos, também utilizando a Região Controladora (mtDNA), constatamos que a baixa variabilidade não é um padrão para as espécies do gênero: para *C. torquatus*, espécie que possui uma distribuição ampla pelo pampa gaúcho e parte do Uruguai, a diversidade haplotípica variou entre $Hd = 0,81$ (Fernandes, 2008) e $Hd = 0,91$ (Roratto, 2012); para *C. lami*, outra espécie que ocorre no Estado do Rio Grande do Sul, mas que possui uma distribuição restrita e está ameaçada de extinção, a diversidade haplotípica foi 0,87 (Lopes e Freitas, 2012); para a espécie *C. australis*, que é mais próxima filogeneticamente de *C. flamarioni*, e possui o mesmo tipo de distribuição (quase que exclusivamente restrita à primeira linha de dunas costeiras), a diversidade haplotípica foi 0,83 (Mora *et al.*, 2006).

Comparando os dados obtidos para o *locus DRB* (MHC) com os obtidos a partir de marcadores neutros de microssatélites para a mesma espécie (Fernández-Stolz *et al.*, 2007), os valores de frequência alélica média para MHC foram maiores (0,312 para MHC e 0,149 para microssatélites). Comparando os dados de MHC com os obtidos para o mesmo *locus* em outra espécie do gênero, *C. talarum* (Cutrera e Lacey, 2006), os valores de frequência alélica média nas duas espécies foi muito parecida (0,312 para *C. flamarioni* e 0,316 para *C. talarum*) (Tab. 5).

Os valores de heterozigosidade observada foram mais baixos, tanto quando comparados com o mesmo *locus* para *C. talarum* quando comparados com marcadores microssatélites de *C. flamarioni*. A heterozigosidade observada para MHC foi menor do que para microssatélites mesmo nas populações de Xangri-lá e Remanso, que passaram por

reduções populacionais recentes (gargalos-de-garrafa) identificados em estudo anterior (Fernández-Stolz *et al.*, 2007) (Tab. 5, Fig. 6 e Fig. 7).

Tabela 5. Comparação dos índices de diversidade de *Ctenomys flamarioni* e *Ctenomys talarum* para marcadores de microssatélites e para o éxon 2 do locus *DRB* (MHC), dados para: número amostral por população (*n*), heterozigosidade observada (*Ho*), heterozigosidade esperada (*He*), número médio (ou absoluto, no caso de MHC) de alelos por locus (*A*), frequência de alelos por locus (*f*) e frequência média de alelos por marcador por espécie (*f_m*). Populações de *C. talarum*: Mar de Cobo (MC), Necochea (NE). Populações de *C. flamarioni*: Xangri-lá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bojuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA) e Chuí (CH). Dados de microssatélites de *C. flamarioni* segundo Fernández-Stolz (2007). Dados para *C. talarum* segundo Cutrera e Lacey (2006).

Espécie	População	Locus	n	Ho	He	A	f	f _m
<i>C. flamarioni</i>	XA	<i>DRB</i> (éxon 2)	11	0,18	0,17	3,0	0,27	
<i>C. flamarioni</i>	RE	<i>DRB</i> (éxon 2)	12	0,25	0,37	5,0	0,42	
<i>C. flamarioni</i>	PI	<i>DRB</i> (éxon 2)	10	0,20	0,35	3,0	0,30	
<i>C. flamarioni</i>	SS	<i>DRB</i> (éxon 2)	11	0,09*	0,25	3,0	0,27	
<i>C. flamarioni</i>	BU	<i>DRB</i> (éxon 2)	8	0,25	0,34	3,0	0,38	
<i>C. flamarioni</i>	SJ	<i>DRB</i> (éxon 2)	10	0,30	0,59	3,0	0,30	
<i>C. flamarioni</i>	CA	<i>DRB</i> (éxon 2)	7	0,42	0,64	3,0	0,43	
<i>C. flamarioni</i>	TA	<i>DRB</i> (éxon 2)	10	0,00*	0,35	3,0	0,30	
<i>C. flamarioni</i>	CH	<i>DRB</i> (éxon 2)	7	0,00	-	1,0	0,14	0,312
<i>C. flamarioni</i>	XA	Microssatélite	24	0,36*	0,45	2,7	0,11	
<i>C. flamarioni</i>	RE	Microssatélite	30	0,37	0,41	2,7	0,09	
<i>C. flamarioni</i>	PI	Microssatélite	31	0,49	0,53	3,6	0,12	
<i>C. flamarioni</i>	SS	Microssatélite	13	0,41	0,51	2,6	0,20	
<i>C. flamarioni</i>	BU	Microssatélite	10	0,70	0,76	2,7	0,27	
<i>C. flamarioni</i>	SJ	Microssatélite	12	0,30	0,46	2,2	0,18	
<i>C. flamarioni</i>	CA	Microssatélite	8	0,21*	0,41	1,4	0,18	
<i>C. flamarioni</i>	TA	Microssatélite	22	0,36	0,48	1,3	0,06	
<i>C. flamarioni</i>	CH	Microssatélite	8	0,25	0,23	1,1	0,14	0,149
<i>C. talarum</i>	MC	<i>DRB</i> (éxon 2)	30	0,80	0,81	13,0	0,43	
<i>C. talarum</i>	NE	<i>DRB</i> (éxon 2)	30	0,63	0,60	6,0	0,20	0,317
<i>C. talarum</i>	MC	Microssatélite	72	0,41	0,39	3,7	0,05	
<i>C. talarum</i>	NE	Microssatélite	62	0,61	0,57	6,2	0,10	0,075

*Valores significativos para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em negrito.

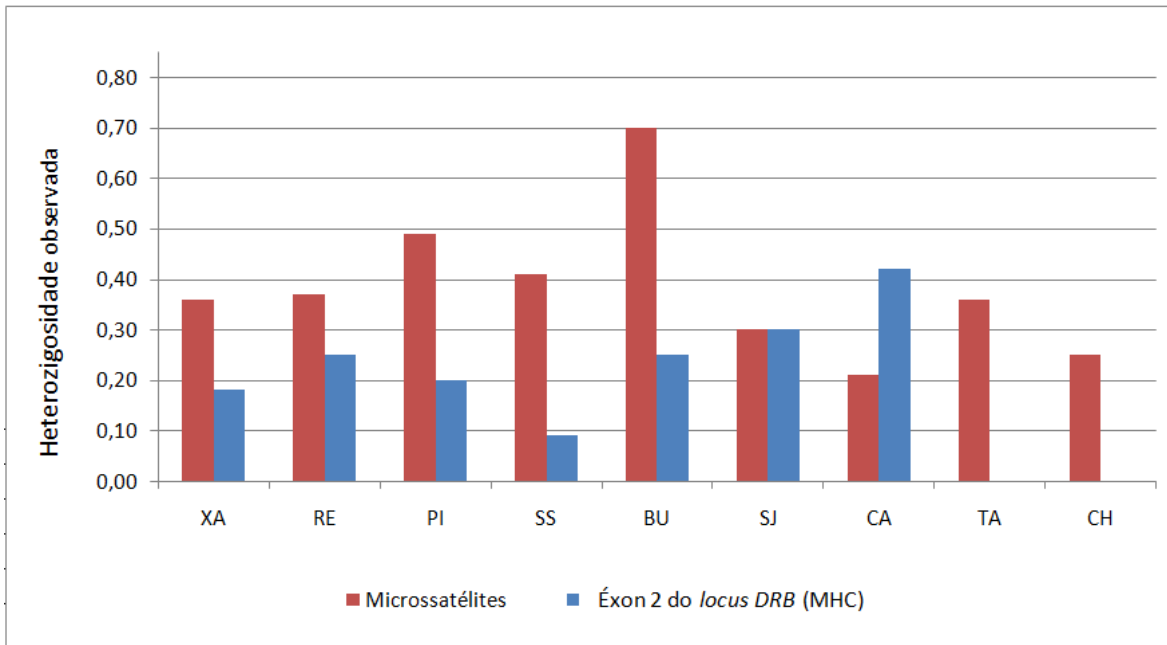


Figura 6. Comparação dos valores para heterozigidade observada em nove *loci* de microssatélites e para o éxon 2 do locus DRB (MHC), em nove populações de *C. flamarioni*: Xangri-lá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bojuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA) e Chuí (CH). Dados de microssatélites de *C. flamarioni* segundo Fernández-Stolz (2007).

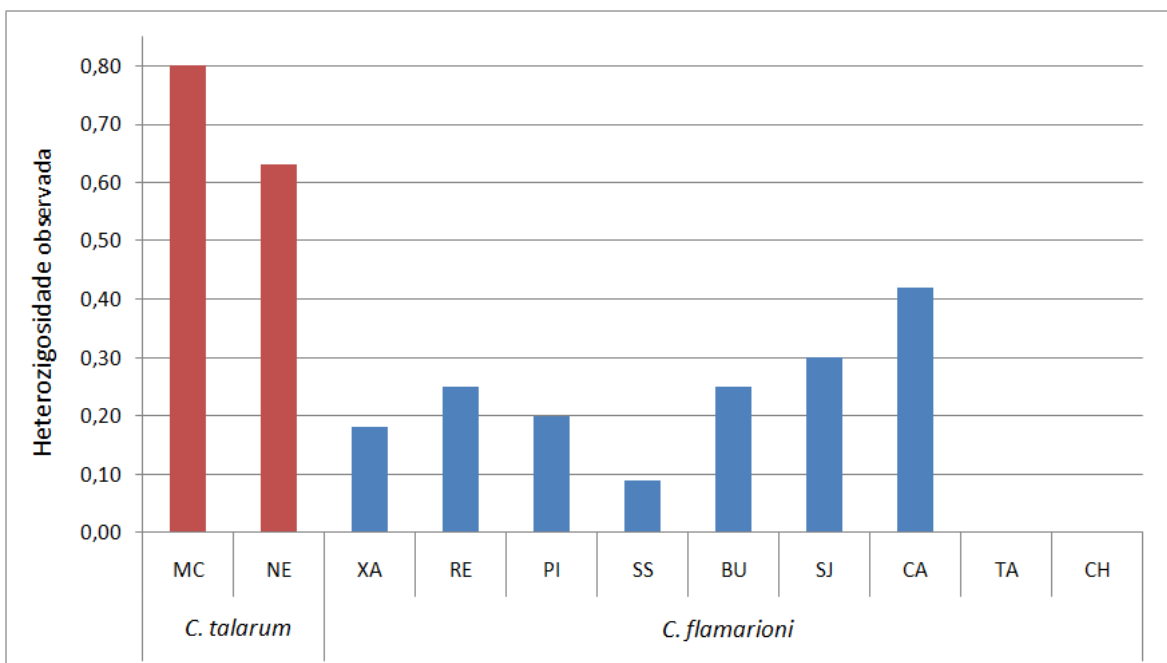


Figura 7. Comparação dos valores para heterozigidade observada nas populações de *Ctenomys talarum* e *C. flamarioni* para o éxon 2 do locus DRB (MHC). Populações de *C. talarum*: Mar de Cobo (MC), Necochea (NE). Populações de *C. flamarioni*: Xangri-lá (XA), Remanso (RE), Pinhal (PI), São Simão (SS), Bojuru (BU), São José do Norte (SJ), Cassino (CA), Taim (TA) e Chuí (CH). Dados para *C. talarum* segundo Cutrera e Lacey (2006).

Em estudo utilizando o mesmo *locus* (*DRB*, éxon 2) para duas populações de *C. talarum*, Cutrera e Lacey (2006) também encontraram valores de diversidade consideravelmente maiores do que os encontrados em nosso estudo. Essas autoras investigaram a influência da demografia na diversidade genética desse *locus* de MHC, comparando duas populações com diferentes densidades e estruturas de parentesco. Dado que se observa uma maior exposição a agentes patogênicos, e também um maior coeficiente de endocruzamento, em populações mais densas, se espera que esses fatores elevem o coeficiente de seleção e conseqüentemente aumentem a diversidade genética. Como esperado, os valores de diversidade haplotípica encontrados para a população com maior densidade, Mar de Cobo, foi 0,765 e para Necochea, com menor densidade, foi 0,605. Desta maneira, mesmo para a população de Necochea, com um coeficiente de seleção considerado baixo para MHC, a diversidade haplotípica foi praticamente o dobro da encontrada para *C. flamarioni* em nosso estudo (Tab. 5 e Fig. 7).

As menores diversidades nucleotídica e haplotípica foram encontradas para a população de Xangri-lá ($Hd = 0,1775$, $\pi = 0,0006$), que está no extremo norte da distribuição dessa espécie. Além da instabilidade natural, típica do ecossistema de dunas, determinado pelo regime de ventos e marés, o litoral norte do Rio Grande do Sul sofre com uma crescente ocupação humana. A exploração imobiliária e turística é muito desenvolvida nessa região, acompanhada da introdução de espécies exóticas e extração de areia, dentre outros fatores, que causam a redução e fragmentação desse ambiente (Fernández-Stolz, 2007).

Em estudo utilizando marcadores microssatélites foi detectado para Xangri-lá e Remanso, populações do litoral norte da distribuição, reduções significativas dos tamanhos populacionais (Fernández-Stolz *et al.*, 2007). Essas reduções populacionais, e conseqüente redução da variabilidade genética, podem estar diretamente associadas à ocupação, degradação e fragmentação do habitat, que diminui o fluxo gênico entre as populações e permite que a deriva tenha um papel importante na perda da variabilidade. De acordo com o que indicam nossos resultados, essas reduções populacionais teriam afetado não somente os *loci* neutros, mas devem ter tido um papel importante na perda da variabilidade também no *locus* de MHC estudado.

Seguindo o padrão de baixa variabilidade dos índices de diversidade anteriores, a heterozigidade observada (H_o) foi menor do que a esperada para todas as populações estudadas e o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi significativo para déficit de heterozigotos para as populações do Taim e de São Simão. A menor heterozigidade observada foi para a população do Taim, que não apresentou nenhum indivíduo heterozigoto e a população do Chuí foi monomórfica para esse *locus*, essas duas populações se encontram no sul da distribuição de *C. flamarioni*. O litoral sul não possui fortes evidências de impacto antrópico, nem ocupação e fragmentação do habitat por ação humana, mas é uma região muito afetada pelos regimes de ventos e marés e um local de bastante instabilidade ambiental (Fernández-Stolz, 2007). Esses fatores estocásticos parecem estar contribuindo para a fragmentação e mesmo para a diminuição das populações, favorecendo a ação da deriva e acelerando a perda de alelos ao acaso. No caso da população do Chuí, a ausência de variabilidade observada poderia também estar associada ao fato de representar o limite sul da distribuição para esta espécie, tornando-a isolada e permitindo a troca de alelos somente com a população do Taim, que por sua vez também possui baixa variabilidade genética.

As populações do centro da distribuição também apresentaram baixos índices de variabilidade genética, embora não tão baixos quanto às dos extremos: para a população do Cassino foram obtidos os maiores valores de diversidades haplotípica, nucleotídica e de heterozigidade observada ($H_d = 0,6484$, $\pi = 0,0037$, $H_o = 0,429$). Estes valores concordam com o padrão observado em estudos anteriores: maiores índices de variabilidade para as populações localizadas na região central da distribuição da espécie, o que sugere uma história demográfica de maior estabilidade ao longo do tempo (Fernández-Stolz, 2007; Fernández-Stolz *et al.*, 2007).

Por outro lado, a distribuição característica de *C. flamarioni* (linear ao longo da planície costeira do Rio Grande do Sul), restringe o fluxo gênico no sentido norte-sul, o que se reflete em como os alelos foram compartilhados entre as populações. A maioria dos alelos foi compartilhada entre as populações vizinhas, ou bem próximas, e alguns alelos foram exclusivos, mostrando um certo isolamento geográfico entre elas. Os valores de F_{ST} foram menores para as populações vizinhas, sendo que o menor valor foi entre Xangri-lá e Remanso ($F_{ST} = -0,002$), as populações mais próximas geograficamente (2,5 km), e o maior valor foi entre Xangri-lá e Cassino ($F_{ST} = 0,221$), separados por uma grande

distância geográfica (354 km). Esses dados concordam com o encontrado para *loci* de microssatélites e mtDNA, os quais mostraram uma relação positiva de isolamento pela distância (Fernández-Stolz, 2007) esperado para uma espécie com baixa vagilidade e com uma distribuição linear.

O alelo mais frequente (H2), compartilhado entre todas as populações, pode ter sido mantido nas populações por favorecer a eliminação de algum patógeno específico de ampla distribuição. Muitos estudos com MHC têm apresentado associação entre alelos particulares de MHC e a resistência a infecção de certos parasitas (Apanius *et al.*, 1997; Sommer, 2005). Cutrera *et al.* (2011) reportaram associação significativa entre alelos do *locus DRB* e a carga parasitária, bem como grupos de alelos e a intensidade de resposta humoral contra novos antígenos. Isso indica que determinados alelos estão associados ao combate de certos parasitas e podem permanecer em maior proporção nas populações, dependendo a que tipo de parasitas os animais estão sendo expostos.

Como dito anteriormente, as populações de Xangri-lá e Remanso, no norte da distribuição, sofreram reduções populacionais recentes, detectadas através de marcadores neutros, assim como para a população de Bojuru (Fernández-Stolz, 2007). Os resultados para as populações do sul (Cassino, Taim e Chuí) mostraram a variabilidade mais baixa entre as estudadas, concordando com o esperado para populações que passaram por reduções demográficas, mas os testes estatísticos não puderam ser executados por essas populações não possuírem o número mínimo de *loci* polimórficos exigidos pelo programa (Fernández-Stolz, 2007). Esses resultados indicam que fatores além da ocupação humana estão moldando as histórias populacionais dessa espécie, a história de instabilidade do sistema costeiro deve ter tido um papel importante no padrão de variabilidade que vemos hoje nessa espécie. Tudo indica que as populações tiveram reduções tão consideráveis no seu tamanho que a perda da diversidade foi observada tanto em *loci* neutros quanto no *locus DRB*, e que a seleção não foi suficiente para reter a diversidade, mesmo para um *loci* que se espera estar sob seleção balanceadora.

Em outra análise, também com ctenomídeos, mas com outro *locus* de MHC (*DQB*) Hambuch e Lacey (2002) investigaram a influência da estrutura populacional na manutenção da variabilidade em *loci* neutros e de MHC em duas espécies, uma social, *C. sociabilis*, e outra solitária, *C. haigi*. Essas autoras encontraram valores iguais de

heterozigosidade observada para o *locus DQB* ($H_o = 0,818$) para as duas espécies, contrastando com os dados de microssatélites, que foram muito diferentes entre elas: para a espécie social os valores de heterozigosidade observada ficaram entre 0,000 e 0,300 e para a espécie solitária os valores ficaram entre 0,263 e 0,941.

Esses resultados indicam que a intensidade de seleção sobre o *locus* de MHC deve ter sido alta o suficiente para manter a diversidade, comparável a espécie solitária, e que o contato social é um fator importante, o qual afeta as pressões seletivas que mantêm a diversidade do sistema imune. A maior exposição a patógenos, e também o maior coeficiente de endocruzamento na espécie social, comparada à solitária, são fatores importantes que elevariam o coeficiente de seleção e conseqüentemente aumentariam a diversidade nos *loci* de MHC. Sendo *C. flamarioni* uma espécie solitária, fatores como endocruzamento e exposição a patógenos não seriam tão fortes como para elevar o coeficiente de seleção e esse poderia ser mais um motivo para explicar a baixa variabilidade encontrada nesse estudo.

Muitos estudos com espécies que passaram por severas reduções populacionais têm documentado reduzida diversidade tanto para *loci* neutros como para os do sistema MHC (Bollmer *et al.*, 2011; Babik *et al.*, 2012; Babik *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2012; Bollmer *et al.*, 2011; Eimes *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2004; Bollmer *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2012), sugerindo que a deriva genética tem sido mais importante que a seleção balanceadora, nesses casos.

Apesar da seleção balanceadora ter a capacidade de reter a diversidade, mesmo quando reduções severas do tamanho populacional levam à perda de variabilidade em outros *loci* do genoma (Aguilar *et al.*, 2004), quando o tamanho efetivo se torna muito pequeno, o coeficiente de seleção se torna tão baixo que passa a se comportar de maneira neutra (Maruyama e Nei, 1981; Kimura, 1983). Nossos resultados indicam que as reduções populacionais que ocorreram, detectadas através dos *loci* neutros influenciaram também o *locus* de MHC estudado e a seleção balanceadora não foi suficiente para manter a diversidade.

7.2 Detectando seleção

7.2.1 Seleção ao nível populacional

O teste de Hardy-Weinberg para o éxon 2 do *locus DRB* (MHC) apresentou heterozigosidade observada (H_o) menor do que a esperada (H_e) em todas as populações estudadas e déficit de heterozigotos significativo para Taim e São Simão, indicando que a seleção balanceadora não está sendo suficiente para manter a heterozigosidade desse *locus* nos indivíduos. Considerando que em uma população exposta a uma matriz de patógenos, os indivíduos heterozigotos são favorecidos por serem capazes de reconhecer e resistir a uma gama mais ampla de infecções, a perda dessa diversidade genética pode aumentar o risco de extinção, devido à diminuição da aptidão dos indivíduos, a perda da flexibilidade adaptativa e aumento da suscetibilidade a doenças (Allendorf e Luikart, 2007).

Já que os indivíduos heterozigotos não parecem estar sendo favorecidos, outro fator que pode estar influenciando diz respeito a seleção sexual. O acasalamento preferencial negativo, que poderia aumentar a aptidão dos indivíduos (já que um número maior de descendentes teria elevados níveis de MHC heterozigotos) (Penn e Potts, 1999; Bernatchez e Landry, 2003) pode não estar acontecendo e isso indicaria um elevado nível de endogamia nas populações. As consequências da endogamia podem levar a perda de aptidão reprodutiva, a expressão de alelos recessivos deletérios e a perda da flexibilidade adaptativa, tudo isso elevando o risco de extinções populacionais (Allendorf e Luikart, 2007).

Os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu foram negativos e significativos para as populações de Xangri-lá e Remanso. Valores negativos para essas estatísticas podem ser atribuídos à seleção purificadora ou à expansão populacional recente. Levando em consideração a história dessas populações, contadas através de *loci* neutros, esses valores possivelmente indicam que essas populações estão expandindo, já que elas passaram por reduções populacionais recentes (Fernández-Stolz *et al.*, 2007). Os valores não foram significativos para as outras populações, indicando que a seleção balanceadora não está sendo forte o suficiente para ser detectada através desses testes ou porque as diminuições populacionais foram tão importantes que a seleção balanceadora não foi capaz de reter a diversidade no *locus* estudado.

7.2.2 Seleção ao nível molecular

Os resultados para as taxas de substituição (d_N/d_S) mostraram uma tendência para as substituições sinônimas (a maioria dos resultados apresentou $\omega < 1.0$), apesar de não apresentarem diferenças estatísticas significativas entre modelos neutros e discretos e modelos de seleção positiva, indicando evolução neutra para esse *locus*, com uma tendência para seleção purificadora.

Se levarmos em consideração todas as histórias populacionais dessa espécie, as reduções populacionais e a perda da variabilidade podem estar relacionadas e os gargalos-de-garrafa-populacionais podem ter influenciado tanto na diversidade dos *loci* neutros quanto no *locus* de MHC. Tendo em vista uma recente meta-análise, que sugere que genes de MHC podem perder até 15% mais variação do que os *loci* neutros durante declínios populacionais, provavelmente pela perda de alelos raros durante o processo (Sutton *et al.*, 2011), podemos inferir que essas reduções, pelas quais passaram as populações desse estudo, podem ter sido fortes o bastante para deixar um sinal de seleção purificadora no *locus* estudado.

Olhando de um modo geral, os testes de seleção a nível populacional e a nível molecular indicam que a seleção não foi suficiente para manter a diversidade no *locus* de MHC. O padrão de perda de diversidade foi muito parecido tanto em populações que sofreram reduções recentes quanto em populações nas quais essa redução não foi detectada, ou não pode ser testada. Todos os testes indicaram uma tendência para seleção purificadora, o contrário do que se espera para um *locus* de MHC. Essa perda de diversidade pode estar associada ao ambiente instável aonde ocorre essa espécie, o que permite que fatores estocásticos desempenhem um papel importante nas dinâmicas populacionais e a perda de alelos ao acaso pode ser mais intensa nesse caso. Além disso, o isolamento entre as populações e sua distribuição linear ao longo da costa, que limitam o fluxo no sentido norte - sul, podem ser fatores determinantes na limitação da troca de genes e na manutenção da diversidade.

Estudos com outros *loci* de MHC são importantes para avaliar se esse é um padrão que se repete ao longo do genoma, já que alguns estudos indicam que a baixa diversidade em um *locus* de MHC pode ser compensada pela alta diversidade em outro, e que isso seria essencial para responder a uma gama maior de parasitas (por exemplo: Gómez *et al.*, 2010).

7.3 Análises filogenéticas

A árvore filogenética gerada a partir de nossos dados de MHC, juntamente com sequências de estudos anteriores para outras espécies do gênero, retornou valores de suporte baixos para os ramos, resultado de poucos sítios polimórficos. Apesar disso, o agrupamento *mendocinus* foi recuperado, corroborando com a filogenia do gênero, gerada a partir do marcador citocromo-*b* (Parada *et al.*, 2011), que identificou oito grupos de ctenomídeos.

Todas as sequências de *C. flamarioni* agruparam com as outras espécies do grupo *mendocinus* (*C. australis*, *C. mendocinus*, *C. porteousi*) demonstrando que as sequências geradas em nosso estudo são muito próximas das encontradas para as espécies do mesmo grupo. As espécies do grupo *boliviensis* (*C. boliviensis*, *C. goodfellowi*, *C. steinbachi*) também ficaram agrupadas.

Dois indivíduos da espécie *C. argentinus* ficaram bem distantes na árvore e duas espécies do grupo *frater* (*C. frater* e *C. conoveri*) também. Alguns indivíduos de *C. pearsoni* e *C. torquatus* formaram um subclado, mas 3 indivíduos de *C. torquatus* ficaram separados deles. Os outros grupos foram pouco representados para recuperar qualquer agrupamento: grupo *magellanicus* (*C. haigi*), grupo *opimus* (*C. opimus*), grupo *talarum* (*C. talarum*) e grupo *tucumanus* (*C. argentinus*).

Cutrer e Lacey (2007) encontraram 2 alelos de MHC (*DRB*, éxon 2) que foram compartilhados entre algumas espécies estudadas, demonstrando que esse não seria um bom marcador filogenético, já que o conjunto de dados obtido indica que o polimorfismo entre as espécies é resultado de seleção balanceadora. Elas sugerem que os fatores que estariam contribuindo para a discrepância entre as árvores geradas a partir de MHC e citocromo-*b* poderiam ser (1) a baixa amostragem, (2) os distintos padrões de herança e as taxas de mutação para MHC ou ainda (3) a recombinação, que teria um papel importante nos padrões de diversidade observados.

Apesar disso, todos os indivíduos de *C. flamarioni* ficaram no mesmo subclado, mais uma indicativa de que esse marcador pode estar se comportando de forma neutra nessa espécie. Isso pode ser resultado dos declínios populacionais que levaram à baixa variabilidade genética encontrada em vários *loci* estudados nessa espécie (região

controladora, citocromo-*b* e microssatélites). A retenção de alelos muito parecidos pode também ser resultado de uma pressão de seleção, em algum momento da história, para os mesmos tipos de patógenos, já que alguns estudos indicam uma associação entre alelos particulares de MHC e a resistência a infecção de certos parasitas (por exemplo Apanius *et al.*, 1997; Sommer, 2005, Cutrera *et al.*, 2011).

Mais estudos precisam ser feitos para investigar os tipos de parasitas aos quais estão sujeitos os indivíduos de *C. flamarioni* e se algum grupo de alelos pode estar associado ao combate desses patógenos, o que poderia ajudar a esclarecer os resultados encontrados nesse estudo.

8 CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir do éxon 2 do *locus DRB* do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) corroboram os estudos anteriores e relacionam *C. flamarioni* ao grupo *mendocinus*. A variabilidade encontrada para o marcador MHC é baixa quando comparada à encontrada em outros estudos com espécies do mesmo gênero e é, em geral, mais baixa do que a encontrada para marcadores neutros para a mesma espécie. Os resultados indicam que as reduções populacionais que ocorreram, detectadas através dos *loci* neutros, influenciaram também o *locus* de MHC estudado e que a seleção balanceadora não teria sido suficiente para reter a diversidade nesse *locus*. O padrão de perda de diversidade foi muito parecido tanto em populações que sofreram reduções recentes quanto em populações nas quais essa redução não foi detectada, o que leva a crer que o ambiente instável, aonde ocorre essa espécie, está desempenhando um papel importante nas dinâmicas populacionais. O *status* de conservação da espécie é considerado crítico, por todos os fatores que afetam a espécie, como a instabilidade do ambiente em que ocorrem, a fragmentação e destruição do habitat pela ação humana e pela sua baixa diversidade genética, especialmente em um *locus* importante do sistema imunológico. A perda dessa diversidade genética pode aumentar o risco de extinção, devido à diminuição da aptidão dos indivíduos, a perda da flexibilidade adaptativa e aumento da suscetibilidade a doenças, todos esses fatores aumentariam o risco de extinções locais colocando em perigo o futuro da espécie.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'sáber AN (1990) Paleoclimas quaternários e pré-história da América Tropical. Rev. Brasil. Biol. 50: 805-820.
- Anderson S, Yates TL, Cook JA (1987) Notes on Bolivian mammals 4. The genus *Cteronys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern lowlands. American Museum Novitates 2891: 1-20.
- Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK (1997) The nature of selection on the major histocompatibility complex. Crit. Rev. Immunol. 17: 179–224.
- Aguilar A, Roemer G, Debenham S *et al.* (2004) High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 3490-3494.
- Ackerman AL, Cresswell P (2004) Cellular mechanisms governing crosspresentation of exogenous antigens. Nat. Immunol. 5: 678–684.
- Alcaide M, Lemus JA, Blanco G, Tella JL, Serrano D, Negro JJ, Rodríguez A and García-Montijano M (2010) MHC diversity and differential exposure to pathogens in kestrels (Aves: *Falconidae*). Mol. Ecol. 19:691-705.
- Allendorf FW and Luikart G (2007) Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Malden, MA.
- Azurduy HF (2005) Una nueva especie fósil de *Ctenomys* (Rodentia) y breve panorama paleontológico del género en Bolivia. Kemppfiana 1: 29-39.
- Babik W, Durka W and Radwan J (2005) Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). Mol. Ecol. 14: 4249-4257.
- Babik W, Kawalko A, Wójcik JM and Radwan J (2012) Low Major Histocompatibility Complex Class I (MHC I) Variation in the European Bison (*Bison bonasus*). J. Heredity 103(3): 349–359.

- Bandelt HJ, Forster P and Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Becker L, Nieberg C, Jahreis K and Peters E (2009) MHC class II variation in the endangered European mink *Mustela lutreola* (L. 1761) - consequences for species conservation. *Immunogenetics* 61(4): 281-288.
- Bernatchez L and Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J. Evol. Biol.* 16: 363-377.
- Bielawski JP and Yang Z (2005) Maximum likelihood methods for detecting adaptive protein evolution, in *Statistical Methods in Molecular Evolution*, R. Nielsen, Editor. Springer-Verlag: New York. p. 103-124.
- Blouin MS, Parsons M, Lacaille V, Lotz S (1996) Use of microsatellite *loci* to classify individuals by relatedness. *Mol. Ecol.* 5: 393-401.
- Bollmer JL, Vargas FH, Parker PG (2007) Low MHC variation in the endangered Galápagos penguin (*Spheniscus mendiculus*). *Immunogenetics* 59: 593-602.
- Bollmer JL, Ruder EA, Johnson JA, Eimes JA and Dunn PO (2011) Drift and selection influence geographic variation at immune *loci* of prairie-chickens. *Mol. Ecol.* 20: 4695–4706
- Castillo HA, Cortinas MN and Lessa EP (2005) Rapid Diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*, Rodentia: Ctenomyidae) Contrasting Mitochondrial and Nuclear Intron Sequences. *J. Mammal.* 86: 170-179.
- Catzefflis F, Patton J, Percequillo A, Bonvicino C and Weksler M (2008). *Ctenomys flamarioni*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>.
- Cheng Y, Sanderson C, Jones M and Belov K (2012) Low MHC class II diversity in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Immunogenetics* 64: 525–533

Church JA (2001) How Fast Are Sea Levels Rising? *Science* 294: 802-803.

Corrêa ICS, Baitelli R, Ketzer JM and Martins R (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.

Cutrera AP and Lacey EA (2006) Major histocompatibility complex variation in talas tuco-tucos: the influence of demography on selection. *J. Mammal.* 87: 706-716.

Cutrera AP and Lacey EA (2007) Trans-species polymorphism and evidence of selection on class II MHC *loci* in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Immunogenetics* 59: 937-948

Cutrera AP, Lacey EA, Mora MS and Lessa EP (2010) Effects of contrasting demographic histories on selection at major histocompatibility complex *loci* in two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 99: 260-277.

Cutrera AP, Zenuto RR and Lacey EA (2011) MHC variation, multiple simultaneous infections and physiological condition in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 1023-1036

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

Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M *et al.* (2005) Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 7922-7927.

Doherty PC, Zinkernagel RF (1975) Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 complex. *Nature* 256:50-52

Eimes JA, Bollmer JL, Whittingham LA, Johnson JA, Van Oosterhout CV and Dunn PO (2011) Rapid loss of MHC class II variation in a bottlenecked population is explained by drift and loss of copy number variation. *J. Evol. Biol.* 24: 1847-1856.

- Ellegren H, Hartman G, Johansson M, Andersson L (1993) Major histocompatibility complex monomorphism and low-levels of DNA-fingerprinting variability in a reintroduced and rapidly expanding population of beavers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 8150–8153.
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L and Schneider S (2005) Arlequin version 3.0: an integrated software package for Population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- 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
- Fernandes FA (2008) Filogeografia de *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae). (Tese de Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Fernandes FA, Gonçalves GL, Ximenes SSF and Freitas TRO (2009b) Karyotypic and molecular polymorphisms in the *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae): taxonomic considerations. *Genetica* 136: 449–459.
- Fernández-Stolz GP (2007) Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia - Ctenomyidae), através de marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Fernández-Stolz GP, Stolz JFB and Freitas TRO (2007) Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco-das-dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. *J. Mammal.* 88: 935-945.

- Fontana CS, Bencke GA and Reis RE (2003) Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Freitas TRO (1994) Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Octodontidae) and its cytogenetic relationship with other species of the genus. *Cytogenet. Cell. Genet.* 67:193-198.
- Freitas TRO (1995a) Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Stud. Neotrop. Fauna and Environ.* 30: 53-59.
- Freitas TRO (1995b) Geographic distribution of sperm forms in the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Rev. Bras. Genet.* 18: 43-46.
- Freitas TRO (2001) Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in southern Brazil: *Ctenomys lami* Spec. Nov. separated from *C. minutus* Nehring 1887. *Stud. Neotrop. Fauna and Environ.*, 36: 1-8.
- Freitas TRO (2007) *Ctenomys lami*: the highest chromosomal variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system. *Acta. Theriol.* 52 (2): 171-180.
- Freitas TRO, Fernandes FA, Fornel R and Roratto PA (2012) An endemic new species of tuco-tuco, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), with a restricted geographic distribution in southern Brazil. *J. Mammal.* 93(5): 1355-1367.
- Freygang, CC, Marinho JR and Freitas TRO (2004) New karyotypes and some considerations about the chromosomal diversification of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) on the Coastal Plain of the Brazilian state of Rio Grande do Sul. *Genetica* 121(2): 125–132.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925
- Garrigan D and Hedrick PW (2003) Detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution* 57: 1707-1722.

- Gómez D, Conejeros P, Marshall SH, Consuegra S (2010) MHC evolution in three salmonid species: a comparison between class II alpha and beta genes. *Immunogenetics* 63(6): 395.
- Guindon S and Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Hambuch TM and Lacey EA (2002) Enhanced selection for MHC diversity in social tuco-tucos. *Evolution* 56: 841-845.
- Hawley DM, Fleischer RC (2012) Contrasting Epidemic Histories Reveal Pathogen-Mediated Balancing Selection on Class II MHC Diversity in a Wild Songbird. *PLoS ONE* 7(1): e30222.
- Hedrick PW, Lee RN, Garrigan D (2002) Major histocompatibility complex variation in red wolves: evidence for common ancestry with coyotes and balancing selection. *Mol. Ecol.* 11: 1905–1913
- Hedrick PW, Parker KM, Gutiérrez-Espeleta GA, Rattink A and Lievers K (2000) Major histocompatibility complex variation in the Arabian oryx. *Evolution* 54: 2145-2151.
- Hedrick PW, Parker KM, Miller EL and Miller PS (1999) Major histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski's horse. *Genetics* 152: 1701-1710.
- 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.
- Hoelzel ARJ, Stephens JC and O'Brien SJ (1999) Molecular genetic diversity and evolution at the MHC *DQB* locus in four species of pinnipeds. *Mol. Biol. and Evol.* 16: 611-618.
- Honeycutt RL (2009) Rodents (Rodentia). In *The Timetree of Life*, SB. Hedges and Kumar (eds). Pp. 490-494.

- Hughes AL and Hughes MK (1995) Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics* 42: 233–243.
- Hughes AL and Nei M (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I *loci* reveals overdominant selection. *Nature* 335: 167–170.
- Jensen PE (2007) Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat. Immunol.* 8: 1041–1048.
- Kimura M (1983) *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.
- Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (2000) *Life Underground: the biology of subterranean rodents*. The University of Chicago Press, Chicago and London, 449 pp.
- Lessa EP and Cook JA (1998) The Molecular Phylogenetic of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys* Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9:88-99.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Lopes CM and Freitas TROF (2012) Human Impact in Naturally Patched Small Populations: Genetic Structure and Conservation of the Burrowing Rodent, Tuco-Tuco (*Ctenomys lami*). *Journal of Heredity* 103(5): 672–681.
- Lukas D, Bradley BJ, Nsubuga AM, Doran-Sheehy D Robbins MM and Vigilant L (2004) Major histocompatibility complex and microsatellite variation in to populations of wild gorillas. *Mol. Ecol.* 13: 3389-3402.
- Marivaux LJJ, Welcomme M and JJ Jaeger (2002) The role of Asia in the origin and diversification of hystricognathous rodents. *Zoologica Scripta* 31: 225-239.
- Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE *et al.* (2001) Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 57: 236–283

- Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE *et al.* (2002) Nomenclature for factors of the HLA system. *Hum. Immunol.* 63: 1213–1268
- Mascheretti S, Mirol PM, Gimenez MD, Bidau CJ, Contreras JR, Searle JB (2000) Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidae), based on mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Biol. J. Linn. Soc.* 70: 361–376.
- Massarini AI and Freitas TRO (2005) Morphological and cytogenetic comparison in species of the *mendocinus*-group (genus *Ctenomys*) with emphasis in *C. australis* and *C. flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae). *Caryologia* 58: 21-27.
- Maruyama T and Nei M (1981) Genetic variability maintained by mutation and overdominant selection in finite populations. *Genetics* 98: 441-459.
- Medrano JF, Aesen E and Sharrow L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Mikko S, Andersson L (1995) Low major histocompatibility complex class-II diversity in European and North-American moose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 4259–4263.
- Mikko S, Roed K, Schmutz S, Andersson L (1999) Monomorphism and polymorphism at MHC DRB *loci* in domestic and wild ruminants. *Immunological Reviews* 167: 169–178.
- Miller HC, Lambert DM (2004) Genetic drift outweighs balancing selection in shaping post-bottleneck major histocompatibility complex variation in New Zealand robins (Petroicidae). *Mol. Ecol.* 13: 3709-3721.
- Miller HC, Allendorf F and Daugherty CH (2010) Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.) *Mol. Ecol.* 19: 3894–3908.

- Mora MS, Lessa EP, Kittlein MJ, and Vassallo AI (2006) Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys Australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *J. Mammal.* 87(6): 1192-1203.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK, the SNP workshop group (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 19: 208-216
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York
- Nowak RM (1999) *Walker's Mammals of the World*. Vol. 2. 6^a ed. Baltimore and London, Johns Hopkins University Press, pp 1243-1681.
- Oliver, MK and Piertney SB (2011) Selection Maintains MHC Diversity through a Natural Population Bottleneck. *Mol. Biol. Evol.* 29(7): 1713–1720
- Parada A, D'Elía G, Bidau CJ, Lessa EP (2010) Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) *J. Mammal.* 92(3): 671–682
- Penn DJ and Potts WK (1999) The evolution of mating preference and major histocompatibility complex genes. *Am. Nat.* 153: 145–164.
- Ploegh H and Watts C (1998) Antigen recognition. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 57-58.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7): 1253–1256.
- Posada D and Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- Radwan J, Kawalko A, Wójcik JM and Babik W (2007) MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Mol. Ecol.* 16: 531-540.

- Ramos-Onsins SE, and Rojas J (2002) Statistical properties of new neutrality test against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092-2100.
- Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- 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.
- Roratto PA (2012) Tuco-tucos do pampa rio-grandense: a filogeografia de *Ctenomys torquatus* (Rodentia - Ctenomyidae) e a descrição de uma nova espécie. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Rozas J, Sanchez-Del Barrio JC, Messeguer X and Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sambrook J, Russel DW (2002) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. (trans: Huang Pei-Tang *et al.*). Science Press, Beijing
- Scharf SJ, Long CM and Erlich HA (1988) Sequence analysis of the HLA DR beta and HLA DQ beta *loci* from the pemphigus vulgaris patients. *Hum. Immunol.* 22: 61-69.
- Sommer, S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front. Zool.* 2: 16.
- Smulders MJM, Snoek LB, Booy G and Vosman B (2003) Complete loss of MHC genetic diversity in the common hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands: consequences for conservation strategies. *Conserv. Genet.* 4: 441-451.
- Slade RW, Moritz C, Heideman A and Hale PT (1993). Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Mol. Ecol.* 2: 359–373.

- Slade RW, Hale PT, Francis DI, Marshall Graves JA and Sturm RA (1994) The marsupial MHC: the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, contain an expressed DNA-like gene on chromosome 1. *J Mol. Evol.* 38: 496-505.
- Slamovits CH, Cook JA, Lessa EP and Rossi MS (2001) Recurrent amplification and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): A phylogenetic approach. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1708-1719.
- Sutton JT, Nakagawa S, Robertson BC, Jamieson IG (2011) Disentangling the roles of natural selection and genetic drift in shaping variation at MHC immunity genes. *Mol. Ecol.* 20: 4408–4420
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739
- Taylor SS, Jenkins DA, Arcese P (2012) Loss of MHC and Neutral Variation in Peary Caribou: Genetic Drift Is Not Mitigated by Balancing Selection or Exacerbated by Mhc Allele Distributions. *PLoS ONE* 7(5): e36748
- Tomazelli LJ and Villwock JA (2000) O Cenozóico no Rio Grande do Sul Geologia da Planície Costeira. *In: M Holz and L F De Ros (eds) Geologia do Rio Grande do Sul. CIGOUFRGS, Porto Alegre, pp 375-406.*
- Van Tienderen PH, de Haan AA, Van der Linden G, Vosman B (2002) Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. *Trends Ecol. Evol.* 17: 577-582.
- Verzi DH, Olivares AI, Morgan CC (2010) The oldest South American tuco-tuco (late Pliocene, northwestern Argentina) and the boundaries of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammal. Biol.* 75: 243-252.

- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Westerdahl H, Wittzell H, Von Schantz T and Bensch S (2004) MHC class I typing in a songbird with numerous *loci* and high polymorphism using motifspecific PCR and DGGE. *Heredity* 92: 534-542.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Computer Applications in the Biosciences* 13: 555–556.
- Yang Z (2007) PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1586–1591.