

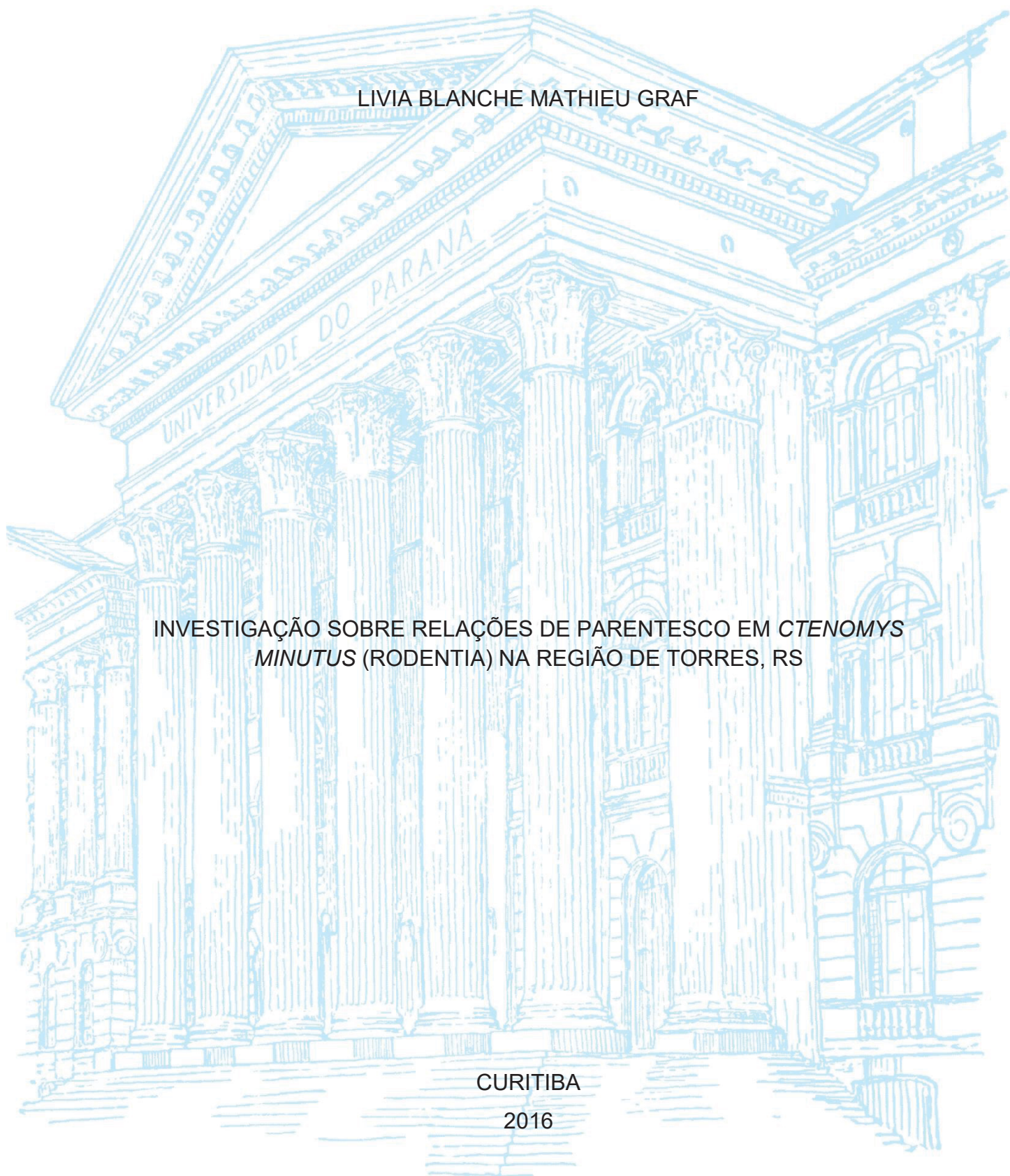
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIVIA BLANCHE MATHIEU GRAF

INVESTIGAÇÃO SOBRE RELAÇÕES DE PARENTESCO EM *CTENOMYS*
MINUTUS (RODENTIA) NA REGIÃO DE TORRES, RS

CURITIBA

2016



LIVIA BLANCHE MATHIEU GRAF

INVESTIGAÇÃO SOBRE RELAÇÕES DE PARENTESCO EM *CTENOMYS*
MINUTUS (RODENTIA) NA REGIÃO DE TORRES, RS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dr^a. Iris Hass

Co-orientador: Prof. Dr. Thales Renato O. de Freitas

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Graf, Livia Blanche Mathieu.

Investigação sobre relações de parentesco em *Ctenomys Minutus*
(Rodentia) na região de Torres, RS. / Livia Blanche Mathieu Graf. – Curitiba,
2016.

46 f. : il.

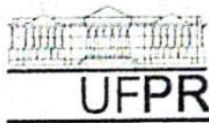
Orientadora: Iris Hass.

Coorientador: Thales Renato O. de Freitas.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Parentesco. 2. Rato. 3. Reprodução. 4. Animais - Comportamento. 5.
Roedores. I. Título. II. Hass, Iris. III. Freitas, Thales Renato O. de. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 599.352



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

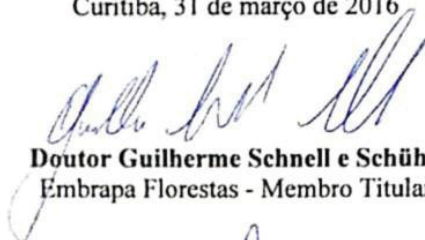


PARECER


Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **LÍVIA BLANCHE MATHIEU GRAF**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética são de parecer que se aprove a candidata.

Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.


Curitiba, 31 de março de 2016



Doutor Guilherme Schnell e Schühli
Embrapa Florestas - Membro Titular

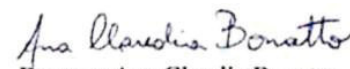


Doutor Daion Cledes Cardoso
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Membro Titular



Doutora Iris Hass
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto



Doutora Ana Claudia Bonatto
Vice-Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

Dedico esta dissertação aos meus avós e minha mãe pela fonte de amor inesgotável, incentivo, compreensão e constante presença em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dr^a. Iris Hass e Professor Dr. Thales Renato O. de Freitas pela orientação, amizade, pelo apoio, e principalmente pelo incentivo para que eu realizasse o curso de mestrado;

Aos técnicos e pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial a Doutoranda Mayara D. Medeiros pelo apoio, hospedagem e ensinamentos, a Doutoranda Sandra Bulau pelo auxílio de última hora e o Dr. Daniel Galiano pelo material fornecido e por tirar minhas dúvidas constantes.

A Flávia Schlichta por me apresentar novas ferramentas de estudo especialmente pelo ensino e colaboração na realização das técnicas e utilização de softwares para as análises do estudo.

Aos professores do PRPPGen, minha gratidão pela forma de conduzir o curso em todas as etapas.

A Dr^a Georgia Gelmini por auxiliar no andamento das análises do sequenciador.

A minha família, que por muitos encontros sentiram minha ausência. Em especial a minha prima Desiree Mathieu, que mesmo pelas circunstâncias esteve do meu lado me passando boas energias, muita força e palavras de apoio.

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos os colegas do curso de mestrado pelo convívio e pelos momentos de amizade em especial Amanda Soares, Gabriel Francisco Santos e Doutorando Tiago Dengrandi pela amizade e colaboração no desenvolvimento desta dissertação.

Ao meu companheiro Jefferson Santos pelo apoio e paciência ao longo do curso.

As minhas amigas eternas, Melina Seyfried, Mariana Feres, Fernanda Pegorini, Caroline Barboza e Fabiane Beatrice pela paciência de entender a minha ausência nos encontros marcados.

Aos meus colegas de trabalho que me auxiliaram no momento de desespero para formatação, correção e resumo da dissertação, em especial Camila Zanella, Carlos Henrique, Tiago Rosa e Jahyr Almeida.

Ao meu chefe Denis Martins pela paciência e confiança e por permitir tirar horas de trabalho para escrever a dissertação e ter reunião com os orientadores.

Pela minha mãe que em alguns momentos se preocupou em saber se estava comendo adequadamente preparando jantares especiais e me auxiliando na limpeza da casa nos momentos de escrita da dissertação.

E por último, mas não menos importantes aquelas pessoas que direta ou indiretamente participaram/acompanharam minha trajetória de mestrando não só dentro da universidade, mas também como amigos que fiz durante este período.

Muito obrigada!

RESUMO

O roedor subterrâneo *Ctenomys minutus* (tuco- tuco), vive na planície costeira da região sul do Brasil, registrado desde a praia de Laguna no Sul em Santa Catarina até a cidade de São José do Norte no Rio Grande do Sul. Com o objetivo de entender melhor sua forma de acasalamento e busca de parceiros, este estudo fez uso de sete marcadores microssatélites, desenvolvidos para a espécie *Ctenomys torquatus* (*Tor*), para análise de parentesco de uma população (47 indivíduos) de Torres –RS, remanejada para outro local devido a construção de um condomínio. O nível de diversidade genética foi analisada através do programa GenAlex e Microsatellite Toolkit. Para análise de parentesco foi utilizado o programa ML-Relate, onde foram estimados os graus de parentesco e as prováveis relações entre os indivíduos da população. Apenas um dos microssatélites, Tor 4 apresentou indicação de alelos nulos. O número de alelos variou de 5 a 8, com média de 7,8 por *loci*. A heterozigosidade observada variou entre 0,277 e 0,851 (média de 0,86) e heterozigosidade esperada variou entre 0,412 e 0,780 (média de 0,89). As análises de parentesco sugeriram uma relação de parentesco de 0 a 1 de verossimilhança. Os resultados indicaram que todos os indivíduos da população se encontram relacionados de alguma forma, com pouco indicativo de emigração de outros indivíduos. Foi encontrado dois machos alfa que contribuíram com maior frequência de parentesco na população.

Palavras-chave: *Ctenomys minutus*, relação de parentesco, Tuco – tuco, microssatélites.

ABSTRACT

The subterranean rodent with the biggest distribution, *Ctenomys minutus* (tuco- tuco), lives in the coastal plain of southern Brazil. Occurring from Laguna Beach in southern Santa Catarina to the city of São José do Norte in Rio Grande do Sul. With the objective of better understanding their way of breeding and finding partners, this study used seven microsatellite markers, developed for the species *Ctenomys torquatus* (Tor) for kinship analysis of a population (47 individuals) of Torres-RS, relocated to another location due to construction of a condominium. The level of genetic diversity was analyzed by GenAlex and Microsatellite Toolkit program. For kinship analysis it was used ML-Relate software, with which the degree of kinship and the probable relationships between individuals of the population were estimated. Only one of the microsatellites, Tor 4, showed indication of null alleles. The number of alleles ranged from 5 to 8, with an average of 7.8 per loci. The observed heterozygosity varied between 0.277 and 0.851 (an average of 0.86) and expected heterozygosity varied between 0.412 and 0.780 (an average of 0.89). The relationship analysis suggested a relatedness from 0 to 1 of verisimilitude. The results indicated that all individuals in the population are related in some way, with little indication of emigration from other individuals. It was found two alpha males who contributed most frequently kinship in the population.

Keywords: *Ctenomys minutus*, kin ship, tuco-tuco, microsatellite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das espécies do gênero <i>Ctenomys</i>	5
Figura 2: <i>Ctenomys minutus</i> (foto de Daniel Galiano).....	7
Figura 3: Imagem de satélite (Google Earth) mostrando uma parte da região de Torres –RS.....	9
Figura 4: Picos gerados pelo programa Peak scanner para o iniciador Tor 2.....	17
Figura 5 : Marcador Tor 9 e o excesso de picos.....	18
Figura 6: Distribuição dos indivíduos coletados.....	24
Figura 7: Foto da população de <i>Ctenomys minutus</i>	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características de 8 microssatélites isolados de <i>Ctenomys torquatus</i> (<i>Tor</i>).....	15
Tabela 2: Análise da diversidade genética: Na: número de alelos de cada loci; Ho e He: heterozigotidade observada e esperada.....	18
Tabela 3: Frequências alélicas dos microssatélites.....	20
Tabela 4: Número de homozigotos observado e esperado em cada locus.....	21
Tabela 5: Presença e ausência de alelos nulos em cada locos.....	21
Tabela 6: Locus com evidências de desequilíbrio de ligação.....	22
Tabela 7: Dados de coleta dos indivíduos de <i>Ctenomys minutus</i> , da região de Torres- RS.....	22
Tabela 8: Resultados para os pareamentos testados no programa ML Relate entre (M) machos versus (F) fêmeas de <i>Ctenomys minutus</i>	27
Tabela 9: Resultados para os pareamentos testados no programa ML Relate entre (F) fêmeas versus (F) fêmeas de <i>Ctenomys minutus</i>	28
Tabela 10: Resultados para os pareamentos testados no programa ML Relate entre (M) machos versus (M) machos de <i>Ctenomys minutus</i>	29
Tabela 11: Quantidade de relações de parentesco de cada indivíduo da população.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A ordem Rodentia	3
2.2 Família CTENOMYDAE e o gênero Ctenomys (Bleinville 1926)	4
2.3 Ctenomys minutus Neihring 1887	5
2.4 Região de Torres/ RS.....	7
2.5 Microssatélites.....	9
3 OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4 MATERIAIS E METODOS	13
4.1 Composição das amostras.....	13
4.2 Extração de DNA	13
4.3 Quantificação do DNA.....	14
4.4 Seleção dos Iniciadores de microssatélite e condições de amplificação.....	15
4.5 Genotipagem	15
4.6 Análise genética.....	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 Extração de DNA	17
5.2 PCR.....	17
5.3 Genotipagem	17
6 CONCLUSÃO	32
7 REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

A ordem Rodentia constitui o grupo de mamíferos mais diversificado do planeta (NOWAK, 1999). Distribui-se em todos os continentes com exceção da Antártica. Os habitats onde encontramos esses animais são bem variados, sendo desde terrestres à aquáticos ou semi-aquáticos e subterrâneos (NOWAK, 1999). Sendo este último habitat no qual os roedores possuem adaptações bem peculiares, vivendo parte de sua vida, seja para reprodução ou alimentação, chamados de fossoriais por definição (LACEY et al. 2000; NEVO, 1979) a maioria deles ocorrem em áreas abertas como savanas, estepes e regiões arenosas e podem ser encontrados em todos os continentes com exceção da Austrália (LACEY et al. 2000).

O gênero *Ctenomys*, único da família Ctenomyidae (LESSON, 1842), compreende 70 espécies fossoriais (BIDAU, 2015; GARDNER et al. 2014). Possuem adaptações para vida subterrânea como garras e musculatura bem desenvolvidas para cavar, principalmente dos membros anteriores. Tem hábitos solitários, onde cada indivíduo mantém seu sistema de túnel, com exceção de *C. sociabilis* que é social (LACEY, 2001).

Este gênero se distribui na porção centro-sul na América do Sul, ocorrendo desde a Bolívia e sul do Peru até a Terra do Fogo, na Argentina. Ao longo desta distribuição podem ser encontrados desde o nível do mar até 3.700 metros de altitude na Cordilheira do Andes no Peru (LACEY et al. 2000). A espécie deste estudo, *Ctenomys minutus* Nehring, 1887, se distribui na planície costeira da região sul do Brasil, registrada desde a praia de Laguna no Sul em Santa Catarina até a cidade de São José do Norte no Rio Grande do Sul.

Segundo Galiano (2015), a presença desta espécie afeta a biomassa de plantas da região onde ocorre, assim como a cobertura de gramíneas, solo menos compacto e grande quantidade de nutrientes encontrados, como fosfato e potássio, por conta de sua atividade de escavar e forragear. Este comportamento implica na manutenção do ambiente aonde esta espécie ocorre, demonstrando a grande importância de se estudar a biologia da conservação da espécie *C. minutus* em seu habitat natural.

A manutenção da diversidade genética é dos principais focos da biologia da conservação, já que é ela que pode evidenciar o potencial adaptativo/evolutivo de uma espécie. Os principais problemas para a conservação deste gênero estão relacionados a três fatores fundamentais: a instabilidade intrínseca de certos ambientes naturais onde elas ocorrem, a atividade antrópica crescente, e o escasso conhecimento que se tem sobre as características biológicas, ecológicas e genéticas deste grupo de roedores.

O objetivo deste estudo consiste em ampliar o conhecimento da espécie *C. minutus* através da descrição da diversidade genética e estabelecer as relações de parentesco, utilizando marcadores microssatélites, da população localizada em Torres/RS, onde os espécimes foram remanejadas para outro local devido a construção de um condomínio residencial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ordem Rodentia

A ordem Rodentia apresenta uma grande diversidade de espécies, com variação quanto ao tamanho do corpo e quanto à densidade populacional das espécies. As 2.277 espécies desta ordem são distribuídas em 34 famílias e 481 gêneros (HONEYCUTT, 2009), possuem uma grande quantidade de adaptações, que permitem estes animais viverem em diferentes habitats (NOWAK, 1999), que apresentam adaptações variadas e relacionadas aos diferentes habitats que ocupam praticamente todos os continentes. Normalmente, seus representantes são pequenos quando comparados com outras ordens de mamíferos, sendo o maior representante desta Ordem a capivara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, pertencente à família Hydrochaeridae, podendo chegar a 1,30 metros de altura e pesar até 50 Kg. Os menores representantes da família Muridae, cujos exemplares podem medir até 10 cm e pesar até 15 g (EISENBERG, 1981; SARAGE; LONG, 1986).

A principal característica dos roedores é a presença de sua dentição altamente especializada para roer. Todas as espécies de roedores possuem um par de incisivos na arcada dentária superior e inferior seguidos por um espaço, o diastema, e por um ou mais molares e pré-molares. Os roedores não possuem mais de quatro incisivos e nenhum roedor possui caninos. Seus incisivos não têm raiz e não são cobertos por esmalte, sendo assim, crescem continuamente e são desgastados no ato de roer, devido ao atrito e desgaste da dentina, o que mantém os dentes bastante afiados. Esse sistema de "cisalhamento" é muito eficiente e é uma das chaves do enorme sucesso dos roedores, pois se torna uma ferramenta bastante versátil, utilizada para cortar gramíneas, carregar a prole com delicadeza, raspar casca de árvore e até para cavar túneis (EMMONS; FEER, 1990; MUSSER; CARLETON, 2005; NOWAK (1999).

A ordem Rodentia é classificada em cinco famílias, distribuídas em quase todos os continentes exceto: Austrália e Antártica, são elas: Bathyergidae (África), Geomyidae (América do Norte), Muridae (ásia, Europa e África),

Octodontidae e Ctenomyidae (família com todas as espécies com comportamento subterrâneo) (América do Sul) (LACEY et al. 2000; NEVO, 1979; NOWAK, 1999).

2.2 Família CTENOMYDAE e o gênero Ctenomys (Bleinnville 1926)

Esta família compreende apenas um gênero: *Ctenomys* com 70 espécies (BIDAU, 2015; GARDNER et al. 2014). São animais com hábitos subterrâneos e sua morfologia é bem adaptada para este modo de vida: seu corpo é cilíndrico, cabeça grande, membros e pescoço curtos; possuem olhos pequenos; orelha reduzida e bula timpânica alargada. As espécies do gênero *Ctenomys* possuem massa corpórea que pode variar entre 100 a 1000 g (NOWAK, 1999).

Os representantes da família Ctenomyidae são popularmente chamados de Tuco-tucos, devido à vocalização que produzem (NEVO, 1979).

Normalmente são encontrados em dunas, ambientes abertos e campos naturais, com poucas espécies encontradas em ambientes florestais. Possuem uma ampla diversidade cariotípica, com números diplóides variando entre $2n=10$ em *C. ateinbachi* a $2n=70$ em *C. pearsoni* (ANDERSON et al. 1987; FREITAS, 1994; LACEY et al. 2000; ORTELLS et al. 1990; REIG et al. 1990), sendo *C. minutus* a espécie com maior variabilidade cromossômica entre os roedores subterrâneos (FREITAS, 1997; FREYGANG et al. 2004; GAVA; FREITAS, 2003).

O comportamento da espécie e estruturas de suas populações é condicionada pelo seu habitat subterrâneo, tendo populações fragmentadas devido a condições ecológicas e barreiras geográficas (COOK et al. 1990; NEVO, 1979; REIG et al. 1990). Por essas razões sugere-se que o fluxo gênico desta espécie seja baixa, devido a pouca mobilidade (vagilidade) (FREITAS, 1995; MALIZIA et al. 1995; NEVO, 1979; PEARSON et al. 1968; REIG et al. 1990).

No Brasil são encontrados oito espécies de Tuco-tucos. Três deles distribuíam-se no Estado de Mato Grosso e as outras cinco espécies apresentam distribuição para o Estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Figura 01) (BIDAU, 2015).

Os túneis servem como proteção para os ocupantes, sendo mantidos fechados em condições estáveis de temperatura, umidade, concentração de oxigênio, dióxido de carbono, etc. (MCNAB, 1966). Podem ser facilmente percebidos no campo pelos vários montículos de areia sobre a vegetação rasteira, caracterizando a existência das entradas dos túneis (GAVA, 1996).

Estes animais são herbívoros, alimentando-se de raízes, folhas, várias espécies vegetais e principalmente gramíneas. Pelo fato de terem hábitos fossoriais Influenciam muito no habitat, pois promovem aeração do solo, o que auxilia diretamente na população de plantas na região onde vivem (LOPES et al. 2015; VALLE et al. 2001; ZENUTO; BUSCH, 1998).

2.3 *Ctenomys minutus* Neihring 1887

C. minutus se distribui na planície costeira da região sul do Brasil, registrada desde a praia de Laguna no Sul em Santa Catarina até a cidade de São José do Norte no Rio Grande do Sul (Figura 1) (FREYGANG et al., 2004). Entre todas as espécies de tuco - tucos, esta é a que apresenta maior

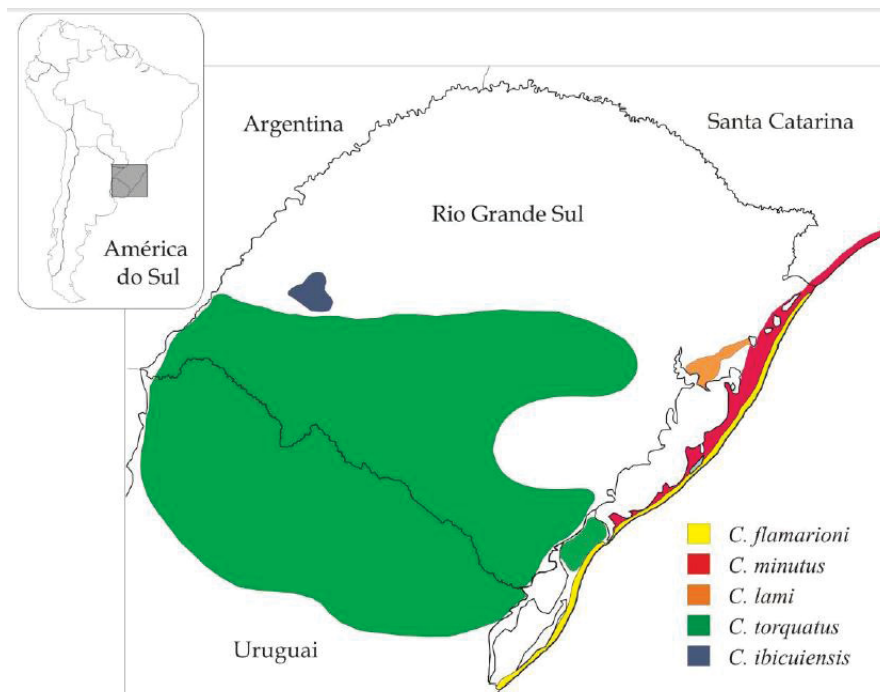


Figura 1: Distribuição das espécies do gênero *Ctenomys*. Fonte: Tatiane Noviski.

distribuição, vivendo em dunas costeiras e regiões arenosas, com distância aproximadamente de 2Km da costa, e tem como predadores naturais as corujas, cobras, gaviões, cachorros do mato e carcarás, comuns deste ambiente (FREITAS, 1995; LOPES et al., 2015). Esta espécie tem atraído interesse especial em termos de especiação e evolução em virtude de suas distribuições irregulares, baixa mobilidade, territorialidade e extensa variação cariotípica (REIG, 1990), que revelam possíveis processos de especiação, já que indivíduos híbridos são encontrados naturalmente.

A espécie se alimenta de uma grande variedade de vegetais, raízes e principalmente gramíneas. Um estudo realizado por Lopes et al. (2015) identificou através da análise das fezes de *C. minutus*, cerca de 13 famílias de plantas em sua dieta, com predominância das famílias Poaceae, Araliaceae, Fabaceae e Asteraceae.

Esta espécie cava túneis circulares, com uma entrada principal, e saídas laterais mais curtas, no seu interior são encontrados câmaras de repouso assim como palha, alimento e fezes (RUI; GASTAL, 1997). Como pequenos mamíferos roedores subterrâneos, eles possuem costume de recolher os alimentos acima do solo, não muito longe de suas tocas. Podem forragear nos túneis procurando raízes e caules subterrâneos, se alimentando ali mesmo, o que é muito favorável para a espécie já que o hábito de cavar túneis demanda de muito gasto energético (BUFFENSTEIN, 2000; COMPARATORE et al. 1995; MARTINO et al. 2007; VALLE et al. 2001).

Segundo Marinho; Freitas (2006) a razão sexual observada para esta espécie apresenta uma tendência a um número de fêmeas maior do que machos, o que provavelmente está relacionado com maior mortalidade e deslocamento dos machos para fixação de território e procura de fêmeas para acasalamento. *C. minutus* quando adulto possui uma coloração castanho médio/escuro (Figura 2), com a parte inferior castanho claro, já quando mais jovens (até três meses de idade), a coloração é mais clara (FONSECA, 2003; MARINHO; FREITAS, 2006).

Segundo Fonseca (2003), os machos de *C. minutus* são maiores do que as fêmeas, ambos com hábitos solitários.



Figura 2: *Ctenomys minutus* (foto de Daniel Galiano).

O período reprodutivo é no inverno. Em média cada fêmea gera dois filhotes, porém é possível observar acasalamento durante o ano todo (FONSECA, 2003).

2.4 Região de Torres/RS

Segundo Marinho; Freitas (2006) esta espécie sofre forte influência do uso de terras para agricultura e pecuária, assim como pela urbanização e drenagem de solos para cultivo de arroz.

Torres é um município do litoral brasileiro situado no extremo norte do estado do Rio Grande do Sul e compreende cerca de 264,5 km². A vegetação do local é representada por dunas costeiras com espécies herbáceas de rápido crescimento, que sobrevivem a condições de alta salinidade, fazendo parte do bioma da Mata Atlântica (FALKENBERG, 1999). Outros fatores abióticos também exercem influência na distribuição e crescimento da vegetação como restrição de nutrientes, umidade, mobilidade da areia e exposição aos ventos. (WILSON; SYKES, 1999). As dunas podem ser móveis ou fixas, com vegetação de restinga, paisagem que foi característica da planície costeira nos 610 km de costa litorânea no Rio Grande do Sul (BRACK, 2006).

Este ambiente sofre uma forte influência humana devido a: grande interesse imobiliário; retirada clandestina de areia; ocupação de áreas de

preservação permanente (dunas, margens de rios e lagoas definidas pelo Código Florestal Federal (Lei 4.771/1965); destinação inadequada de resíduos sólidos; uso indiscriminado de agrotóxicos; esgoto; desmatamento; queimadas; mineração (pedreiras); ausência de proteção à vegetação das áreas de preservação permanente; poluição dos mananciais hídricos e reprodução desordenada de pinus (*Pinus sp.*), que cresce como planta invasora, com sementes dispersas facilmente pelo vento (BRACK, 2006). Todas estas perturbações no sistema prejudicam o equilíbrio natural do ecossistema local, já que as populações de organismos estão troficamente interligadas, uma diminuição ou extinção de um organismo desestabiliza toda a comunidade biológica e ainda estes ecossistemas estão interligados com outros, direta ou indiretamente, podendo prejudicar todo o planeta (URBAN; FURTADO, 2006).

Na última década o Litoral Norte do Rio Grande do Sul apresentou o maior crescimento populacional (Figura 3), em termos relativos, com uma taxa anual de 2,81%, sendo maior do que o dobro das taxas anuais do Estado (1,23%) e do Brasil (1,63%), o que acaba por dificultar a conservação deste ambiente. (BRACK, 2006).

Apesar de *Ctenomys minutus* não estar no livro vermelho de espécies ameaçadas, todos estes fatores prejudicam a conservação de espécies encontradas no local, como ocorreu com *Ctenomys flamarioni*, que está registrada como espécie vulnerável (FERNANDES et al. 2007; FERNANDEZ-STOLZ et al. 2007; FREITAS, 2007; GAVA; FREITAS, 2003).



Figura 3: Imagem de satélite (Google Earth) mostrando uma parte da região de Torres-RS. A esquerda da imagem é possível perceber a região beira mar, no círculo o local onde foram coletadas as amostras utilizadas no trabalho. Nota-se a existência de uma grande ocupação humana ao redor do local de coleta.

Qualquer fragmentação no ambiente pode alterar o fluxo gênico da espécie, causar morte ou isolamento dos indivíduos, por isso é de extrema importância obter o máximo de dados sobre o comportamento reprodutivo, habitat, história e a genética para que possamos preservar e conservar estes pequenos roedores (GALIANO, 2015).

2.5 Microssatélites

Marcadores moleculares podem ser utilizados para estimar os parâmetros que permitam inferir a história evolutiva, estrutura populacional e ocorrência de fluxo gênico em populações naturais. Dentre esses marcadores, um dos mais utilizados são os microssatélites (BONVICINO et al. 2008; SELKOE; TOONEN, 2006).

Nos anos 80 diferentes experimentos demonstraram que existiam regiões com sequências repetitivas no genoma de muitos eucariontes, algumas mais simples outras mais complexas. As sequências simples repetitivas (SSR –

Simple Sequence Repeats) denominadas de microssatélites são compostas de até 1 a 4 nucleotídeos adjacentes repetidas em tandem. Em eucariontes estas repetições simples são mais frequentes, formando loci genéticos muito mais polimórficos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Marcadores microssatélites têm sido observados em muitos eucariontes, como baleias, seres humanos, *Drosophila*, roedores entre outros. Os elementos repetidos mais frequentes em mamíferos são extensões com nucleotídeos CA e TG. As regiões que contém estas sequências simples podem individualmente ser amplificadas através da técnica PCR a partir de um par de iniciadores que flanqueiam a região microssatélite (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Estudos com *locus* de microssatélites de população de *Ctenomys flamarioni* indicam a ocorrência de gargalos populacionais nos ambientes mais antropizados (FERNANDEZ-STOLZ et al. 2007, FERNANDES et al. 2007). Outro estudo utilizando microssatélites em espécies de *Ctenomys* foi realizado por Lacey (2001), que comparou duas populações de *Ctenomys* utilizando 15 *loci* microssatélites em *C. haigi* e *C. sociabilis*. Os resultados revelaram uma maior variabilidade genética em *C. haigi* (3-13 alelos por *loci*) do que em *C. sociabilis* (1-3 alelos por *loci*), assim como maior heterozigotidade, possivelmente devido a reduções históricas no tamanho populacional (por exemplo efeito de gargalo). Além disso, *C. sociabilis* tem poucas tendências migratórias e sociais, o que pode limitar a variabilidade genética. Estudos realizados por Tchaicka (2002) com a espécie *C. haigi*, analisando 6 *loci* microssatélites, isolados de *C. haigi* (Hai), objetivava a determinação da estrutura genética das populações bem como o fluxo gênico entre eles, decorrentes a barreira geográfica. O estudo foi composto por 277 indivíduos de 6 localidades diferentes. Foi observado o número total de 27 alelos para os 6 *loci* avaliados. Como conclusão deste estudo a autora propôs que houve isolamento geográfico pelo rio Maribo de *C. minutus* em uma das populações estudadas, de Torres - RS.

Roratto et al. (2011), responsável por isolar os microssatélites do presente estudo, utilizou uma média de 294 espécimes de 2 populações de *Ctenomys torquatus*. Como resultados nenhum *loci* apresentou alelos nulos e desequilíbrio de ligação. Foram evidenciados em média 2,6 alelos para uma população (Cachoeira do Sul - RS) e 4,3 para outra população (Butiá - RS).

Heterozigotidade esperada e observada foi de 0,63 – 0,61 e 0,37 - 0,39 respectivamente. Como conclusão do estudo inferiu-se que as mudanças geográficas em escala de tempo, associadas a conhecimentos geológicos da região, apontam o rico papel dos rios como barreiras geográficas populacionais.

Estimar o grau de parentesco permite melhor compreender o padrão de dispersão e a composição dos grupos sociais de uma determinada espécie. Algumas metodologias moleculares permitem mensurar a similaridade genética entre indivíduos e, com isso, inferir relações de parentesco (BERG et al. 2009). Dentre os marcadores moleculares o mais utilizado é o marcador de microssatélites, devido ao seu alto grau de polimorfismo (QUELLER; GOODNIGHT, 1989). A estimativa de parentesco é influenciada pela heterozigotidade, número de microssatélites utilizados, frequência alélica e as relações de parentesco em questão a serem analisadas (WANG, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estimar as relações de parentesco de uma população da espécie *Ctenomys minutus*, da localidade de Torres – RS.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a diversidade genética intra-populacional;
- Comparar a diversidade intra-populacional encontrada com outras populações de outras espécies do mesmo gênero que foram relatadas em literatura;
- Estimar as relações de parentesco entre indivíduos da população.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Composição das amostras

Neste estudo foram utilizadas amostras de 47 exemplares da espécie *Ctenomys minutus* provenientes da região de Torres (29° 20' 06" S; 49° 43' 37" O), estado do Rio Grande do Sul. As coletas dos exemplares deram-se do período de 30 de novembro de 2013 e 6 de dezembro de 2013, sendo que de cada espécime foi coletado uma pequena biópsia da orelha, que foram então fixadas (armazenados em tubos de 1,5ml com álcool 70% a 4°C ou a – 20°C) e depositadas no banco de tecidos do Laboratório de Citogenética e Evolução, do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre -RS.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada seguindo o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle et al (1987) como segue:

EXTRAÇÃO:

- Pré aquecer a solução de CTBA em banho maria a 60°
- Colocar o tecido em um tubo de 1,5 ml;
- Adicionar 500 µL de CTAB;
- Adicionar 15 µL de proteinase K;
- Incubar em banho Maria a 60° overnight;

PURIFICAÇÃO:

- Adicionar clorofórmio-álcool isoamil 24:1 em um volume igual ao do CTAB;
- Inverter o tubo gentilmente por 2 minutos;
- Centrifugar por 10 minutos a 15.000 rpm;

- Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL, previamente identificado, quantificando o volume do sobrenadante retirado.

PRECIPITAÇÃO:

- Adicionar 2/3 do volume de etanol absoluto ao sobrenadante em cada tubo ;
- Deixar precipitando 1 hora – 20°C ou overnight a 4°C;

LAVAGEM:

- Centrifugar por 10 minutos a 15000 rpm;
- Descartar gentilmente o sobrenadante;
- Adicionar 500 microlitros de etanol 70%;
- Centrifugar por 10 minutos a 15000 rotações por minuto;
- Descartar gentilmente o sobrenadante;

SECAGEM:

- Deixar os tubos abertos sobre o papel toalha a temperatura ambiente para o precipitado secar;
- Quando o pellet estiver seco, adicionar 50 microlitros de TE 1x;
- Incubar os tubos na estufa a 60°C por no mínimo 20 minutos para completa eluição do DNA.

4.3 Quantificação do DNA

Os resultados das extrações foram conferidos em gel de agarose 0,8 % em TBE 1x por 25 minutos, com aplicação de 3 µL de DNA total com 2 µL de azul de bromofenol 1,5% e visualização em luz UV. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro, para determinar a concentração de DNA por µL. Após, uma alíquota do DNA de cada espécime foi diluída em água ultrapura para 20 µL concentração final de 50 nanogramas de DNA por µL, para utilização nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

4.4 Seleção dos Iniciadores de microssatélite e condições de amplificação

Para realização deste estudo foram selecionados o total de 8 iniciadores microssatélites, todos heterólogos, desenvolvidos para outras espécies: *Ctenomys torquatus* (Tor) (RORATTO et al. 2011) (Tabela 1).

Tabela 1: Características de 8 microssatélites isolados de *Ctenomys*

Tabela 1 Característica de 8 microssatélites isolados de <i>ctenomys torquatus</i> (TOR)				
Loci	Primer 5' - 3'	Repetição	Temperatura (°c)	Tamanho (pb)
TOR1	F: CGATGTCTTCTTATCTAGATATC R: TGGTATTGTGTCTTTCTGT	(GATA) ₁₀ (GACA) ₅ (GATA) ₄	50	364-372
TOR2	F:GCTAAACTACACAGCCTTATTTAATGT R:GGAACAGACAATCAATGACAAG	(GATA) ₁₅ AT(GATA) ₃	60	185-205
TOR4	F: CAACCTTGACTAATCAGATACATAAA R:AAAGCTGACATTCTCCTGT	(GATA) ₁₂ (GACA) ₇	62	206-242
TOR5	F:TTTCCAAAGCAATGATAGGT R: GGCTAGATAGCTAGATAAAAAGATAG	(GATA) ₁₂	55	249-273
TOR6	F: CTGCAAGTCAAAGCAACTCT R: AGACCCTGTTTCAGGAAGAT	(ATAG) ₁₁	55	184-200
TOR7	F: TTACCGGTCAGTAACACTAAATATAA R: TGTCCTAATAAATCGGTTTTGAA	(GATA) ₆ GATTA(GATA) ₆	57	190-210
TOR8	F: CCCTAGCCCCTGCTGTTAG R: CACTTGGGAGACTGAGGCA	(GATA)NGATG(GATA) ₄	58	238-250
TOR9	F: GGGACTGGGATTTGAGGAAT R: CAGGAGGAGCAGGAATTTGA	(GT) ₁₆	60	192-206

As reações de mix (mistura) foram realizadas com volume final de 20 µL para todos os pares de primers, (0.2 µL DNTp; 0,2 µL primer F; 0,4 µL primer R; 0,4 µl de U M13; 0,2 µL Taq Buffer; 0,8 µL MgCl₂; 5,0 µL de DNA e o restante de água MiliQ). As condições de PCR foram: um ciclo inicial para desnaturação a 94° C por 5 minutos, 28 ciclos com temperatura variando entre 72° e 94° C, oito ciclos com variação de temperatura entre 94° e 72° (temperatura do primer universal : 53°C) e por fim um ciclo com extensão final de 5 minutos a 72°C.

4.5 Genotipagem

Após a certificação da amplificação, os espécimes foram genotipados no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH), Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. No processo de montagem das placas (placas de 96 poços) cada poço recebeu 9,8 µL de formamida, 0,5 µL de size standard (LIZ 600) e 1 µL de da amostra. O tempo de injeção das amostras nos capilares foi de 20 segundos a 3.5 Kv a 60°C. Tempo de corrida foi de 46 minutos, a 15Kv. O eletroferograma gerado com a corrida foi analisado no *software Peak Scanner*.

4.6 Análise genética

Através do *software* GenAlex (PEAKALL; SMOUSE, 2012) foi estimado o número total de alelos por *locus*, número de alelos esperados, a heterozigosidade observada e esperada. O *software* Microsatellite ToolKit (PARK, 2001) é utilizado para evidenciar possíveis digitalizações de dados repetidos. Para observação de alelos nulos, erros de genotipagem e equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o *software* MICROCHECKER (VAN OOSTERHOUT et al. 2004). O *software* Arlequin 3.5 (EXCOFFIER et al. 2005) desenvolvido para estudos de genética de populações foi utilizado para calcular equilíbrio de ligação entre os *locus* estudados. A Correção de Bonferroni (RICE, 1989) foi aplicada para reavaliação de alelos nulos, evidenciados pelo *software* Microchecker posteriormente testado, para os locos que apresentaram significância de 95%.

Com o programa ML-Relate (KALINOWSKI et al. 2006) foram calculadas estimativas de máxima verossimilhança de parentesco e relacionamento. ML-Relate é projetado para dados de microsatélites e pode acomodar alelos nulos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA

Foi possível extrair o DNA de todos os 47 indivíduos da amostra, porém houve grande variação na quantificação do DNA, variando de 33 ng/microlitros a 3103 ng/microlitros (Anexo II).

5.2 PCR

Através da PCR, os testes de amplificação dos nove iniciadores foram realizados com cada uma das 47 amostras. Devido à inserção do iniciador universal na sequência alvo logo após a amplificação da mesma, a PCR apresenta duas etapas importantes. Na primeira etapa ocorre o pareamento do iniciador específico para amplificação da sequência alvo, com 29 ciclos, e na segunda etapa ocorre o anelamento do iniciador universal na cauda específica, composta por 8 ciclos como descrito nos materiais e métodos.

Todos os iniciadores mostraram sucesso de amplificação. Algumas amostras tiveram menos sucesso sendo repetidas na sequência.

5.3 Genotipagem

Todas as amostras, ou seja, 47 indivíduos para os oito *loci* Tor, foram genotipadas. Os eletroferogramas gerados com as corridas foram analisados no programa *Peak Scanner* (Figura 4) e mostram picos que correspondem aos alelos de cada indivíduo da população.

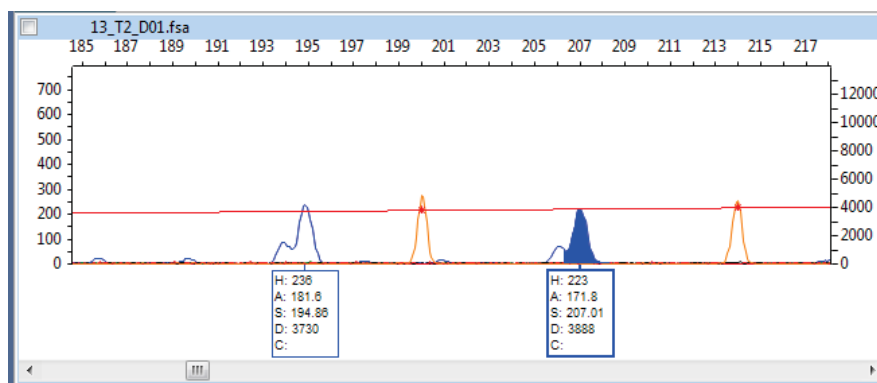


Figura 4: Picos gerados pelo programa Peak scanner para o iniciador Tor 2. A interpretação destes picos demonstrando o tamanho dos fragmentos encontrados, nesse caso um heterozigoto, 195 e 207 pares de bases, com valores já ajustados.

Dos oito *loci* analisados, o Tor 9 teve resultados não satisfatórios (Figura 5) na análise dos resultados do sequenciador, contendo um excesso de picos, sendo descartado das análises. Os picos extras existentes na genotipagem deste iniciador podem ser explicados pelas bandas *stutter*, produzidas por deslizamentos da DNA polimerase durante a reação de PCR, de modo a originarem fragmentos que são uma ou várias repetições mais curtas ou mais longas que o verdadeiro alelo. Todas as amostras deste iniciador mostraram excesso de picos, podendo ser uma característica própria por pertencer a outra espécie de *Ctenomys*.

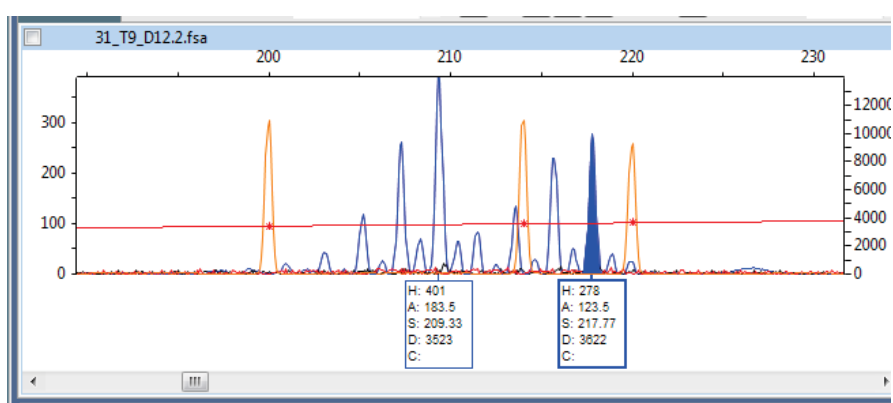


Figura 5: Marcador Tor 9 e o excesso de picos.

Os picos dos sete iniciadores restantes, que apresentaram boas condições de análise, foram avaliados e mostraram-se polimórficos. Em ordem crescente para o número de alelos por locos temos: Tor 2 e Tor 5 com oito alelos; Tor 8 com sete alelos; Tor 1 e Tor 7 com seis alelos e Tor 4 e Tor 6 com cinco alelos (Tabela 2). Sendo que a média encontrada foi de 7.78 alelos por *locus*.

Os valores para heterozigosidades observadas (H_o) e heterozigosidade esperadas (H_e) (Tabela 2), assim como o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados para todos os locos separadamente no programa GenAlex (LEWIS; ZAYKIN, 2001). A média de todos os *locus* para a H_e foi de 0,89 e para H_o foi

de 0,86. A heterozigosidade esperada só foi menor do que a observada no iniciador Tor 4 (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da diversidade genética: Na: número de alelos de cada *loci*; Ho e He: heterozigosidade observada e esperada;

Locí	N	Na	Ho	He
TOR1	47	6	0,745	0,715
TOR2	47	8	0,915	0,780
TOR4	47	5	0,277	0,412
TOR5	47	8	0,702	0,697
TOR6	47	5	0,851	0,658
TOR7	47	6	0,745	0,754
TOR8	47	7	0,681	0,575
Mean	11,47	7,78	0,86	0,89

Desvios significativos do equilíbrio, devido a deficiência de heterozigotos, foram observados para Tor 4, que provavelmente apresentou erros de genotipagem pela presença de alelos nulos mesmo após correção de Bonferroni, embora apresente 5 alelos para este *loci* como também observado para o iniciador Tor 6, que está em equilíbrio, no Tor 4 dois *loci* com frequência de 1,06% (Tabela 3) são exclusivos do indivíduo 43 (fêmea). O mesmo ocorreu em Tor 5 com indivíduo 9 (fêmea), que na Figura 6, aparece geograficamente isolada. Com o mesmo marcador foi encontrado outro alelo raro no indivíduo 41 que também é uma fêmea. Estes achados, portanto, explicam a baixa frequência destes alelos, e que pode no caso do Tor 4 ter influenciado no resultado da ocorrência de alelos nulos. Possivelmente em uma amostra populacional maior, estes não sejam mais considerados alelos raros.

As amostras que apresentaram com alelos raros, assim como 10% das demais amostras (aleatoriamente sorteadas), foram refeitas (PCR e genotipagem) com o intuito de confirmar primeiros resultados. Todas as repetições apresentaram resultados iguais à primeira genotipagem.

Tabela 3 :Frequências alélicas dos microssatélites. As menores frequências estão em destaque (negrito)

Micros.	alelos	freq.	Micros.	alelos	freq.
Tor 1	376	31,91	Tor 2	191	2,13
	380	20,21		195	6,38
	382	2,13		199	31,91
	388	4,26		207	22,34
	396	37,23		211	23,40
	398	4,26		223	7,45
				239	1,06
		243	5,32		
Tor 4			Tor 5	195	1,06
	199	1,06		199	1,06
	207	1,06		207	1,06
	239	17,02		259	21,28
	243	74,47		263	14,89
	247	6,38		271	46,81
				285	1,06
		295	12,77		
Tor 6	193	6,38	tor 7	202	16,30
	197	7,45		210	1,09
	201	32,98		212	26,09
	205	46,81		220	23,91
	209	6,38		224	30,43
		228	2,17		
Tor 8	236	4,26			
	240	3,19			
	244	1,06			
	252	9,57			
	256	62,77			
	260	11,70			
	268	7,45			

A frequência de homozigotos e a frequência da diferença entre homozigotos esperados e observados (Tabela 4), foram calculadas pelo programa MicroCheker através de simulações de Monte Carlo (*bootstrap*) usando um intervalo de confiança de 95% para cada *loci* individualmente. A frequência de alelos nulos é calculada por indivíduo/por *locus*, sendo significativo para valores superiores a 0,05. Em seguida, uma comparação de 64 dados utilizando três algoritmos (Chakiraborty, Brokfield 1 e Brokfield 2) estima a frequência real do alelo nulo, que se mostrou significativa apenas no *locus* Tor 4 (Tabela 4), retratando a ausência de amplificação de um dos alelos deste iniciador durante a PCR. Uma explicação para tal fato seria o número amostral da população aqui estudada (47 indivíduos), pois Roratto et al. (2011) analisou Tor 4 em uma amostra de 294 indivíduos e não obteve alelo nulo.

Segundo Jerne e Lagoda (1996), alelos nulos podem confundir a interpretação do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos dados amostrados e geralmente ocorrem por falta de amplificação de uma ou mais sequências de DNA devido a mutações que ocorrem na região de anelamento dos iniciadores, por consequência geram um genótipo falso homocigoto (ALDRICH *et. al.*, 1998, WHITE *et. al.*, 1999).

Tabela 4: Número de homocigotos observados e esperado em cada *locus*

Locus	Homocigoto esperado	Homocigoto observado
Tor 1	13,414	12
Tor 2	10,319	4
Tor 4	27,627	34
Tor 5	14,255	14
Tor 6	16,053	7
Tor 7	11,271	11
Tor 8	19,989	15

Tabela 5: Presença e ausência de alelos nulos em cada *locus*

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Tor 1	no	-0,0188	-0,0206	-0,0176	0
Tor 2	no	-0,102	-0,0793	-0,0755	0
Tor 4	yes	0,1442	0,1968	0,096	0,096
Tor 5	no	-0,0044	-0,0039	-0,0032	0
Tor 6	no	-0,1705	-0,1276	-0,1161	0
Tor 7	no	-0,0025	-0,0039	-0,0034	0,0698
Tor 8	no	-0,1371	-0,0846	-0,0674	0

Legenda: *Locus* = iniciadores; Null Present = presença de alelos nulos; No = não; Yes = Sim; Oosterhout = valores encontrados pelo programa; Chakraborty = primeiros dados usados para comparação; Brookfield 1 e 2 = segundo e terceiro dados usados para comparação.

Os resultados do programa Arlequin mostram que alguns pares de iniciadores (Tor4/Tor1; Tor6/Tor 1; Tor6/Tor4; Tor4/Tor7; Tor6/Tor7) apresentam desequilíbrio de ligação (Tabela 6). No artigo de descrição dos *locus* Tor

publicado por Roratto et al. (2011) não houve desequilíbrio de ligação neste *locus* o que mostra que não é um problema do marcador. O que aqui pode ter ocorrido é por se tratar de um iniciador heterólogo, a região de anelamento do iniciador pode estar sendo complementar a uma região não de microssatélite ou mesmo que seja uma região de microssatélite pode haver problemas de não anelamento perfeito do mesmo, o que pode levar a falhas na genotipagem.

TABELA 6: *Locus* com evidências de desequilíbrio de ligação

Legenda: + = estão ligados; - = não estão ligados.

<i>Loci</i>	Tor 1	Tor 2	Tor 4	Tor 5	Tor 6	Tor 7	Tor 8
Tor 1	*	-	+	-	+	-	-
Tor 2	-	*	-	-	-	-	-
Tor 4	+	-	*	-	+	+	-
Tor 5	-	-	-	*	-	-	-
Tor 6	+	-	+	-	*	+	-
Tor 7	-	-	+	-	+	*	-
Tor 8	-	-	-	-	-	-	*

De acordo com os dados registrados nos dias de captura dos indivíduos analisados (Tabela 7), realizados pela equipe da Universidade do Rio Grande do Sul, a população possui maior quantidade de fêmeas em relação aos machos, o que corrobora com os estudos realizados por Gastal (1994); Heuser (2001) e Marinho (1997). Observa-se também através de imagem de satélite que a população é bem equilibrada no que diz respeito a distribuição de machos e fêmeas (Figura 6).

Tabela 7: Dados de coleta dos indivíduos de *Ctenomys minutus*, da região de Torres- RS

IDENTIFICAÇÃO	PESO (g)	SEXO	DATA	GPS	OBSERVAÇÃO
TO-01	110	M	30/11/2013	TO.01	Jovem
TO-02	80	F	30/11/2013	TO.02	Jovem
TO-03	120	M	30/11/2013	TO.03	-
TO-04	155	M	30/11/2013	TO.04	-
TO-05	200	F	30/11/2013	TO.02	amamentando
TO-06	120	M	30/11/2013	TO.01	-
TO-07	215	F	30/11/2013	TO.01	Mãe do TO.01 e TO.06
TO-08	245	M	30/11/2013	TO.08	-
TO-09	235	F	30/11/2013	TO.09	Perfurada
TO-10	90	M	30/11/2013	TO.09	Filho da TO.09
TO-11	330	M	30/11/2013	TO.11	-

TO-12	200	F	30/11/2013	TO.12	Cicatrizada
TO-13	225	F	30/11/2013	TO.13	-
TO-14	360	M	30/11/2013	TO.14	-
TO-15	350	M	30/11/2013	TO.15	-
TO-16	75	F	30/11/2013	TO.16	Jovem
TO-17	245	F	30/11/2013	TO.17	-
TO-18	205	F	30/11/2013	TO.18	-
TO-19	150	M	01/12/2013	TO.13	Filho da TO.13
TO-20	105	F	01/12/2013	TO.20	Irmão da TO.23
TO-21	100	F	01/12/2013	TO.12	Filho da TO.12
TO-22	380	M	01/12/2013	TO.22	-
TO-23	110	M	01/12/2013	TO.20	Irmão do TO.20
TO-24	145	F	01/12/2013	TO.24	-
TO-25	220	F	01/12/2013	TO.25	-
TO-26	200	F	01/12/2013	TO.26	-
TO-27	75	indeter.	01/12/2013	TO.25	talvez fêmea
TO-28	210	F	02/12/2013	TO.28	-
TO-29	240	M	02/12/2013	TO.29	-
TO-30	195	F	02/12/2013	TO.30	-
TO-31	110	M	02/12/2013	TO.31	Filhote
TO-32	220	F	02/12/2013	TO.32	-
TO-33	220	F	02/12/2013	TO.31	Mãe do TO.31
TO-35	230	F	03/12/2013	TO.35	-
TO-36	220	F	03/12/2013	TO.36	-
TO-37	250	F	03/12/2013	TO.37	-
TO-38	260	F	03/12/2013	TO.38	-
TO-39	150	M	04/12/2013	TO.39	-
TO-40	330	M	04/12/2013	TO.40	-
TO-41	215	F	05/12/2013	TO.41	Rádio colar
TO-42	350	M	05/12/2013	TO.42	Rádio colar
TO-43	230	F	05/12/2013	TO.43	Rádio colar
TO-44	95	F	05/12/2013	TO.44	-
TO-45	110	M	05/12/2013	TO.45	-
TO-46	280	F	06/12/2013	TO.46	Rádio colar
TO-47	65	indeter.	06/12/2013	TO.47	Jovem
TO-48	170	F	06/12/2013	TO.48	Rádio colar

Fonte: Daniel Galiano.

De acordo com estudos realizados por Fonseca (2003) através de observações e coleta de 191 indivíduos, os critérios para categorias de jovem, subadultos e adultos são realizados através do peso, ficando da seguinte forma:

- * Fêmea jovem $\leq 87,5$ g < subadultos < 95 g \leq adultos
- * Macho jovem $\leq 87,5$ g < subadultos < 230 g \leq adultos



Figura 6: Distribuição dos indivíduos coletados. Em destaque Indivíduos mais isolados como 40/38, 29/30 e 28/31(filhote) formam três casais.

Assim nas amostras do presente estudo é possível observar: 4 jovens (To – 02, 16, 27 e 47), 1 subadulto fêmea (To – 44), 10 machos subadultos (To – 01, 03, 04, 06, 19, 23, 31, 39 e 45) e 32 adultos (8 machos e 24 fêmeas), porcentagem de 25% machos e 75% fêmeas adultas.

Segundo Rui; Gastal (1997) e Marinho; Freitas (2006) a dispersão de *Ctenomys minutus* é feita geralmente pelos jovens, sendo as regiões periféricas da área da população habitada por subadultos. Na população de Torres não ocorreu a dispersão descrita, na periferia foi observado adultos (To – 28, 40, 38, 30, 29, 9, 22, 41 e 32) com exceção de To 31 e To 04 que são subadultos (Figura 6).

Os indivíduos To 06 e To 07 foram coletados junto com To 01, portanto estão na mesma coordenada, o mesmo ocorre com To 23 encontrado com To 20, To 3 com To 18 e To 2 com To 16.

Segundo os resultados do programa ML- Relate (Tabelas: 8, 9 e 10), é possível perceber que alguns indivíduos machos (Macho +: M+) mais velhos (maior peso) contribuíram mais com a descendência da população, To 22, por exemplo, indicou em média sete descendentes, sendo três machos (To 23, 29 e

31) e quatro fêmeas (To 18, 20, 38 e 32), To 14, seis descendentes, um macho To 04 e cinco fêmeas (To 25, 27, 41, 35 e 37) e To 15 em média cinco descendentes, três machos (To 3, 8 e 10) e duas fêmeas (To 32, 46). Fêmeas que contribuíram com maior quantidade de proles também podem ser identificadas, To 46, por exemplo, possui em média seis descendentes, sendo quatro machos (To 8, 10, 29, incluindo To 22 (M+)) e duas fêmeas (To 25 e 28). To 05 quatro descendentes, dois machos (To 1, 45) e duas fêmeas (To 7 e 16) e To 18 com cinco descendentes, três machos (To 4, 19 e 39) e uma fêmea To 43. Todos estes indivíduos se encontram na região mais concentrada da população, o que pode explicar a maior quantidade de prole. Já os casais isolados To 40/38 foram identificados como pais do To 31 que se encontra próximo ao casal junto com To 28. To 28 tem forte descendência com To 33, 22 e 19 que se encontram a uma longa distância, mostrando que os indivíduos podem percorrer distâncias para acasalamento. Já To 40 tem números de MLr muito baixos, com quase nenhum vínculo com outro indivíduo da população a não ser To 31, o que pode ser explicado pela distância que ele se encontra do restante da população. O último par é 29/30, To 29 tem relação próxima com indivíduos To 22 e 15, ambos na parte mais concentrada da população. To 30 tem relação com To 09 que se encontra isolado na outra extremidade da população. Já To 09, apesar de ser uma fêmea adulta, não possui praticamente nenhuma relação forte com outro organismo da população a não ser To 30. Além disso, esta fêmea possui dois alelos raros, ou seja, não encontrado em nenhum outro espécime desse grupo. Provavelmente possa ter imigrado de outra população próxima. Ela foi encontrada “perfurada”, o que significa que foi fecundada recentemente.

Os dados de relação de parentesco deram resultados entre 0 e 1, como mostra tabela 8, 9 e 10. Sendo a Tabela 8 referente a machos versus fêmeas, tabela 9 fêmeas com fêmeas para análise de possíveis irmãs e mãe /filha e tabela 10 machos versus machos para análise de possíveis irmãos ou pai/filho. Como observado nos dados das Tabelas 8, 9 e 10, alguns indivíduos com valores baixos de grau de parentesco (MLr) apareceram com relação de parentesco e vice versa. Esse fato pode estar relacionado ao número de *locus* utilizados na análise, presença de alelos nulos apresentados e desequilíbrio de

ligação. Assim, com os dados do ML-Relate foi possível, utilizando sempre os jovens como referência, confirmar as seguintes observações da Tabela 7:

- To 19 é filho de To 13 e o possível pai é To 22 (M+);
- Fêmea To 21 é filha de To 12 (mãe) e possível pai To 8 que se encontram bem próximos na população;
- To 20 é irmão de To 23, ambos filhos do pai To 22 (M+), possível mãe To 17 (Figura 7);
- To 07 é mãe de 01 e 06, com alto grau de MLr :To 07 obteve como índice de parentesco 0,64 de verossimilhança com To 01(embora tenha obtido dados maiores com To 05 (0,77)), e 0,54 com To 06.



Figura 7: Foto aproximada da porção mais concentrada da população de *Ctenomys minutus*.

Além das informações demonstradas na tabela 7, algumas possíveis famílias podem ser identificadas pelo valor de relação de parentesco das tabelas 8, 9 e 10:

- To 2 é irmã de To 16, (Estão na mesma coordenada).
- To 27 é filha do macho To 14 e fêmea To 25 (ambos próximos).
- To 3 possivelmente filho de To 15 (macho) e To 25/32 (fêmea).
- To 47 possivelmente filho de To 22 (macho) e irmão de To 19.

Alguns indivíduos da população possuem uma relação de parentesco bem evidente, como To 22, que está relacionado com até 18 indivíduos da população, sendo como: irmão, meio irmão ou pais/filhos (Tabela 11). Já o indivíduo com menor relação de parentesco é o To 11 com apenas duas relações com a população, mesmo sendo um macho adulto.

Tabela 11: Quantidade de relações de parentesco de cada indivíduo da população.

Ind.	S	NRP	Ind.	S	NRP	Ind.	S	NRP	Ind.	S	NRP
To 22	M	18	To 03	M	10	To 36	F	9	To 42	M	6
To 25	F	15	To 20	F	10	To 41	F	9	To 12	F	5
To 02	F	12	To 19	M	10	To 06	M	8	To 35	F	5
To 04	M	12	To 26	F	10	To 17	F	8	To 39	M	5
To 10	M	12	To 01	M	9	To 18	F	8	To 47		5
To 15	M	12	To 07	F	9	To 23	M	8	To 30	F	4
To 45	M	12	To 13	F	9	To 38	F	8	To 44	F	4
To 05	F	11	To 16	F	9	To 08	M	7	To 09	F	3
To 14	M	11	To 21	F	9	To 43	F	7	To 48	F	3
To 27	F	11	To 28	F	9	To 24	F	6	To 40	M	3
To 37	F	11	To 29	M	9	To 31	M	6	To 11	M	2
To 46	F	11	To 32	F	9	To 33	F	6			

Legenda: Ind = indivíduo; S= sexo; NRP = número de relações de parentesco.

To 9 e To 40 possuem poucas relações de parentesco e se encontram mais afastados do restante da população ao contrário de To 29 e To 28 que se encontram afastados do restante da população, mas possuem entre 8 e 9 possíveis relações, mostrando que apesar da distância, de alguma forma, eles se relacionaram com os outros indivíduos da região mais concentrada.

De acordo com as tabelas 8, 9, 10 e 11 os dois machos mais pesados To 22 com 380g e To 14 com 360g, são os machos com maior relação de

parentesco na população estudada, podendo ser caracterizados como “machos alfa”.

Os dados aqui apresentados são únicos para o gênero *Ctenomys*, e evidenciaram grande eficácia no tocante a identificação de parentesco e paternidade. Outra tentativa em analisar a dinâmica de acasalamento foi sugerida por Matte (2006) que estudou três populações de *Ctenomys lami*, também através de marcadores microssatélites. Com a análise dos dados foi possível identificar fluxo gênico entre as três populações numa região da planície costeira do Rio Grande do Sul. Porém, a variabilidade genética se mostrou muito baixa, o que impediu uma análise de parentesco e paternidade, provavelmente devido a efeito fundador que pode ter ocorrido naquela população, conforme sugerido pelo autor.

Porém esta metodologia aplicada em outros grupos animais, como a realizada por Bulau (2015), que analisou paternidade de populações de cativo de uma ave rara, cardeal – amarelo (*Gubernatrix cristata*), mostraram resultados de grande impacto como o aqui realizado. Neste estudo foram comparados dados genéticos, oriundos de análise de microssatélites, entre duas populações, uma população silvestre e outra de cativo. Os resultados mostraram que a população de cativo tem uma diversidade genética parecida com a população silvestre, porém apresenta desvios no número de heterozigotos e no equilíbrio de Hardy-Weinberg, provavelmente devido a manejo do cativo. Pode-se também inferir quais cardeais eram menos aparentados com outros indivíduos da população e indica-los como possíveis candidatos a matriz para futura reprodução em cativo.

Assim evidenciamos que trabalhos como o aqui realizado, são muito importantes para entender a dinâmica de acasalamento das espécies de Tuco-tuco, cujo comportamento influencia diretamente na conservação da espécie. Este tipo de estudo também se mostra relevante em programas de reprodução em cativo, auxiliando na obtenção de proles que apresentem alta variabilidade genética, importante para a perpetuação e manutenção da capacidade evolutiva da espécie.

6 CONCLUSÃO

As análises realizadas no presente estudo, incluindo a análise de parentesco, através do emprego de marcadores microssatélites, para espécie *Ctenomy minutus*, permitiram as seguintes conclusões:

1. Dos 8 iniciadores utilizados, apenas um, Tor 4, apresentou alelos nulos por baixa frequência de variação alélica, devido a baixa heteroziguidade.
2. A Heteroziguidade observada foi maior que a esperada e homoziguidade esperada foi maior que a observada, demonstrando variação genética, com excessão de Tor 4.
3. Houve desequilíbrio de ligação entre alguns pares de marcadores, com excessão do Tor 2 e Tor 8, provavelmente por se tratar de um marcador heterólogo.
4. A população analisada possui um maior número de fêmeas do que machos adultos, sendo a quantidade de machos subadultos (que não estão aptos a reprodução) maior do que adultos.
5. Na população de Torres - RS foi observada a ocorrência de adultos nas regiões mais periféricas e dos jovens e subadultos na região mais central da população, com exceção de alguns indivíduos (To 31 e 4).
6. Machos mais velhos (To 22 e 11) contribuíram com uma maior quantidade de relações de parentesco nesta população, sendo considerados "machos alfa".
7. Em todos os indivíduos desta população, foi possível evidenciar algum tipo de relação de parentesco, seja irmão, meio irmão ou pai/filho, o que caracteriza que a entrada de novos indivíduos na população (deme) é pequena.

7 REFERÊNCIAS

ANDERSON, S.; YATES, T. L.; COOK, J. A. Notes on Bolivian mammals. 4: The Genus *Ctenomys* (Rodentia - Ctenomyidae) in Eastern Lowlands. **American Museum Novitates**, , n. 2891, p. 1–198, 1987.

BIDAU, C. J. Family Ctenomyidae Lesson, 1842. In: J. L. Patton; U. F. J. Pardiñas; G. D'Elía (Orgs.); **Mammals of South America**. p.818–877, 2015. The University of Chicago Press.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. **Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Centro pan-americano de febre aftosa, Rio de Janeiro, 2008.

BRACK, P. Vegetação e Paisagem do Litoral Norte do Rio Grande do Sul: patrimônio desconhecido e ameaçado. **Livro de Resumos do II Encontro Socioambiental do Litoral Norte do RS, 2006: ecossistemas e sustentabilidade**. p.46–71, 2006. CECLIMAR – UFRGS.

BUFFENSTEIN, R. Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats. In: E. A. Lacey; J. L. Patton; G. N. Cameron (Orgs.); **Life underground: the biology of subterranean rodents**. p.449, 2000. The University of Chicago Press.

BULAU, S. E. **Variabilidade genética e relações de parentesco de *Gubernatrix cristata* (Vieillot, 1817) - (aves, passeriformes, Thraupidae) - mantidos em cativeiro**, 2015. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

COMPARATORE, M. V; CID, M. S.; BUSCH, C. Dietary preferences of two sympatric subterranean rodent populations in Argentina. **Revista Chilena Historia Natural**, v. 68, p. 197–206, 1995.

COOK, J. A.; ANDERSON, S.; YATES, T. Notes on Bolivian mammals 6. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the highlands. **American Museum Novitates**, , n. 2980, p. 315–320, 1990.

EISENBERG, J. F. **The mammalian radiation. An analysis of trends in evolution, adaptation, and behavior**. University of Chicago Press, 1981.

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide**. The University of Chicago Press, 1990.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FERNANDES, F. A.; FERNANDEZ-STOLZ, G. P.; LOPES, C. M.; FREITAS, T. R. O. The conservation status of the tuc-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 839–847, 2007.

FERNANDEZ-STOLZ, G.; STOLZ, J. F. B.; DE FREITAS, T. R. O. Bottlenecks

and dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 88, p. 935–945, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción AL uso de marcadores moleculares em El análisis genético**. EMBRAPA, 1998.

FONSECA, M. B. **Biologia populacional e classificação etária do roedor subterrâneo tudo-tudo *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 (Rodentia, Ctenomyidae) na planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil**, 2003. Porto Alegre, Brazil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FREITAS, T. R. O. Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Octodontidae) and its cytogenetic relationship with other species of the genus. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 193–198, 1994.

FREITAS, T. R. O. Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil (Rodentia: Octodontidae). **Stud Neotrop Fauna**, v. 30, p. 53–59, 1995.

FREITAS, T. R. O. Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Octodontidae). **Genet Mol Biol**, v. 20, p. 1–7, 1997.

FREITAS, T. R. O. *Ctenomys lami*; The highest chromosome variability in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) due to a centric fusion/fission and pericentric inversion system. **Acta Theriol**, v. 52, n. 2, p. 171–180, 2007.

FREYGANG, C. C.; MARINHO, J. R.; FREITAS, T. R. O. Karyotypes and some considerations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: ctenomyidae) on the coastal plain of the Brazilian State of Rio Grande do Sul. **Genetica**, v. 121, p. 125–132, 2004.

GALIANO, D. **Análise das relações físicas e biológicas do ambiente com uma espécie de Tuco-tuco - CTENOMYS MINUTUS (RODENTIA, CTENOMYIDAE)**, 2015. UFRGS.

GARDNER, S. L.; BRAVO, J. S.; COOK, J. A. New species of *Ctenomys* Blainville 1826 (Rodentia: Ctenomyidae) from the lowlands and central valleys of Bolivia. **Special Publications of the Museum of Texas Tech University**, , n. 62, p. 1–34, 2014.

GASTAL, M. L. Densidade, razão sexual e dados biométricos de uma população de *Ctenomys minutus* Nehring, 1887 (Rodentia, Cavimorpha, Ctenomyidae). **Iheringia, Sér. Zool.**, v. 75, p. 25–33, 1994.

GAVA, A. **Uma zona de hibridação em *C. minutus* (Rodentia: Octodontidae): abordagem citogenética**, 1996. Porto Alegre: UFRGS.

GAVA, A.; FREITAS, T. R. O. Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). **Genetica**, v. 119, p. 11–17, 2003.

HEUSER, V. D. **Avaliação da genotoxicidade induzida por emissões de veículos automotores - *Ctenomys minutus* como organismo bioindicador**,

2001. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

HONEYCUTT, R. L. Rodents (Rodentia). In: S. B. Hedges; S. Kumar (Orgs.); **The Timetree of Life**. p.490–494, 2009. New York: Oxford University Press.

KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. P.; TAPER, M. L. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 576–579, 2006.

LACEY, E. A. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. **Heredity**, v. 86, p. 628, 2001.

LACEY, E. A.; PATTON, J. L.; CAMERON, G. N. **Life underground: the biology of subterranean rodents**. Chicago: University of Chicago Press, 2000.

LOPES, C. M.; BARBA, M. D.; BOYER, F.; et al. DNA metabarcoding diet analysis for species with parapatric and sympatric distribution: a case study on subterranean rodents. **Heredity**, v. 114, p. 525–536, 2015.

MALIZIA, A. I.; ZENUTO, R. R.; BUSCH, C. Demographic and reproductive attributes of dispersers in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). **Canadian Journal of Zoology**, v. 73, p. 732–738, 1995.

MARINHO, J. R. **Estrutura populacional e variação craniométrica intraespecífica em uma zona de hibridação de *C. minutus* Nehring, 1887**, 1997. Porto Alegre: UFRGS.

MARINHO, J. R.; FREITAS, T. R. O. Structure of a *Ctenomys minutus* (Rodentia, Hystricognathi) population in the Coastal Plain of Rio Grande do Sul, Brazil. **Acta Theriologica**, v. 51, p. 53–60, 2006.

MARTINO, N. S.; ZENUTO, R. R.; BUSCH, C. Nutritional responses to different diet quality in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tucos). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, p. 974–982, 2007.

MATTE, E. M. **Análise de parentesco em três subpopulações de *Ctenomys lami* (Rodentia – Ctenomyidae) através de marcadores microssatélites**, 2006. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MUSSER, G. G.; CARLETON, M. D. Superfamily muroidea. In: D. E. Wilson; D. M. Reeder (Orgs.); **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**, 2005. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

NEVO, E. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 10, p. 269–308, 1979.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the World**. 6^o ed. The Johns Hopkins University Press, 1999.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in

- microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535–538, 2004.
- ORTELLS, M. O.; CONTRERAS, J. P.; REIG, O. A. New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia; Octodontidae) from northeastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal malleability of the genus. **Genetica**, v. 82, p. 189–191, 1990.
- PARK, S. Microsatellite toolkit. , 2001.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537–2539, 2012.
- PEARSON, O.; BINTZEN, N.; BOIRY, L.; et al. Estructura social, distribución espacial y composición por edades de una población de tuco tucos (*Ctenomys talarum*). **Investigaciones Zoológicas Chilenas**, v. 13, p. 47–80, 1968.
- QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v. 43, p. 258–275, 1989.
- REIG, O. A.; BUSCH, C.; ORTELLS, M. O.; CONTRERAS, J. L. An overview of evolution, systematic, population biology and molecular biology in *Ctenomys*. In: E. Nevo; O. A. Reig (Orgs.); **Biology of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels**, 1990. New York: Allan Liss.
- RORATTO, P. A.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.; FREITAS, T. R. O. Tetranucleotide microsatellite markers in *Ctenomys torquatus* (Rodentia). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, p. 725–727, 2011.
- RUI, A. M.; GASTAL, M. L. Estrutura de sistemas de túneis e Distribuição Espacial de *Ctenomys minutus* NEHRING 1887 (Rodentia, Ctenomyidae) em Área de Restinga, Torres, RS, Brasil. **Biociências**, v. 5, n. 2, p. 33–44, 1997.
- SARAGE, R. J. G.; LONG, M. R. **Mammal evolution**. Cromwell Road, London: British Museum (Natural History), 1986.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615–629, 2006.
- TCHAICKA, L. **Análise de duas barreiras ao fluxo gênico entre populações de *Ctenomys minutus* (Rodentia-Ctenomyidae) da Planície Costeira do Rio Grande do Sul do Brasil**, 2002. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- URBAN, T.; FURTADO, L. **Diversidade da vida**. 2006.
- VALLE, J. C.; LOHFELT, M. I.; COMPARATORE, V. M.; CID, M. S.; BUSCH, C. Feeding selectivity and food preference of *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). **Mammalian Biology**, v. 66, p. 165–173, 2001.
- WANG, J. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 1, p. 141–145, 2011.

WILSON, J. B.; SYKES, M. T. Is zonation on coasts sand dunes determined primarily by sand burial or by salt spray? A test in New Zealand dunes. **Ecology Letters**, v. 2, p. 233–236, 1999.

ZENUTO, R. R.; BUSCH, C. Population biology of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Tuco–tuco) in a coastal dunefield in Argentina. **Mammalian Biology**, v. 63, p. 357–367, 1998.

ANEXOS

Anexo I

SOLUÇÕES

1. TBE 10x

108g de TrisBase

55g de Ácido Bórico

7,5g de EDTA

Adicionar 800ml de água destilada, esperar todos os reagentes dissolverem e completar o volume final para 1 litro.

2. Gel de Poliacrilamida 10%

10ml de solução mãe de acrilamida 30%

20 ml de TBE 1x

400 µl de APS

40 µl de TEMED

3. Solução Mãe de Acrilamida 30%

145g de acrilamida

5g de bisacrilamida

Completar para 500 ml de água destilada.

4. APS 10%

1g de persulfato de amônio

Completar para 10ml de água destilada e aliquotar em microtubos de 1,5ml e armazenar a – 20°C.

5. Azul de Bromofenol 3%

Estoque: 10ml de água destilada

0,300g de bromofenol

Uso: 11ml de estoque

10,35 Glicerol

6. Solução Fixadora do Gel de Poliacrilamida

120ml de álcool comum

6ml de ácido acético

Completar para 1200ml com água destilada.

7. Solução Reveladora do Gel de Poliacrilamida

18g de NaOH

Completar para 800ml de água destilada.

8. Cloreto de Cálcio 0,1M

1,47g de CaCl₂

Completar para 100ml com água destilada e filtrar a solução em membrana estéril.

9. Cloreto de Magnésio 0,1M

2,03g de MgCl₂

Completar para 100ml com água destilada e autoclavar.

10. KCl (250mM)

Dissolver 0,93g de KCl em 50 ml de água destilada e autoclavar.

11. MgCl₂ 2M

Dissolver 9,5g de MgCl₂ em 45 ml de água destilada. Ajustar o volume para 50ml e autoclavar.

12. Glicose

3,6g de glicose em 18ml de água destilada. Ajustar o volume para 20ml e filtrar em membrana estéril.

13. Tampão de lise

Para 40ml

0,24228g de TRIS

0,7444g de EDTA

0,23376g de NaCl

Adicionar água destilada até obter 40 ml. Manter Ph 8,0

14. Tampão STE

Para 40 ml:

0,234g de NaCl

0,048456g de TRIS

0,0148896g de EDTA

Adicionar água destilada até completar 40 ml, manter Ph 8,0

15. Tampão TE

Para 100ml:

1,2114g de TRIS

0,0372 g de EDTA

Adicionar água destilada até completar 100 ml. Manter Ph de 7,5.

16 NaCl

Para 50 ml adicionar 11,7 g de NaCl

17 Beta mercapto 2%

Adicionar 2 gramas de beta mercapto para 100 ml de água Milli Q.

Anexo II – Tabela de quantificação do DNA.

Tabela: Quantificação do DNA das amostras de <i>Ctenomys minutus</i>			
Amostra	ng/microlitros	Amostra	ng/ microlitros
To 01	101,8	To 25	71,7
To 02	145,5	To 26	50,7
To 03	151,1	To 27	52,9
To 04	58,9	To 28	38,1
To 05	122,9	To 29	1003,6
To 06	102,4	To 30	120,9
To 07	70,7	To 31	3103
To 08	132	To 32	110,2
To 09	97	To 33	89,1
To 10	250,9	To 34	59,5
To 11	74,8	To 35	44,7
To 12	81,1	To 36	55
To 13	118	To 37	35,6
To 14	76,3	To 38	40,6
To 15	47,6	To 39	78
To 16	48,4	To 40	55,8
To 17	89,4	To 41	100,3
To 18	96,4	To 42	66,4
To 19	47,6	To 43	78,6
To 20	53,1	To 44	79,4
To 21	57,1	To 45	57,4
To 22	89,1	To 46	63
To 23	33,8	To 47	136
To 24	60,5		