



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SAMANTHA CELI VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DO
GRUPO DE *Hyla polytaenia* (Anura, Hylidae)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
SAMANTHA CELI VIEIRA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

SM Recco-Pimentel

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

| | |
|------------|--------------|
| UNIDADE | 78C |
| Nº CHAMADA | |
| | I/UNICAMP |
| | V673c |
| V | EX |
| TOMBO, SOB | 62029 |
| PROJ. | 16.P.0086-05 |
| | EX |
| PREÇO | 11,00 |
| DATA | 10/02/05 |
| Nº CPD | |

Bif nºd 342415

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Vieira, Samantha Celi

V673c

Caracterização cromossômica de espécies do grupo de *Hyla polytaenia*

(Anura, Hylidae) / Samantha Celi Vieira. --

Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel

Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. Anuro. 3. Cariótipos. I. Recco-Pimentel, Shirlei. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.


Campinas, 28 de julho de 2004.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior


Assinatura

Profa. Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço

Assinatura

ambr. 07/04

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Shirlei M. Recco Pimentel, pelo apoio, orientação e exemplo profissional.

Ao professor Dr. Fernando Ananias, pelo incentivo, amizade, pelo amparo em vários momentos, por ter me acompanhado desde a graduação até este momento, pelos conselhos valiosos, durante mais esta etapa.

À professora Dra. Luciana Barreto Nascimento, Liliam Gomes, Emiliane Gonçalves e ao professor Dr. Paulo C. A. Garcia, pelo auxílio na coleta das espécies.

Aos monitores Cátia e Reinaldo da Universidade Braz Cubas pelo apoio e auxílio nas coletas.

À Liliam Alves Senne Panagio secretária do programa de pós graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelo auxílio sempre que necessário.

À Klélia pela amizade e treinamento no laboratório.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Às Drs. Odair Aguiar Junior, Luciana Bolsoni Lorenço e Cynthia Peralta de Almeida Prado, pela análise da dissertação na pré-banca e pelas sugestões.

Aos companheiros e amigos do laboratório Odair, Klélia, Ana, Gisele, Sérgio, Gabriel, Luciana, Marta, Carmem, Fernanda e Paula pelo apoio, conselhos, discussões sobre o meu trabalho, pelo exemplo profissional, pelos vários e intensos momento bons e divertidos que tivemos juntos.

Aos meus amigos Lilian, Eduardo e Manuel pela amizade, companhia e pelos momentos bons dentro e fora do ambiente de trabalho.

À minha querida amiga Yeda por seu carinho, amizade, pelo apoio nos momentos felizes e tristes e por sua presença constante em minha vida.

À minha eterna amiga Juliana pelo apoio em tudo o que faço sempre, por sua amizade e carinho que se fizeram presente mesmo à distância.

À minha amada irmã e amiga Cibele, pela amizade, carinho e apoio.

Ao meu amado noivo Rodrigo por sua ajuda em tudo o que podê, por sua compreensão, por seu amor, carinho e incentivo sempre que eu desanimava.

Aos meus amados pais José e Vanderli que me acompanharam em todos os momentos de minha vida, pelo incentivo com os estudos pelos conselhos e pela pessoa que sou hoje.

À Deus por me permitir conhecer e amar tantas pessoas maravilhosas, pela força e pela minha vida.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Abstract..... | 1 |
| Resumo..... | 3 |
| | |
| I. INTRODUÇÃO..... | 5 |
| 1. A Família Hylidae..... | 5 |
| 2. O grupo em estudo..... | 7 |
| 3. A problemática..... | 7 |
| 4. Análise citogenética nos anuros: aspectos gerais..... | 10 |
| 5 Região Organizadora do Nucléolo..... | 11 |
| 6. Heterocromatina..... | 14 |
| 7. Análises citogenéticas no gênero <i>Hyla</i> | 15 |
| 8. Citogenética do grupo de <i>Hyla polytaenia</i> e de espécies relacionadas..... | 18 |
| 9. Justificativa..... | 20 |
| 10. Objetivos..... | 21 |
| 11. Referências Bibliográficas..... | 22 |
| | |
| II. ARTIGO..... | 34 |
| Resumo..... | 36 |
| Introdução..... | 37 |
| Material e Métodos..... | 38 |
| Resultados..... | 40 |
| Discussão..... | 41 |
| Referências Bibliográficas..... | 48 |
| Legendas das Figuras..... | 55 |
| | |
| III. CONCLUSÕES GERAIS..... | 61 |

ABSTRACT

The taxonomic relationship between the *Hyla polytaenia* and *Hyla pulchella* groups is still controversial because of their morphological similarities. Cytogenetic studies are available for some species of the *H. pulchella* group, and for *H. bischoffi* and *H. guentheri*, currently not included in either of the two groups. However, there is little cytogenetic data for species belonging to the *H. polytaenia* group. Only the karyotype of *H. polytaenia* has been described by conventional staining methods. In this work, we analyzed three species of the *Hyla polytaenia* group in order to obtain cytogenetic information that could be useful for taxonomic comparisons among these taxa and between the two groups of species. Specimens of *H. polytaenia*, *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*) and *H. leptolineata* were collected in the states of Minas Gerais, São Paulo and Santa Catarina, respectively. Mitotic chromosomes were obtained from intestinal and testicular cell suspensions and stained with Giemsa, or subjected to C-banding, silver nitrate staining and fluorescence *in situ* hybridization. All three species had a diploid complement of $2n=24$, with a similar chromosomal morphology. Pairs 1, 2, 8, 9, 10, 11 and 12 were metacentrics, whereas pairs 3, 5 and 7 were submetacentrics and pairs 4 and 6 were subtelocentrics. The NORs were located on pair 10 in the three species. Two specimens of *H. leptolineata* showed an additional NOR in the telomeric region on the short arm in only one of the homologues of pair 1, while in one individual, the additional NOR was detected in both homologues of the same pair.

Hyla polytaenia and *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*) had an identical C-banding pattern. *Hyla leptolineata* can be distinguished from *H. polytaenia* and *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*) by the presence of an interstitial band on the long arms of pair 3 and the absence of interstitial

bands on the short arms of pair 6 and on the long arms of pair 7. The three species showed one heterochromatic block on the long arm of pair 10, adjacent to the centromere in *H. polytaenia* and *H. leptolineata* and interstitial in *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*).

A comparison of the karyotypes of species of the *H. polytaenia* groups analyzed here with those available for the *H. pulchella* group, and with *H. bischoffi* and *H. guentheri*, showed that they cannot be chromosomally distinguished from each other through conventionally stained karyotypes. Although the NOR location and some interstitial heterochromatic bands varied among all these species, homeologies were detected among some species of both groups and with *H. bischoffi* and *H. guentheri*. A common characteristic of all species was the presence of the heterochromatic block in pair 10 that appeared to be a marker for these closely related species.

Based on these results, we conclude that all of the species currently included in the *H. pulchella* and *H. polytaenia* groups, and also *H. bischoffi* and *H. guentheri*, can be combined within a single group of *Hyla*. This conclusion also indicates the need for a taxonomic revision of the grouping of these species.

RESUMO

A composição dos grupos de *Hyla polytaenia* e de *Hyla pulchella* e o relacionamento entre eles ainda é controverso pelo fato de compartilharem algumas características morfológicas. Existem estudos citogenéticos para algumas espécies do grupo de *Hyla pulchella* e também das espécies *H. bischoffi* e *H. guentheri* que disputam a inclusão em um dos grupos. No entanto, pouco se conhece sobre as espécies do grupo de *Hyla polytaenia*, sendo que a única descrição existente refere-se à determinação do cariótipo de *H. polytaenia* por métodos convencionais. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar três espécies deste grupo, o que permitirá uma comparação entre essas *taxa*, contribuindo com dados citogenéticos para o esclarecimento dessa problemática. As espécies *H. polytaenia*, *H. sp. (aff. polytaenia)* e *H. leptolineata*, provenientes de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, respectivamente, foram analisadas quanto à morfologia cromossômica através de coloração convencional com Giemsa, à localização da região organizadora do nucléolo (NOR) através de impregnação por prata e hibridação “in situ” e quanto ao padrão de distribuição de heterocromatina detectada por bandamento C.

As três espécies analisadas apresentam $2n = 24$ cromossomos, sendo os pares 1, 2, 8, 9, 10, 11 e 12 metacêntricos, os pares 3, 5 e 7 submetacêntricos e os pares 4 e 6 subtelocêntricos. A NOR foi localizada no par 10 nas três espécies. Dois indivíduos de *H. leptolineata* apresentaram NOR adicional na região telomérica do braço curto de um dos homólogos do par 1 e um indivíduo nos dois homólogos do mesmo par.

Hyla polytaenia e *H. sp. (aff. polytaenia)* apresentaram o mesmo padrão de distribuição de heterocromatina. *Hyla leptolineata* pode ser distinguida de *H. polytaenia* e de *H. sp. (aff.*

polytaenia) pela presença de uma banda no braço longo do par 3 e ausência das bandas intersticiais no braço curto do par 6 e no braço longo do par 7. As três espécies apresentaram um bloco heterocromático no braço longo do par 10, sendo mais próximo ao centrômero em *H. polytaenia* e *H. leptolineata* e mais distante do centrômero, em posição intersticial em *H. sp. (aff. polytaenia)*.

Comparação dos cariótipos das espécies do grupo de *Hyla polytaenia* com aquelas do grupo de *Hyla pulchella* e com *H. bischoffi* e *H. guentheri* revelou similaridades entre eles quanto à morfologia dos cromossomos, à localização da NOR e à presença de algumas bandas heterocromáticas intersticiais. Uma característica comum a todas as espécies é a presença do bloco heterocromático no par 10 que parece ser um marcador para essas espécies proximamente relacionadas. Os dados citogenéticos mostraram que todas essas espécies poderiam compor um único grupo e sugere-se a revisão taxonômica desses agrupamentos.

I. INTRODUÇÃO

1. A Família Hylidae

A Família Hylidae é constituída por mais de 800 espécies distribuídas em cinco subfamílias: Pelodyadinae, Hemiphractinae, Hylinae, Phyllomedusinae e Pseudinae, com um total de 42 gêneros (Frost, 2002).

Através de análises de fósseis, Chantell (1964) propôs que a Família Hylidae teria se originado a partir dos leptodactídeos. Essa teoria foi suportada por análises moleculares de Ruvinsky e Maxson (1996) que reforçam essa ancestralidade não somente para os hílídeos, mas para todos os representantes neotropicais da superfamília Bufonoidea, que tiveram *Eleutherodactylus cuneatus* (Leptodactylidae, Eleutherodactylinae) como grupo-irmão. Segundo estes autores a Família Leptodactylidae se mostrou polifilética, portanto a ancestralidade dos Leptodactylidae em relação aos Hylidae depende do representante de Leptodactylidae que foi utilizado na análise.

A Família Hylidae compreende em sua maioria espécies arborícolas e poucas aquáticas ou terrestres. As espécies arborícolas desenvolveram adaptações para esse modo de vida, como a presença de discos digitais desenvolvidos que lhes permitem subir em árvores e fixar-se em superfícies verticais; possuem cabeça e olhos grandes, localizados lateralmente e direcionados para frente, realçando a visão para baixo e sua perspectiva bilateral. Frequentemente as pererecas, como são chamadas essas espécies arborícolas, apresentam cintura delgada, patas posteriores longas que lhes permite saltar grandes distâncias e tamanho corpóreo extremamente variável (de 17 a 140 mm) (Duellman & Trueb, 1994; Cogger & Zweifel, 1998; Pough *et al.*, 1999).

A subfamília Hyalinae é dentre todas a mais expressiva, com cerca de 26 gêneros e uma distribuição geográfica bastante ampla, compreendendo as Américas do Norte e do Sul, o oeste da Índia, a Eurásia (inclusive o extremo norte da África), o arquipélago Japonês e a Guatemala e a Nova Zelândia, onde algumas espécies foram introduzidas (Frost, 2002).

Dentre os gêneros da subfamília Hyalinae, o gênero *Hyla*, com cerca de 335 espécies (correspondente a 40% do total de espécies desta Família), é um dos mais ricos em número de espécies entre os anuros (Frost, 2002). Este gênero é composto por espécies arborícolas verdadeiras, apresenta ampla distribuição geográfica, não sendo encontrado apenas nas regiões da Indonésia, Malásia, Polinésia, Etiópia e Madagascar (Duellman & Trueb, 1994; Frost, 2002). Na região Neotropical o número de espécies nesse gênero é muito grande, especialmente no Brasil (Duellman & Trueb, 1994). Segundo Cruz e Caramaschi (1998), na região Neotropical o gênero *Hyla* está representado por grande número de espécies distribuídas em diversos grupos morfológicos, vários destes carentes de estudos sobre sua composição e posição taxonômica. Segundo estes mesmos autores, embora tais grupos não possuam valor nomenclatural, são de relevância para a compreensão de um gênero tão diversificado e complexo como *Hyla*. Segundo Duellman *et al.* (1997), os conhecimentos existentes sobre as espécies de *Hyla* da América do Sul ainda são muito escassos para permitir uma análise filogenética significativa, pois menos de 20% das espécies do gênero reúne dados de morfologia externa, osteologia, canto e cariótipo.

2. O grupo em estudo

O grupo de *Hyla polytaenia* sempre foi motivo de controvérsia entre vários taxonomistas, que sempre tentaram caracterizar as espécies pertencentes a ele. A proposta mais recente que definiu a composição de espécies deste grupo foi feita por Cruz e Caramaschi (1998), com base em caracteres morfológicos, incluindo as espécies *Hyla polytaenia* Cope, 1870, *H. cipoensis* Lutz, 1968, *H. goiana* Lutz, 1968 e *H. leptolineata* Braun e Braun, 1977. Posteriormente, foram incluídas também *H. buriti* Caramaschi e Cruz, 1999, *H. stenocephala* Caramaschi e Cruz, 1999 e *H. phaepleura* Caramaschi e Cruz, 2000 (Cruz & Caramaschi, 1998; Caramaschi & Cruz, 1999; 2000).

O grupo de *Hyla polytaenia* reúne espécies de pequeno porte (25,6 a 37,6 mm nos machos e 29,0 a 41,5 mm nas fêmeas), com corpo alongado e cabeça estreita, padrão de colorido dorsal composto por linhas e faixas longitudinais mais ou menos definidas, que se intercalam nas cores branca e várias tonalidades de marrom, e ausência de barras transversais ou manchas nas faces anterior e posterior das coxas e na região inguinal. A distribuição geográfica das espécies do grupo de *Hyla polytaenia* no Brasil inclui localidades do centro-oeste, sul e sudeste (Cruz & Caramaschi, 1998).

3. A problemática

Apesar dos estudos de caracterização das espécies do grupo de *Hyla polytaenia* por critérios morfológicos, ainda existem problemas de inclusão ou exclusão de espécies devido à existência de caracteres apomórficos compartilhados com espécies de grupos tidos como relacionados, como aquelas pertencentes ao grupo de *Hyla pulchella*. O grupo de *Hyla*

pulchella consiste de populações de espécies encontradas no Brasil, Uruguai, Bolívia e Argentina, e tem sido dividido em várias espécies e subespécies geograficamente definidas (Duellman *et al.*, 1997). Entre as espécies encontradas no Brasil estão *H. pulchella* Duméril e Bibron, 1841, *H. joaquinii* Garcia *et al.*, 2003 (anteriormente *H. pulchella joaquinii* Lutz, 1968), *H. cymbalum* Bokermann, 1963, *H. semiguttata* Lutz, 1925, *H. marginata* Boulenger, 1912, *H. prasina* Burmeister, 1856 e *H. caingua* Carrizo, 1990. Os caracteres utilizados por Duellman *et al.* (1997) para definir o grupo foram: corpo moderadamente robusto, cabeça tão larga quanto longa; flancos e áreas escondidas das coxas de coloração pálida com manchas, barras ou reticulações negras ou, coxas e flancos de coloração escura com manchas pálidas; machos com antebraços hipertrofiados, portando um prepólex bem desenvolvido terminando em um espinho; canto de anúncio consistindo em uma série de notas “tipo-sino”; coloração dorsal marrom, verde ou cinza e geralmente com manchas escuras do tipo reticulações ou barras transversais. Considerando este conceito do grupo de *Hyla pulchella*, as espécies do grupo de *Hyla polytaenia* se distinguem pela ausência de manchas arredondadas ou barras nas coxas, por possuírem antebraços normais, não hipertrofiados, e por não possuírem prepólex com espinho ósseo (Cruz & Caramaschi, 1998).

As espécies *H. bischoffi* Boulenger, 1887 e *H. guentheri* Boulenger, 1886 (sem grupo definido) compartilham algumas características morfológicas com espécies do grupo de *Hyla polytaenia* (Langone, 1997) e outras com espécies do grupo de *Hyla pulchella* (P. C. Garcia e G. Vinciprova – informação pessoal). A espécie *H. bischoffi*, tendo como localidade-tipo o Rio Grande do Sul, era antigamente confundida com *H. pulchella* em

material de coleções (Lutz, 1973). Cochran (1955) colocou esta espécie no grupo de *Hyla albopunctata* e mais tarde Lutz (1973) a incluiu no grupo de *Hyla polytaenia*.

A espécie *H. guentheri* foi incluída por Lutz (1973) no grupo de *Hyla polytaenia* por causa do padrão de coloração dorsal, situação assumida também por Braun e Braun (1977, 1980). Por outro lado, Klappenbach e Langone (1992) e Langone (1997) consideraram que *H. guentheri* poderia fazer parte do grupo de *Hyla pulchella*, devido a características morfológicas. Ainda, segundo Garcia (informação pessoal), há também semelhança no padrão de canto de anúncio. Langone (1997) concluiu que não se podia ainda afirmar em que grupo a espécie em questão deveria ficar, já que até aquele momento não existiam definições claras dos grupos de *Hyla pulchella* e de *Hyla polytaenia*. Porém, Cruz e Caramaschi (1998) e Caramaschi e Cruz (1999, 2000) concluíram que as espécies incluídas no grupo de *Hyla polytaenia* podem ser prontamente distinguídas de *H. bischoffi* e *H. guentheri* pela ausência de barras e manchas arredondadas nas partes ocultas das coxas e região inguinal.

Por outro lado, Ananias *et al.* (2004 - in prep.) e Faivovich *et al.* (2004 - in press), através de análises moleculares de seqüências do DNA mitocondrial, mostraram que as espécies *H. bischoffi* e *H. guentheri* sempre estão incluídas no mesmo clado das espécies do grupo de *Hyla pulchella*, corroborando assim a proposta de inclusão destas duas espécies nesse grupo. Porém, a presença de *H. sp.* (aff. *polytaenia*) representante do grupo de *Hyla polytaenia* no mesmo clado das espécies do grupo de *Hyla pulchella*, indicou um parafiletismo do grupo de *Hyla pulchella* em relação ao grupo de *Hyla polytaenia* (Ananias *et al.*, 2004 - in prep.).

4. Análise citogenética nos anuros: aspectos gerais

Até a década de 80, os estudos citogenéticos em Anura eram desenvolvidos com técnicas simples de coloração visando a caracterização do número e da morfologia dos cromossomos, especialmente com Giemsa. Esses estudos iniciais permitiram detectar a ocorrência de certa variabilidade entre os anuros, que se mostrou grande em determinados gêneros, como *Eleutherodactylus* (Bogart, 1970, 1973, 1981, 1991; Bogart & Hedges, 1995) e pequena em outros, como em *Bufo* (Bogart, 1973).

Através dessas análises observou-se que espécies muito semelhantes morfológicamente, que poderiam ser consideradas como uma única espécie, poderiam apresentar diferenças no número e/ou na morfologia cromossômica. Isso foi verificado em *Hyla brunnea* ($2n=34$) e *Hyla septentrionalis* ($2n=24$) (Cole, 1974), em *Hyla nana* e *H. sanborni* ($2n=30$) (Medeiros *et al.*, 2003), em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998), em *Paratelmatobius cardosoi* e *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) ($2n=24$) (Lourenço *et al.*, 2000, 2003).

Através de técnicas citogenéticas refinadas como bandamento C, bandamento de replicação tardia, bandamentos com enzimas de restrição, método de impregnação pela prata, coloração com fluorocromos e a hibridação “in situ” com corantes fluorescentes, é possível distinguir espécies muito semelhantes morfológicamente. Podemos citar as espécies de *Bufo* analisadas por Baldissera *et al.* (1999), que apresentaram grande semelhança em sua morfologia cromossômica, porém através da localização da NOR com o emprego da técnica de impregnação pela prata foi possível distingui-las. Através do método de bandamento C, também é possível detectar variações que distinguem espécies consideradas próximas e que apresentam morfologia cromossômica bastante semelhante,

como descrito em *Hyla* (Anderson, 1991), *Telmatobufo* (Formas & Cuevas, 2000) e *Colostethus* (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003).

Esses métodos têm sido úteis também para mostrar variações intra-específicas de localização e número de NORs e de heterocromatina, como relatado para as espécies *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991), *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995), *Hyla ebraccata* (Kaiser *et al.*, 1996), *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998), e *P. cuvieri* (Silva *et al.*, 1999).

5. Região Organizadora do Nucléolo (NOR)

As regiões organizadoras nucleolares são sítios cromossômicos dos genes que codificam os RNAs ribossômicos (RNAr), e em células interfásicas estes se expressam formando o nucléolo, organela esta que está envolvida na biogênese de ribossomos (Sumner, 1990; Mello, 2001). As NORs contêm numerosas cópias dos genes que codificam os RNAr 18S, 5,8S e 28S, arranjadas *in tandem* e separadas por seqüências espaçadoras. A associação desses RNAr com proteínas ribossomais e com o RNAr 5S, sintetizado fora do nucléolo, originam as subunidades 40S e 60S dos ribossomos (Long & David, 1980; Miller, 1981).

A detecção das NORs pode ser feita através da impregnação pelo íon prata (método Ag-NOR). Este é o método mais usado para a identificação de NORs, embora detecte apenas as NORs que estiveram ativas na intérfase precedente. Sabe-se no entanto, que a prata pode ainda impregnar inespecificamente regiões de heterocromatina, como observado por Lourenço *et al.* (1998) em *Physalaemus petersi* e por Busin *et al.* (2000) em *Pseudis* sp.

(aff. *minuta*), embora possa ser distinguida da NOR impregnada por prata através da intensidade de sua coloração.

O método de impregnação pela prata baseia-se na afinidade do íon Ag^+ por proteínas denominadas argirofílicas associadas ao RNAr recém-transcrito e ao DNAr em transcrição chamadas genericamente de “proteínas Ag-NOR”, que incluem a RNA polimerase I, o UBF (principal fator de transcrição do rDNA), a DNA topoisomerase I e a nucleolina (Howell, 1977; Schwarzacher *et al.*, 1978; Hernandez-Verdum, 1993).

Dentre outros métodos, a hibridação “in situ” fluorescente com sonda para DNAr é o método mais específico para evidenciar NORs, pois é possível identificar também NORs que não foram marcadas pelo método de prata, como foi observado em *Hyla nana* (Medeiros *et al.*, 2003), *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003a) e em *Eleutherodactylus binotatus* (Siqueira-Jr. *et al.*, 2004 - in press).

Segundo Nardi *et al.* (1977), a localização dos genes para RNAr ocorre geralmente nos mesmos cromossomos em espécies relacionadas. Exemplo disso foi observado em *Bufo crucifer*, *B. ictericus* e *B. schneider* (o último mencionado como *B. paracnemis*; Kasahara *et al.*, 1996), *H. microcephala* e *H. phlebodes* (Kaiser *et al.*, 1996), *Pleurodema brachyops* e *P. thaul* (Schmid *et al.*, 1993), entre outros.

Entretanto, diferenças no número e na localização de NORs têm sido relatadas, tanto para espécies distintas como para populações de uma mesma espécie (Baldissera *et al.*, 1993; Schmid *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Lourenço *et al.*, 2000; Cuevas & Formas, 2003; Medeiros *et al.*, 2003; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003a, Siqueira-Jr. *et al.*, 2004 - in press).

As NORs podem ainda coincidir com a constrição secundária, com blocos de heterocromatina ou localizar-se adjacente a estes e apresentar heteromorfismo de tamanho (Schmid, 1982; Anderson, 1991; Schmid *et al.*, 1993; Ananias, 1996; Kasahara *et al.* 1996; Lourenço *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999, 2000; Aguiar-Jr. *et al.*, 2002, 2003; Schmid *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2003; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003a, b; Siqueira-Jr. *et al.*, 2004 (in press)).

Schmid (1982) sugeriu que NORs heteromórficas surgem através de deleção parcial ou por duplicação e triplicação de uma das NORs. King *et al.* (1990) por sua vez consideram que a maioria dos heteromorfismos observados envolve amplificação de certas seqüências de DNAr ou amplificação da NOR inteira.

Segundo Schmid *et al.* (1990), a maioria dos anuros apresenta apenas um par cromossômico que contém a NOR, e isso é válido tanto para espécies de anuros mais basais quanto para espécies mais derivadas. Exceções a essa regra são indicativos de rearranjos durante o processo evolutivo, envolvendo segmentos do cromossomo que contém a NOR.

A presença de NORs múltiplas é considerada por King *et al.* (1990) um estado derivado em Anura e tem sido observado em espécies de diferentes famílias (Schmid *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Cuevas & Formas, 2003; Medeiros *et al.*, 2003; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003a; Siqueira-Jr. *et al.*, 2004 - in press). A evolução de NORs múltiplas em anuros provavelmente inclui eventos como inversão, translocação, transposição por elementos genéticos móveis e amplificação de cístrons ribossomais seguida de erros de reinserção durante a oogênese como tem sido discutido por diversos autores (King *et al.*, 1990; Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 1998).

6. Heterocromatina

A heterocromatina é definida como sendo a forma mais compacta da cromatina, com replicação tardia do DNA, ou seja, inicia sua replicação depois da eucromatina, caracteristicamente no final da fase S, e apresenta certa inatividade gênica (Alberts *et al.*, 1999; Mello, 2001).

A heterocromatina rica em DNA altamente repetitivo é encontrada com frequência nas regiões centroméricas, teloméricas e algumas vezes intersticiais de cromossomos homólogos, podendo ser detectada através do método de bandamento C. Este é o método mais utilizado em estudos com anuros, uma vez que o bandamento G e R apresentam resultados satisfatórios apenas em amniotas (Sumner, 1990).

O padrão de banda C de espécies muito próximas pode diferir em termos de quantidade de heterocromatina, número de bandas, localização e propriedades de coloração da heterocromatina, podendo ser um importante caráter sistemático, que permite a sugestão de rearranjos genéticos ocorridos durante a evolução do grupo em estudo, além de ser um importante marcador na identificação de determinados cromossomos (Sumner, 1990).

O cariótipo de anfíbios é caracterizado por possuir, em geral, grande quantidade de heterocromatina (Schmid *et al.* 1990). King (1991) relatou que em algumas espécies de Archaeobatrachia foram detectadas pequenas quantidades de heterocromatina através de técnicas de bandamento, e que os Neobatrachia mostram uma grande diversidade interespecífica na distribuição e quantidade de heterocromatina. King (1991) considerou que em anfíbios o aumento da heterocromatina é uma tendência evolutiva, embora não seja descartada a possibilidade de ocorrência de diminuição dessa cromatina em grupos isolados. De acordo com essas variações, este autor propôs o envolvimento de três

processos na evolução desse tipo de cromatina em anfíbios: a adição de heterocromatina a sítios cromossômicos específicos, a transformação de regiões cromossômicas eucromáticas em regiões heterocromáticas e a evolução em conjunto de múltiplos sítios heterocromáticos.

Variações interespecíficas de quantidade e distribuição de heterocromatina foram relatadas por alguns autores em diferentes famílias de anuros, possibilitando a distinção citogenética entre espécies bastante próximas como *Pleurodema brachyops* e *P. thaul* (Schmid *et al.*, 1993), *Mixophyes fasciolatus* e *M. schevilli* (Schmid *et al.*, 2002), *Colostethus marchesianus*, *C. caeruleodactylus*, *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*) e *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*) (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003 a) e *Alsodes pehuenche*, *A. verrucosus* e *A. aff. vittatus* (Cuevas & Formas, 2003). Variações intraespecíficas também têm sido relatadas, como em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998) e *Paratelmatobius cardosoi* (Lourenço *et al.*, 2000).

7. Análises citogenéticas no gênero *Hyla*

Pouco mais de 90 espécies do gênero *Hyla* foram estudadas citogeneticamente até o momento, e em sua maioria os cromossomos foram analisados apenas por técnicas de coloração convencional.

Bogart (1973) considera a existência de dois grupos dentro do gênero *Hyla*, que podem ser caracterizados pelo número de cromossomos, um grupo de espécies com $2n = 24$ e outro com $2n = 30$. O grupo com 30 cromossomos é considerado por Bogart (1973) e Kaiser *et al.* (1996) como sendo monofilético, uma vez que apresenta um número diplóide conservado. Variações desses números foram relatadas para *H. brunnea* com $2n = 34$

cromossomos, sendo este o número mais discrepante para o gênero (Cole, 1974). Bogart (1973) analisou populações distintas de *H. albosignata* que apresentaram $2n = 20$ e $2n = 18$ cromossomos, e Beçak (1968) relatou para *H. albopunctata* o número cromossômico de $2n = 22$.

Segundo Morescalchi (1990), o cariótipo das espécies de *Hyla* com 24 cromossomos é característico de espécies derivadas por ser um cariótipo simétrico e unimodal, que segundo Bogart (1973) e Miura *et al.*, (1995), teria sua origem de um ancestral com $2n = 26$ cromossomos.

Conforme observado por Beçak (1968) ao comparar os cariótipo de diversas espécies da família Hylidae e Leptodactylidae, espécies com maior número cromossômico em geral apresentam maior número de cromossomos telocêntricos, como é o caso de *Hyla brunnea*, ($2n = 34$). Esta espécie é bastante semelhante morfológicamente a *H. septentrionalis* que apresenta $2n = 24$ cromossomos e apenas um par subtelocêntrico (Cole, 1974). Segundo Morescalchi (1973), a redução no número cromossômico presumivelmente ocorre, não por perda de material genético, mas por rearranjos deste material, como fusões cêntricas, especialmente entre pequenos cromossomos telocêntricos.

Diversos autores têm estudado as espécies de *Hyla* não somente através de seus números cromossômicos, mas também de análise de bandamento C, Ag-NOR, hibridação “in situ” fluorescente, bandamento de replicação tardia e bandamento por enzimas de restrição, que ajudam a compreender as alterações cromossômicas ocorridas ao longo da evolução e, em alguns casos, do processo de diferenciação e especiação em anuros (Schmid *et al.*, 1995; Kasahara *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2003).

Anderson (1991) analisou 21 das 28 espécies de *Hyla* holoárticas, através de bandamento C e localização da NOR. Para 8 delas, o autor também utilizou o bandamento por enzimas de restrição. Neste mesmo trabalho descreveu a existência de cromossomos sexuais em *H. squirela* e *H. femoralis*. Kaiser *et al.* (1996) analisaram duas populações alopátricas de *H. ebraccata* da Costa Rica, e relataram a ocorrência variações intra-específicas de localização e número de NORs e de heterocromatina entre elas, além de analisarem *H. microcephala* e *H. phlebodes* através de bandamento C e localização da NOR. Ananias (1996) analisou algumas espécies do grupo de *Hyla pulchella* através de bandamento C e localização de NOR, análise esta que possibilitou a caracterização destas espécies e diferenciação de espécies semelhantes. Raber *et al.* (2004 – in press) analisaram duas espécies consideradas muito próximas daquelas do grupo de *Hyla pulchella*, *H. bischoffi* e *H. guentheri*, através do padrão de distribuição de heterocromatina e localização da NOR. Medeiros *et al.* (2003) analisaram populações sintópicas de *H. nana* e *H. sanborni*, espécies muito similares morfológicamente, mas que puderam ser separadas através de diferenças no cariótipo, padrão de bandamento C e localização de NOR, embora ambas apresentassem $2n = 30$ cromossomos. Esses autores relataram ainda a existência de um pequeno cromossomo B em alguns indivíduos de *H. nana*. Schmid e Steinlein (2003) analisaram *H. femoralis* através de localização da NOR e distribuição de heterocromatina. Estes autores confirmaram a existência de heteromorfismo de cromossomos sexuais do tipo XY/XX, através da localização da NOR no cromossomos X, devido à deleção da NOR no cromossomo Y, resultando em diferença no número de genes de rDNA. Wiley (2003) também analisou a NOR desta espécie através de hibridação “in situ” com sonda de rDNA. Ananias *et al.* (2004) analisaram as espécies *H. semiguttata*, *H. aff. semiguttata* e *H.*

marginata, pertencentes ao grupo de *Hyla pulchella*, através de bandamento C e localização da NOR.

Estes estudos mostram que dados citogenéticos permitem a identificação de alterações cromossômicas que ocorreram ao longo da evolução, possibilitando a identificação de possíveis rearranjos cromossômicos, auxiliando no esclarecimento de relações filogenéticas e possibilitando a distinção de espécies morfologicamente idênticas.

8. Citogenética do grupo de *Hyla polytaenia* e de espécies relacionadas

No grupo de *Hyla polytaenia*, apenas o cariótipo da espécie *H. polytaenia* foi descrito por Rabello (1970) através de coloração convencional. Neste trabalho foi constatada a presença de $2n = 24$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

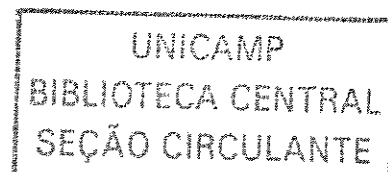
Do grupo de *Hyla pulchella* foram analisadas as espécies *H. pulchella*, *H. joaquini*, *H. prasina*, *H. caingua*, *H. semiguttata*, *H. marginata* e *H. aff. semiguttata*, todas apresentando $2n = 24$ cromossomos com padrão morfológico bastante semelhante (Ananias, 1996; Ananias *et al.*, 2004). O padrão de bandamento C também mostrou uma similaridade muito grande entre estas espécies, à exceção de *H. pulchella* que apresentou menor quantidade de heterocromatina em seu genoma. A NOR se localizou no telômero do braço longo do par 12 em *H. prasina* e *H. pulchella*, no telômero do braço curto do par 1 em *H. joaquini*, *H. semiguttata* e *H. aff. semiguttata*, na região pericentromérica do braço longo do par 7 em *H. caingua*, e na região pericentromérica do braço longo do par 10 em *H. marginata* (Ananias, 1996; Ananias *et al.*, 2004).

As espécies *H. bischoffi* e *H. guentheri* foram analisadas por Raber *et al.* (2004 – in press), sendo os cariótipos bastante semelhantes aos das espécies do grupo de *Hyla*

pulchella, não só quanto ao número e morfologia dos cromossomos mas também quanto à presença de um mesmo marcador, um bloco de heterocromatina evidente no braço longo do par 10.

Através de análises moleculares dos genes citocromo b e da região controle do DNA mitocondrial de espécies do grupo de *Hyla pulchella* e das espécies *H. bischoffi*, *H. guentheri* e *H. sp. (aff. polytaenia)*, Ananias *et al.* (2004 – in prep.) sugerem que a presença da NOR no par 1 em *H. joaquini*, *H. semiguttata* e *H. aff. semiguttata* deve ser um caráter basal em relação às outras localizações, sendo este considerado um estado plesiomórfico para esse caráter.

Portanto, considerando que já existem dados citogenéticos de espécies do grupo de *Hyla pulchella* e de *H. guentheri* e *H. bischoffi* na literatura, a caracterização de espécies do grupo de *Hyla polytaenia* permitirá uma comparação completa desse complexo de espécies de *Hyla*, auxiliando na compreensão das relações entre todos esses *taxa*.



9. Justificativa

A composição dos grupos de *Hyla polytaenia* e de *Hyla pulchella* e o relacionamento entre eles ainda é motivo de controvérsia, como relatado anteriormente. Várias espécies do grupo de *Hyla pulchella*, bem como *H. bischoffi* e *H. guentheri*, que já fizeram parte de ambos os grupos, já foram citogeneticamente analisadas. O único dado de citogenética disponível na literatura para as espécies do grupo de *Hyla polytaenia* se restringe a descrição do cariótipo para a espécie *H. polytaenia*. A ampliação desse estudo com a inclusão de outras espécies do grupo de *Hyla polytaenia* visa a obtenção de dados para uma análise comparativa dos cariótipos que poderá auxiliar na compreensão das relações entre estes grupos e espécies, e em especial, a identificação de alterações cromossômicas que ocorreram ao longo da evolução já que, em alguns casos, esses dados têm ajudado a compreender o processo de diferenciação e especiação em anuros.

10. Objetivos

Caracterizar citogeneticamente as espécies *H. polytaenia*, *H. sp.* (aff. *polytaenia*) e *H. leptolineata*, do grupo de *Hyla polytaenia* com o intuito de contribuir com dados que possam auxiliar na análise do relacionamento deste com o grupo de *Hyla pulchella* e com outras espécies tidas como proximamente relacionadas.

11. Referências Bibliográficas

- Aguiar-Jr., O.; Lima, A.P., Giaretta, A.A. & Recco-Pimentel, S.M., (2002) Cytogenetic analysis of four poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura, Dendrobatidae). *Herpetologica*, 58 (3): 293–303.
- Aguiar-Jr., O.; Carvalho, K.A.; Giaretta, A.A. & Recco-Pimentel, S.M., (2004) Cytogenetics of *Hylodes* and *Crossodactylus* species (Anura, Leptodactylidae) with comments on Hylodinae/Dendrobatidae relationships. *Genetica* 121: 43–53.
- Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. (1999) Fundamentos da Biologia Celular. Artmed. Porto Alegre. pp. 757.
- Ananias, F. (1996) Análise citogenética de espécies e subespécies de *Hyla* do grupo *pulchella* (Anura, Hylidae). Dissertação de Mestrado – UNICAMP. 101 p.
- Ananias, F.; Garcia, P.C.A.; Bacci-Jr, M.; Martins, V.G.; Faivovich, J.A.; Azeredo-Espin, M.L. & Recco-Pimentel, S.M. (2004–in prep.) Molecular phylogenetic analysis of some phenotypically variable populations of *Hyla semiguttata* and related species (Anura: Hylidae).
- Ananias, F.; Garcia, P.C.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2004) Conserved karyotype in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 140: 42-48.

Anderson, K. (1991) Chromosome evolution in Holartic *Hyla* treefrogs. In: Green, D. M. & Sessions, S.K. Eds. Amphibian Cytogenetic and Evolution. Academic Press Inc. San Diego, California, p. 299–331.

Baldissera Jr., F.A.; Oliveira, P.S.L. & Kasahara, S. (1993) Cytogenetics of four brazilian *Hyla* species (Amphibia – Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Rev. Bras. Genét.* 16(2): 335-345.

Baldissera, F.A., Batistic, R.F. & Haddad, C.F.B. (1999) Cytotaxonomic considerations with description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo* (Anura, Bufonidae). *Amphibia-Reptilia*, 20: 420-431.

Beçak, M.L. (1968) Chromosomal analysis of eigtghteen species of Anura. *Caryologia*, 21(3):191-208.

Bogart, J.P. (1970) Los cromosomas de anfibios del genero *Eleutherodactylus*. *Jact.* IV. *Congr. Latin. Zool.* 1: 65-78.

Bogart, J.P. (1973) Evolution of anuran karyotypes. In Evolutionary Biology of The Anurans: Contemporary research on Major Problems (J.L. Vial, ed.), pp. 337-349, University of Missouri Press, Columbia.

- Bogart, J.P. (1981) Chromosomes studies in *Sminthillus* from Cuba and *Eleutherodactylus* from Cuba and Puerto Rico (Amphibia: Leptodactylidae). Life Sci. Contr. R. Ont. Mus. 129: 1-22.
- Bogart, J.P. (1991) The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic Press, San Diego, pp. 233-257.
- Bogart, J.P. & Hedges, S.B. (1995) Rapid chromosome evolution in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). J. Zool. 235: 9-31.
- Braun, P.C. & Braun, C.A.S. (1977) Nova espécie de *Hyla* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Anura, Hylidae). Rev. Bras. Biol. 37(4):853-857.
- Braun, P.C. & Braun, C.A.S. (1980) Lista prévia dos anfíbios do Estado do Rio Grande do Sul Iheringia, Ser. Zool. 56: 121-146.
- Busin, C.S.; Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S.M. (2000) Chromosomal rearrangments as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura) Genetica, 110 : 131-141.
- Caramaschi, U. & Cruz, C.A.G. (1999) Duas espécies novas do grupo de *Hyla polytaenia* Cope, 1870 do Estado de Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). Bol. Museu Nac. Zool., 403:1-10.

- Caramaschi, U. & Cruz, C.A.G. (2000) Duas espécies novas de *Hyla* Laurenti, 1768 do Estado de Goiás, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). Bol. Museu Nac. Zool, 422: 1-12.
- Chantell, C.J. (1964) Some mio-pliocene hylids from the valentine formation of Nebraska. Am. Midl. Nat. 72: 211-225.
- Cruz, C.A.G. & Caramaschi, U. (1998) Definição, composição e distribuição geográfica do grupo de *Hyla polytaenia* Cope, 1870 (Amphibia, Anura, Hylidae). Bol. Museu Nac. Zool., Rio de Janeiro, 392: 1-19.
- Cochran, D.M. (1955) Frogs of southeastern Brazil. Smithsonian Institution, Washington, D. C. : VII – XI : 84-87.
- Cogger, H.G. & Zweifel, R.G. (1998) Encyclopedia of reptiles & amphibians. Academic Press, Natural World. San Diego. 132p.
- Cole, C.J. (1974) Chromosome evolution in selected treefrogs including Casque-Headed species (*Pterohyla*, *Prioprion*, *Hyla* and *Smilisca*). Amer. Mus. Nov. 2541: 1–10.
- Cuevas, C.C.& Formas, R.J. (2003) Cytogenetic analysis of four species of the *Alsodes* (Anura, Leptodactylidae) with comments about the karyological evolution of the genus. Hereditas 138: 138–147.

Duellman, W.E. & Trueb, L. (1994) Biology of Amphibians, The John Hopkins University Press. Baltimore. 670 pp.

Duellman, W.E.; De La Riva, I.; Wild, E.R. (1997) Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. *Scient. Papers Nat. Hist. Museum Univ. Kansas* 3:1-41.

Faivovich, J.; Garcia, P.C.A.; Ananias, F.; Lanari, L.; Basso, N.G. & Wheeler, W.C.A. (2004 - in press) A molecular perspective of the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Mol. Phyl. and Evol.*

Foote D.L.; Willey, J.E.; Little, M.L. & Meyne, J. (1991) Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 196-199.

Formas, J.R. & Cuevas, C.C. (2000) Comparative cytogenetic analysis of the Chilean leptodactylid frog genus *Telmatobufo*, with description of *T. venustus*. *Proc. Biol. Soc. Washington*, 113: 890-899.

Frost, D.R. (2002) Amphibian species of the world. An online reference: Version 2.21. <<http://research.amnh/heptology/amphibia/index.html> American Museum of Natural History, New York, USA.

Hernandez-Verdum, D.; Hubert, J. Bourgeois, C.A. & Bouteille, M. (1993) Nucleolar proteins during mitosis. In: Chromos. Today, 11. Sumner, A.T. & Chandley, A.C (eds.). London. 79-90.

Howell, W.M. (1977) Visualization of ribosomal gene activity: silver-staining proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chormosoma* 62: 361-367.

Kaiser, H.; Mais, C.; Bolaños & F.; Steinlein, C. (1996) Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. *Genetica* 98: 95-102.

Kasahara, S.; Silva, A.P.Z. & Haddad, C.F.B. (1996) Chromosome banding in three species of brazilian toads (Amphibia – Bufonidae). *Braz. J. Genet.* 19: 237-242.

Kasahara, S.; Silva, A.P.Z.; Gruber, S.L. & Haddad, C.F.B. (2003) Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil *Cytogenetic And Genome Research* 103 (1-2): 155-162.

- King, M.; Contreras, S.N. & Honeycutt, R.L. (1990) Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. *Genetica* 80:17-29.
- King, M. (1991) Evolution of heterochromatin in the Amphibian genome. In: Green, M. G. & Sessions, S. K., eds. Amphibian Cytogenetic and Evolution. Academic Press, San Diego, pp. 359-91.
- Klappenbach, M.A. & Langone, J. (1992) A. Lista sistemática y sinonímica de los anfibios del Uruguay. *An. del Museo Nac. Hist. Nat. Montevideo* 2 (VII): 163-222.
- Langone, J.A. (1997) Caracterización de *Hyla guentheri* Bouleger 1886 (Amphibia, Anura Hylidae). *Cuad. Herp.* 11: 13-20.
- Long, E.O. & David, I.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Bioch.* 49: 727-764.
- Lourenço L.B.; Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1998) Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chrom. Res.* 6: 621-628.

- Lourenço, L.B.; Garcia, P.C.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2000) Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae) with phylogenetic comments. *Hereditas* 133: 201-209.
- Lourenço, L.B.; Garcia P.C.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2003) Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* and new insights into the relationship with *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae). *Italian Journal of Zoology* 70 (2): 183-190.
- Lutz, B. (1973) Brazilian species of *Hyla*. Austin & London, University of Texas Press. 112-123p.
- Medeiros, L.R.; Rossa-Feres, D.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003) Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. *J. Heredity* 94 (2): 149-154.
- Mello, M.L.S. (2001) Nucléolo. In: Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. Eds. A Célula 2001. Manole, São Paulo, 287p.
- Mello, M.L.S. (2001) Cromatina e cromossomos. In: CARVALHO, H.F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. A Célula 2001. Manole, São Paulo, 287p.
- Miller, O.L. (1981) The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. *J. Cell Biol.* 91: 15-17.

- Miura, I.; Nishioka, M.; Borkin, L.J. & Wu, Z. (1995) The origin of the brown frogs with $2n=24$ chromosomes. *Experientia* 51: 179-188.
- Morescalchi, A. (1973) Amphibia. In: Cytotaxonomy and vertebrate evolution. AB. Chiarelli and G. Capanna Eds. Acad. Press, London and New York, pp.233-348.
- Morescalchi, A. (1990) Cytogenetics and problem of Lisamphibian relationships. In: Cytogenetics of Amphibians and Reptiles. E. Olmo ed., Birkhäuser Verlag, Basel pp. 1-9.
- Nardi, I.; Barsacchi-Pilone, G. & Andronico, F. (1977) Chromosomal location of the rRNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). *Chromosoma* 64: 67-84.
- Pough, F.V.; Andrews, R.W.; Cadle, J.E.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H. & Wells, K.D. (1999) Herpetology. Upper Saddle River. Prattice-Hall, Inc. XI+577p. 1198.
- Rabello, M.N. (1970) Chromosomal studies in brazilian anurans. *Caryologia*, 23 (1): 45-59.
- Raber, S.C.; Carvalho, K.A.; Garcia; P.C.A.; Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S.M. (2004—in press) Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). *Phylomedusa*, 3(1).

- Rosa, C.; Aguiar-Jr., O.; Giaretta, A.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2003) Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in a leptodactylid frog. *Copeia* 1: 166–174.
- Ruvinsky, I. & Maxson, L.R. (1996) Phylogenetic relationships among bufonoid frogs (Anura: Neobatrachias) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5 (3): 533-547.
- Schmid, M. (1982) Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-44.
- Schmid, M.; Steilein, C.; Nanda, I. & Epplen, J.T. (1990) Chromosome banding in Amphibia. In: Cytogenetics of Amphibians and Reptiles. Olmo, E. (ed.) Birkhäuser, pp.21-45.
- Schmid, M.; Steilein, C.; Feichtinger, W & Poot, M. (1993) Chromosome banding in Amphibia XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet Cell Genet* 62: 42-48.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Weimer, R.; Mais, C.; Bolaños, F. & León, P. (1995) Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytog. Cell Genet.* 69: 18–26.

- Schmid, M.; Haaf, T; Steinlein, C.; Nanda, I & Mahony, M. (2002) Chromosome banding in Amphibia XXV. Karyotype evolution and heterochromatin characterization in Australian *Mixophyes* (Anura, Myobatrachidae). *Cytogenet Genome Res.* 97: 239-253.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; García, R.V. & Badillo, A.F. (2003) Chromosome banding in Amphibia XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and derives Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytog. Genome Res.* 101: 62–73.
- Schmid, M. & Steinlein, C. (2003) Chromosome banding in Amphibia XXIX. The primitive XY/XX sex chromosomes of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). *Cytog. Genome Res.* 101: 74–79.
- Schwarzacher, H.G.; Milkelsaer, A.V. & Schnedl, W. (1978) The nature of Ag-staining of nucleolus organizer region. Electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis. *Cytogen. Cell. Genet.* 20: 24-39.
- Silva, A.P.Z., Haddad C.F.B. & Kasahara S. (1999) Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas*, 131: 135-141.

- Silva, A.P.Z., Baldissera-Jr, F.A., Haddad, C.F.B. & Kasahara, S. (2000) Karyotypes and nucleolus organizer regions of the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia, Ser. Zool.*, 88: 159-164.
- Siqueira-Jr., S.; Ananias, F. & Recco-Pimentel, S.M. (2004—in press.) Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. *Gen. Mol. Biol.*
- Sumner, A. T. (1990) C-banding and related methods. In: Chromosome banding. Unwin Hyman Ed. London, pp. 39-69.
- Veiga-Menoncello, A.C.P.; Lima, A.P.; & Recco-Pimentel, S.M. (2003a) Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas* 139: 189–198.
- Veiga-Menoncello, A.C.P.; Lima, A.P.; & Recco-Pimentel, S.M. (2003b) Cytogenetic of two central Amazonian species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with nidicolous tadpoles. *Caryologia* (56) 3: 253–260.
- Wiley, J.E. (2003) Replication banding and FISH analyses reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. *Cytog. Genome Res.* 101: 80–83.

II. ARTIGO

**Caracterização cromossômica de espécies do grupo de *Hyla polytaenia*
(Anura, Hylidae)**

Samantha C. Vieira¹, Fernando Ananias², Paulo C. A. Garcia³, Luciana B. Nascimento⁴ &
Shirlei M. Recco-Pimentel¹

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, SP. ²Laboratório de Genética, Curso de
Ciências Biológicas, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP. 12916900 e-mail:
fernando.ananias@saofrancisco.edu.br. ³Área de Ciências da Saúde, Curso de Ciências
Biológicas, Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) 08780-911, Mogi das Cruzes, SP. e-
mail: paulochristiano@umc.br. ⁴Museu de Ciências Naturais, Departamento de Ciências
Biológicas, PUC 30535-610 Belo Horizonte, M. G. e-mail: luna@pucminas.br

Correspondence to:

Shirlei M. Recco-Pimentel

Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP

CP 6109, 13083-863 – Campinas, SP, Brasil.

Fone/Fax: +55-193788-6111

e-mail: shirlei@unicamp.br

Resumo

A composição dos grupos de *Hyla polytaenia* e de *Hyla pulchella* e o relacionamento entre eles ainda é controverso. Como os dados citogenéticos para espécies do grupo de *Hyla polytaenia* são bastante escassos, dificultando a comparação entre esses grupos, no presente trabalho foram analisadas as espécies *H. polytaenia*, *H. sp.* (aff. *polytaenia*) e *H. leptolineata*. As três espécies apresentaram número diplóide de $2n=24$ cromossomos com morfologia bastante semelhante, com cromossomos metacêntricos (pares 1, 2, 8, 9, 10, 11 e 12), submetacêntricos (3, 5 e 7) e subtelocêntricos (4 e 6). A NOR foi localizada no par 10 nas três espécies. Três indivíduos de *H. leptolineata* apresentaram NOR adicional na região telomérica do par 1, sendo que em dois deles em apenas um dos homólogos. *Hyla polytaenia* e *H. sp.* (aff. *polytaenia*) apresentaram o mesmo padrão de distribuição de heterocromatina, diferindo de *Hyla leptolineata* pela ausência de uma banda no braço longo do par 3 e presença das bandas intersticiais no braço curto do par 6 e no braço longo do par 7. As três espécies apresentaram um bloco heterocromático no braço longo do par 10, sendo mais próximo ao centrômero em *H. polytaenia* e *H. leptolineata* e intersticial em *H. sp.* (aff. *polytaenia*). Comparação dos cariótipos das espécies do grupo de *Hyla polytaenia* com aqueles do grupo de *Hyla pulchella* e com *H. bischoffi* e *H. guentheri* revelou similaridades entre eles quanto à morfologia dos cromossomos, à localização da NOR e à presença de algumas bandas heterocromáticas intersticiais. Uma característica comum a todas as espécies é a presença do bloco heterocromático no par 10 que parece ser um marcador para essas espécies proximamente relacionadas. Os dados citogenéticos mostram que todas essas espécies poderiam compor um único grupo e sugere-se a revisão taxonômica desses agrupamentos.

Introdução

O grupo de *Hyla polytaenia* foi definido através de análises morfológicas, sendo constituído atualmente de sete espécies, *Hyla polytaenia* Cope, 1870, *H. cipoensis* B. Lutz, 1968, *H. goiana* B. Lutz, 1968, *H. leptolineata* Braun & Braun, 1977, *H. buriti* Caramaschi e Cruz, 1999, *H. stenocephala* Caramaschi e Cruz, 1999 e *H. phaeopleura* Caramaschi e Cruz, 2000 (Cruz & Caramaschi, 1998; Caramaschi & Cruz, 1999; 2000). Admite-se que o grupo de *Hyla polytaenia* seja proximamente relacionado ao grupo de *Hyla pulchella* e a inclusão de espécies nesses grupos tem causado controvérsia (Lutz, 1973; Langone, 1997). As espécies *H. bischoffi* Boulenger, 1887 e *H. guentheri* Boulenger, 1886, atualmente sem grupo, também compartilham algumas características morfológicas com espécies do grupo de *Hyla polytaenia* (Langone, 1997) e outras com espécies do grupo de *Hyla pulchella*, o que fez com que a inclusão em um ou outro grupo fosse motivo de discordância entre os pesquisadores.

Algumas espécies do grupo de *Hyla pulchella*, como *H. pulchella* Duméril e Bibron, 1841; *H. joaquini* Lutz, 1968; *H. prasina* Burmeister, 1856, *H. caingua* Carrizo, 1990; *H. marginata* Boulenger, 1887; *H. semiguttata* Lutz, 1925 e *H. aff. semiguttata* e as espécies *H. bischoffi* e *H. guentheri* foram estudadas citogeneticamente e caracterizadas quanto à morfologia de seus cromossomos, revelando grande semelhança entre todos esses cariótipos (Ananias, 1996, Ananias *et al.*, 2004; Raber *et al.*, 2004 – in press). No entanto, para o grupo de *Hyla polytaenia* há apenas a descrição do cariótipo da espécie *H. polytaenia* somente por métodos de coloração convencional (Rabello, 1970).

As mesmas espécies do grupo de *H. pulchella* citadas acima e também *H. bischoffi*, *H. guentheri* e *H. sp. (aff. polytaenia)* foram analisadas através de seqüências do gene citocromo b e região controle do DNA mitocondrial (Ananias *et al.*, 2004 – in prep.), num estudo que sugeriu a inclusão de *H. bischoffi* e *H. guentheri* no grupo de *Hyla pulchella*. Além disso, nos cladogramas obtidos naquele trabalho, *H. sp. (aff. polytaenia)* também permaneceu sempre no mesmo clado das espécies do grupo de *Hyla pulchella* e de *H. bischoffi* e *H. guentheri*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi ampliar a análise citogenética do grupo de *Hyla polytaenia*, com o estudo de *H. polytaenia*, *H. sp. (aff. polytaenia)* e *H. leptolineata*, permitindo assim uma comparação com as espécies consideradas próximas (grupo de *Hyla pulchella* e *H. bischoffi* e *H. guentheri*), buscando novos caracteres que permitam avaliar os relacionamentos entre esses grupos.

Material e Métodos

Animais

Foram analisados 15 espécimes de *Hyla polytaenia*, provenientes da Área de Proteção da Captação da Mutuca (APCM), Vale do Ribeirão da Mutuca, município de Nova Lima, Minas Gerais, 28 espécimes de *H. sp. (aff. polytaenia)*, coletados na Serra do Itapety, Mogi das Cruzes, São Paulo e 10 espécimes de *H. leptolineata*, provenientes do município São Domingo, Santa Catarina. Os animais foram coletados com autorização do Instituto

Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) – processo nº 02010002896/03-29.

Todos os animais foram depositados e registrados no Museu de História Natural “Professor Adão José Cardoso” na Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, sob os números de acesso ZUEC 12333 - 12347 (*H. polytaenia*), ZUEC 12278, 12321 - 12332, 12348 - 12352 e 12379 - 12381 (*H. sp.* (aff. *polytaenia*) e ZUEC 11968 - 11977 (*H. leptolineata*).

Obtenção das metáfases e técnicas empregadas

As preparações cromossômicas foram obtidas através de suspensão de células do epitélio intestinal e testículos de animais previamente tratados com colchicina 2% por cerca de quatro horas como descrito por King & Rofe (1976) e Schmid (1978).

As técnicas utilizadas foram: coloração convencional com Giemsa, Ag-NOR como descrito por Howell e Black (1980), bandamento C, segundo a técnica de Sumner (1972), com modificação no tempo de incubação em hidróxido de bário e hibridação “in situ” fluorescente (FISH) com sonda de DNA ribossomal (HM 123, plasmídeo recombinante contendo fragmentos de DNAr de *Xenopus laevis*) (Meunier-Rotival *et al.*, 1979) seguindo o método descrito por Viegas-Péquinhot (1992).

Os cromossomos foram medidos com auxílio do Programa “Image – Pro Plus”, versão 4.0 e classificados de acordo com Green & Sessions (1991) ver tabela 1.

Resultados

Cariótipo

As três espécies analisadas apresentaram $2n=24$ cromossomos e cariótipo bimodal com 6 pares de cromossomos grandes e 6 pares de cromossomos pequenos. Os pares 1, 2, 8, 9, 10, 11 e 12 são metacêntricos; os pares 3, 5 e 7 são submetacêntricos e os pares 4 e 6 são subtelo-cêntricos (tabela 1, figuras 1 e 5). Em *H. leptolineata* foi observada uma constrição secundária próxima ao telômero do braço longo em um dos homólogos do par 10. Em *H. polytaenia* esta constrição foi observada em ambos os homólogos (figura 1a e c; 5a e c).

Região organizadora do nucléolo (NOR)

Em *Hyla polytaenia* e *H. sp. (aff. polytaenia)* os métodos Ag-NOR e hibridação “in situ” evidenciaram a NOR no braço longo do par 10, sendo que em *H. polytaenia* a NOR se localiza mais próxima ao telômero, coincidindo com a constrição secundária, e em *H. sp. (aff. polytaenia)* mais próximo ao centrômero e com heteromorfismo de tamanho entre os homólogos (figuras 2 a e b; 4a e b; 5a e b).

Em *H. leptolineata*, a NOR está localizada na região telomérica do braço longo do par 10, coincidente com a constrição secundária, apresentando heteromorfismo de tamanho (figuras 2c e 5c). Em três dos dez indivíduos analisados, uma NOR adicional foi detectada pelo método Ag-NOR na região telomérica do braço curto de um dos homólogos do par 1 e essa condição foi confirmada pela hibridação “in situ” fluorescente (figuras 2d, 4c e 5c). Apenas um dos três indivíduos que apresentaram NOR adicional pela impregnação por prata, apresentou o outro homólogo do par 1 marcado por FISH (figura 4d).

Heterocromatina

A banda C evidenciou blocos de heterocromatina nos centrômeros de todos os cromossomos das três espécies. *Hyla polytaenia* e *H. sp. (aff. polytaenia)* apresentaram uma banda fracamente corada no telômero do braço longo do par 1, um bloco heterocromático fortemente corado em quase todo braço curto do par 6, um bloco adjacente ao centrômero no braço longo do par 7 e um outro no braço longo do par 10 (figuras 3a e b, 5 a e b). *Hyla leptolineata* apresentou uma banda no telômero do braço longo do par 1 e na região intersticial do braço longo do par 3, além de uma banda fortemente corada adjacente ao centrômero no braço longo do par 10 (figuras 3c e 5c). O bloco heterocromático do par 10 está localizado na região pericentromérica em *H. polytaenia* e em *H. leptolineata* e mais distante do centrômero em posição intersticial no braço em *H. sp. (aff. polytaenia)* (figuras 3 e 5).

Discussão

As espécies do grupo de *Hyla polytaenia* analisadas no presente trabalho apresentaram cariótipos muito semelhantes entre si em número e morfologia cromossômica. O cariótipo de *H. polytaenia* do presente estudo é semelhante ao descrito por Rabello (1970), embora haja divergência na classificação de alguns cromossomos uma vez que o presente estudo baseou-se de parâmetros mais recentes propostos por Green & Sessions (1991).

As três espécies analisadas podem ser distinguidas entre si pelo padrão de distribuição da heterocromatina. *Hyla polytaenia* e *H. sp. (aff. polytaenia)* diferiram de *H. leptolineata* pela presença em ambas de uma banda fortemente corada no braço curto do par 6 e no

braço longo do par 7. *Hyla leptolineata*, por outro lado, apresentou heterocromatina intersticial no braço longo do par 3, que não foi observada nas outras duas espécies. Essa diferenciação, através da distribuição de heterocromatina, de espécies próximas com cariótipos muito parecidos já foi observada também em *Colostethus marchesianus*, *C. caeruleodactylus*, *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*) e *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*) (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003) e também entre as espécies do grupo de *Hyla pulchella* (Ananias, 1996; Ananias *et al.*, 2004).

As espécies do grupo de *Hyla polytaenia* analisadas no presente trabalho apresentaram a morfologia dos cromossomos muito semelhante a das espécies do grupo de *Hyla pulchella* analisadas até o momento, como *H. pulchella*, *H. prasina*, *H. joaquini*, *H. caingua* (Ananias, 1996), *H. semiguttata*, *H. aff. semiguttata* e *H. marginata* (Ananias *et al.*, 2004) e àquelas descritas para *H. guentheri* e *H. bischoffi*, (Raber *et al.*, 2004 – in press) espécies próximas não incluídas nesses grupos. As espécies de *Hyla* com $2n = 24$ cromossomos apresentam em geral um cariótipo bastante conservado quanto à morfologia dos cromossomos por coloração convencional. No entanto, agrupando as características de morfologia cromossômica com a distribuição de heterocromatina e a localização de região organizadora do nucléolo, podem-se observar semelhanças e diferenças entre as espécies de *Hyla* tidas como proximamente relacionadas, conforme resumido na tabela 2.

Assim, o bloco heterocromático no telômero do braço longo do par 1 das três espécies analisadas no presente trabalho foi detectado também para *H. joaquini*, *H. prasina* (Ananias, 1996), *H. bischoffi*, *H. guentheri* (Raber *et al.*, 2004 – in press), *H. semiguttata*, *H. aff. semiguttata* e *H. marginata* (Ananias *et al.*, 2004). A banda C intersticial no braço longo do par 3 encontrada em *H. leptolineata* parece corresponder à encontrada em *H.*

caingua e *H. prasina* (Ananias, 1996). A presença de um bloco de heterocromatina que se estende do centrômero em direção ao braço curto do par 6 observado em *H. polytaenia* e *H. sp.* (aff. *polytaenia*), foi relatado por Raber *et al.* (2004 – in press) em *H. bischoffi*. A região banda C-positiva encontrada adjacente ao centrômero no braço longo do par 7 em *H. polytaenia* e *H. sp.* (aff. *polytaenia*) foi relatada também para *H. prasina* (Ananias, 1996).

No entanto, a banda C mais notável é o bloco de heterocromatina detectado no braço longo do par 10 nas três espécies analisadas, única característica que também foi detectada em todas as espécies do grupo de *Hyla pulchella* analisadas até o momento (Ananias, 1996; Ananias *et al.*, 2004) e em *H. bischoffi* e *H. guentheri* (Raber *et al.*, 2004 – in press). Embora o par 10 pareça ser homeólogo para todas essas espécies do grupo de *Hyla pulchella*, para *H. bischoffi*, *H. guentheri* e para o grupo de *Hyla polytaenia* ele difere dentre essas espécies quanto à posição da banda heterocromática intersticial citada (mais próximo ou mais distante do centrômero).

As três espécies do grupo de *Hyla polytaenia* apresentaram a NOR no par 10 adjacente ao bloco de heterocromatina, sendo que em *H. sp.* (aff. *polytaenia*) localiza-se na região pericentromérica, como em *H. marginata* (Ananias *et al.*, 2004), e em *H. polytaenia* e *H. leptolineata* na região telomérica, como em *H. bischoffi* e *H. guentheri* (Raber *et al.*, 2004 – in press). Considerando este cromossomo homeólogo, o posicionamento interno da NOR e do bloco de heterocromatina no par 10 pode ser explicado por rearranjo cromossômico como inversão paracêntrica, já que a razão de braços não mudou entre esses cromossomos. Outros casos de inversão paracêntrica já foram anteriormente descritas em anfíbios, como em *Alytes obstetricans* (Schmid *et al.*, 1987) e em *Paratelmatobius cardosoi* (Lourenço *et al.*, 2003).

Hyla polytaenia difere de *H. sp. (aff. polytaenia)* apenas pelo posicionamento invertido da NOR e do bloco heterocromático no braço longo do par 10, o que não permite considerá-las espécies citogeneticamente distintas. Nas outras espécies do grupo de *Hyla pulchella*, a NOR ocorre no par 7 em *H. caingua*, no par 12 em *H. pulchella* e *H. prasina* e no par 1 em *H. joaquini*, *H. semiguttata* e *H. aff. semiguttata*. A variação na localização da NOR em cariótipos de espécies pertencentes ao mesmo grupo, ou a grupos relacionados indica a ocorrência de rearranjos cromossômicos envolvendo os segmentos cromossômicos da NOR durante a evolução dos anuros (Schmid *et al.*, 1978; Schmid, 1982), o que deve ter ocorrido com as espécies dos grupos em questão. Alguns mecanismos para explicar a dispersão da NOR no genoma de anuros têm sido discutidos por diversos autores. Entre esses mecanismos pode-se citar a transposição da NOR, que são carregadas por elementos genéticos móveis presentes próximos a essas regiões, amplificação de cístrons ribossomais, e sua re-inserção em outros locais que ocorrem durante a ovogênese de anfíbios ou ainda ocorrência de translocações envolvendo segmentos cromossômicos que contêm a NOR (King *et al.*, 1990; Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1995).

A NOR adicional em um dos homólogos do par 1, detectada por impregnação por prata e confirmada por hibridação “in situ”, em três dos indivíduos de *H. leptolineata* ocupa a mesma região cromossômica da NOR de *H. joaquini*, *H. semiguttata* e *H. aff. semiguttata* (Ananias, 1996; Ananias *et al.*, 2004). Em um desses três indivíduos os dois homólogos do par 1 foram marcados pela FISH. A ocorrência de NOR adicional marcada pela prata em apenas um dos homólogos do par cromossômico foi descrita também para vários outros anuros, como *H. chrysocelis* e *H. versicolor* (Wiley *et al.*, 1989), *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991), *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995) e *Physalaemus cuvieri* (Silva *et al.*,

1999). Marcações adicionais evidenciadas pela FISH que não foram observadas através da impregnação por prata foram relatadas em *H. nana* (Medeiros *et al.*, 2003) e em *Colosthetus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003). Segundo Kaiser *et al.* (1996), apesar destes casos sugerirem evidente inativação de sítios de NOR, não há descrição de regulação da NOR em anfíbios. Embora não se tenha uma explicação definitiva para a não impregnação pela prata, pode-se especular que o tamanho reduzido da NOR possa ter dificultado a visualização da impregnação de prata naquela região, ou ainda, que as seqüências detectadas por FISH possam não representar unidades repetitivas completas e funcionais.

A presença de NOR no par 1 e em outros pares como condições basal e derivada, respectivamente, foi sugerida com base em análise molecular de DNA mitocondrial de espécies do grupo de *Hyla pulchella* (Ananias *et al.*, 2004 - in prep.). Nossos resultados corroboram esta hipótese, uma vez que em uma mesma população da espécie *H. leptolineata* ocorreram mais indivíduos com NOR somente no par 10 e apenas três indivíduos com NOR principal no par 10 e NOR adicional em um ou dois dos homólogos do par 1, podendo-se aventar a possibilidade de transferência da NOR para o par 10.

Considerando a hipótese proposta por Ananias *et al.* (2004 - in prep.), a localização da NOR no par 10 como estado derivado agruparia as três espécies analisadas no presente estudo com *H. marginata*, *H. bischoffi* e *H. guentheri*. No entanto, esse agrupamento não ocorre se consideramos a análise molecular de Faivovich *et al.* (2004 - in press), pois nesse caso a NOR no par 10 não seria um estado derivado outra explicação possível seria a de que o surgimento da NOR no par 10 possa ter ocorrido duas vezes, uma para as espécies *H. guentheri*, *H. bischoffi* e *H. marginata* (grupo de *Hyla pulchella*) e outra para as espécies de

H. polytaenia, *H. sp. (aff. polytaenia)* e *H. leptolienata* (grupo de *Hyla polytaenia*). A divergência existente entre os dois estudos provavelmente ocorreu porque foram utilizadas espécies diferentes do grupo de *Hyla polytaenia* nas duas inferências filogenéticas. Portanto, a condição apomórfica da NOR no par10 ainda parece ser uma questão pendente.

A análise de morfologia cromossômica, padrão de heterocromatina e localização da região organizadora do nucléolo mostrou várias homeologias (ver tabela 2) que demonstram a grande semelhança das espécies do grupo de *Hyla pulchella* com as espécies do grupo de *Hyla polytaenia* e destas com as espécies *H. bischoffi* e *H. guentheri*. Portanto não corroboram o estabelecimento de dois grupos separados e nem a exclusão de *H. bischoffi* e *H. guentheri* dos grupos de *Hyla polytaenia* e de *Hyla pulchella*. A proximidade dessas duas espécies com o grupo de *Hyla pulchella* foi discutido por Raber *et al.* (2004 – in press) através de estudos citogenéticos, por Garcia (2003) através de análise morfológica e por Faivovich *et al.* (2004 – in press) e Ananias *et al.* (2004 - in prep.) através de dados moleculares. A análise molecular de espécies do grupo de *Hyla pulchella* (Ananias *et al.*, 2004 – in prep.) incluiu também *H. sp. (aff. polytaenia)*, que permaneceu sempre no mesmo clado das espécies do grupo de *Hyla pulchella*, *H. bischoffi* e *H. guentheri*, o que está de acordo com os dados citogenéticos.

Portanto, com base nos dados morfológicos, citogenéticos e moleculares disponíveis, sugere-se que o agrupamento dessas espécies seja reavaliado.

Referências Bibliográficas

- Ananias, F. (1996) Análise citogenética de espécies e subespécies de *Hyla* do grupo *pulchella* (Anura, Hylidae). Dissertação de Mestrado – UNICAMP.
- Ananias, F.; Garcia, P.C.A.; Bacci-Jr, M.; Martins, V.G.; Faivovich, J.A.; Azeredo-Espin, M.L. & Recco-Pimentel, S.M. (2004–in prep.) Molecular phylogenetic analysis of some phenotypically variable populations of *Hyla semiguttata* and related species (Anura: Hylidae).
- Ananias, F.; Garcia, P.C.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2004) Conserved karyotype in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 140: 42-48.
- Caramaschi, U. & Cruz, C.A.G. (1999) Duas espécies novas do grupo de *Hyla polytaenia* Cope 1870 do Estado de Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Bol. Museu Nac. Zool.*, 403:1-10.
- Caramaschi, U. & Cruz, C.A.G. (2000) Duas espécies novas de *Hyla* Laurenti, 1768 do Estado de Goiás, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Bol. Museu Nac. Zool.*, 422: 1-12.
- Cruz, C.A.G. & Caramaschi, U. (1998) Definição, composição e distribuição geográfica do grupo de *Hyla polytaenia* Cope, 1870 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Bol. Museu Nac. Zool.*, Rio de Janeiro, 392: 1-19.

Faivovich, J.; Garcia, P.C.A.; Ananias, F.; Lanari, L.; Basso, N.G. & Wheeler, W.C.A.

(2004) A molecular perspective of the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Mol. Phyl. and Evol.*

Foote D.L.; Willey, J.E.; Little, M.L. & Meyne, J. (1991) Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 196-199.

Garcia, P.C.A. (2003) Revisão taxonômica e análise filogenética das espécies do gênero *Hyla* Laurenti do complexo *marginata/semiguttata* (Amphibia, Anura, Hylidae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brasil.

Green, D.M. & Session, S. K. (1991) Nomenclature for Chromossomes In: Amphibian cytogenetics and evolution (eds. Green, D.M. & Sessions, S.K.) Academic. Press, San Diego. 455p.

Howell, W.M. & Black, D.A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia* 36: 1014-5.

Kaiser, H.; Mais, C.; Bolaños & F.; Steinlein, C. (1996) Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. *Genetica* 98: 95-102.

- King, M. & Rofe, R. (1976) Karyotypic variation in the Australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma* 54: 75 – 87.
- King, M.; Contreras, S.N. & Honeycutt, R.L. (1990) Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. *Genetica* 80: 17-29.
- Langone, J.A. (1997) Characterization de *Hyla guentheri* Bouleger 1880 (Amphibia, Anura Hylidae). *Cuad. Herp.* 11 (1-2): 13-20.
- Lourenço L.B.; Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1998) Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chrom. Res.* 6: 621-628.
- Lourenço, L.B.; Garcia P.C.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2003) Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* and new insights into the relationship with *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae). *Italian Journal of Zoology* 70 (2): 183-190.
- Medeiros, L.R., Rossa-Feres, D.C. & Recco-Pimentel, S. M. (2003) Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. *J. Heredity* 94 (2): 149-154.

- Meunier-Rotival M.; Cortadas, J.; Macaya, G. & Bernardi, G. (1979) Isolation and organization of calf ribosomal DNA. Nucl. Acids Res. 6: 2109-2123.
- Rabello, M. N. (1970) Chromosomal studies in brazilian anurans. Caryologia, 23(1):45-59.
- Raber, S. C.; Carvalho, K. A.; Garcia, P. C. A.; Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S. M. (2004 – in press) Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae) Phylomedusa, 3(1).
- Schmid, M. (1978) Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66: 361-388.
- Schmid, M. (1982) Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. Chromosoma 87: 327-44.
- Schmid, M., Vitelli, L. & Batistoni, R. (1987). Chromosome banding in Amphibia XI: Constitutive heterochromatin, nucleolus organizer regions 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. Chromosoma (95): 271-284.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Weimer, R.; Mais, C.; Bolaños, F. & León, P. (1995) Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism and multiple

- nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytog. Cell Gent.* 69: 18 – 26.
- Sumner, A. T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.
- Veiga-Menoncello, A. C. P.; Lima, A. P.; & Recco-Pimentel, S. M. (2003) Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas* 139: 189 – 198.
- Viegas-Péquignot E. (1992) *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. ed. *In situ hybridization: a practical approach*. Oxford, Oxford University press, IRL press, pp 137-158.
- Wiley, J. E.; Little, M. L.; Romano, M. A.; Blount, A. & Cline, G. R. (1989) Polymorphism in the location of the 18S and 28S rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysocelis* and *H. vesicolor*. *Chromosoma* 97: 481-487.

Tabela 1. Dados morfométricos dos cromossomos de *Hyla polytaenia*, *H. sp.* (aff. *polytaenia*) e *H. leptolineata*.

| <i>Hyla polytaenia</i> | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| Nº | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| RB | 1,10 | 1,61 | 2,03 | 3,30 | 1,72 | 4,10 | 1,86 | 1,23 | 1,40 | 1,10 | 1,07 | 1,05 |
| TR | 15,05 | 13,62 | 10,49 | 10,30 | 9,75 | 8,63 | 6,97 | 5,21 | 4,20 | 4,02 | 3,63 | 3,40 |
| PC | m | m | sm | st | sm | st | sm | m | m | m | m | m |
| <i>Hyla sp (aff. polytaenia)</i> | | | | | | | | | | | | |
| Nº | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| RB | 1,06 | 1,48 | 1,91 | 3,25 | 2,01 | 4,16 | 1,87 | 1,19 | 1,32 | 1,11 | 1,05 | 1,11 |
| TR | 16,07 | 14,28 | 11,60 | 11,02 | 10,71 | 8,03 | 6,25 | 5,35 | 4,46 | 4,40 | 3,57 | 3,50 |
| PC | m | m | sm | st | sm | st | sm | m | m | m | m | m |
| <i>Hyla leptolineata</i> | | | | | | | | | | | | |
| Nº | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| RB | 1,14 | 1,3 | 1,69 | 3,27 | 1,69 | 4,18 | 1,86 | 1,14 | 1,09 | 1,04 | 1,01 | 1,02 |
| TR | 16,01 | 14,30 | 12,01 | 11,32 | 10,58 | 7,98 | 6,33 | 5,12 | 4,36 | 4,23 | 3,58 | 3,43 |
| PC | m | m | sm | st | sm | st | sm | m | m | m | m | m |

Legenda: RB = Razão de braços; TR = Tamanho relativo (%) PC = posição centromérica; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico e st = subtelocêntrico.

Tabela 2: Semelhanças (cinza escuro ou claro) entre as espécies analisadas no presente trabalho e as espécies proximalmente relacionadas.

| Espécies | Características | | | | | | | | | |
|---|----------------------------|-----------------------------------|---------------|--|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--|
| | Morfologia dos cromossomos | Cromos. portador da NOR principal | NOR adicional | Banda C telom. no braço longo do par 1 | Banda C no par 10 | Banda C intersticial no par 3 | Banda C intersticial no par 6 | Banda C intersticial no par 7 | Banda C intersticial em outros pares | |
| <i>H. polytaenia</i> (1) | Pares 9 e 10 metacêntricos | Par 10 | Ausente | Presente | Presente na posição pericentromérica | Ausente | Presente | Presente | Ausente | |
| <i>H. sp</i> (<i>aff. polytaenia</i>) (1) | Pares 9 e 10 metacêntricos | Par 10 | Ausente | Presente | Presente na posição intersticial | Ausente | Presente | Presente | Ausente | |
| <i>H. leptolineata</i> (1) | Pares 9 e 10 metacêntricos | Par 10 | Par 1 | Presente | Presente na posição pericentromérica | Presente | Ausente | Ausente | Ausente | |
| <i>H. guentheri</i> (2) | Pares 9 e 10 SM → M | Par 10 | Ausente | Presente | Presente na posição pericentromérica | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | |
| <i>H. bischoffi</i> (2) | Par 9 e 10 SM → M | Par 10 | Ausente | Presente | Presente na posição pericentromérica | Ausente | Presente | Ausente | Ausente | |
| <i>H. marginata</i> (4) | Pares 9 e 10 SM → M | Par 10 | Ausente | Presente | Presente na posição intersticial | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | |
| <i>H. semiguttata</i> (4) | Pares 9 e 10 SM → M | Par 1 | Ausente | Presente | Presente na posição pericentromérica | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | |
| <i>H. aff. semiguttata</i> (4) | Pares 9 e 10 SM → M | Par 1 | Ausente | Presente | Presente na posição pericentromérica | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | |
| <i>H. joaquina</i> (3) | Pares 9 e 10 SM → M | Par 1 | Ausente | Presente | Presente na posição pericentromérica | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente | |
| <i>H. pulchella pulchella</i> (3) | Pares 9 e 10 SM → M | Par 12 | Ausente | Ausente | Presente na posição pericentromérica | Ausente | Ausente | Ausente | Par 1 | |
| <i>H. prasina</i> (3) | Pares 9 e 10 SM → M | Par 12 | Ausente | Presente | Presente na posição pericentromérica | Presente | Ausente | Presente | Pares 1 e 4 | |
| <i>H. caingua</i> (3) | Pares 9 e 10 SM → M | Par 7 | Ausente | Ausente | Presente na posição pericentromérica | Presente | Ausente | Ausente | Ausente | |

SM → M = submetacêntrico para metacêntrico.

Referências: (1) presente trabalho; (2) Raber *et al.*, 2004; (3) Ananias, 1996; (4) Ananias *et al.*, 2004.

Legendas das Figuras

Figura 1. Cariótipos de *Hyla polytaenia* (a), *H. sp. (aff. polytaenia)* (b) e *H. leptolineata* (c), corados com Giemsa. Barra = 10 μ m

Figura 2. Localização da NOR através do método de impregnação por prata em *Hyla polytaenia* (a), em *H. sp. (aff. polytaenia)* (b) e em *H. leptolineata* (c e d). Seta indica NOR adicional em um dos homólogos do par 1. Barra = 10 μ m

Figura 3: Padrão de bandamento C de *Hyla polytaenia* (a), *H. sp. (aff. polytaenia)* (b) e *H. leptolineata* (c). Setas indicam bandas não centroméricas. Barra = 10 μ m

Figura 4: Localizações de NOR através de hibridação “in situ” fluorescente em *Hyla polytaenia* (a), em *H. sp. (aff. polytaenia)* (b) e em *H. leptolineata* (c e d). Setas indicam NOR adicional. Barra = 10 μ m.

Figura 5: Ideograma representando o cariótipo de *Hyla polytaenia* (a); *H. sp. (aff. polytaenia)* (b) e *H. leptolineata* (c). Áreas escuras: banda C; Círculos: localização de NOR; Interrupções: constrição secundária.

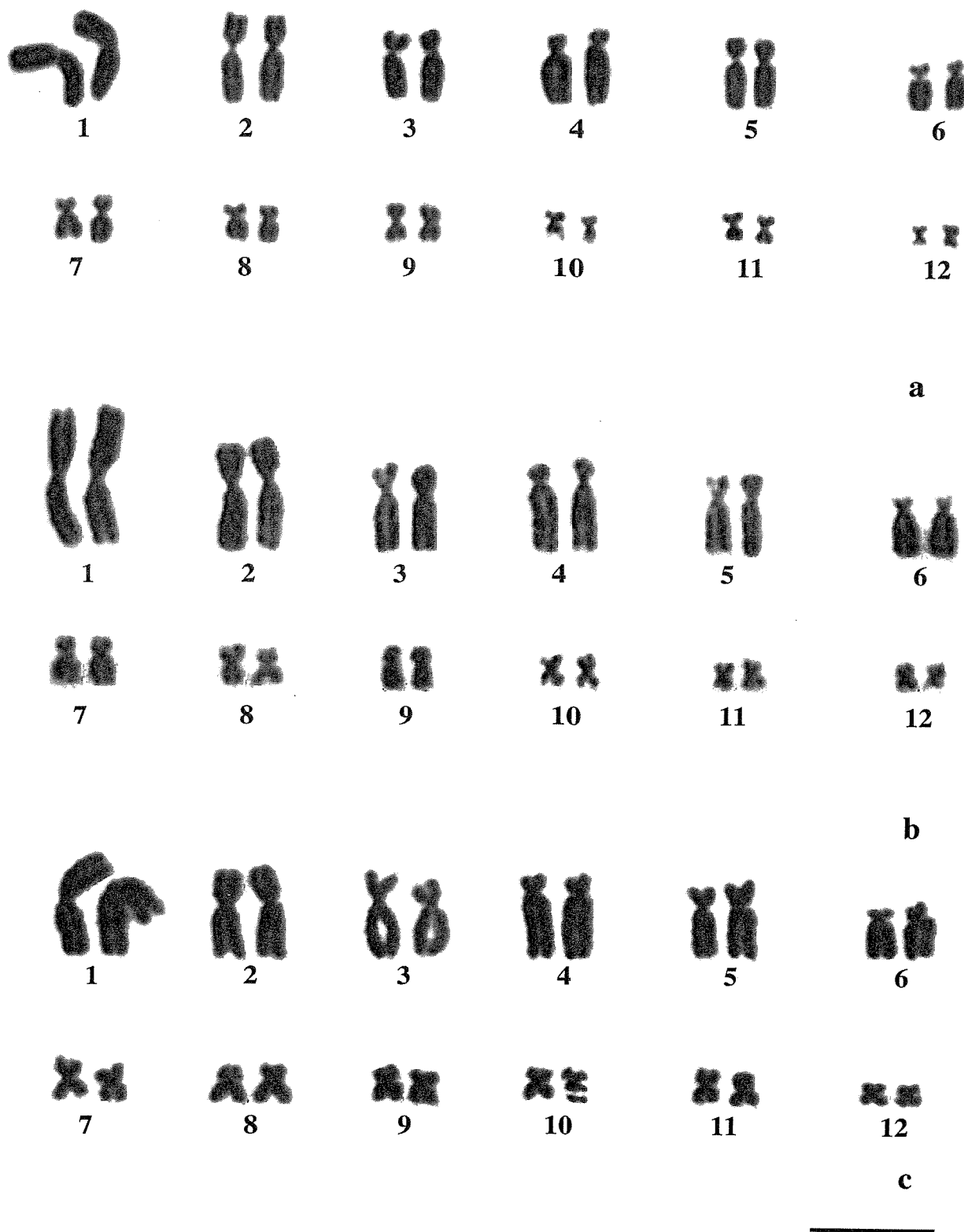


Figura 1

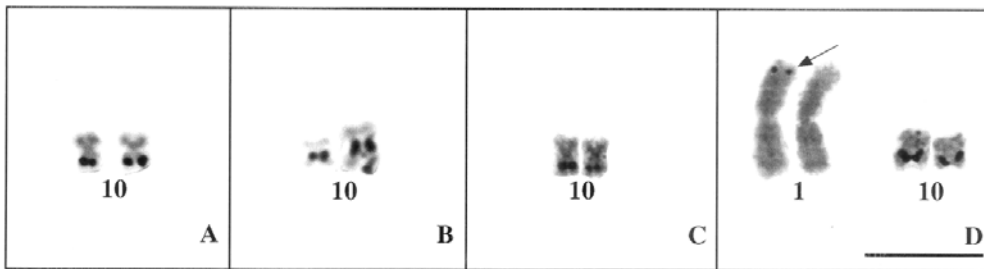


Figura 2

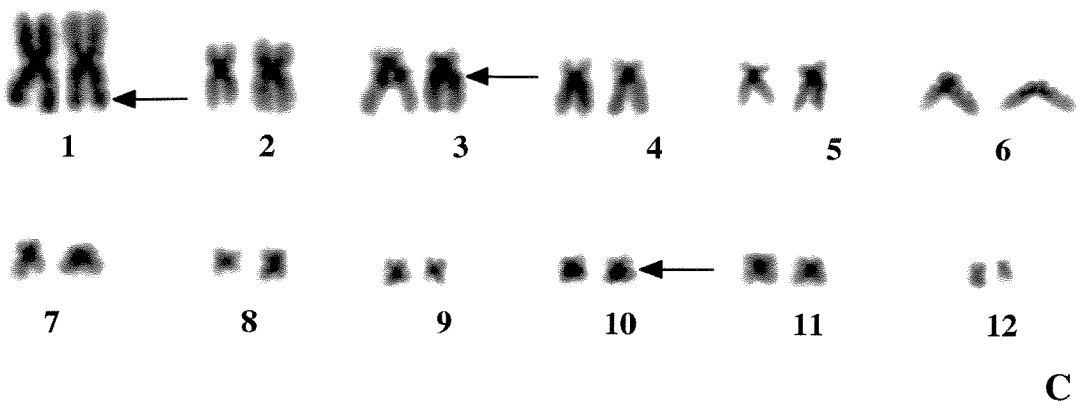
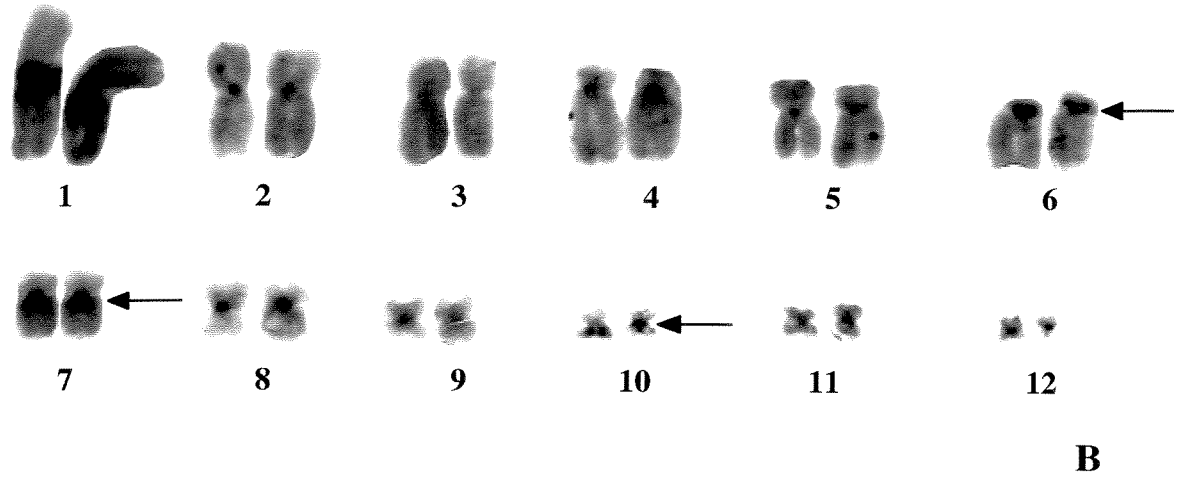
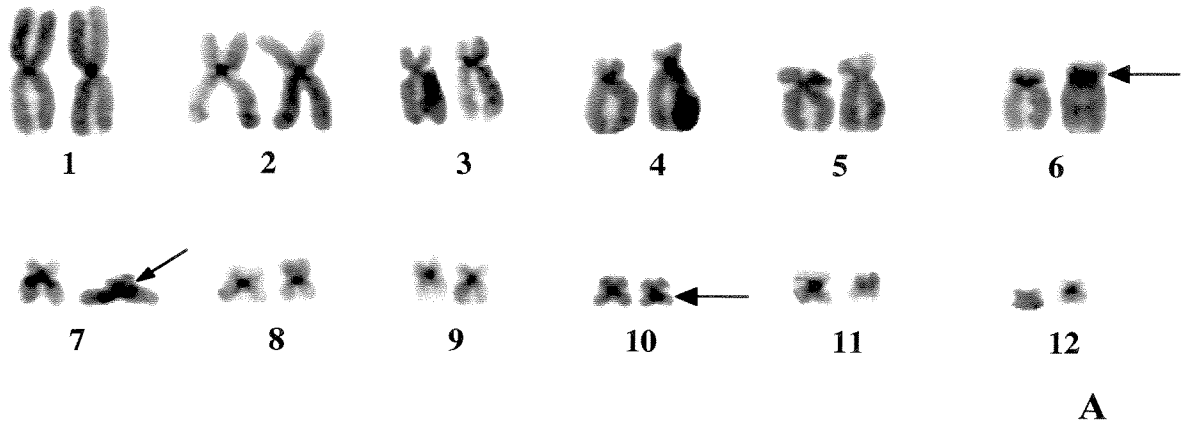


Figura 3

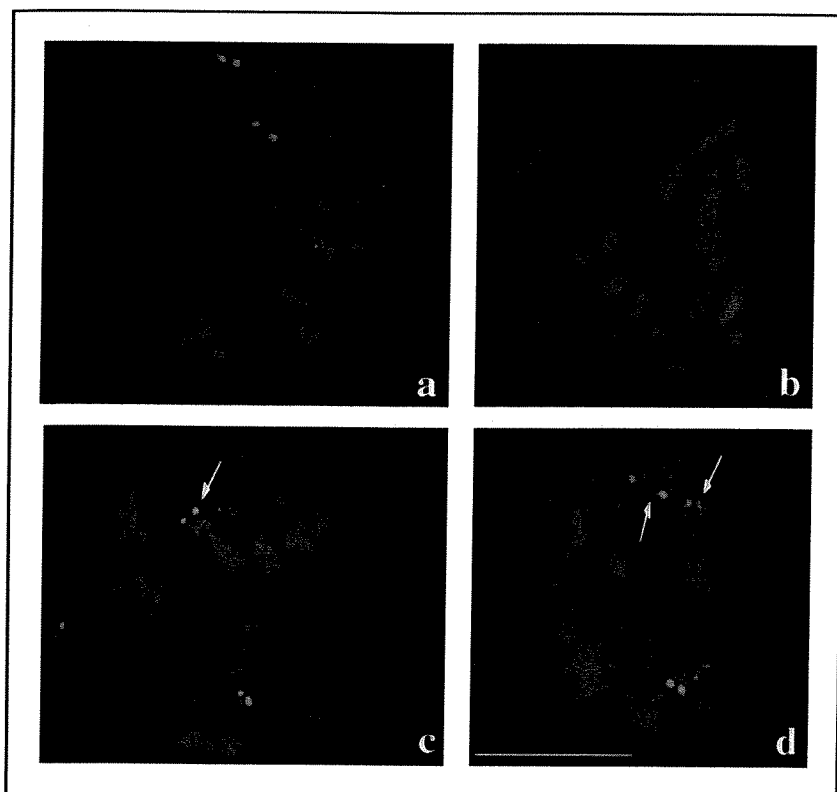


Figura 4

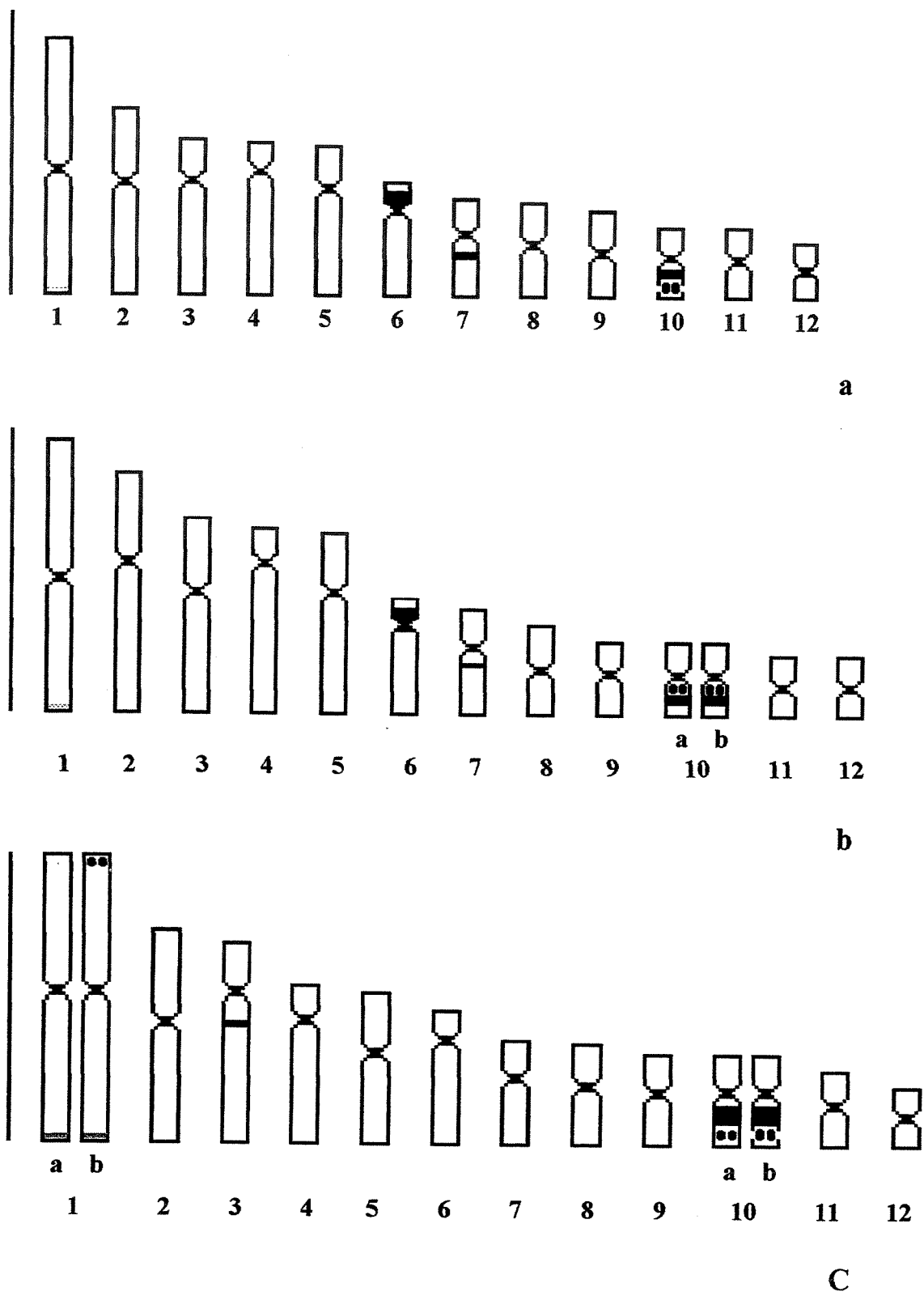


Figura 5

III. CONCLUSÕES GERAIS

1. As espécies *Hyla polytaenia*, *H. sp.* (aff. *polytaenia*) e *H. leptolineata* apresentaram $2n = 24$ cromossomos e cariótipos muito semelhantes, não sendo possível distinguí-las pela morfologia dos cromossomos em coloração convencional.
2. *Hyla polytaenia* e *H. sp.* (aff. *polytaenia*) se diferenciam de *H. leptolineata* pela presença de blocos heterocromáticos nos pares 6 e 7 e ausência da banda do par 3. Por outro lado não foi possível distinguir *H. polytaenia* de *H. sp.* (aff. *polytaenia*), pois a única diferença entre essas espécies é o posicionamento da NOR e da banda C no par 10.
3. O posicionamento do bloco de heterocromatina no par 10, mais próximo ao pericentromérico em *H. polytaenia* e em *H. leptolineata* e em intersticial no braço longo em *H. sp.* (aff. *polytaenia*), pode ser explicado por rearranjo cromossômico, como inversão paracêntrica, já que a razão de braços não mudou entre esses cromossomos.
4. As espécies do grupo de *Hyla polytaenia* apresentaram a morfologia dos cromossomos muito semelhante a das espécies do grupo de *Hyla pulchella* analisadas até o momento e a *H. bischoffi* e *H. guentheri* o que corrobora a proximidade relatada entre essas espécies por outros pesquisadores.

5. Alguns blocos heterocromáticos encontrados nas três espécies parecem ser homeólogos em algumas das espécies de outros grupos tidas como proximamente relacionadas, não caracterizando exclusivamente um agrupamento ou outro.

6. A banda C no par 10 parece ser um marcador que reúne as espécies do grupo de *Hyla polytaenia*, do grupo de *Hyla pulchella* e *H. bischoffi* e *H. guentheri* já que está presente em todas as espécies analisadas.

7. A NOR adicional detectada em um dos homólogos do par 1 observada em três indivíduos de *H. leptolineata*, mesmo par onde se localiza a NOR principal em *H. joaquini*, *H. semiguttata* e *H. aff. semiguttata*, corrobora a hipótese sugerida com base em análise citogenética e molecular que considerou as NORs no par 1 e no par 10 como condição basal e derivada, respectivamente, podendo-se aventar a possibilidade de transferência da NOR para o par 10.

8. Os dados citogenéticos do presente trabalho não corroboram o estabelecimento de dois grupos separados (de *Hyla polytaenia* e de *Hyla pulchella*) e nem a exclusão de *H. bischoffi* e *H. guentheri* dos dois grupos. Portanto, sugere-se que os agrupamentos atuais dessas espécies sejam reavaliados, com base nos dados citogenéticos, morfológicos e moleculares disponíveis atualmente.