

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CARMEN SÍLVIA BUSIN

ESTUDO CITOGENÉTICO COMPARATIVO

DE *Pseudis minuta* E DE *P. sp. (aff. minuta)*

(ANURA, PSEUDIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Carmen Sílvia Busin</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>05/10/00 S. Recco-Pimentel</i>

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

MODE	BC
CHAMADA:	F/UNICAMP
	B.964.4
Ex.	
BC BC/	40409
C.	278/2000
☐ D ☒	
CO	R\$ 11,00
	17-02-00
CPD	

CM-00133168-B

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

Busin, Carmen Silvia

B964e Estudo citogenético comparativo de *Pseudis minuta* e de
Pseudis aff. minuta (Anura, Pseudidae)/Carmen Silvia Busin.
Campinas, SP: [s.n.] 2000.
59 f. illus.

Orientadora: Shirlei Maria Recco Pimentel

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. Cariótipo. 3. Banda C. I. Pimentel, Shirlei
Maria Recco. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 05/01/2000

Banca Examinadora

Titulares:

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)


(Assinatura)

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello


(Assinatura)

Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad


(Assinatura)

Suplente:

Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada

(Assinatura)

Às minhas filhas

Renata, Flávia e Luciana,

meu tudo...

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer profundamente a todos os que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho e, especialmente:

- à Profª. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel que soube conciliar em sua orientação segura, dedicação, paciência, incentivo, apoio e a amizade indispensáveis à realização deste trabalho;

- à Diretora do ICB/UPF, Profª. Lorena Consalter Geib pelo incentivo e apoio em todos os momentos;

- à Dra. Thaís Leiroz Codenotti, pelo carinho, incentivo, amizade e auxílio sempre prestados;

- à Klélia Aparecida de Carvalho, pelo auxílio técnico de laboratório e principalmente pela amizade e carinho;

- ao zoólogo Giovanni Vinciprova pelas coletas e identificação dos espécimes;

- aos professores do Curso de Mestrado em Biologia Celular pela grande capacidade demonstrada e pela amizade;

- à Dra. Mary Anne Heide Dolder pela revisão do texto em inglês;

- aos colegas, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Citogenética, IB, UNICAMP pelo apoio, carinho e amizade;

- aos funcionários do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial à secretária Liliam Panagio, pelo eficiente auxílio prestado;

- aos colegas do mestrado Interinstitucional, Convênio UNICAMP - UPF pelo companheirismo e amizade;

- aos colegas professores e funcionários do ICB/UPF principalmente à Marcinha, Maria de Lurdes e ao Regis pelo eficiente auxílio prestado;

- à Universidade de Passo Fundo pelo apoio financeiro e pela oportunidade da realização deste mestrado;

- à UNICAMP pela oportunidade de um Mestrado Interinstitucional;
- à CAPES pelo auxílio financeiro;
- aos nossos alunos, grandes motivadores da construção de nosso saber, principalmente à estagiária do laboratório de Biologia Celular/UPF Juliana da Luz;
- às minhas amadas filhas, grandes incentivadoras, amigas e companheiras que tanto contribuíram para que este sonho se realizasse;
- à minha família, principalmente à minha mãe e ao meu pai por tudo que da vida me ensinaram.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
I. INTRODUÇÃO	01
1. Classe Amphibia	01
2. Ordem Anura	01
3. Família Pseudidae	02
4. Citogenética de Anuros	04
5. Região Organizadora Nucleolar	05
5.1. Aspectos Gerais	05
5.2. Métodos usados para evidenciar a NOR	07
6. Heterocromatina	08
6.1. Aspectos Gerais	08
6.2. Método de banda C	09
6.3. Heterocromatina em anuros.....	10
7. Evolução cariotípica em anuros	12
8. Objetivos	15
9. Referências Bibliográficas	16
II. ARTIGO	22
Resumo	24
Introdução	25
Materiais e Métodos	26
Resultados.....	27
Discussão	30
Referências bibliográficas	35
Legendas das figuras	38
Figuras	40
III. CONCLUSÕES GERAIS	45

RESUMO

A família Pseudidae inclui os gêneros *Pseudis* e *Lysapsus*, com origem recente na América do Sul e com distribuição no sul e sudeste do Brasil, no Uruguai e na Argentina. O gênero *Pseudis*, por apresentar singularidades de morfologia e não apresentar afinidade com nenhuma das demais rãs, intrigou durante muito tempo os zoólogos, motivando sucessivas inclusões em diferentes famílias. *Pseudis minuta* foi anteriormente denominada *Lysapsus mantidactylus* por apresentar características dos dois gêneros. No Estado do Rio Grande do Sul, em Tainhas, ocorre uma população, aqui denominada de *Pseudis* aff. *minuta*, que difere de *P. minuta* por apresentar indivíduos mais robustos e pequena diferença na vocalização. Neste trabalho, foi realizada a análise citogenética de espécimes de *P. aff. minuta*, de Tainhas, e de indivíduos de outras duas populações de *P. minuta*, provenientes de São Jerônimo e Eldorado do Sul, (RS). As preparações cromossômicas, obtidas por suspensão de células de epitélio intestinal e testículos, foram submetidas à coloração com Giemsa, bandamento C e Ag-NOR. As populações de São Jerônimo e Eldorado do Sul apresentaram $2n = 24$ cromossomos, classificados como metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos. Blocos heterocromáticos foram localizados centromericamente em todos os cromossomos, além de dois segmentos intersticiais nos braços curtos dos cromossomos 2 e um nos braços curtos do par 4. Os homólogos 7 apresentaram blocos heterocromáticos subtelocêntricos nos braços longos, coincidindo com a NOR ativa. A população de Tainhas apresentou $2n = 28$ cromossomos, com quatro pares adicionais de cromossomos telocêntricos. Blocos heterocromáticos foram localizados em todas as regiões centroméricas. Além disso, os cromossomos do par 1 apresentaram dois segmentos intersticiais nos braços curtos; o par 9, telocêntrico, um segmento intersticial, e o par 5 apresentou blocos heterocromáticos subtelocêntricos nos braços longos, coincidindo com a NOR ativa. Unindo-se os pares telocêntricos 6/7 e os pares 8/9 da população de Tainhas, obteve-se um cariótipo $2n = 24$ semelhante ao das outras duas populações. Comparando-se esse cariótipo artificialmente montado aos das outras duas populações verificou-se uma coincidência de localização de algumas bandas heterocromáticas intersticiais e da NOR, embora a população de Tainhas apresentasse

maior quantidade de heterocromatina. Estes resultados sugerem uma origem comum e recente para os dois tipos de cariótipos observados. Há evidências de que a diferenciação desses cariótipos possa ter ocorrido por rearranjos cromossômicos do tipo fissão e por adição de heterocromatina. Os dados confirmam que a população de Tainhas, $2n = 28$, deve representar uma nova espécie, o que está de acordo com a análise morfológica e de canto feita por outros pesquisadores.

ABSTRACT

The family Pseudidae includes the genera *Pseudis* and *Lysapsus*, and is widely distributed in the south, southeastern and central regions of Brazil, as well as in Uruguay and Argentina. In the present study a cytogenetic analysis was done of two populations of *Pseudis minuta* occurring in São Jerônimo and Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, and a population of closely related animals, *Pseudis* aff. *minuta*, occurring in Tainhas, RS. The later are larger than *P. minuta* individuals and have a slightly different call. Chromosome preparations obtained from a suspension of intestinal and testis cells were stained with Giemsa solution or processed for C-banding and NOR detection. Specimens from São Jerônimo and Eldorado do Sul had the same karyotype with $2n=24$ chromosomes. The centromeric regions of all the chromosomes contained C-banded heterochromatin. Two interstitial bands were also observed in the short arms of chromosomes 2 and 4. Chromosome pair 7 had a subtelocentric band on the long arm coincident with an active NOR region. Animals from Tainhas population had $2n=28$ chromosomes, with four additional pairs of telocentric chromosomes. Heterochromatic blocks were observed in all centromeric regions. In addition, pair 1 had two distinct interstitial C-bands on the short arms and the telocentric pair 9 had one C-band. In pair 5, the heterochromatic block of the long arm was coincident with the NOR. Combining the telocentric pairs 6 + 7 and 8 + 9 of *P. aff. minuta* yielded a karyotype with $2n=24$ chromosomes, similar to that of *P. minuta*. Organized as such, the similarities included the same chromosome number, a similar chromosome morphology, and similar localization of some interstitial heterochromatic bands and NOR. However, there were differences in the amount of heterochromatin, which was larger in the Tainhas population. These findings suggest a common origin for these two karyotypes and that centric fission and heterochromatin addition have been involved in their differentiation. The cytogenetic results indicate that the population from Tainhas with $2n=28$ chromosomes, is na undescribed species.

I. INTRODUÇÃO

1. Classe Amphibia

A Classe Amphibia divide-se em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (Duellman & Trueb, 1986). Segundo Pough *et al.* (1993), as subclasses Labyrinthodontia e Lepospondyli foram as primeiras a aparecer na face da terra, há cerca de 350 milhões de anos, tendo desaparecido após 200 milhões de anos. Já a subclasse Lissamphibia, provavelmente tenha aparecido no período Jurássico da Era Mesozóica, há cerca de 200 milhões de anos. Recentemente foi comprovado por Shubin & Jenkins (1995) a existência de fósseis de Anura no período Jurássico inferior, sendo *Prosalirua bitis* o mais antigo representante, já tão especializado quanto as formas atuais.

A subclasse Lissamphibia possui em torno de 4 mil espécies distribuídas em três ordens: Urodela (ou Caudata), representada pelas salamandras, com cerca de 350 espécies; Gymnophiona, representada pelas cobras-cegas, com aproximadamente 170 espécies e Anura, representada pelos sapos, rãs e pererecas com cerca de 3.500 espécies (Duellman & Trueb, 1986).

2. Ordem Anura

A ordem dos anuros, ao contrário da ordem das salamandras e das cobras-cegas que possuem um número limitado de espécies, apresenta cerca de 3.500 espécies que ocorrem em todos os continentes, exceto na Antártica. A distribuição geográfica destes animais é bastante variada. Encontram-se exemplares acima de 3.650 metros de altitude na Serra Nevada, Califórnia, e na região dos Andes acima de 4.870 metros de altitude (Storer *et al.*, 1989). Esta ordem divide-se em 26 famílias: Leiopelmatidae, Ascaphidae, Discoglossidae, Bombinatoridae, Rhinophrynidae, Pipidae, Pelobatidae, Pelodytidae, Myobatrachidae, Leptodactylidae, Heleophrynidae, Bufonidae, Brachycephalidae, Rhinodermatidae, Dendrobatidae, Pseudidae, Hylidae, Pelodyadidae, Centrolenidae, Microhylidae, Sooglossidae, Ranidae, Hemisliidae, Arthroleptidae, Hyperoliidae e Rhacophoridae (Frost, 1985).

Os anuros apresentam como características gerais corpo curto, ausência de cauda, quatro extremidades com os membros posteriores em forma de poderosas patas saltadoras, escavadoras ou nadadoras. São geralmente ovíparos com fecundação externa e desenvolvimento indireto. As larvas são aquáticas, inicialmente com brânquias externas e posteriormente com brânquias internas. Durante a metamorfose aparecem primeiro as patas posteriores e após as anteriores. Os adultos, geralmente, têm vida terrestre (Ziswiler, 1988).

Nesta ordem normalmente o encontro entre os sexos se dá por orientação sonora. O macho vocaliza com o intuito de atrair a fêmea e, por vezes, também, para afastar os machos de sua própria espécie (Wells, 1977). O canto é característico da espécie e a maioria apresenta de dois a três tipos diferentes de canto, utilizados em diferentes situações que servem para identificar tanto a espécie como o sexo do animal que o emite. Táxons aparentados, freqüentemente, apresentam cantos similares (Lutz, 1973; Storer *et al.*, 1989; Pough *et al.*, 1993).

Cabe à fêmea escolher o macho para o amplexo. Essa forma de acasalamento é diferente por não possuir órgão copulador introdutório. As fêmeas depositam seus ovos em local apropriado, como na água, sob folheto da mata ou ainda armazenados em partes do corpo da fêmea ou do macho.

3. Família Pseudidae

Nessa família, com origem recente na América do Sul (Savage, 1973), encontram-se os gêneros *Pseudis* e *Lysapsus*.

Pseudidae constitui um grupo de batráquios neotropicais dotados de certos atributos peculiares, o que lhes confere uma posição sistemática ainda um tanto duvidosa e discutida.

Seus representantes são aquáticos, arciferais, com artelhos apresentando membranas natatórias plenamente desenvolvidas e uma falange extra em cada um deles. Os polegares são opostos aos outros dedos, geralmente dilatados em extremidades redondas ou em forma de discos terminais. Os Pseudidae apresentam os dentes maxilares e vomerianos muito desenvolvidos, omosterno e esterno amplos e cartilagosos, diapófise sacral cilíndrica e

côndilo occipital amplamente separado. O tamanho das larvas (girino) é paradoxalmente maior do que o tamanho dos adultos. Além dos traços morfológicos, muitas características cromossômicas e bioquímicas, como por exemplo a hiperbiliverdinemia fisiológica, direciona esta linha filética de anuros à família Hylidae (Barrio & Rubel, 1970). Eles foram considerados, por um longo tempo, como pertencentes a uma subfamília de Hylidae.

Barrio e Rubel (1970) consideravam a família Pseudidae como derivada dos Hylidae, incluindo-a como subfamília desta. As espécies de Pseudidae mencionadas por esses autores têm $2n = 24$ e $NF = 48$, e fórmulas cariotípicas semelhantes às dos Hylidae com $2n = 24$, o que favoreceu a hipótese de derivação a partir desta família. Morescalchi (1973) propõe, ainda, que os Pseudidae poderiam ser derivados de Leptodactylidae, visto que há espécies dessa família na Austrália, com $2n = 24$ (subfamília Myobatrachinae), não sendo impossível, no entanto, que a subfamília Leptodactylinae caracterizada por $2n = 22$, tenha passado por um estágio de $2n = 24$. Contudo, a ausência de cariótipo com $2n = 24$ em Leptodactylidae das Américas reflete, provavelmente, a origem dos atuais grupos existentes, ou seja, os ancestrais já deveriam ter $2n = 22$ e $2n = 26$, como os atuais grupos americanos apresentam. Uma vez que a família Pseudidae originou-se na América do Sul e em uma época bem posterior à deriva continental, deve ser oriunda de algum grupo que aqui existia. Se fosse procedente de Leptodactylidae teria $2n = 22$ ou $2n = 26$, ou, o que é mais provável, de um Hylidae com $2n = 24$. O único grupo de leptodactídeo com $2n = 24$ na América do Sul é o gênero *Adenomera* (Bogart, 1974), que deve ser um grupo derivado e recente (Batistic, 1989), se comparado à Pseudidae, não podendo estar na sua linha de ancestralidade, o que é também bastante evidente pelas características morfológicas apresentadas (Batistic, 1989).

O gênero *Pseudis* Wagler, 1830, é representado por anuros com pupilas horizontais, membros posteriores longos, dedos das mãos e dos pés com uma falange adicional, que pode dar uma maior mobilidade ao animal, dentes vomerianos em duas faixas estreitamente unidas e pele não muito granular (Ceí, 1980).

Esse gênero intrigou, durante muito tempo, os zoólogos pelas singularidades de sua morfologia motivando, assim, sucessivas inclusões em diversas famílias diferentes pois não

mostram grande afinidade com nenhuma das demais rãs. Em épocas mais recentes, criou-se, então, uma nova família para esse gênero: *Pseudidae*.

A espécie *Pseudis minuta* Peters, 1872, foi anteriormente incluída no gênero *Lysapsus*, como *L. mantidactylus*, por apresentar características dos dois gêneros. Por outro lado, diferentes populações identificadas como *Pseudis minuta* apresentam diferenças no tamanho dos indivíduos e na vocalização (G. Vinciprova - comunicação pessoal).

4. Citogenética de Anuros

Os Anuros, por apresentarem poucas variações morfológicas, grande número de espécies e grande diversidade de habitats, tornam as análises baseadas somente anatomia e morfologia externa, algumas vezes, de difícil interpretação. Com isso as análises citogenéticas contribuem para as investigações em taxonomia e filogenia.

O estudo das variações cromossômicas contribui na formulação de hipóteses sobre a relação filogenética entre diferentes grupos taxonômicos, assim como dentro de um mesmo grupo e, ainda, permite a análise de rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução desses táxons.

Muitas vezes, a filogenia sugerida pela citogenética coincide com a proposta das análises morfológicas, moleculares e bioquímicas. Porém, existem controvérsias entre esses tipos de análises como resposta à superficialidade de alguma delas, levando a interpretações, muitas vezes, incorretas. A análise isolada de um caráter sistemático não é capaz de fornecer informações filogenéticas em todos os níveis taxonômicos. Algumas técnicas de estudo permitem relacionar filogeneticamente espécies próximas e outras, por vezes, elucidam a relação dentre táxons mais elevados (Hillis, 1987). Percebe-se, então, a necessidade da análise conjunta de dados de diferentes naturezas para a proposição de hipóteses mais robustas sobre a filogenia do grupo de interesse. Dessa maneira, os estudos citogenéticos fornecem dados que devem ser analisados conjuntamente com os de outras técnicas como as morfológicas, as moleculares e as bioquímicas.

Segundo Kuramoto (1990), a grande maioria das espécies de anuros já estudadas possui grande similaridade no número diplóide de cromossomos, de $2n = 22$ a $2n = 26$, o

que torna necessário, então, além da análise do número e da morfologia dos cromossomos, utilizar-se da análise da heterocromatina, das regiões organizadoras de nucléolo e teloméricas, para uma resposta mais elucidativa tanto na sistemática quanto nas relações filogenéticas de determinado grupo.

Segundo Sumner (1990), espécies muito próximas podem diferir não somente na quantidade de heterocromatina em seus genomas, mas também, no número de bandas, na localização e nas propriedades de coloração da heterocromatina. Diferenças nos padrões heterocromáticos entre espécies são encontradas tanto nos anuros primitivos - Archaeobatrachia - onde foram detectadas pequenas quantidades de heterocromatina através de técnicas de bandamento, quanto em anuros modernos - Neobatrachia - que mostram grande diversidade interespecífica na distribuição e na quantidade de heterocromatina.

5. Região Organizadora Nucleolar (NOR)

5.1 Aspectos gerais

As regiões organizadoras nucleolares são sítios cromossômicos formados por numerosas cópias de genes que codificam RNAr 18S, 5,8S e 28S, arranjadas *in tandem* e separadas por seqüências espaçadoras (Long & David, 1980; Miller, 1981). Esses espaçadores são removidos do transcrito primário, que no caso de anfíbios é 40S, durante o processo de maturação desse tipo de RNA.

Entre os indivíduos da mesma espécie o tamanho das diferentes NORs pode variar consideravelmente devido ao número variável de cópias do gene ribossomal apresentado por cada uma delas (Schmid, 1982).

As NORs são ricas em GC, principalmente nas regiões que codificam os RNAs 18S, 5,8S e 28S (Sumner, 1990) e, geralmente, são localizadas em regiões cromossômicas que apresentam constrições secundárias, como relatado por Henderson *et al.* (1972) e Hsu *et al.* (1975). Entretanto, segundo Goessens (1984), algumas evidências mostram que nem todas as NORs aparecem como constrições secundárias e que, em alguns casos, podem conter heterocromatina. Sugere, ainda, a localização adjacente de determinado tipo de heterocromatina em relação a algumas NORs. Em anfíbios, especialmente em anuros, as

NORs tendem a coincidir com bandas heterocromáticas e podem ou não ter grandes blocos de banda C positiva associados a elas (King 1980, 1988; King *et al.* 1990). Segundo Li e Graur (1991), as regiões espaçadoras entre cistrons 18S + 28S são provavelmente compostas parcialmente ou inteiramente de seqüências repetitivas de DNA, o que justifica a evidência dessa região pela técnica de bandamento C. Provavelmente essa heterocromatina existente nas NORs impede a formação de quiasmas, acarretando a flexibilidade evolutiva observada em relação às NORs de anfíbios, uma vez que o *crossing-over* é um mecanismo de homogeneização das famílias multigênicas. Porém, De Lucchini *et al.* (1988), em estudo com um urodelo do gênero *Triturus*, propuseram que a ocorrência de seqüências repetitivas nos IGS do rDNA desses anfíbios provoca um aumento na frequência de recombinação e/ou amplificação dessas regiões. Isso acarretaria a grande variabilidade de número e de tamanho apresentada por "sítios adicionais" de rDNA. Essa proposta, sugerida também por Hawley *et al.* (1993) em *Drosophila*, está de acordo com as observações de que o pareamento de alguns blocos heterocromáticos é essencial para o pareamento de cromossomos.

Nem todas as NORs de uma célula transcrevem na intérfase, mas as ativas originam nucléolos. Essas estruturas são constituídas por cerca de 85% de proteínas relacionadas ao processo de transcrição e proteínas ribossomais, além de DNA e RNA ribossomais que podem chegar, respectivamente, até 17% e 10% do nucléolo (Schwarzcher, 1993). Nos nucléolos ocorre tanto a síntese do transcrito primário como também o seu processamento para a produção do RNAr 18S, 5,8S e 28S. A associação desses RNAr com proteínas ribossomais e com os RNAr 5S sintetizados fora do nucléolo e então transportados para esse, resultam na formação das subunidades ribossomais 40S e 60S. O tipo, o tamanho e o número de nucléolos existentes na célula variam conforme o tipo celular estudado, o estado fisiológico da célula e o número de NORs existentes na mesma.

Análises cuidadosamente realizadas quanto ao número, localização cromossômica e características moleculares em NORs de diferentes indivíduos permitem a identificação de homologias entre diferentes populações e espécies, possibilitando, em alguns casos, o reconhecimento de alguns rearranjos cromossômicos que possivelmente diferenciam cariotipicamente diversos grupos.

5.2 Métodos usados para evidenciar a NOR

A detecção das NORs para a análise do seu número e de sua localização cromossômica, pode ser feita através de hibridização *in situ* ou através de técnicas citoquímicas, como a coloração com mitramicina ou cromomicina, bandamento N e impregnação pelo íon prata. A hibridização *in situ* é o mais específico e evidencia todas as NORs, inclusive as inativas. A cromomicina e a mitramicina coram regiões genômicas ricas em GC podendo evidenciar não apenas as NORs mas também muitos outros segmentos ricos em GC como certas regiões heterocromáticas. Matsui e Sasaki (1973) e Schweizer (1976) propuseram o bandamento N que envolve a extração de ácidos nucleicos e histonas dos cromossomos, seguida pela coloração em solução de Giemsa, para evidenciar NORs. Porém, o método mais utilizado atualmente, o de impregnação pela prata, tem envolvido ao mesmo tempo a complexidade de conclusões e a simplicidade metodológica. Originalmente, esta técnica de Howell *et al.* (1975) envolve vários estágios como a fixação dos cromossomos com formalina, o tratamento com uma solução de pré-impregnação com prata amoniacal, o tratamento com hidróxido de sódio diluído e finalmente a impregnação com uma mistura de formalina e prata amoniacal. Após várias alternativas na tentativa de melhorar os resultados finais da impregnação pela prata, o procedimento sugerido por Howell e Black (1980) tem sido o mais seguido. Nesse método utiliza-se uma solução coloidal adicionando-se ácido fórmico em uma solução de gelatina diluída. Essa solução é misturada imediatamente antes do uso à uma solução de prata e as lâminas são incubadas em uma estufa a 60°C. Esse método recebeu o nome de "Ag-NOR".

O método de Ag-NOR está baseado na afinidade argirófila específica das proteínas associadas a NOR chamadas genericamente de "proteínas Ag-NOR". Considera-se que somente as NORs nas quais a transcrição está ocorrendo é que apresentam essas proteínas associadas e, portanto, as NORs inativas não responderiam ao método de Ag-NOR (Schwarzacher *et al.*, 1978; Buys & Osinga, 1980; Schmid *et al.*, 1986; Sumner, 1990; Hernandez-Verdun *et al.*, 1993).

A impregnação pela prata, embora seja um método bastante utilizado, não é específico para NORs, pois outras estruturas como heterocromatina, cinetocoro e "cores" cromossômicos também podem ser marcadas. No entanto, essas estruturas quando

marcadas são facilmente distinguíveis das NORs pelas suas formas e colorações, pois geralmente as NORs aparecem mais escuras e são puntiformes (Sumner, 1990).

A técnica de Ag-NOR possibilitou observar que a maioria dos anuros, tanto de famílias primitivas como de derivadas, apresenta um par de NORs por genoma diplóide (King *et al.*, 1990). Schmid (1982), em estudos com anuros, sugere, ainda, que heteromorfismos de tamanho de NORs sejam bastante comuns nesse grupo e que NORs duplicadas ou triplicadas não ocorrem em homozigose em populações selvagens, estando sempre associadas a NORs de tamanho "normal". A hipótese levantada por Schmid (1982) para explicar a não ocorrência de homozigose de NORs com amplificações desse tipo é de que a homozigose de sequências duplicadas juntamente com as NORs tenha efeito deletério visto que o excesso de rDNA parece não ser prejudicial ao organismo.

6. Heterocromatina

6.1 Aspectos Gerais

Heterocromatina é um termo usado genericamente para descrever a cromatina ou segmentos cromossômicos que permanecem condensados durante todo o ciclo celular, sendo transcricionalmente inativos (Babu & Verma, 1987; Alberts *et al.*, 1996). Atualmente, a definição de heterocromatina leva em consideração a composição do DNA e sua resposta às técnicas específicas de bandamento (Anderson, 1991; Sumner, 1994).

Conforme Sumner (1994), a heterocromatina geralmente compreende pequena porção do genoma, porém em casos especiais pode chegar a 50% do total de DNA da célula.

King (1991) sugere que a heterocromatina exerça papel importante na proteção de sítios eucromáticos adjacentes de modificações estruturais acarretadas por recombinação, uma vez que reduz a formação de quiasmas.

A cromatina, dependendo do tipo de condensação, pode ser classificada em três tipos no núcleo interfásico: eucromatina condensada, heterocromatina facultativa e heterocromatina constitutiva. Essas classes podem ser diferenciadas em microscopia de luz, no entanto, ao microscópio eletrônico tais cromatinas apresentam a mesma densidade. Na eucromatina condensada a inativação é reversível e ocorre em determinada geração celular.

Ela é transcricionalmente inativa ou por estar em estado reprimido com seu DNA inativo temporária e reversivelmente, ou por ser constituída de DNA não-codificador e assim ser permanentemente incapaz de transcrever (John, 1988). A heterocromatina facultativa é uma forma de eucromatina que sofreu inativação e condensação no início do desenvolvimento do organismo e permanece nesse estado por muitas gerações celulares em todos os tecidos somáticos. A heterocromatina constitutiva por sua vez, é aquela localizada em posições idênticas de cromossomos homólogos em todas as células como uma entidade permanente. Foram segmentos de heterocromatina constitutiva que Heitz (1928) descreveu e denominou de heterocromatina. A inexistência de genes na heterocromatina constitutiva e a observação de que essa cromatina pode ser deliberadamente eliminada ou não amplificada, enquanto o restante do DNA sofre politenização em células somáticas de dípteros, levou alguns pesquisadores a considerarem a heterocromatina um "lixo" do núcleo. Porém, Sumner (1994) postula que a ausência de genes não exclui a possibilidade de essa cromatina exercer outras funções.

A heterocromatina constitutiva é geralmente detectada citogeneticamente através da técnica de bandamento C. As heterocromatinas com outras características são percebidas por outros métodos, bandamento N ou impregnação pela prata. Sumner (1990) cita a reação de Feulgen para investigação de regiões cromossômicas com maior ou menor condensação. Técnicas de bandamento G, R e Q, tão convincentes e elucidativas em mamíferos, são pouco eficazes em Amphibia. Relatos apresentados ou se referem a apenas alguns cromossomos dos complementos analisados ou são pouco esclarecedores. Acredita-se que haja alguma dificuldade intrínseca à estrutura dos cromossomos da ordem dos Anura que limita a aplicabilidade dessas técnicas.

6.2 Método de banda C

A técnica de bandamento C, hoje considerada como a melhor para se detectar citologicamente regiões heterocromáticas constitutivas, teve como origem o método clássico de hibridização *in situ* desenvolvido por Pardue & Gall (1970). Esses pesquisadores observaram que as regiões centroméricas dos cromossomos coravam mais intensamente com Giemsa, após terem sido desnaturadas com uma base antes da hibridização. Esses autores sugeriram, então, que as regiões evidenciadas por esse método

eram constituídas quase que totalmente de DNA altamente repetitivo, denominado de DNA satélite. Em várias espécies foi encontrado DNA altamente repetitivo nas regiões banda C-positivas. Porém, Sumner (1990) cita que embora essa correlação entre DNA altamente repetitivo e banda C-positiva ocorra com frequência, existem casos em que não foi detectado esse tipo de DNA em regiões visualizadas pelo bandamento C.

A técnica usada atualmente foi descrita por Sumner (1972). Embora muitas variantes tenham posteriormente sido publicadas, as modificações são de menor importância. Apenas ajustes de tempo e de concentrações das soluções usadas são necessárias para diferentes espécies e idades das preparações dos materiais a serem submetidos à análise.

6.3 Heterocromatina em anuros

Espécies muito próximas podem diferir no padrão heterocromático de seus genomas no que se refere ao número, a localização e as propriedades de coloração, tornando-se assim um importante componente nas análises citogenéticas e evolutivas (Sumner, 1990).

Conforme revisão feita por King *et al.* (1990), aproximadamente 840 espécies de anuros foram analisadas cariotipicamente; destas, em 252 foi utilizada alguma técnica de bandamento. Porém destas, 92 foram analisadas somente pela técnica de Ag-NOR ou por hibridização *in situ* com sondas de DNA r 18S + 28S, e 160 espécies foram estudadas por técnicas como as de bandamento C, Q e DAPI, que, de alguma forma, indicam a evolução da heterocromatina em Amphibia.

King (1991) relata que diferenças nos padrões heterocromáticos entre espécies são encontradas não somente nos anuros primitivos mas também nos mais evoluídos. Porém, nos anuros primitivos, em sete famílias pertencentes aos Archaeobatrachia, foram detectadas pequenas quantidades de heterocromatina através das técnicas de bandamento, enquanto os Neobatrachia, anuros modernos, mostram uma grande diversidade interespecífica na distribuição e quantidade de heterocromatina. King (1991), após observar a variação na quantidade de heterocromatina banda C-positiva em Amphibia, propôs o envolvimento de três processos na evolução da heterocromatina constitutiva nesse grupo: a adição de heterocromatina a sítios cromossômicos específicos, a transformação de regiões

cromossômicas eucromáticas em regiões de heterocromatina constitutiva e a evolução em conjunto de múltiplos sítios heterocromáticos. A adição de heterocromatina é resultante da amplificação de seqüências de DNA repetitivo e provavelmente está correlacionada a mudanças no comprimento dos cromossomos. Embora existam evidências que mostrem que a adição de heterocromatina é uma tendência em Amphibia, nada impede que deleções de regiões heterocromáticas tenham ocorrido. O segundo processo, conceituando a transformação das regiões eucromáticas em heterocromáticas, resulta na heterocromatinização do genoma de Amphibia (King, 1980). Esse processo não promove grandes alterações no comprimento do cromossomo e, embora esse mecanismo de transformação da cromatina ainda não seja bem compreendido, existem duas teorias tentando explicá-lo. Em uma delas, a amplificação de seqüências repetitivas específicas distribuídas de forma interespaçada ao longo de uma região eucromática, acarreta uma modificação no estado de condensação dessa região, que poderia, inclusive, ser percebida por fluorocromos e pelo bandamento C. A outra teoria sugere que essa alteração na condensação cromossômica - heterocromatinização - seja resultado da incorporação de uma seqüência de DNA repetitivo originada a partir da amplificação de um sítio específico, a uma região de DNA de seqüência única. Qualquer que seja a origem causal da heterocromatinização, esse processo implica desativação gênica, conforme propõe White (1973).

Em Amphibia, o aumento da heterocromatina constitutiva é considerado como uma tendência evolutiva, embora não seja descartada a possibilidade de ocorrência de diminuição dessa cromatina em grupos isolados. Contrariando a hipótese de que a heterocromatina constitutiva seja um "lixo" sem função, essa tendência evolutiva propõe algum papel funcional para esse DNA não-codificador. O envolvimento da heterocromatina constitutiva na redução de recombinação entre cromossomos sexuais em diferenciação, parece ocorrer realmente em Amphibia, o que seria uma das possíveis funções dessa heterocromatina (King, 1991).

O terceiro processo, citado por King (1991), refere-se à tendência de seqüências de DNA repetitivo evoluir em harmonia, acarretando certa homogeneidade entre os membros dessa família que é maior dentro de uma mesma espécie do que entre espécies relacionadas. Processos como *crossing-over* desigual, conversão gênica, transposição de DNA,

amplificação gênica e *slippage* na replicação estão envolvidas na homogeneização dessas seqüências (Dover, 1988). A maioria das regiões heterocromáticas pericentroméricas em Anura é rica em GC enquanto em Caudata essas regiões são ricas em AT. Isso mostra uma dicotomia e uma distribuição não-casual das mesmas nesses dois grupos. Já a heterocromatina associada às NORs é rica em GC, em Caudata e em Anura. Miura *et al.* (1995) descreveram a presença de um padrão de banda C característico entre várias espécies e subespécies, que permite caracterizar e diferenciar espécies de diferentes regiões, demonstrando assim uma variação interpopulacional.

Todas essas características da heterocromatina banda C-positiva que foram mencionadas comprovam a importância das informações que o seu estudo pode fornecer, contribuindo na avaliação citogenética e evolutiva de determinados grupos.

7. Evolução cariotípica em anuros

Apesar dos anuros apresentarem grande similaridade fenotípica, os estudos citogenéticos têm revelado, em alguns grupos, grande variabilidade cariotípica. Quanto ao cariótipo de anuros, Morescalchi (1973) sugere que famílias mais primitivas apresentem elevado número de cromossomos, enquanto as famílias mais recentes apresentem situação inversa.

Vários autores descrevem a estabilidade cariotípica de alguns grupos de animais, sendo a dos anuros a mais extensa. Porém, atualmente, a tendência é negar totalmente esta estabilidade pois mesmo os grupos que aparentemente são muito estáveis nesse aspecto, quando submetidos a técnicas mais apuradas, revelam grandes inovações e rearranjos cromossômicos. Contudo, em certo sentido, é possível falar-se em “estabilidade” quanto aos cariótipos, principalmente nos Anura, o que não implica imobilismo das estruturas, mas sim, estabilidade no número de cromossomos, característica essa que parece marcante na maioria das famílias dessa ordem. Em se tratando de famílias mais modernas de anuros, essa estabilidade é claramente percebida, como por exemplo em Bufonidae, Ranidae, Leptodactylidae e Hylidae. Segundo Bogart (1973) e Tandy & Keith (1972), a família que se apresenta mais estável em relação ao número de cromossomos é Bufonidae, especialmente em espécies relacionadas do grupo de *Bufo regularis*, que apresentam,

atualmente, um par de cromossomos a menos, e que aparentemente se perdeu. Na família Ranidae, com grande distribuição geográfica, espécies analisadas na Europa, no Japão e na América, apresentam $2n = 26$ cromossomos, com poucas exceções. Somente na África essa família sofreu profunda transformação com grande variação do número de cromossomos, que vai desde $2n = 14$ até $2n = 26$ cromossomos (ver revisão de Scheel, 1971; Morescalchi, 1973; Bogart e Tandy, 1981).

É evidente que os cromossomos não se mantêm estáveis quando não há variação do número, pois a comparação de estruturas cariotípicas entre espécies próximas mostra, freqüentemente, grandes similaridades, mas, também, variações de tamanho relativo e posição centromérica dos cromossomos. O conteúdo de DNA também pode variar razoavelmente, inclusive em espécies próximas, sugerindo a ocorrência de duplicações e deleções de segmentos.

A redução do número de cromossomos num cariótipo, característica de anuros mais recentes, é explicada por fusão cêntrica ou telomérica ou, ainda, por perda de cromossomos. King (1991) associa à evolução cariotípica, o aumento na quantidade de heterocromatina.

Conforme Bogart (1991), nos anuros de regiões temperadas, que vivem em grandes agregados panmíticos, a taxa evolutiva cariotípica é lenta, enquanto em anuros de regiões tropicais, que apresentam populações estruturadas em demes, ou seja, população local, pequena e intercruzante, a evolução é rápida. O autor traça uma relação entre variabilidade cromossômica e deme, dando sustentação à teoria de Mayr (1969), de que o mecanismo de isolamento cromossômico deva ocorrer especialmente em animais que tendem a formar populações pequenas. Mayr (1969) propõe que esses mecanismos de isolamento possam exercer papel importante no processo de especiação, sendo a região ideal para isso a periferia da distribuição de uma espécie, onde as populações dessa espécie geralmente são pequenas, isoladas e, com alta frequência de endocruzamentos.

Já Bickham e Baker (1979) propuseram o modelo de canalização para explicar a evolução cromossômica, com base em dados relativos a tartarugas e a morcegos. No modelo de canalização, sugerido pelos autores, um cariótipo sofre modificações significativas quando uma linhagem invade uma nova zona adaptativa onde novos

rearranjos cromossômicos são vantajosos. Esse modelo foi criticado por King (1985) na premissa de que apenas alterações cromossômicas não robertsonianas ocorrem durante rápida diversificação de uma população discordando, ainda, no fato de que no modelo de canalização proposto, todas as mutações cromossômicas fixadas são benéficas. King (1985) salientou também que Bickham e Baker (1979) não consideraram todas as possíveis situações quando propuseram a fixação de rearranjos adaptativos, citando como exemplo, a possibilidade de existirem alterações cromossômicas neutras e de polimorfismos balanceados serem mantidos em vez da fixação de um caráter.

No modelo de canalização, os autores consideraram os Anura um bom exemplo de um grupo antigo em que o cariótipo foi canalizado, salientando que sua evolução foi mais lenta do que em outros vertebrados.

A teoria de Borgat (1991) contraria o modelo de canalização, pois, segundo o autor, os anuros podem ser o melhor grupo para demonstrar o modelo em dème. Tessier *et al.* (1991) comprovaram a teoria de Borgat (1991) em *Leptodactylus hochstetteri*, Leptodactylidae, que apresenta grande variação cromossômica e ocorre em pequenas populações. Essa teoria é também aceita por Zeyl e Green (1992), que propuseram que a mesma seja estendida para a análise evolutiva de famílias de DNA satélite.

Com base nestas considerações, verifica-se que os estudos citogenéticos em Anura revelam grande importância para o esclarecimento dos processos que resultam na especiação, podendo fornecer exemplos em que os rearranjos cromossômicos tenham sido fundamentais para a especiação, conforme teoria de White (1978) ou, como proposto por Imai (1983) e Coyne (1984), que essas alterações tenham ocorrido independentemente ou subsequente à especiação.

8. Objetivos

Buscando determinar se as populações de *Pseudis minuta* do Rio Grande do Sul, que apresentam diferenças no tamanho dos indivíduos e na vocalização diferem citogeneticamente, neste trabalho foram determinados os cariótipos, os padrões de heterocromatina constitutiva e a localização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) de três populações.

9. Referências bibliográficas

- Alberts B., Bray D., Lewia J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D. *Biologia Molecular da Célula*. Artes Médicas, 352-4, 378-80, 1996.
- Anderson K. Chromosome evolution in Holoartic *Hyla* treefrogs. In: Green M. & Sessions S. K. (ed) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, 299-331, 1991.
- Babu A. & Verma R.S. Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* 108: 115-28, 1987.
- Barrio A. & Rubel D.P. Características del Cariótipos de los Pseudidos. *Physis – Tomo XXIX*, 79: 505-10, 1970.
- Batistic R.F. Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura, Amphibia). Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, 203p.
- Bickham J.W. & Baker R.J. Canalization model of chromosomal evolution. In: “Models and Methodologies in Evolutionary Theory” (J.H. Schwartz and H.G. Rollins., eds.), pp. 70-84. *Bull. 13, Carnegie Mus. Nat. Hist. Pittsburgh*, 1979.
- Bogart, J.P. Evolution of anura karyotypes. In: *Evolutionary Biology of The Anurans: Contemporary Research on Major Problems* (J.L. Vial, ed.), University of Missouri Press, Columbia, 1973.
- Bogart, J.P. A karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae). *Copeia*, 1974: 728-737, 1974.
- Bogart J.P. & Tandy M. Chromosome lineagens in *African ranoid* frogs. *Monitore Zool. Ital (N.S.) Suppl.*, 15, 55 – 91, 1981.
- Bogart J.P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Academic Press, San Diego, pp. 233-57, 1991.

- Buyts C.H.C.M. & Osing J. Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide group at chromosomal nucleolus organizing region. *Chromosoma* 77: 1-11, 1980.
- Cei, J. M. Amphibians of Argentina. In: *Monitore Zool. Ital. (N.S.) Monogr.* 2, 1980.
- Coyne, J.A. Correlation between heterozygosity and rate of chromosome evolution in animals. *Am. Nat.* 123: 725-729, 1984.
- De Lucchini S., Andronico F. Andreazzoli M. Giuliani M. Savino R. & Nardi I. Extra-ribosomal spacer sequences in *Triturus*. *J. Mol. Biol.* 204: 805-13, 1988.
- Dover, G.A. The new genetics. In: *The handling of chromosomes*, Allen and Unwin, London, 151-168, 1988.
- Duellman W.E. & Trueb L. In: *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. New York, 1986.
- Frost D.R. *Amphibian Species of the World*. Allen Press and Association of Systematics Collections, Lawrence, Kansas, 1985.
- Goessens G. Nucleolar Structure. *Int. Rev. Cytol.* 87: 107-158, 1984.
- Hawley, R.S. Irick, H., Zitron, A.E., Haddox, D.A., Lohe, A. New, C., Whitney, M.D., Arbel, T., Jang, J., McKim, K., Childs, G. There are two mechanisms of a chiasmate segregations in *Drosophila* one of which requires heterochromatic homology. *Dev. Genet.* 13: 440-467, 1993.
- Heitz E. Das heterochromatin der moose. I. *J. bot. Wiss.* 69: 762-818, 1928.
- Henderson A.S., Warburton D. & Atwood K.C. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 3394-98, 1972.
- Hernandez-Verdun D. , Roussel P. & Gautier T. Nucleolar proteins during mitosis. In: Sumner A.T. & Chandley A. C., eds. *Chromosomes Today*. Chapman and Hall Ed. London, Vol. 11:79-96, 1993.

- Hillis D. M. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 23-42, 1987.
- Howell W.M. & Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015, 1980.
- Howell W.M., Denton T.E. & Diamond J.R. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* 31: 260-62. 1975.
- Hsu T.C., Spirito S.E. & Pardue M.L. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53: 25:36, 1975.
- Imai, H.T. Quantitative analyses of karyotype alteration and species differentiation in mammals. *Evolution* 37: 1154-1161, 1983.
- Jonh B. The biology of heterochromatin. In: Verma R.S. Ed. *Heterochromatin Molecular and Strutural Aspects*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-147, 1988.
- King M. C-banding studies on Australian *Hylid* frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191-217, 1980.
- King M. The canalization model of chromosomal evolution: a critique. *Syst. Zool.* 34:69-75, 1985.
- King M. The interrelationship of G-banding, C-banding pattern and nucleolus organizer structure in anuran amphibians. In: *Kew Chromosome Conference 111* (P.E. Brandam, ed.), pp 51-63, 1988.
- King, M., Contreras, N. & Honeycutt, R.L. Variation within and between nucleolar regions in Australian *Hylid* frogs (*Anura*) shown by 18S and 28S *in situ* hybridization. *Genetics* 80:17-29, 1990.
- King M. The evolution of the amphibian genome. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, pp 359-391, Academic Press, San Diego, 1991.

- Kuramoto, M. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. *Bull. Fukuoka, Univ. of Educ.* 39:83-127, 1990.
- Li, W-H & Graur, D. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Mass., 1991.
- Long E. O. & David I.B. Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Bioch.* 49:727-64, 1980.
- Lutz, B. *Brasilian species of Hyla*. Univ. do Texas Press, Autin & London. 74-85, 1973.
- Matsui S.I. & Sasaki M. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. *Nature* 246: 148-150, 1973.
- Mayr E. Species, speciation and chromosomes. In Benirschke, K (ed.) *Comparative Mammalian Cytogenetics*. Springer – Verlag, New York, 1-7, 1969.
- Miller O.L. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. *J. Cell Biol.* 91: 15-17, 1981.
- Miura I., Niishioka M., Bordikin L.J. & Wu Z. The origin of the brown frogs with $2n = 24$ chromosomes. *Experientia* 51: 79-188, 1995.
- Morescalchi A. Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution. In *Amphibia*. A.B. Chiarelli & E. Capana, pp. 233-348, Academic Press, New York, 1973.
- Pardue M.L. & Gall. J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-8, 1970.
- Pough F.H., Heiser J.B. & McFarland W.N. *Salamandras, Anuros e Cecílias*. In: *A vida dos vertebrados*. Atheneu Editora, São Paulo, 1993.
- Savage, J.M. The geographic distribution of frogs: patterns and predictions. In: Vial, J.L. *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research and major problems*. Univ. Missouri Press, Columbia, 351-445, 1973.

- Scheel J.J. The seven – chromosome karyotype of the African frog *Arthroleptis*, a probable derivate of the thirteen – chromosome karyotype of *Rana* (Ranidae, Anura). *Hereditas* 67:287-90, 1971.
- Schmid M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the estructure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-44, 1982
- Schmid M., Sims S.H., Haaf T. & MacGregor H.C. Chromosome Banding in Amphibia X. 18S and 28S ribosomal. RNA genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrotheca riobombae* *Chromosoma* 94:139-45, 1986.
- Schweizer D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-24, 1976.
- Schwarzcher H.G., Mikelsaar A.V. & Schneol W. The nature of Ag. Staining of nuclelus organizer region. Electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis, and meiosis. *Cytogenet. Cell Genet.* 20 : 24-39, 1978.
- Schwarzcher H.G. & Wachtler F. The nuclelus. *Anat. Embryol.* 188: 515-536, 1993.
- Shubin N. H. & Jemkins Jr. F.A. A jurassic jumping frog. *Nature* 7 (377): 49-52, 1995.
- Storer T.I., Usinger R.L., Stebbeins R.C. & Nybakken J.W. Class Amphibia: Anfibios. In: *Zoologia Geral. Companhia Ed. Nacional* , 618-41, 1989.
- Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-6, 1972.
- Sumner A.T. C-banding and related methods. In: *Chromosome banding. Unwin Hyman Ed. London.* 39-90, 1990.
- Sumner A.T. Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. *Eur. J. Histochem* 38: 91-109, 1994.
- Tandy M. & Keith R. *Bufo* of Africa. In W. F. Blair (ed) *Evolution in the genus Bufo*. Univ. Tex Press, Austin and London, 119-70, 1972.

- Tessier C. Slaven D. & Green D.M. Population density and daily movement patterns of Hochstetter's frog, *Leiopelma hochstetteri*, in New Zealand mountain stream. J. Herpetol. 25:213-14, 1991.
- White M.J.D. Animal cytology and evolution. Cambridge Univ. Press, London, 1973.
- White M.J.D. Model of speciation. W.H. Freeman, São Francisco, 1978.
- Zeyl C. W. & Green D.M. Heteromorphism for a highly repeated sequence in the New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*. Evolution 46: 1891-99, 1992.
- Ziswiler V. Zoologia especial dos Vertebrados. Tomo I: Anamniotas. pp:238-240, 296-297. 1988.
- Wells, K. D. The social behavior of anuran amphibians. Anim. Behav. 25: 666-693, 1977.

II. ARTIGO

Evolução cariotípica em *Pseudis* (Pseudidae, Anura)

C.S. Busin¹, G. Vinciprova² & S. M. Recco-Pimentel³

¹Departamento de Biologia, Universidade de Passo Fundo, RS, Brasil

²Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do sul, Brasil.

³Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

Título resumido: Citogenética de *Pseudis minuta*

Correspondence adress:

Dr. S.M. Recco-Pimentel, Departamento de Biologia Celular, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Telefone: 055-19-788 7786; Fax: 055-19-239 7821; e-mail: shirlei@obelix.unicamp.br.

RESUMO

Foi realizada análise citogenética de espécimes de *Pseudis* provenientes de três localidades do Estado do Rio Grande do Sul (RS), sul do Brasil, buscando-se diferenças cariotípicas que possam estar relacionadas às diferenças encontradas no tamanho e nas características físicas de vocalizações dos indivíduos da população de Tainhas, em relação aos de São Jerônimo e de Eldorado do Sul. Os espécimes dessas duas populações foram identificados como *Pseudis minuta* enquanto aqueles de Tainhas foram identificados como *P.sp* (aff. *minuta*). Dois cariótipos diferentes foram encontrados. As populações de São Jerônimo e de Eldorado do Sul apresentam $2n = 24$ cromossomos, classificados como metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos. A população de Tainhas apresenta cariótipo com $2n = 28$ cromossomos, com quatro pares adicionais de cromossomos telocêntricos. Unindo-se esses cromossomos pela região centromérico-telomérica obtém-se um cariótipo de $2n=24$, semelhante aos das outras populações, coincidindo também quanto à localização de NOR e de algumas bandas heterocromáticas marcadoras, como a presente no cromossomo 2. A população de Tainhas, no entanto, apresenta maior quantidade de heterocromatina, evidenciada pela presença de outras bandas C, especialmente localizadas nos cromossomos telocêntricos. Os dados sugerem uma origem comum e derivada para os dois cariótipos observados. Há evidências de que a diferenciação desses cariótipos possa ter ocorrido por rearranjos cromossômicos do tipo fissão e por adição de heterocromatina. A população de Tainhas, $2n = 28$, deve corresponder a uma nova espécie, o que está de acordo com a análise morfológica e de canto feita por outros pesquisadores.

INTRODUÇÃO

A família Pseudidae inclui os gêneros *Pseudis* e *Lysapsus*, com origem recente na América do Sul (Savage, 1973) e com distribuição no sul, sudeste, centro-oeste e no norte do Brasil, no Uruguai, na Argentina, Colômbia e Venezuela. O gênero *Pseudis*, por apresentar singularidades de morfologia e não apresentar afinidade com nenhuma das demais rãs, intrigou, durante muito tempo, os zoólogos motivando sucessivas inclusões em diferentes famílias. Barrio & Rubel (1970) verificaram para espécies de Pseudidae fórmulas cariotípicas $2n = 24$ e $NF = 48$, muito semelhante à da família Hylidae, o que favoreceu a hipótese de derivação a partir dessa família. Já Morescalchi (1973) propõe que os Pseudidae poderiam ser derivados dos Leptodactylidae. Porém, o único grupo de Leptodactylidae com $2n = 24$ cromossomos, na América do Sul, está no gênero *Adenomora*, deve ser um grupo derivado recentemente se comparado a Pseudidae, não podendo estar na sua linha de ancestralidade, o que também é bastante evidente pelas características morfológicas que apresentam (Batistic, 1989).

A espécie *Pseudis minuta*, Peters, 1872, foi anteriormente incluída no gênero *Lysapsus*, como *L. mantidactylus*, por apresentar características comuns aos dois gêneros (Barrio & Rubel, 1970). Por outro lado, os animais de diferentes populações do Estado do Rio Grande do Sul, identificadas como *Pseudis minuta*, apresentam diferenças no tamanho dos indivíduos e na vocalização, sugerindo que tenha ocorrido especiação (Vinciprova, G. - comunicação pessoal). Essas três populações foram comparadas citogeneticamente, buscando evidências cromossômicas para as diferenças observadas e informações adicionais para o entendimento das relações filogenéticas de Pseudidae.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes

Todos os animais utilizados neste trabalho foram coletados no Estado do Rio Grande do Sul (RS), sul do Brasil (Fig. 1). Os espécimes de *P. minuta* analisados foram coletados em Eldorado do Sul (Mina de Guaíba) - 30°00'00" S, 51°25'00" W - (população I), cinco machos e cinco fêmeas, e em São Jerônimo (H.F. Ramos) - 30°27'30" S, 52°08'52" W - (população II), dois machos e cinco jovens. Os espécimes coletados em Tainhas (Rio Contendas) - 29°16'53" S, 50°15'28" W - (população III), 10 machos e nove fêmeas, serão referidos no presente trabalho como de *P. sp.* (aff. *minuta*). Os animais desta população são maiores e apresentam pequenas diferenças na vocalização (G. Vinciprova – comunicação pessoal). Todos os animais estão depositados no Museu de História Natural Prof. Adão José Cardoso, da Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil, com os números ZUEC 11578 a 11603 e 60.26 a 60.37.

Preparação e Técnicas cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas por suspensão de células do intestino e dos testículos, de acordo com o método sugerido por Stephenson *et al.* (1972). As lâminas foram submetidas à coloração convencional com Giemsa, à técnica de banda C (King, 1980) e Ag-NOR (Howell & Black, 1980). Os cromossomos foram classificados de acordo com os valores propostos por Green & Sessions (1991).

RESULTADOS

Descrição dos Cariótipos

Dois cariótipos diferentes foram encontrados. Todos os espécimes das populações I e II apresentaram $2n = 24$ cromossomos, sendo os pares 1, 2, 3, 8, 10, 11 e 12 metacêntricos; os pares 4, 5, 7, e 9 submetacêntricos e o par 6 subtelocêntrico (Tabela 1). O braço longo do par 7 apresenta uma constrição secundária subtelocêntrica, sendo que em 64% das metáfases esta ocorreu em apenas um dos homólogos, em 29%, nos dois cromossomos do par e em 7% não foi evidenciada a constrição em nenhum dos cromossomos do par, independente do sexo do animal (Figs. 2A e B).

O cariótipo da população III tem $2n = 28$ cromossomos, sendo que os pares 1, 2, 10, 12, 13 e 14 são metacêntricos; os pares 3, 5, e 11 são submetacêntricos; o par 4 é subtelocêntrico e os pares 6, 7, 8 e 9 são telocêntricos (Tabela 1). Em 91% das metáfases analisadas, foi identificada uma constrição secundária nos cromossomos do par 5 e em 9% a constrição aparece em somente um dos cromossomos do par, independente do sexo do animal (Fig. 2C).

Banda C

As populações I e II apresentaram o mesmo padrão de banda C. Todos os cromossomos apresentaram blocos de heterocromatina centromérica. Além disso, dois segmentos intersticiais fortemente marcados foram localizados nos braços curtos dos cromossomos 2 e um no par 4. Os cromossomos dos pares 1 e 4 apresentaram também uma pequena banda telomérica nos braços curtos. Os braços curtos do par 6 apresentaram-se totalmente heterocromáticos. Os homólogos do par 7 apresentaram bandas pericentroméricas, um segmento intersticial nos braços curtos e ainda um bloco heterocromático telomérico em um dos cromossomos e subtelomérico no outro cromossomo do par. Os cromossomos do par 8 apresentaram uma fraca marcação banda C positiva, intersticial, nos braços longos (Fig. 3A e B; 8A e B).

A população III, $2n = 28$, também apresentou heterocromatina centromérica em todos os cromossomos. Os cromossomos do par 1 apresentaram as mesmas bandas C intersticiais encontrados nos pares 2 dos cariótipos das populações I e II. Nos braços curtos do par 3 foi detectado um pequeno bloco heterocromático telomérico, coincidindo com o bloco encontrado nos cromossomos dos pares 4 das populações anteriores. Os cromossomos do par 4, subtelocêntricos, apresentaram banda C pericentromérica nos braços curtos, igual à encontrada nos cromossomos do par 6 das populações I e II. O par 5 apresentou blocos heterocromáticos intersticiais nos braços curtos e subteloméricos nos braços longos. O bloco subtelomérico é heteromórfico, sendo maior em um dos homólogos que no outro. Os cromossomos dos pares 6, 7 e 8 apresentaram um segmento heterocromático intersticial e os cromossomos do par 9, dois segmentos também intersticiais. Nos cromossomos do par 7 encontrou-se, ainda, um bloco heterocromático telomérico (Figs.3C e 8C).

Ag – NOR

Nas populações I e II observou-se um par de NOR localizada nos braços longos dos cromossomos do par 7, coincidindo com a constrição secundária e com um bloco heterocromático ali encontrado. Na população I, a NOR localiza-se na região telomérica nos cromossomos em que não se visualizou a constrição secundária e subtelomericamente nos cromossomos que a constrição foi visualizada (Fig. 4A e B; 8A e B). Na população II foi constatado um heteromorfismo no tamanho da NOR em todos os indivíduos. Em um dos cromossomos, foi observado um único bloco e no outro cromossomo do par, dois blocos (Figs. 4A e B). Na população III também verificou-se a presença de apenas um par de NORs subtelomérica, porém localizada nos cromossomos do par 5. O heteromorfismo evidenciado nessa população refere-se ao tamanho da NOR, semelhante ao encontrado na população II (Fig. 4C; 7C). Os cromossomos 5 e 7 apresentam diferenças de tamanho identificados como 5' e 7' nos ideogramas (Fig. 8).

Cromossomos meióticos

A análise dos cromossomos meióticos de exemplares das populações I e II submetidas ao método de bandamento C indicaram a presença de 12 pares bivalentes com cromossomos em final de diacinese, confirmando, assim, o número $2n = 24$ cromossomos encontrado nas preparações mitóticas (Fig. 5A). Na população III, as preparações cromossômicas submetidas à coloração convencional com Giemsa e ao método de banda C indicaram a presença de 14 pares bivalentes em diacinese confirmando o cariótipo $2n = 28$ cromossomos (Fig. 5B e C).

DISCUSSÃO

O número de cromossomos de uma espécie em evolução pode aumentar ou diminuir sem que haja grande variação na quantidade de DNA nuclear. Esses cariótipos surgem geralmente por quebras de cromossomos na altura do centrômero - fissão cêntrica - dando origem a dois telocêntricos ou por um processo inverso denominado fusão cêntrica ou telomérica. As alterações no número de cromossomos devem ter correlação entre cariótipo – ambiente, sendo o mecanismo fissão-fusão cêntrica ou fusão telomérica os mediadores dessa correlação (Guerra, s/d).

A população III diferiu das populações I e II tanto no número quanto na morfologia dos cromossomos, apresentando quatro pares de cromossomos telocêntricos os quais não foram verificados nos cariótipos das populações I e II. Ao compararmos o padrão de heterocromatina da população III com o padrão das populações I e II, verificamos que as três populações apresentam um par cromossômico com dois notáveis blocos intersticiais de heterocromatina constitutiva. Unindo-se os telocêntricos 6/7 forma-se um par metacêntrico semelhante aos cromossomos do par 1. Da mesma forma, unindo-se os telocêntricos 8/9 da população III, forma-se um par semelhante ao 4 das populações I e II. Assim, com essa montagem artificial (ver Figura 6), verificamos que o número, a morfologia e as localizações da constrição secundária e da NOR, coincidem nas três populações, além das bandas heterocromáticas marcadoras dos cromossomos 2 e 4.

Partindo dessa constatação, levantamos a hipótese de uma origem comum para os dois diferentes cariótipos, o que poderia ter ocorrido por fissão cêntrica dos cromossomos 1 e 4 de um cariótipo semelhante ao das populações I e II, originando os cromossomos 6, 7, 8 e 9 na população III, ou então poderia ter ocorrido fusão cêntrica ou a fusão telomérica dos cromossomos 6/7 e 8/9 de um cariótipo semelhante ao da população III, que originaria os cromossomos 1 e 4 das populações I e II.

Consideramos a segunda hipótese menos provável, pois estudos realizados anteriormente em espécies da família Pseudidae, revelaram sempre um número diplóide de cromossomos igual a 24 (ver Barrio e Rubel, 1970), sugerindo a origem dos atuais Pseudidae a partir de um cariótipo ancestral $2n = 24$ cromossomos. Também suporta essa hipótese, de fissão cêntrica, as supostas relações filogenéticas de Pseudidae com Hylidae $2n$

= 24, a mais provável, ou com Leptodactylidae, $2n = 22$ cromossomos. Se Pseudidae tivesse origem de um cariótipo com um número maior de cromossomos do que $2n = 24$, então deveriam ter se originado de algum outro grupo que existia aqui na América do Sul, o que parece menos provável.

Esta hipótese, no entanto, confronta com inúmeros dados da literatura que sugerem em Anura uma tendência de diminuição no número de cromossomos como o mecanismo mais comum na evolução cariotípica (Beçak *et al.*, 1970; Bogart, 1973, 1991; Miura *et al.*, 1995). Há, no entanto, alguns grupos em Anura que também apresentaram evidências de que a evolução cariotípica ocorreu por aumento no número de cromossomos. Cole (1974), ao analisar os cariótipos de *Hyla brunnea* ($2n = 24$ cromossomos) e *H. septentrionalis* ($2n = 34$ cromossomos), propôs que o cariótipo com maior número de cromossomos ($2n = 34$), seja o derivado, apoiando-se no fato que a maioria dos hílideos estudados possui $2n = 24$ e $n = 12$ cromossomos. Ainda, o aumento do número de cromossomos de uma espécie pode ocorrer a partir de eventos de não disjunção meiótica dos cromossomos, que resultam em poliploidização caritípica (Tymowska, 1991). Porém, nesses casos, o aumento refere-se a todo conjunto haplóide de cromossomos, o que não ocorreu em *P. sp.* (aff. *minuta*), onde o acréscimo foi de apenas quatro pares cromossômicos.

A população III difere das populações I e II também pela presença de maior quantidade de heterocromatina, detectada pelo método de banda C. Bandas extras ocorrem exatamente nos cromossomos telocêntricos, em regiões próximas ao centrômero. Essa heterocromatina parece diferir qualitativamente do restante existente no genoma. Isso pôde ser inferido da observação de que essas bandas heterocromáticas parecem coincidir com bandas castanho escuras, detectadas nas lâminas submetidas à impregnação pela prata (Ag-NOR) (ver Figura 6). A detecção de heterocromatina por esse método representa uma inespecificidade da técnica Ag-NOR, cujo alvo principal são as proteínas ácidas associadas às NORs ativas. Esses dados sugerem que esses segmentos heterocromáticos têm uma composição diferente daquela dos outros segmentos que foram evidenciados somente pelo método de bandamento C. Pretendemos futuramente investigar essa heterocromatina por técnicas mais específicas, como fluorocromos que evidenciam regiões ricas em GC e em AT.

Os resultados deste trabalho sugerem que a mudança na quantidade de heterocromatina pode ter tido um papel importante na diferenciação desses cariótipos. O aumento da heterocromatina constitutiva é considerado uma tendência na evolução cariotípica de Amphibia, embora, como já foi afirmado por vários autores não se descarte a possibilidade de ocorrência de diminuição, em alguns casos.

King (1991) propôs o envolvimento de três processos evolutivos na variação da heterocromatina: a adição de heterocromatina a sítios cromossômicos específicos; a transformação de regiões cromossômicas eucromáticas em regiões de heterocromatina constitutiva e; a evolução em conjunto de múltiplos sítios eucromáticos. Na primeira proposta a adição de heterocromatina é resultante da amplificação de seqüências de DNA repetitivo e provavelmente estaria correlacionada a mudanças no comprimento dos cromossomos. Já na transformação de regiões eucromáticas em heterocromáticas não haveria grandes alterações no comprimento dos cromossomos. Na evolução conjunta de múltiplos sítios eucromáticos pressupõe-se que uma família de DNA repetitivo evolua em harmonia, acarretando uma certa homogeneidade entre os membros dessa família, sendo maior dentro de uma espécie do que entre espécies relacionadas. Schmid (1993) explicou a substancial diferença encontrada no tamanho do genoma em diferentes espécies de *Pleurodema* por mudanças homogêneas e simétricas nas quantidades de todas as classes de seqüências de DNA ao longo dos cromossomos, que não modificaram sua morfologia ancestral. Em *Pseudis minuta* e *P. sp. (aff. minuta)* não se verificou grande mudança de tamanho dos cromossomos e não há dados suficientes para se relacionar com alguma das hipóteses acima citadas.

No entanto, é evidente que os cromossomos telocêntricos apresentaram um aumento notável de heterocromatina, que foi verificado tanto pelo método de banda C, quanto pelo método Ag-NOR. A investigação da composição dessa heterocromatina, utilizando-se técnicas mais refinadas, como fluorocromos específicos, e a avaliação do conteúdo de DNA poderiam auxiliar na elucidação dessa problemática.

Outro fator que deve ser considerado para sustentar a hipótese de uma origem comum para os cariótipos das três populações é a localização das NORs. Nas populações I e II ocorrem nos cromossomos do par 7. Na população III a NOR localiza-se no par 5, que corresponde ao 7 das populações I e II em morfologia. Este cromossomo 5 ocuparia a

posição 7 no cariótipo montado da população III (ver Figura 6) onde os pares telocêntricos 6/7 e 8/9 foram unidos, coincidindo com a localização da NOR nos cariótipos das populações I e II.

Interessante também foi a presença de heteromorfismo no tamanho da NOR entre os homólogos, detectado nas populações II e III. Segundo Schmid (1982), o tamanho das NORs pode variar entre diferentes indivíduos da mesma espécie, devido ao diferente número de cópias de genes ribossomais apresentado por cada NOR. Esses heteromorfismos podem ocorrer mesmo entre diferentes células de um mesmo indivíduo, conforme relata King *et al.* (1990) para espécies de *Litoria* e de *Cyclorana novaehollandiae*.

As NORs de tamanho maior observadas em grande parte dos cariótipos, em um dos homólogos do par 7, pop. II e em um dos homólogos do par 5, pop. III, podem ser resultado de deleção ou de duplicação e triplicação de um dos cistrons, fato comum em populações selvagens, estando sempre associadas a NORs de tamanho normal (Schmid, 1982). Outro mecanismo possível seria a amplificação de determinadas seqüências do rDNA ou de todo o cistron (King *et al.*, 1990). Nos casos de *P. minuta* e *P. sp.* (aff. *minuta*) é possível que tenha ocorrido duplicação, já que em algumas metáfases é possível visualizar dois blocos nítidos marcados pela prata e que a população I só apresenta a NOR de tamanho menor, em homozigose.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem sugerir que a população III, de Tainhas, possa ter surgido a partir de indivíduos com $2n = 24$ cromossomos, como os das populações I e II. A diferenciação cromossômica no gênero *Pseudis* parece ter envolvido mecanismos de fissão cêntrica, provavelmente dos cromossomos dos pares 1 e 4. A quantidade sensivelmente maior de heterocromatina na população III, a presença de bandas heterocromáticas marcadoras e a localização das NORs, coincidentes nas três populações, corroboram esta hipótese. Os nossos dados confirmam também que a população III deve corresponder a uma nova espécie, o que está de acordo com a análise morfológica e de canto feita por Kwet & Di-Bernardo (1999). Os dados relativos aos indivíduos da população III, que diferem dos indivíduos das populações I e II principalmente no porte físico, por apresentarem maior robustez e uma pequena diferenciação no canto, confirmam que a taxa de variação cariotípica é maior do que a variação morfológica. Este dados

ênfatizam ainda a importância que o estudo citogenético pode ter nos estudos taxonômicos e das relações filogenéticas, principalmente em Anura.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte financeiro. À Klélia Aparecida de Carvalho pelo auxílio técnico de laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batistic R.F. Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura, Amphibia). Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, 203p.
- Barrio, A & Rubel, D.P. Características del Cariótipos de de los Pseudidos. *Physis* – Tomo XXIX, 79: 505-10 (1970).
- Beçak, M.L, Denaro L & Beçak, W: Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics* 9:225-38 (1970).
- Bogart, J.P. Evolution of anuran karyotypes. In *Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems* (J.L. Vial, ed), pp: 337-49, University of Missouri Press, Columbia (1973).
- Bogart, J.P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Academic Press, San Diego, pp. 233-57 (1991).
- Cole, C.J. Chromosome evolution in selected treefrogs including casque-headed species (*Pternohyla*, *Tripiron*, *Hyla* and *Smilisca*). *Amer. Museum Novitates*, nº 2541, pp:1-10 (1974).
- Green, M. D & Sessions,S. K. Nomenclature for Chromosomes. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, pp 431-32. Academic Press, San Diego (1991).
- Guerra, M., Introdução à Citogenética Geral. Guanabara Koogan S. A. 112-124.
- Howell, W. M. & Black, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015 (1980).
- King, M. C-banding studies on Australian *Hylid* frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191-217 (1980).

- King, M., Contreras, N & Honeycutt, R. L. Variation within and between nucleolar regions in Australian hyloid frogs (Anura) shown by 18S and 28S *in situ* hybridization. *Genetics* 80:17-29 (1990).
- King, M. The evolution of the amphibian genome. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, pp 359-391, Academic Press, San Diego (1991).
- Kwet, A. & Di-Bernardo, M. Pró-Mata – Anfíbios. *Amphibien. Amphibians*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil (1999).
- Miura, I., Niishioka, M., Bordikin, L. J. & Wu, Z. The origin of the brown frogs with $2n = 24$ chromosomes. *Experientia* 51: 79-188 (1995).
- Morescalchi, A. Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution. In: *Amphibia*. A.B. Chiarelli and E. Capana, pp. 233-348, Academic Press, New York (1973).
- Savage, J.M. The geographic distribution of frogs: patterns and predictions. In: Vial, J.L. *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research and major problems*. Univ. Missouri Press, Columbia, 351-445, 1973.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-44 (1982).
- Schmid, M, Steinlein, C, Feichtinger, W & Poot, M. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 62: 42-48 (1993).
- Stephenson, E. M., Robinson, E.S. e Stephenson, N. G. Karyotypic variation within the genus *Leipelma* (Amphibia, Anura). *Can. J. Genet. Cytol.*, 14: 691-702, (1972).

TABELA 1: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *P. minuta* (Pop. I e II) e de *P. sp. (aff. minuta)* (Pop. III). Classificação segundo Green & Sessions (1991).

Cromossomo	Pop. I				Pop. II				Pop. III			
	R.B. X ± S	T.R.% X ± S	I.C. X ± S	P.C.	R.B. X ± S	T.R.% X ± S	I.C. X ± S	P.C.	R.B. X ± S	T.R.% X ± S	I.C. X ± S	P.C.
01	1.22 ± 0.12	15.07 ± 0.41	0.42 ± 0.02	M	1.21 ± 0.13	15.37 ± 0.40	0.43 ± 0.02	M	1.66 ± 0.10	11.36 ± 0.05	0.38 ± 0.02	M
02	1.54 ± 0.26	13.23 ± 0.75	0.38 ± 0.03	M	1.50 ± 0.35	13.64 ± 0.42	0.39 ± 0.28	M	1.67 ± 0.16	10.57 ± 0.09	0.38 ± 0.03	M
03	1.56 ± 0.15	11.93 ± 0.38	0.37 ± 0.03	M	1.60 ± 0.15	12.67 ± 0.46	0.37 ± 0.03	M	1.69 ± 0.03	9.72 ± 0.09	0.34 ± 0.02	SM
04	1.77 ± 0.29	10.56 ± 0.51	0.34 ± 0.04	SM	1.80 ± 0.10	1.84 ± 0.30	0.35 ± 0.02	SM	3.02 ± 0.14	8.25 ± 0.21	0.24 ± 0.01	ST
05	1.96 ± 0.40	9.41 ± 0.54	0.33 ± 0.05	SM	2.13 ± 0.52	8.95 ± 0.51	0.31 ± 0.06	SM	1.73 ± 0.02	7.77 ± 0.28	0.35 ± 0.01	SM
06	3.41 ± 0.9	7.90 ± 0.45	0.21 ± 0.05	ST	3.60 ± 0.44	8.03 ± 0.42	0.24 ± 0.05	ST	-	7.49 ± 0.11	-	T
07	2.45 ± 0.29	6.92 ± 0.29	0.25 ± 0.08	SM	1.96 ± 0.36	6.66 ± 0.40	0.33 ± 0.04	SM	-	7.12 ± 0.04	-	T
08	1.52 ± 0.40	5.94 ± 0.35	0.36 ± 0±0.4	M	1.67 ± 0.25	5.83 ± 0.30	0.36 ± 0.04	M	-	6.28 ± 0.06	-	T
09	1.68 ± 0.28	5.61 ± 0.38	0.36 ± 0.06	SM	1.69 ± 0.33	5.60 ± 0.31	0.35 ± 0.03	SM	-	5.99 ± 0.43	-	T
10	1.63 ± 0.29	5.13 ± 0.39	0.38 ± 0.09	M	1.35 ± 0.25	4.73 ± 0.30	0.40 ± 0.04	M	1.71 ± 0.08	5.88 ± 0.35	0.38 ± 0.02	M
11	1.37 ± 0.32	4.55 ± 0.58	0.38 ± 0.05	M	1.54 ± 0.13	4.26 ± 0.41	0.39 ± 0.05	M	1.38 ±0.06	5.54 ±0.21	0.38 ± 0.05	SM
12	1.52 ± 0.20	3.74 ± 0.40	0.38 ± 0.03	M	1.42 ± 0.19	3.63 ± 0.15	0.38 ± 0.05	M	1.47 ± 0.20	4.81 ± 0.23	0.39 ± 0.02	M
13	-	-	-	-	-	-	-	-	1.46 ± 0.21	4.68 ± 0.05	0.39 ± 0.02	M
14	-	-	-	-	-	-	-	-	1.22 ± 0.18	3.94 ± 0.23	0.38 ± 0.01	M

I.C. Índice centromérico, M = metacêntrico, P.C. = Posição do centrômero, R.B. = Relação de braços, S = Desvio padrão, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, T = Telocêntrico, T.R. = Tamanho relativo e X = média.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1. Mapa com a localização dos municípios de Eldorado do Sul, São Jerônimo e Tainhas (RS), onde foram coletados os espécimes.

Fig. 2. Cromossomos metafásicos de células intestinais de *P. minuta* e *P. sp.* (aff. *minuta*) corados com Giemsa. A: Pop. I (ZUEC 11580), fêmea. B: Pop. II (ZUEC 11589), fêmea. C: Pop. III (ZUEC 11597), macho. (Barra = 6 µm)

Fig. 3. Cromossomos metafásicos de células intestinais de *P. minuta* e *P. sp.* (aff. *minuta*) submetidos a banda C. A: Pop. I (ZUEC 11583), macho. B: Pop. II (ZUEC 11591) fêmea. C: Pop. III (ZUEC 60.30), fêmea. (Barra = 6 µm)

Fig. 4. Cromossomos metafásicos de células intestinais de *P. minuta* (Pops. I e II) e *P. sp.* (aff. *minuta*) (Pop. III) submetidos ao método de Ag-NOR. A: Par 7 da pop. I mostrando a localização da NOR subtelo mérica em um dos cromossomos do par e telomérica no outro. B: Par 7 da pop. II mostrando NOR com heteromorfismo de tamanho entre os homólogos. C: Par 5 da pop. III mostrando heteromorfismo de NOR. (Barra = 5 µm)

Fig. 5. Cromossomos meióticos em diacinese em *P. minuta* e *P. sp.* (aff. *minuta*). A: Diacinese de indivíduo da pop. I com 12 bivalentes, submetidos a bandamento C. B: Diacinese de indivíduo da pop. III com 14 bivalentes submetidos a coloração com Giemsa. C: Diacinese de indivíduo da pop. III com 14 pares bivalentes submetidos ao bandamento C. (Barra = 5 µm).

Fig. 6. Montagem de um cariótipo utilizando um conjunto haplóide de cromossomos (primeiro cromossomo de cada par) de *P. minuta* (pop. II) e um conjunto haplóide de cromossomos (segundos cromossomos de cada par) da *P. aff. minuta* (pop. III), submetidos ao método de bandamento C. Note que os pares 1 e 4 da pop. II aparentemente representam os pares telocêntricos 6/7 e 8/9, respectivamente, da pop. III, unidos pelos centrômeros (Barra = 6µm).

Fig. 7. Cromossomos da pop. III de *P. aff. minuta* submetidos ao método Ag-NOR, mostrando a NOR localizada no par 5 e as bandas heterocromáticas inespecificamente evidenciadas por esse método. (Barra = 5 µm).

Fig. 8. Ideogramas de *P. minuta* e *P. aff. minuta*. A : Pop. I; B: Pop. II; C: Pop. III. Os setores em preto indicam regiões heterocromáticas e em cinza NORs. Os morfos estão representados por 5' e 7'.

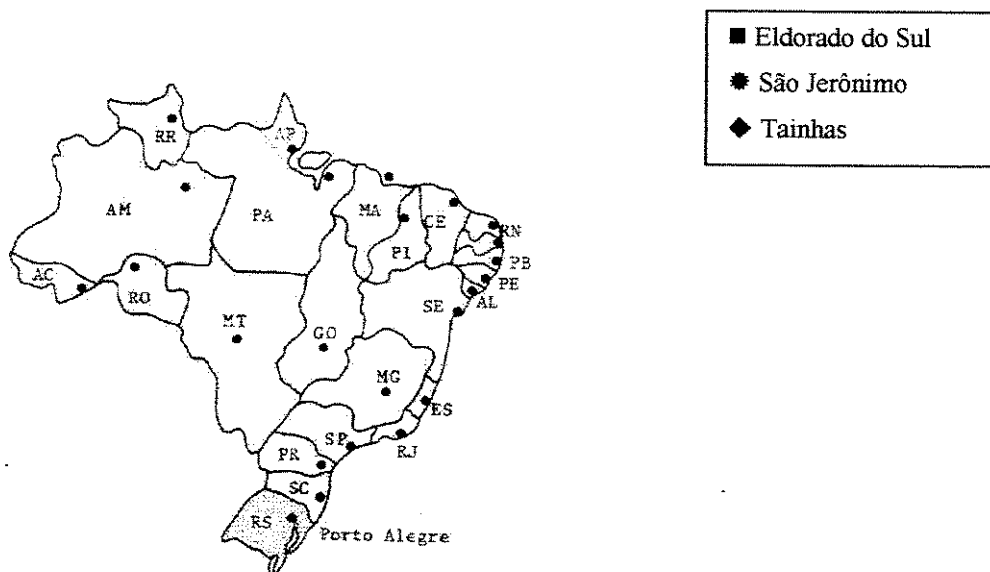
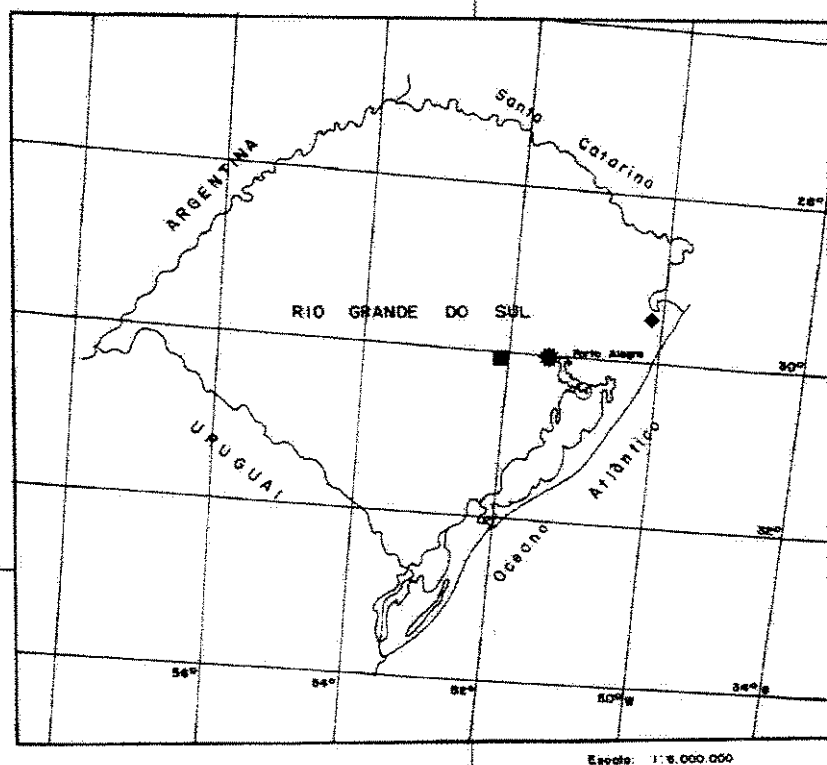


Figura 1

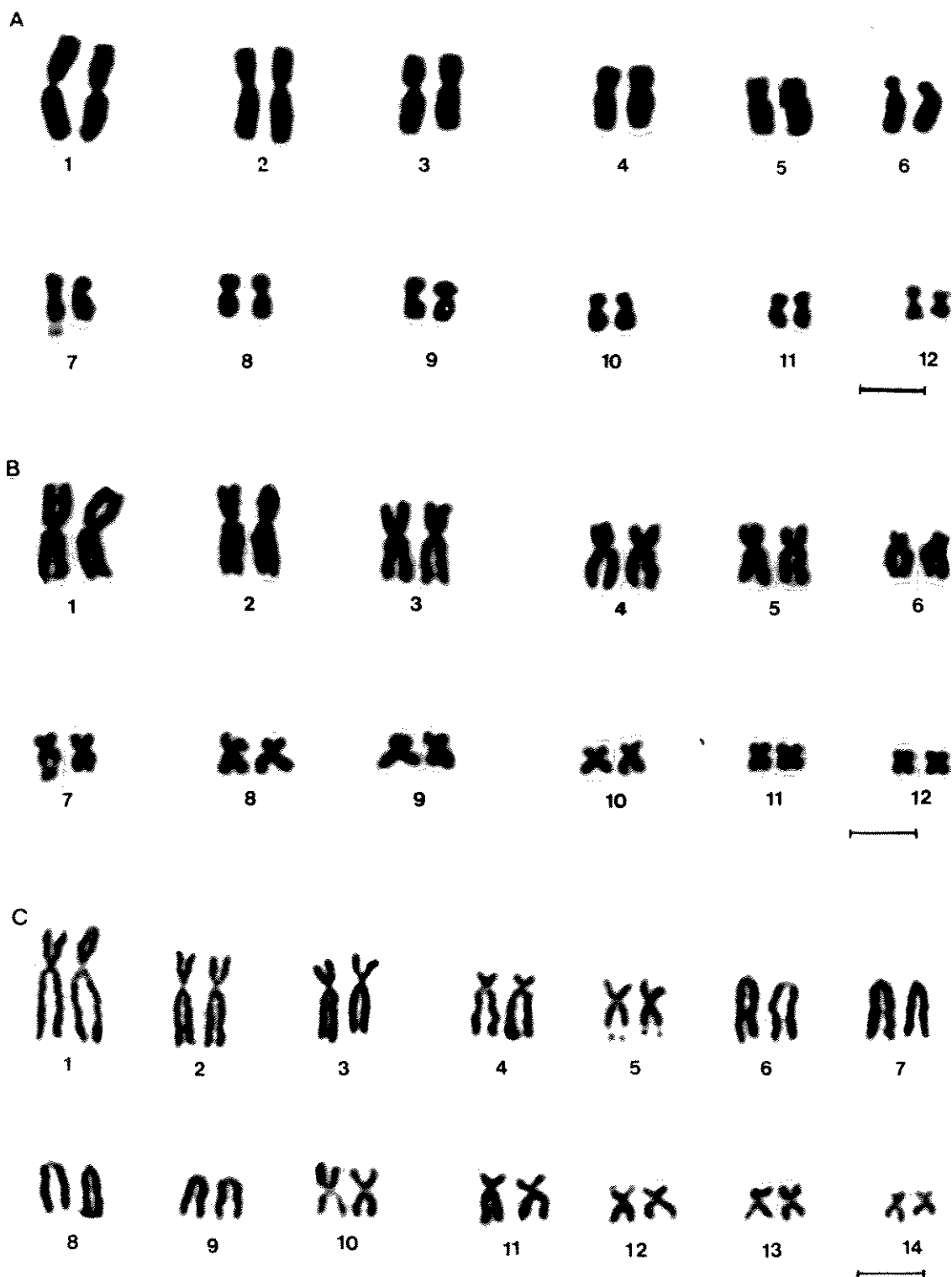


Figura 2

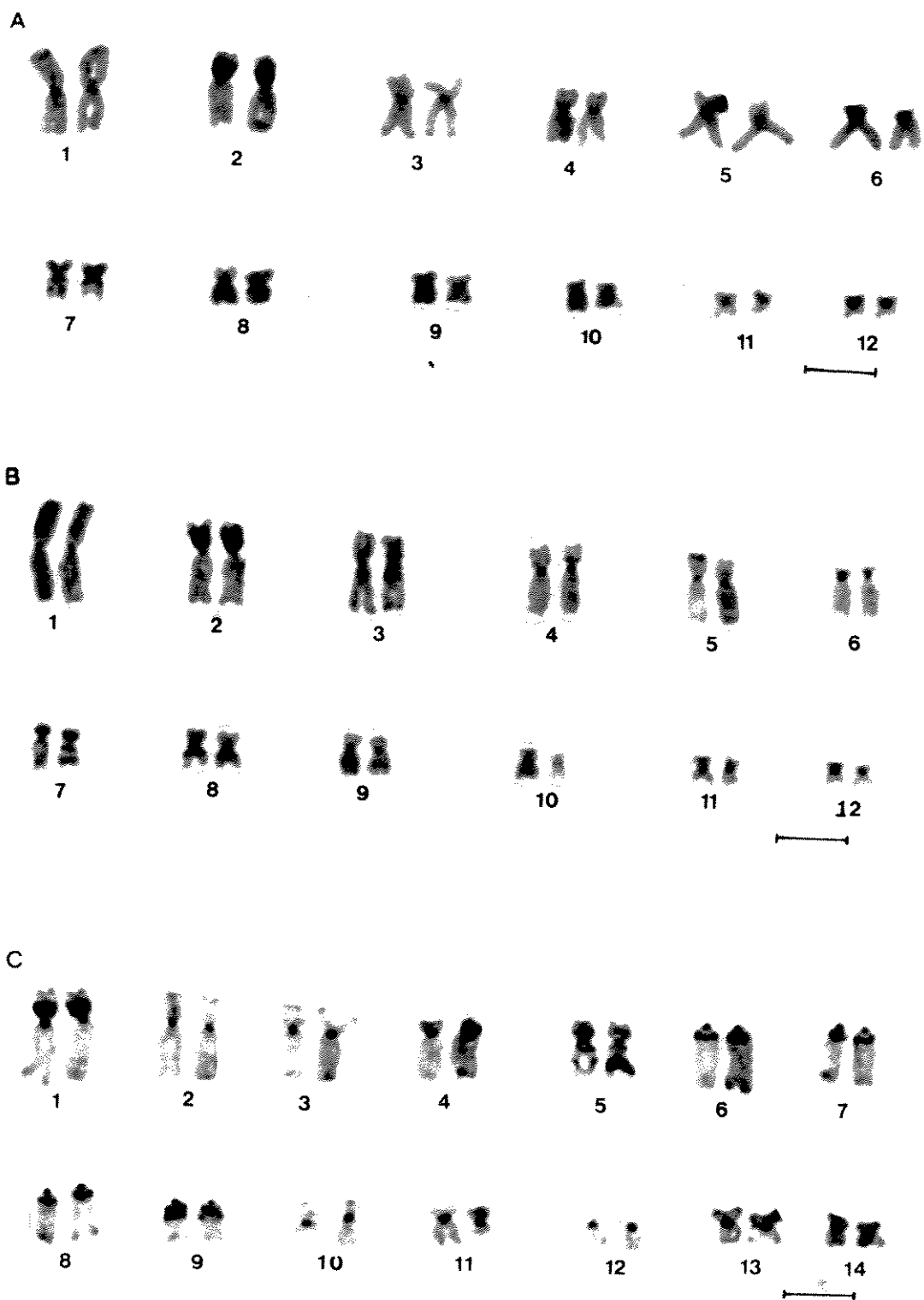


Figura 3

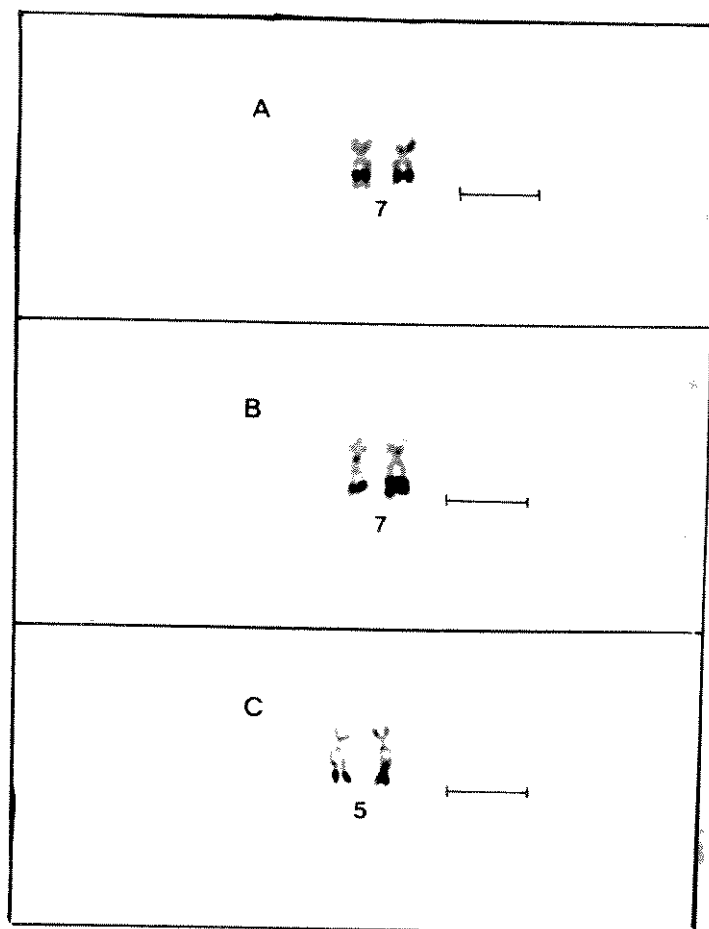


Figura 4

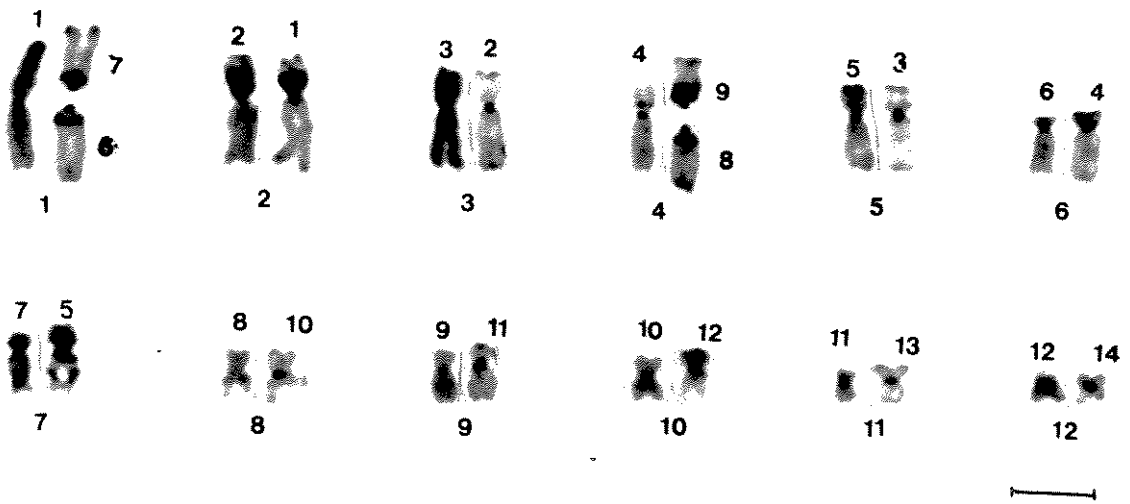


Figura 6

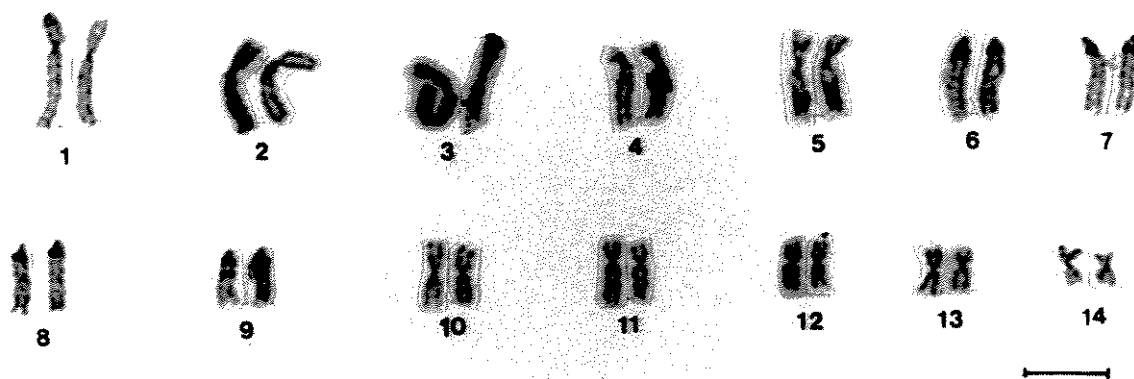


Figura 7

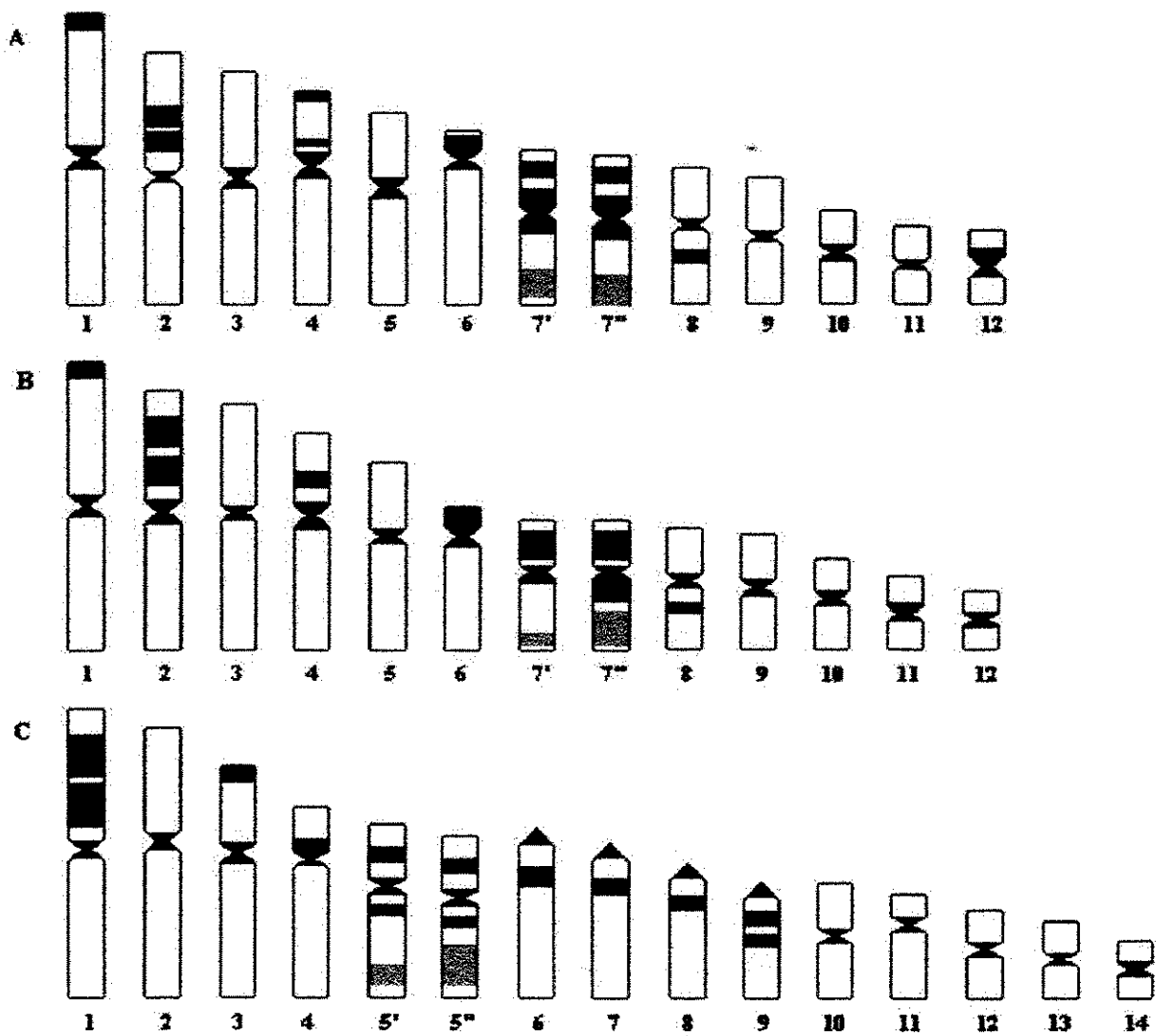


Figura 8

III. CONCLUSÕES GERAIS

1. Foram encontrados dois cariótipos diferentes. As populações de *P. minuta* de Eldorado do Sul e de São Jerônimo apresentam $2n=24$ cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e um subtelocêntrico. *P. sp.* (aff. *minuta*), população de Tainhas, apresenta $2n = 28$ cromossomos, com quatro pares adicionais de cromossomos telocêntricos.
2. A NOR localiza-se na região telomérica dos braços longos do par 7 em *P. minuta* e na mesma posição no par 5 em *P. sp.* (aff. *minuta*). A localização da NOR coincide com uma constrição secundária, nem sempre presente, o que explica também a localização da NOR telomérica ou subtelomérica.
3. A NOR apresenta heteromorfismo de tamanho em *P. minuta* e em *P. sp.* (aff. *minuta*), provavelmente devido à duplicação do cístron ribossomal em um dos cromossomos homólogos.
4. Todos os cromossomos dos dois cariótipos apresentam heterocromatina na região centromérica e bandas C intersticiais, sendo algumas marcadoras, comuns aos dois cariótipos. *P. sp.* (aff. *minuta*), no entanto, apresenta maior quantidade de heterocromatina intersticial do que *P. minuta*.
5. As regiões de heterocromatina intersticial adicionais, banda C positivas, encontradas em *P. sp.* (aff. *minuta*) marcaram-se também, inespecificamente, pelo método de impregnação por prata, o que sugere diferenças na composição em relação às outras heterocromatinas observadas.
6. As bandas C marcadoras possibilitaram a montagem de um cariótipo da população de Tainhas, onde unindo-se os pares telocêntricos 6 com 7 e 8 com 9 obtém-se um

cariótipo com $2n = 24$ cromossomos com morfologia e padrão de heterocromatina muito semelhantes aos de *P. minuta*, e também a localização da NOR coincidente. Há evidências, portanto, de que o cariótipo da população de Tainhas possa ter se originado de um cariótipo com $2n = 24$ cromossomos, semelhante ao das populações de *P. minuta* estudadas, por mecanismos de fissão cêntrica e por adição de heterocromatina.

7. A análise citogenética realizada permite propor que a população de Tainhas seja considerada uma espécie nova, o que é corroborado também pelas observações de pequenas diferenças morfológicas e de canto feitas por outros pesquisadores.