

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/5651
IB/80305

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1984

(Este exemplar corresponde a redação final¹
da tese defendida

α

por CARLOS GONZAGA DE ALMEIDA , e aprovada
pela Comissão julgadora

Unicamp, 27 de Maio de 1984
Mário

ASPECTOS BIOLÓGICOS E CITOGÊNETICOS DE
HYLA FUSCOVARIA (AMPHIBIA - ANURA).

Dissertação apresentada ao Insti-
tuto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Biologia.

Orientador : Prof a Dr a Dēbora de Queiroz Tavares
Orientador Programa : Prof a Dr a Hebe M.L.de Souza

CAMPINAS - S.P.

- 1984 -

mgm

Classif.	T
Autor	AL 64 a
V.	Ex.
Tombo	BC/ 5651
IBI	623

CM000579961

IB/ 80305
BC/ 5651

A MARIA PAULINA DE ALMEIDA
E ANTONIA BATISTA VEIGA.

AOS MEUS PAIS.

AOS MEUS IRMAOS.

AOS MEUS AMIGOS.

AGRADECIMENTOS

A Dra Débora de Queiroz Tavares, pelo seu apoio sincero, orientação amiga e transmissão de experiência científica.

À Radenka Francisca Batistic, pelas discussões amigas, sugestões valiosas, leitura do manuscrito e interesse durante a realização deste trabalho.

À Dra Christine Hackel, pelo interesse e dedicação durante a leitura do manuscrito.

Ao Dr. Luiz Dino Vizotto e Dr. Mithitaka Soma, pela atenciosa leitura do manuscrito.

Ao meu irmão Ariovaldo Veiga de Almeida, pelo apoio, amizade, compreensão, eficiência e dedicação em todos os momentos da preparação deste trabalho.

Ao Prof. Adão J. Cardoso, pela leitura, colaboração na identificação dos animais e interesse demonstrado pelo trabalho.

A Dra Yoko B. Rosato e Ana M. Azeredo Espin, pelo apoio e amizade durante minha permanência nos laboratórios do Barração de Genética.

Ao Dr. Crodowaldo Pavan, por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho, além de todo seu apoio e amizade durante a minha permanência em seu laboratório.

Ao laboratório de Estatística da UNICAMP, onde como primeiro cliente tive oportunidade de fazer novos amigos: Sebastiao Amorim Irene M. Ferreira e Rosane Nusenbaum.

À Noely Nogueira Pinho e Carlos Ramiro Latorre, pelo apoio amigo na organização da bibliografia e confecção dos esquemas deste trabalho.

Aos amigos Wilson, Ailton, Gaby, Roberto, Vinícius, Cacã, Din, Sérgio, Fátima, Mario, Neto, Ze, Nenê, Edson, Cláudia, Gerson, Rita, Emigdio e Karin por me haverem sempre estimulado, tornando nossos momentos felizes.

Aos meus familiares, pelo apoio e confiança.

Outras pessoas também colaboraram desinteressadamente na realização deste trabalho. A não citação nominal não significa esquecimento; sou profundamente grato pela colaboração prestada.

Agradeço a CAPES pela concessão da Bolsa que permitiu a realização e dedicação integral a este trabalho.

INDICE

I - Introdução.....	1
I.1 Panorama geral dos anfíbios.....	1
I.2 A família Hylidae.....	2
- Constituição cariotípica e caracterização taxonômica da família.....	3
- <u>Hyla fuscovaria</u>	6
- Espermatozoides dos anfíbios anuros.....	7
I.3 Citogenética dos Hylidae.....	8
- Estudos atuais de citogenética aplicados à análise cromossômica dos anfíbios.....	11
- Diferenças cromossômicas durante o desenvolvimento....	13
- Genes codificadores de RNA ribossômico.....	15
- Técnicas demonstrativas dos genes de RNA ribossômico.	15
- Heterocromatina.....	18
- Heterocromatina facultativa.....	19
- Heterocromatina constitutiva.....	20
- Evolução nas técnicas de visualização da heterocromatina constitutiva.....	20
- Distribuição de heterocromatina constitutiva nos anfíbios.....	24
- Funções da heterocromatina.....	25
M - Materiais e Métodos.....	26
M.1 - <u>Hyla fuscovaria</u> : Coleta, criação e manutenção em laboratório.....	26
M.2 - Descrição dos padrões de manchas dorsais.....	27
M.3 - Obtenção dos espermatozoides de <u>Hyla fuscovaria</u>	28

M.4 -	Preparações citológicas para obtenção de cromossomos de adultos e girinos.....	29
M.5 -	Cariótipo e análise morfométrica dos cromossomos de adultos e girinos.....	31
M.6 -	Técnica de Banda C efetuada em núcleos celulares de adultos e girinos.....	33
M.7 -	Técnicas de Banda RON efetuada em núcleos celulares interfásicos e cromossomos de adultos e girinos.....	34
R -	Resultados.....	36
R.1 -	Dados referentes à criação de <u>Hyla fuscovaria</u>	36
R.2 -	Estudo do padrão de manchas e morfometria dos ovos de <u>Hyla fuscovaria</u>	37
R.3 -	Espermatozoides de <u>Hyla fuscovaria</u>	38
R.4 -	Cariótipo.....	40
R.5 -	Banda C.....	55
R.6 -	Banda RON - Estudo dos núcleos interfásicos e metafásicos.....	55
D -	Discussão.....	83
D.1 -	<u>Hyla fuscovaria</u> em laboratório.....	83
D.2 -	Padrões de coloração dorsal.....	84
D.3 -	Morfologia dos espermatozoides.....	84

D.4 - Cariótipo de <u>Hyla fuscovaria</u>	90
D.4.1 - Variações numéricas.....	90
D.4.2 - Comparação morfométrica dos cromossomos de girinos e adultos.....	91
D.4.3 - Banda C.....	92
D.4.3.1 - Banda C em <u>Hyla fuscovaria</u>	93
D.4.4 - Banda RON.....	96
 S - Sumário.....	100
 C - Conclusão.....	102
 B - Bibliografia.....	103

1 - Introdução

I.1 - Panorama geral dos anfíbios

A Classe Amphibia é dividida em três subclasses; Labyrinthodontia, Lepospondilis e Lissamphibia.

A primeira e a segunda foram pioneiras sobre a terra, há cerca de 350 milhões de anos, e extinguiram-se após 200 milhões de anos.

A terceira subclasse, Lissamphibia apareceu no Jurássico, há cerca de 150 milhões de anos. Expandiram-se rapidamente e apresentam atualmente cerca de 3000 espécies, distribuídas em três Ordens: Anura (Salientia), Urodela (Caudata) e Apoda (Caecilia ou Gymnophiona). Do total de espécies vivas 85%, são Anuros, 10% Urodelos e 5% Apodos.

Os Anfíbios modernos são encontrados na maioria dos habitats, apresentando ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em todos os continentes. A adaptação do grupo é notável, conquistando mesmo áreas deserticas, onde sobrevivem armazenando água em seus corpos e em estado de hibernação dentro de tocas, que guardam relativa umidade (Blair, 1976).

A ordem Apoda apresenta distribuição essencialmente circuntropical. Os Urodelos predominam no Hemisfério Norte, exceto pela extensa radiação para a América Central e do Sul. Os Anuros, por sua vez, são encontrados em quase toda área ocupada pelos Urodelos e Ápodas, excluídas as regiões de condições hibernais extremas do Hemisfério Norte. São os únicos anfíbios presentes em regiões como o Oeste da Índia, Madagascar, Nova Guiné, Austrália, Nova Zelândia e Ilhas do Oeste e Sudoeste do Pacífico (Savage, 1973).

A Ordem Anura, a mais bem sucedida ordem dos anfíbios, apresenta 77% de suas famílias com centro de distribuição Tropical, 14% em áreas Subtropicais do Hemisfério Norte.

A uniformidade morfológica dos Anuros é característica. o que explica a fácil identificação da ordem. Entretanto, as semelhanças exibidas dentro do grupo tornam difíceis as análises das tendências filogenéticas e a distinção dos caracteres convergentes dentro da ordem.

Os estudos taxonômicos começaram em meados do século XVIII com Laurenti (1768). introdutor do termo Salientia para denominação do grupo. No Século XIX. Dumeril (1806.1807), refere-se ao grupo como Ecaudati ou Anoures como nomes equivalentes. A partir de então, uma série de considerações taxonômicas são realizadas (Wagles, 1830; Dumeril & Bibron, 1841). A revisão de Griffiths (1963) esclarece que no início do século XX a maioria dos caracteres básicos necessários para determinação das subordens dos Anuros foram alcançadas, principalmente após os trabalhos realizados por Nicholls (1916) sobre a estrutura da coluna vertebral dos Anuros. Estes estudos levaram Noble (1931) a elaborar uma classificação mais abrangente, empregada pela maioria dos autores da época. Na década de 60, o conhecimento e melhor entendimento dos padrões de distribuição zoogeográfica (Savage, 1973) e melhor avaliação dos critérios filogenéticos dentro do grupo (Griffiths, 1963) permitiu melhor classificação dos Anuros. Porém, uma classificação ideal e completa não foi ainda alcançada. E mesmo algumas famílias apresentam dificuldades de posicionamento taxonômico (Bogart, 1971; Morescalchi, 1968).

Estudos mais abrangentes e o desenvolvimento de novos critérios, associando aspectos biológicos, ecológicos, bioacústicos, citogenéticos, etc. poderão ajudar a contornar estes problemas, levando à melhor compreensão da taxonomia e da evolução, dentro do grupo.

I.2 - Família Hylidae

Contendo 32 gêneros, os Hylídeos apresentam grande variedade e distribuição geográfica, tendo alcançado maior grau de diferenciação na Região Neotropical. Griffiths (1963), considera definitiva a sua evolução a partir da Família Leptodactylidae, embora não sejam excluídas a possibilidade de origem polifilética, de vários ramos de Leptodactilídeos.

1.2.1 - Constituição cariotípica da família.

A família Hylidae apresenta diferenciação cromossômica marcante, sobretudo dentro do gênero Hyla. O número de cromossomos é variável dentro de certos limites, e variações de número (Tabela I) e de estrutura são comuns dentro da família.

Tabela I

Número de cromossomos de 16 gêneros da família Hylidae *

Gênero	Número de cromossomos
(1) - <u>Acris</u>	22
(2) - <u>Flectonotus</u>	30
(3) - <u>Hyla</u>	18 ^a . 20 ^b . 22 ^c . 24 ^d . 26 ^e . 30 ^f e 34 ^g
(4) - <u>Phyllomedusa</u>	26 ^a e 52 ^b
(5) - <u>Phrynohyas</u>	24
(6) - <u>Pseudacris</u>	24
(7) - <u>Anothera</u>	24
(8) - <u>Diaglena</u> (= <u>Iripriion</u>)	24
(9) - <u>Fritziana</u>	30
(10) - <u>Litoria</u>	24 ^a . 26 ^b e 30 ^c
(11) - <u>Nyctimystes</u>	26
(12) - <u>Pterohyla</u>	24
(13) - <u>Ptychohyla</u>	24
(14) - <u>Smilisca</u>	24
(15) - <u>Triprion</u>	24
(16) - <u>Gastrotheca</u>	26

* - Dos 16 gêneros restantes não foram encontrados registros cariotípicos.

- (1).(3)^d.(3)^f.(4).(5).(6).(7).(8).(12).(13).(14).(15) : Duellman & Cole., 1965.

- (2).(3)^b.(3)^f.(15) : Bogart. 1973.

- (3)^c.(3)^d.(3)^f.(9) : Beçak. M. L.. 1967. 1968.

- (3)^e : Stephenson & Stephenson. 1970.

- (4) : Beçak & col.. 1970.
- (3)^a : Bogart. 1972 e Batistic. 1984.
- (10)^a : Menzies & Iipet. 1976.
- (10)^b. (10)^c : Woodruff. 1972.
- (11). (16) : Duellman. 1967.
- (16) : Bogart. 1972; Schmid. 1983; Batistic. 1979.
- (3)^e : Cole. 1974.

Na região Holoártica. todos os Hylidae apresentam $2n = 24$ cromossomos. com exceção do gênero Acris que possui $2n = 22$ cromossomos (Bogart. 1970). Estas similaridades cariotípicas indicam proximidade entre os integrantes do gênero Acris com os gêneros Hyla e Pseudacris presentes na Região Holoártica. O elo entre os Hylidae Holoárticos e Neotropicais é possivelmente representado por Phrynohyas venulosa e Hyla sordida presentes. respectivamente. na Colômbia e no Panamá.

Os Hylidae Neotropicais apresentam grande variação no número de cromossomos (tabela I). Contudo. entre os componentes do gênero Hyla encontram-se variações comparáveis as apresentadas pelos demais membros da família Hylidae.

O menor número de cromossomos ocorre em Hyla albosignata de Boraceia. com $2n = 18$ (Bogart. 1973; Batistic, 1984) e em Hyla albosignata de Ieresopolis. com $2n = 20$ (Bogart. 1973). Hyla albopunctata apresenta $2n = 22$ (Beçak. 1968). A maioria das Hyla de tamanho grande e de porte médio a pequeno. apresenta $2n = 24$ (tabela III) como as Hyla do grupo rubra. x-signata e catharinae. As Hyla encontradas em regiões de montanha da Nova Guiné. como Hyla arfaquina. Hyla beckie e Hyla darlingtoni. apresentam $2n = 26$ cromossomos (Stephenson. 1970). As espécies de tamanho muito pequeno. como Hyla minuta. Hyla microps (Beçak. 1968; Bogart. 1973) apresentam $2n = 30$. e Hyla brunnea com $2n = 34$ (Cole. 1974).

Como consequência da variabilidade do gênero. Cochran (1955) e Lutz B. (1973). propuseram reunir as espécies do gênero Hyla em vários grupos naturais.

Cochran. na década de 50. propôs a divisão do gênero Hyla em 11 grupos (tabela II). Cada grupo foi caracterizado por afinidades e variações morfológicas. recebendo o nome da espécie que apresenta as principais características do grupo.

Tabela II

Subdivisões do gênero Hyla Laurenti segundo Cochran 1955

- I - Grupo venulosa (3 sp)
- II - Grupo faber (4 sp)
- III - Grupo albopunctata (7 sp)
- IV - Grupo minuta (9 sp)
- V - Grupo rubra (12 sp)
- VI - Grupo albomarginata (5 sp)
- VII - Grupo marmorata (2 sp)
- VIII - Grupo geographica (1 sp)
- IX - Grupo aurantiaca (2 sp)
- X - Grupo anceps (1 sp)
- XI - Grupo goeldii (1 sp)

Lutz, na década de 70. subdividiu os Hylidae, pertencentes ao gênero Hyla, em 6 grupos mais abrangentes, contendo um total de 19 subgrupos (Tabela III). Esta ampliação reestruturou, de modo mais acurado, as Hylas brasileiras, tornando-se obra de referência para estudos dos Hylidae pertencentes ao gênero Hyla.

Tabela III

Subdivisões do gênero Hyla Laurenti, segundo Lutz 1973.

- Grupo I - Espécies grandes:
 - 20 sp distribuídas em 5 subgrupos.
- Grupo II - Espécies de tamanho médio a pequeno:
 - 40 sp distribuídas em 5 subgrupos.
- Grupo III - Complexo Hyla rubra - Hyla x-signata
 - 20 sp distribuídas em 3 subgrupos.
- Grupo IV - Complexo Hyla catharinae:
 - 20 sp distribuídas em 3 subgrupos.
- Grupo V - Espécies muito pequenas:
 - 21 sp colocadas em 1 subgrupo.
- Grupo VI - Espécies marginais:
 - 3 sp distribuídas em 2 subgrupos

Resta mencionar entretanto que, nesta mesma época, Bogart (1970) analisando citogeneticamente exemplares dos 11 grupos propostos por Cochran, determinou a existência de dois conjuntos cromossomicamente bastante distintos: um com cariótipo contendo $2n = 24$ cromossomos e outro com $2n = 30$. Segundo o autor, estes estudos cromossômicos sugeriam a existência de dois gêneros de pererecas, sob a denominação de Hyla.

1.2.2 - Hyla fuscovaria A. Lutz, 1925.

Hyla fuscovaria **. descrita em 1925, seria objetivo de atenção quarenta anos depois por Vizotto (1967) e Rabello (1969). O trabalho realizado por Vizotto contribuiu para o conhecimento das fases do desenvolvimento e biologia dos anfibios Anuros da região Norte - Ocidental do Estado de São Paulo.

Rabello (1969), em seu estudo cromossômico de algumas espécies da família Hylidae, descreve o cariótipo da Hyla trachitorax, sinônimo júnior de Hyla fuscovaria, com $2n = 24$ cromossomos.

Hyla fuscovaria é encontrada predominantemente em áreas abertas e desmatadas. Os adultos mostram extrema tolerância ambiental, sendo encontrados em áreas de cerrados, campos encharcados ou irrigados e zonas de desmatamento. Não são encontrados em florestas, apresentando o hábito peculiar de entrar em contacto com habitações humanas (Lutz, B., 1973).

Fouquette e Delahoussaye (1977) analisando a morfologia dos espermatozoides da família Hylidae, propõem mudanças na nomenclatura do gênero Hyla pertencentes ao grupo rubra, para o gênero Ololygon Fitz. Cardoso e Sazima (1980) levantaram dúvidas nomenclaturais envolvendo o gênero Ololygon, sugerido por Fouquette e Delahoussaye, preferindo situá-lo como "nomina dubia". Cruz e Peixoto (1982) e outros autores brasileiros (Andrade & Cardoso, 1983; Cardoso & Haddad, 1982) não tem adotado a denominação Ololygon para espécies pertencentes ao gênero Hyla grupo rubra.

** Hyla fuscovaria A. Lutz. 1925.

Sinonímia: Hyla megapodia Miranda Ribeiro. (1937).

Hyla trachytorax L. Muller e Hellmich. (1936).

Hyla fuscovaria é o maior membro do setor

Hyla x-signata (Lutz. 1973). H. fuscovaria pertence ao complexo Hyla rubra - Hyla x-signata. apresentando como os componentes do complexo. pernas muito longas e padrão dorsal de coloração pardacenta. com caracteres formando desenhos em forma de W ou V. com aspectos reticulares e emaranhados (Lutz, 1925; Vizotto, 1967; Lutz. 1973). coloração amarelo citrino nos flancos e faces ventral das coxas e pernas. A coloração pardacenta dorsal expressa a sua denominação fuscovaria (Prancha I) .

1.2.3 - Espermatozoides dos anfíbios anuros

Os espermatozoides maduros formam normalmente um tipo celular alongado e especialmente modificado para locomoção ativa. Seu desenvolvimento e maturação realiza-se nos túbulos seminíferos dos testículos.

Os espermatozoides dos anuros apresentam uma capa acrossomal longa e afilada na região anterior. envolvendo a porção dianteira do núcleo. facilitando a penetração no óvulo. A cabeça do espermatozoide (núcleo) é lanceolada e contém no seu interior o lote haplóide de cromossomos. extremamente condensados. A peça intermediária representa a região rica em mitocôndrias. responsáveis pelo suprimento energético do espermatozoide. O filamento caudal é formado pela disposição circular de microfilamentos (microtubulos). cercados por uma pequena quantidade de citoplasma e envoltos pela membrana celular.

Os espermatozoides dos anfíbios anuros apresentam grande variabilidade morfológica na dependência da espécie analisada. Até a década de 30 acreditava-se que os espermatozoides dos urodelos apresentavam uniformidade morfológica (Noble, 1931).

Estudos posteriores indicaram considerável diversidade na estrutura dos espermatozoides dos urodelos (Brandon & col., 1974).

A morfologia dos espermatozoides de vários Hylidae, pertencentes ao gênero Hyla, foi analisada por Fouquette e Delahoussaye (1977). Os autores descrevem aspectos comuns quanto a estrutura dos espermatozoides de indivíduos pertencentes ao grupo Hyla rubra. Estes apresentam espermatozoides morfológicamente semelhantes ao da maioria dos anuros. A região anterior dos espermatozoides das espécies do grupo rubra se assemelha a de outros Hylidae. A diferença consiste na presença de dois filamentos caudais no grupo rubra, enquanto os outros Hylidae possuem apenas um filamento caudal. A presença de dois filamentos caudais sugere certo grau de primitividade, quando se compara com os espermatozoides possuidores de apenas um filamento caudal.

O conservadorismo das estruturas dos espermatozoides, e as diferenças morfológicas encontradas entre os componentes da família Hylidae foram utilizados pelos autores, como referência taxonômica para separar as espécies do grupo rubra, do gênero Hyla, criando um novo gênero denominado Ololygon (Fouquette & Delahoussaye, 1977). Contudo, a aceitação do gênero Ololygon para denominar as espécies de Hyla do grupo rubra, não é universal, e problemas de nomenclatura encontrados por Cardoso e Sazima (1980) levam-nos a questionar a validade de tal denominação.

1.3 - Citogenética dos Hylidae

Até a década de 70 acreditava-se que as diversas famílias e a maioria dos gêneros de Anuros tivessem cromossomos metacêntricos, e cariótipos similares e típicos (White, 1973). Esta suposição mostrou-se errônea com o acúmulo de informações sobre diversas espécies.

Os Anuros apresentam cromossomos grandes e excepcional diversidade no teor de DNA por núcleo, o que reflete a situação da Classe Amphibia (Vide tabela IV).

Tabela IV

Valores mínimos e máximos de DNA por núcleo em picograma
(pg / DNA / núcleo). segundo Goin & Goin (1968).

Tunicata (1) *	- 0.3
Agnata (1)	- 5
Chondrichthyes (2)	- 5.5 a 6.7
Osteichthyes :	
Actinopterygii (40)	- 0.9 a 6.1
Sarcopterygii (1)	- 100
Amphibia :	
Caudata (8)	- 20 a 168
Apoda (1)	- 7.4
Anura (44)	- 2.1 a 17
Reptilia (8)	- 2.8 a 5.3
Aves (8)	- 1.7 a 2.9
Mammalia:	
Marsupialia (3)	- 5 a 9.9
Placentalia (10)	- 5 a 7.1

* Os valores entre parênteses representam o número de espécies analisadas.

A Família Hylidae demonstra grande variação na quantidade de DNA por núcleo, apresentando variações de 3.01 ± 0.06 pg de DNA por núcleo em Hyla microps, ate 27.35 ± 0.22 pg/DNA/núcleo, em Phyllomedusa burmeisteri (Soma, 1981).

O alto teor de DNA e o grande tamanho dos cromossomos, associado com o desenvolvimento de técnicas de colquicinização e choque hipotônico, tornaram precisa a determinação do cariótipo da família. O número relativamente pequeno de cromossomos facilitou sua obtenção e análise, dando origem aos trabalhos pioneiros na área de citogenética, na classe Amphibia. Rabello (1969), em revisão bibliográfica, relata os desenvolvimentos técnicos e os principais precursores dos estudos citogenéticos sobre anuros.

São geralmente utilizados os seguintes elementos para caracterizar, descrever e comparar os cromossomos metafásicos:

- O número básico de cromossomos. A morfologia e a percentagem que cada par de homólogos tem, quando comparados com o comprimento total dos cromossomos.
- A presença de constricções secundárias e satélites; seu número, tamanho e posição nos cromossomos.
- Heterocromatina e Eucromatina, suas posições, quantidades e distribuição, demonstradas por técnicas de bandamento.
- Organizadores Nucleolares, posição, número e distribuição, demonstrados por técnicas de hibridização e bandamento.

As características cariotípicas apresentadas, mesmo não evidenciando o conteúdo gênico dos cromossomos, são de importância relevante quando se quer estabelecer comparações inter e intra específicas (White, 1973).

Nos Anuros tem-se acumulado informações nos últimos anos, principalmente com relação a sistemas citogenéticos (Schmid, 1978, 1980, 1981 e 1982; Beçak & Beçak, 1970, 1974; Beçak & col., 1967; Ruiz & Beçak, 1976; Ruiz & col., 1980, 1981), constituindo-se excelente material para estudos evolutivos (Beçak & Beçak, 1974; Morescalchi, 1968, 1977; Bogart, 1973; Bogart & Nelson, 1976).

Comparativamente, a citogenética dos Hylideos apresenta poucos trabalhos (Duellman, 1963, 1970; Schmid, 1978, 1982; Bogart, 1970, 1973; Rabello, 1970; Batistic & col., 1975).

1.3.1 - Estudos atuais de citogenética aplicados a análise cromossômica dos anfíbios

Os recentes avanços alcançados na citogenética contribuíram para o melhor conhecimento das interrelações taxonômicas nos vários grupos de animais e vegetais. Irataremos, a seguir, de alguns aspectos conceituais e avanços técnicos realizados em citogenética de anfíbios.

Além do propósito de revisão, esta parte insere o trabalho aqui elaborado, dentro do contexto das pesquisas em citogenética.

Os avanços na citogenética animal ocorreram principalmente a partir da década de 60, com o emprego de técnicas de coluicinizacão, hipotonizacão, esmagamento de fragmento de tecidos e cultura de células (Ohno & col., 1964; Beçak & col., 1966, 1967).

A evoluçao dos Eucariotos manifestou-se, de modo geral, por um aumento na quantidade de DNA (Britten & Davidson, 1968). As variaçoes na quantidade de DNA, representam diferentes graus de amplificacão dos genes do genoma. O aumento do conteúdo de DNA propicia diversidade e consequente evoluçao. Os fatores envolvidos nesta evoluçao estao relacionados com o mecanismo de mutaçoes cromossomicas, variaçoes numéricas e estruturais e duplicaçoes gênicas (Atchley, 1972; John, 1976).

Nos vertebrados, as duplicaçoes gênicas parecem ser um dos fatores que influenciaram no acréscimo do material genético (Ohno, 1970), contudo a importancia da poliploidia durante os estágios iniciais da evoluçao dos vertebrados e nos vertebrados inferiores, não deve ser desprezada (Ohno & col., 1968; Beçak & col., 1970). Entretanto a presençã de quantidades de DNA, maiores do que o mínimo da classe, não implica, necessariamente, em maior complexidade evolutiva para estas especies.

As duplicações de determinados genes, aliada ao aumento da quantidade de DNA, implicam, provavelmente, em vantagens a nível celular para a manutenção de funções essenciais. Além de superar problemas como os de mutações dos genes não essenciais, o DNA sobressalente pode dar proteção a outras sequências vitais de DNA, podendo mesmo formar barreiras de fertilidade, a nível de emparelhamento cromossômico, o que evitaria o aparecimento de indivíduos híbridos entre as espécies próximas, favorecendo a especiação (Hsu, 1975).

O DNA dos Eucariotos pode ser classificado segundo características de repetição de suas sequências de nucleotídeos. Sequências únicas, com apenas uma cópia no genoma haplóide, contêm os genes reponsáveis pela produção de RNA mensageiro (mRNA). Estas sequências de mRNA específicas, codificam proteínas, e teriam funções outras, ainda na forma de mRNA (Lewin, 1976). Outras sequências são caracterizadas por maior ou menor grau de repetição. Nestas classes de DNA encontramos genes para RNA ribossômico, que apresentam moderado grau de repetição, podendo ser denominados como um tipo especial de heterocromatina.

A relação entre genes de RNA ribossômico e heterocromatina é grande. Mesmo representando entidades distintas, pertencem à classe de DNA que apresentam certo grau de repetição. O estudo da heterocromatina e dos genes de RNA ribossômico por técnicas de banda C e banda RON, tem auxiliado, junto com outras análises citogenéticas tradicionais, a compreensão das interrelações cariotípicas, apresentadas por vários grupos animais (John, 1976; King, 1980; Schmid, 1978).

1.3.2 - Diferenças cromossômicas durante o desenvolvimento

São frequentes as observações quanto a diferenças de tamanho de cromossomos metafásicos, provenientes de tecidos diferentes. Estas observações parecem estar relacionadas mais com a ação de fixadores, nos vários tipos de tecidos, do que com variações intrínsecas (Jackson, 1971). A uniformidade ou atenuação destas variações pode ser conseguida com o emprego da mesma fixação, hidrólise e coloração para as preparações provenientes de um mesmo tecido, ou de tecidos variados, do mesmo animal. De fato, observações realizadas por Smith (1965), demonstram que diferenças de penetração do fixador podem afetar, junto com o tratamento pela colquicina, a simetria dos cromossomos metafásicos das espermatogônias.

Não há suficiente investigação quanto à constância morfológica dos cromossomos durante o desenvolvimento. Os dados apresentados são aparentemente contraditórios (Jackson, 1971 e Stambrook & Flickinger, 1970).

Estudos, tentando relacionar as variações na atividade do genoma durante a embriogênese foram realizados em cromossomos de cultura de células de blastocistos e fibroblastos de camundongos adultos (Burkholder & Commings, 1972), não tendo sido observadas diferenças nos padrões de Bandas G entre os cromossomos, nestes dois estágios de desenvolvimento.

Beçak e Beçak (1973), estudando cromossomos metafásicos de embriões de mamíferos, répteis e anfíbios recém-nascidos, encontraram, apesar das diferenças filogenéticas e do tipo de desenvolvimento, maior número de constrições nos cromossomos denominadas satélites, em número normalmente constante e que são relacionadas com as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) utilizadas na identificação de alguns pares cromossômicos. Estes organizadores nucleolares apresentam cistrons de DNA que codificam para RNA ribossômico. A importância destes genes na síntese proteica é fundamental, sendo que muitas vezes seu número é aumentado nos cromossomos por processo de amplificação gênica

(Breuer & Pavan, 1955; Miller, 1965), quando ocorre uma intensificação da síntese proteica.

Flickinger e col., (1966), com experimentos de hibridização de RNA-DNA, observaram variações nas populações de RNA que se hibridiza com DNA nos vários tecidos embrionários de Rana pipiens. Com estes estudos, os autores propuseram que as variações nas populações de mRNA representariam o funcionamento diferenciado dos genes, nos diversos tipos de células componentes dos tecidos.

Stambrook e Flickinger (1970), estudando os padrões de replicação do DNA em tecidos embrionários indiferenciados de Rana pipiens, observaram que células ectodérmicas de gástrula apresentavam marcação extensa nos cromossomos 1, 7 e 8, demonstrando que estes cromossomos, com exceção das regiões terminais, apresentavam replicação tardia do DNA. Em nêurulas (já determinadas para certos tipos celulares), os pares cromossômicos 1, 7 e 8, não apresentavam estas marcações generalizadas, indicando que o DNA não apresentava replicação tardia. Já nas regiões terminais dos cromossomos 1, 7 e 8, as nêurulas apresentavam DNA com replicação tardia.

Os padrões de replicação tardia do DNA em cromossomos humanos (Ganner & Evans, 1971) e na mosca Samoaia leonensis (Ellison & Barr, 1972), geralmente refletem padrões de fluorescência e de banda G. Estas regiões, de replicação tardia do DNA, estão associadas com o estado heterocromático (Lyon, 1968), entretanto, a inatividade transcripcional destas regiões não é permanente, o que aliás foi demonstrado também por Stambrook e Flickinger (1970).

A dificuldade de obtenção de banda G em cromossomos metafásicos de anfíbios (Schmid, 1978) torna difícil a comparação dos padrões de replicação tardia do DNA de Rana pipiens com a técnica de banda G. Esta técnica mostra o estado estrutural ou morfológico do DNA que forma a heterocromatina, e não o estado funcional dos genes presentes nas regiões. A atividade ou não destes genes é melhor demonstrada, pela técnica de análise da replicação (tardia) do DNA, com isótopos radioativos.

I.3.1 - Genes codificadores de RNA ribossômicos

Estes genes caracterizam-se pelo grau de repetição de suas bases de nucleotídeos, e pela variação no número de cópias de cada gene no genoma. Estes genes, em número normalmente superior a uma centena, são agrupados em determinada região cromossômica, conhecida como Região Organizadora do Nucléolo (RON), por estarem geralmente associadas com o nucléolo, e codificarem as moléculas precursoras do RNA ribossômico (rRNA).

Os genes codificadores de RNA ribossômicos apresentam marcante conservadorismo. As sequências destes genes, até agora estudadas, parecem ser quase idênticas na maioria dos diferentes grupos animais. Este fato parece indicar o envolvimento de algum mecanismo celular para evitar mutações ou refletir a inviabilidade do indivíduo, quando ocorrem alterações destes grupamentos. Em núcleos interfásicos, a presença e o número de nucléolos, revela o número provável de aglomerados de genes ribossômicos (Anastossova - Kristeva, 1977). As constrições secundárias, por estarem geralmente associadas aos nucléolos, são descritas como Regiões Organizadoras Nucleolares e estão presentes, normalmente, em cada um dos cromossomos homólogos que os carrega.

O fato das constrições secundárias serem facilmente observadas ao microscópio óptico e de estarem relacionadas com a organização nucleolar, possibilitou o avanço da análise citogenética (Ohno & col., 1967), apesar de que muitas delas não apresentam evidências de formação de nucléolo (Gall & Pardue, 1969).

I.3.3.1 - Técnicas demonstrativas dos genes codificadores de RNA ribossômico

As sequências repetidas de DNA podem ser demonstradas de várias maneiras. Pode-se, por técnica bioquímica, proceder a desnaturação e sedimentação do DNA em gradiente de densidade de CsCl, possibilitando a separação do DNA em frações leves e pesadas, dependendo da proporção de pirimidinas e purinas presentes no DNA.

Pode-se, citologicamente, fazer a demonstração da localização das RONS em preparação de lâminas por técnicas de Hibridização "in situ" entre o DNA da preparação com rRNA ou rDNA marcados radioativamente. Nesta técnica adaptada por John e col. (1969) e Gall e Pardue (1969), a partir da técnica de hibridização "in filtro" de Ritossa e Spiegelman (1965), o DNA da preparação citológica apresenta-se organizado e com sua estrutura inalterada. Esta técnica denominada hibridização "in situ", consiste resumidamente, em desnaturar o DNA da preparação com soluções básicas ou por calor. O DNA com este tratamento passa de fita dupla à fita simples. A seguir, as preparações são incubadas com rRNA ou rDNA marcados com precursores radioativos. Com a diminuição lenta de temperatura, o rDNA ou rRNA radioativo reassocia-se com as regiões complementares do DNA, formando novamente fita dupla de rRNA ou rDNA marcados, com o rDNA da preparação. As preparações são recobertas com emulsão fotográfica e posteriormente reveladas.

Outras técnicas foram desenvolvidas para visualização das RONS, utilizando Nitrato de Prata, evidenciando os produtos da atividade das RONS com o emprego da impregnação argêntica.

A impregnação argêntica realiza-se pela deposição de prata em várias estruturas celulares. É uma técnica conhecida, contudo, a sua utilização para visualização das RONS foi desenvolvida por Goodpasture e Bloom (1975), que empregaram Nitrato de Prata Amoniacal, luz ou calor para acelerar a reação e solução de Formaldeído, para fixação do complexo proteína-prata das estruturas, presentes nos cromossomos. Esta técnica foi aperfeiçoada por Bloom e Goodpasture (1976) e simplificada por Howell (1977). A impregnação pela prata se dá principalmente nas proteínas nucleolares ácidas (Goodpasture & Bloom, 1975; Taylor & Martin-DeLeon, 1980), delimitando de forma rápida e exata as RONS que estiveram ativas no ciclo celular precedente.

Matsui e Sasaki (1973) desenvolveram outra técnica para coloração diferencial dos organizadores nucleolares. Esta foi denominada banda N, e emprega extração ácida do DNA, RNA e histonas, como pré-tratamento. Após a extração ácida, as preparações são coradas com Giemsa. Funaki e col. (1975) modificaram-na, utilizando fosfato monobásico de sódio, em substituição ao ácido tricloroacético e ácido clorídrico, para extração dos ácidos nucleicos e histonas, resultando em melhor preservação dos cromossomos. A técnica de banda N determina a localização dos cistrons ribossômicos, abrangendo os genes de RNA 18S, 28S e 5S.

Taylor e Martin-DeLeon (1980), comparando a sensibilidade da técnica de banda N com Giemsa e da banda RON com nitrato de prata, demonstraram a sensibilidade reduzida na localização das RONS, com a técnica de banda N.

A análise através da Microscopia Eletrônica mostra que a substância impregnada pela prata está localizada por fora da RON ou à sua volta, mas não no próprio cromossomo. A técnica não demonstra o rRNA nem o rDNA, mas sim o material protéico produzido, fruto específico da atividade da RON. O material impregnado pela prata (Ag-positivo) está presente em maior quantidade nos núcleos metafásicos ou anafásicos da mitose. No final da telófase, o material volta a crescer em quantidade. As metáfases I e II meióticas são Ag-negativas, sendo que as RONS são positivas somente até o paquíteno, indicando que o material acumulado ao redor da RON ativa, é uma proteína ribonuclêica, que durante a mitose permanece na RON. Na vigência da meiose a proteína ribonuclêica é removida antes da diacinese (Schwarzscher & col., 1978).

1.3.4 - Heterocromatina

O núcleo interfásico apresenta grande parte do seu material genético descondensado e disperso em forma de fibras emaranhadas compostas de longas cadeias polinucleotídicas associadas a proteínas, denominada cromatina. Os cromossomos, nesta fase, não apresentam sua forma peculiar e começam a se condensar somente quando se preparam para a divisão celular. A individualização dos fios de cromatina, que compõem os cromossomos, é gradual e alcança o máximo de condensação, durante a metáfase. A descondensação do material genético começa logo após a telófase, voltando a cromatina a apresentar-se dispersa, como no núcleo interfásico.

Durante o ciclo celular a cromatina, que sofre contínuos processos de condensação e descondensação, é denominada eucromatina. As regiões cromossômicas que permanecem condensadas durante a interfase, descondensando tardiamente para replicação do DNA no ciclo celular, são denominadas heterocromatina.

A heterocromatina foi primeiramente observada e analisada por Heitz (1928, 1932 e 1933) e apresenta-se como região nuclear que exhibe cromatina condensada, durante a interfase, demonstrando nesta fase a capacidade de corar-se densamente, com corantes básicos.

A heterocromatina está presente nos cromossomos de todos os organismos, até agora analisados (Brown, 1966. Britten & Kohne, 1968) e é classificada em heterocromatina facultativa e heterocromatina constitutiva.

1.3.4.1 - Heterocromatina facultativa

A heterocromatina facultativa é aquela que ocorre em apenas um dos cromossomos homólogos e não no outro, tornando-o total ou parcialmente heterocromático. A heterocromatina facultativa desempenha função característica, inativando completamente os genes presentes nas regiões sob sua ação. Este tipo especial de heterocromatina representa mais um estado funcional ou fisiológico do cromossomo do que da entidade morfológica permanente, e está presente em circunstâncias específicas, não aparecendo em todas as fases do processo de desenvolvimento celular (Brown, 1966; Lyon, 1961, 1962, 1968 e 1974).

Um exemplo bem estudado de inativação cromossômica ocorre com o cromossomo X de fêmeas de mamíferos, que permanece condensado durante a interfase, em estado heterocromático, formando a cromatina sexual ou corpúsculo de Barr (Lewin, 1976). Enquanto isso, o outro cromossomo X é ativo e permanece eucromático.

A inativação do cromossomo X humano começa por volta do 16 dia de embriogênese. Anteriormente a este período os cromossomos X são eucromáticos e a inativação de um destes cromossomos ocorre ao acaso (Migeon & col., 1968). Na vigência da ovogênese, novamente os cromossomos X apresentam-se eucromáticos, confirmando que o estado não é permanente (Ohno & col., 1961).

O estado heterocromático de um dos cromossomos X assegura que as fêmeas (XX) e os machos (XY) tenham o mesmo número de genes funcionando no genoma. A inativação de um dos cromossomos X representa uma compensação de dosagem dentro das células dos mamíferos, balanceando, assim, a quantidade de genes funcionantes pelo heteromorfismo cromossômico.

Outro caso digno de nota de heterocromatização ocorre em machos do pulgão Planococcus citri, onde todo o lote cromossômico paterno se torna heterocromático nas primeiras fases do desenvolvimento. Entretanto, em alguns tecidos este estado é ainda reversível (Brown & Nur, 1964).

1.3.4.2 - Heterocromatina constitutiva

A heterocromatina constitutiva ocorre em região determinada dos dois cromossomos homólogos e não é transcrita em RNA com função conhecida (Flamm, 1969, 1972; Frenster, 1965; Sieger & col., 1970), e normalmente apresenta replicação tardia do DNA (Lee & Yunis, 1970, 1971). As regiões heterocromáticas constitutivas apresentam DNA altamente repetido, formando um tipo específico de cromatina (Yasmineh & Yunis, 1969, 1970, 1971; Arrighi & Hsu, 1970; Yunis & col., 1971).

1.3.4.2.1 - Evolução nas técnicas de visualização da heterocromatina constitutiva.

A constituição química das regiões heterocromáticas permaneceu desconhecida, até a década de 60. Foi o desenvolvimento das técnicas de ultra-centrifugação em gradiente de densidade de CsCl, que tornaram possíveis os primeiros estudos bioquímicos do DNA. Quando o DNA total é submetido à ultra-centrifugação em CsCl neutro, esse fraciona-se em componentes com densidade diferente do pico principal, sendo este denominado DNA satélite.

Estudos bioquímicos de DNA satélite isolado, realizados por Walker & McClaren (1965), demonstraram que os fios complementares do DNA satélite de camundongos reassociavam-se rapidamente após denaturação por calor, sugerindo que o DNA satélite seria constituído de sequências polinucleotídicas curtas e repetidas. A relação entre taxa de reassociação e a repetição encontrada, foi examinada por Britten & Kohne (1968), em vários organismos. Os autores determinaram neste trabalho, que o DNA satélite pode representar de 20 a 80% do genoma, podendo estar dividido em duas classes: uma, de sequências alternadas altamente repetidas (até 1 milhão de vezes), denominada de DNA satélite, e da qual faz parte, por exemplo, a heterocromatina centromérica. E outra classe, de sequências de repetição moderada (de 100 a 100.000 vezes), representada, por exemplo, pelas sequências de rDNA presentes nas RONS.

Em 1967, Gall e Pardue desenvolveram o método que possibilitou a localização das sequências nucleotídicas específicas, através da hibridização "in situ" do DNA da preparação, com o DNA ou RNA radioativo, que permitia sua detecção por auto-radiografia. Este avanço tornou possível a determinação da distribuição das sequências nucleotídicas altamente repetidas no genoma. Posteriormente, estas auto-radiografias, coradas com Giemsa, determinavam zonas mais coradas na região centromérica, as quais eram coincidentes com a localização dos grãos de auto-radiografia, que representavam regiões de DNA satélite. Modificações na técnica de hibridização "in situ", omitindo-se os passos da hibridização com o ácido nucléico radioativo, assim como da auto-radiografia, determinaram após hidrólise e coloração com Giemsa, a existência das chamadas bandas C, nas regiões cromossômicas, onde se localizava o DNA satélite (Gall & Pardue, 1970).

Modificações, alterando ou omitindo diversos passos da técnica original, foram colocados em prática por Arrighi e Hsu (1971). Sumner (1972) realizou importante alteração no método, utilizando hidróxido de bário para hidrólise, em substituição ao hidróxido de sódio, utilizado na técnica original, permitindo melhor preservação da estrutura cromossômica.

Comings e col. (1973) sugeriram que a banda C fosse resultado da resistência relativamente maior das regiões centroméricas ao rompimento causado tanto pela retirada do DNA, como pela extração proteica ou degradação das proteínas.

O fato dos centrômeros corarem-se geralmente mais intensamente pelo Giemsa do que os telômeros, e de algumas bandas intersticiais também se evidenciarem mais que outras, sugere que a heterocromatina seja uma entidade qualitativamente heterogênea. O argumento de que isto representa apenas variações quantitativas locais, parece ser descartado pela demonstração destas bandas por Schmid (1978). O autor, determinando diversos tipos de DNA satélite, localizados em posições distintas no cariótipo, veio reforçar a hipótese da heterogeneidade qualitativa constitucional da heterocromatina.

O autor, utilizando de técnicas de banda C e banda Q para análise de cromossomos de anfíbios anuros, determinou 3 classes de heterocromatina constitutiva, na dependência do tipo de fluorescência com a quinacrina, e o aparecimento ou não da banda C. Os tipos de heterocromatina constitutiva dos cromossomos, seriam os seguintes: banda C - positiva e fluorescência forte; banda C - positiva e fluorescência mais fraca do que a apresentada pela eucromatina; e banda C - fraca sem fluorescência presente nas regiões teloméricas. Estes fatos, vem reforçar a hipótese de heterogeneidade qualitativa constitucional da heterocromatina.

O avanço nos estudos evolutivos e filogenéticos em vários organismos, observados na década de 70, ocorreu principalmente, graças a localização destas regiões de heterocromatina constitutiva (banda C) e outros tipos de DNA (banda Q, G, R). As técnicas de bandamento cromossômico, além de facilitarem a identificação dos cromossomos homólogos do cariótipo, permitiram um grande desenvolvimento na área de citogenética por intermédio do emprego de técnicas de hibridização "in situ" de trações cada vez mais elaboradas de ácidos nucleicos. Demonstrou-se por exemplo a localização dos cistrons produtores das histonas, através da hibridização "in situ" com o seu mRNA (Pardue & Birnstiel, 1972; Gall & col., 1981).

I.3.4.2.2 - Distribuição da heterocromatina constitutiva em vários grupos

A distribuição da heterocromatina constitutiva evidenciada pela técnica da banda C, mostra que na maioria dos animais e vegetais estudados, as regiões centroméricas, bem como em menor intensidade as regiões teloméricas, são ricas em heterocromatina constitutiva. As regiões intermediárias dos cromossomos podem também apresentar heterocromatina constitutiva, recebendo o nome de banda C intercalar ou intersticial (Arrighi & Hsu, 1971).

A presença de sequências de DNA satélite e outros DNAs altamente repetidos, tem sido demonstrada como tendo ocorrência geral, pela técnica de banda C (John & Miklos, 1979).

O método de banda C não representa contudo, um mecanismo simples de coloração (Comings & col., 1973, 1977; Comings, 1978), pois no processamento desta técnica, realiza-se a remoção diferencial do DNA cromossômico. As regiões heterocromáticas apresentam maior resistência a esta remoção, possivelmente por apresentarem forças de interação DNA-proteínas nucleares diferentes das interações entre o restante do DNA e proteínas. Outros fatores, que possivelmente influenciariam nesta coloração diferencial, seriam a existência de uma compactação desigual de determinadas regiões do DNA ou uma taxa de renaturação mais rápida do que as encontradas nas regiões eucromáticas.

É preciso registrar que a banda C pode ocorrer em regiões cromossômicas que não possuem DNA satélite ou DNA altamente repetido, como no cromossomo Y de Drosophila hydei ou nos cromossomos sexuais do hamster Cricetulus griesus (Henning, 1973).

Os mecanismos envolvidos no processo de banda C, relacionando os aspectos moleculares com a estrutura cromossômica, ainda não estão completamente esclarecidos. Contudo, ampla distribuição da heterocromatina constitutiva tem sido observada em diversos grupos. Citamos alguns exemplos, onde a distribuição de banda C tem sido extensivamente estudada: em insetos, como dípteros (Ullerich, 1976; Hsu, 1971), ortópteros (King & John, 1980, 1982; Drets & Stall, 1974; Santos & Giraldez, 1982; John & King, 1977, 1982), e em mamíferos roedores (Baverstock & col., 1982; Patton & Scherwood, 1982; Pathak & col., 1973; Patton, 1977).

I.3.4.2.3 Distribuição da heterocromatina constitutiva nos anfíbios

Esta distribuição tem sido analisada em vários componentes do grupo. Na salamandra Plethodon cinereus, a localização da heterocromatina constitutiva, na maioria dos cromossomos, está restrita às regiões centroméricas (Mcgregor & Kezer, 1971; Mcgregor & col., 1973); o mesmo não acontece com outra espécie, o Triturus cristatus carnifex, cuja heterocromatina constitutiva localiza-se nas regiões centroméricas e também ao longo dos homólogos (Mcgregor, 1979). Em outras espécies de Triturus, Triturus alpestris e Triturus vulgaris, foi observado além do padrão de heterocromatina constitutiva centromérica e intercalar, heterocromatina constitutiva determinando heteromorfismo de um par de cromossomos homólogos, relacionados com a determinação sexual (Schmid, 1979).

Parece ser norma entre os anfíbios que a banda C, mesmo variando de posição nos cromossomos, de acordo com a espécie analisada, apresente distribuição centromérica, telomérica e intersticial. Esta variabilidade atinge mesmo espécies crípticas, pois em Odontophrynus americanus 2n e 4n de São Paulo, Ruiz e Beçak (1976) determinaram padrões de banda C diferenciados. Em O. americanus, a banda C presente nos centrômeros e telômeros, diferenciava-se na espécie diplóide por apresentar banda C na constrição secundária do cromossomo 4, enquanto na espécie tetraplóide esta banda aparecia no cromossomo 11.

Schmid (1978, 1980, 1982) realizou extenso levantamento sobre bandamento em anfíbios anuros, determinando o padrão de banda C nas famílias Pipidae (2 espécies), Discoglossidae (1 sp), Pelobatidae (3 sp), Phrynomeridae (1 sp), Dendrobatidae (1 sp), Rhacophoridae (3 sp), Atelobatidae (1 sp), Microhylidae (1 sp), Hylidae (5 sp), Ranidae (10 sp) e Bufonidae (19 sp). Do total de 48 espécies analisadas, a maioria dos cromossomos também apresentou heterocromatina constitutiva centromérica, telomérica e intersticial.

Além das técnicas de banda C e banda RON, Schmid estudou o padrão de fluorescência com quinacrina (banda Q), determinado assim as regiões cromossômicas ricas em nucleotídeos AT (Adenina-Timina), classificando a heterocromatina em 3 tipos:

- 1 - Regiões de banda C e banda Q positivas (C+ e Q+)
- 2 - Regiões de banda C positiva e banda Q negativa (C+ e Q-)
- 3 - Regiões de banda C e banda Q negativas (C- e Q-)

Schmid (1980), utilizando fluorocromos específicos para nucleotídeos G (Guanina), como os antibióticos mitracina e cromomicina A3, demonstrou heterocromatina constitutiva do tipo C+Q- e C-Q-, bem como RONS ricas em GC (Guanina-Citosina). Propondo a existência de um 4 tipo de heterocromatina C+ Q-, mas negativo para os fluorocromos, sendo possível que neste caso as sequências AT e GC estejam dispersas no cromossomo, não determinando fluorescência diferencial. Em todas as espécies analisadas pelo autor, as RONS são ricas em GC, assim como as regiões centroméricas.

I.3.4.2.4 - Funções da heterocromatina

A função exercida pela heterocromatina constitutiva permanece difícil de se entender e várias propostas tem sido aventadas, reconhecendo o carácter estrutural regulatório ou evolutivo, não sendo contudo, mutuamente exclusivos. A heterocromatina constitutiva está presente ao redor de áreas vitais dos cromossomos, tais como centrômeros e constrições secundárias, diminuindo assim a frequência de "crossing-over" em cistrons de DNA ribossômico durante a meiose e também absorvendo primariamente os efeitos de agentes mutagênicos. Esta heterocromatina constitutiva poderia ainda facilitar o alinhamento inicial dos cromossomos, antes da ocorrência da sinapse, possibilitando a fixação de rearranjos cromossômicos importantes na especiação, constituindo barreiras contra a formação de híbridos. A heterocromatina constitutiva poderia ainda servir para dividir o genoma em porções funcionais, como é observado no nucléolo, centrômero e em pontos de iniciação para replicação do DNA (Yunis & Yasmineh, 1971).

M - Materiais e Metodos

M.1 - Hyla fuscovaria: coleta, manutenção e fases do desenvolvimento

Foram empregados, no estudo, espécimens adultos, larvas, girinos e ovos de Hyla fuscovaria. O número de animais empregados foi diverso para cada item do estudo. Os valores serão explicados nas respectivas descrições abaixo. Os exemplares adultos, coletados nas proximidades do campus da Cidade Universitaria de Campinas (UNICAMP), foram identificados por I. Sazima e A. Cardoso, do Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Para classificação taxonômica dos espécimens analisados, utilizaram-se os caracteres definidos por Nicholls (1916); Miranda Ribeiro (1926) e Noble (1931). O reconhecimento do gênero e espécie foi determinado segundo os caracteres descritos por Lutz, A. (1925), Cochran (1955) e Lutz, B. (1973).

Procederam-se duas coletas anuais, durante os períodos reprodutivos (Setembro-Março), nos anos de 1979 a 1982. Desde que não se verificassem variações dignas de nota nos exemplares coletados ao longo do estudo, devolvia-se, aos locais de origem, metade da amostra, conservando-se os demais aprisionados.

Os espécimens adultos foram mantidos no laboratório em terrários úmidos e alimentados várias vezes por semana, com moscas e grilos. Os girinos e porções de desovas, provenientes de coletas diurnas, foram mantidos em aquários e caixas d'água de cimento amianto, aerados constantemente. Estas coletas também foram realizadas duas vezes por ano durante o mesmo período acima.

As desovas coletadas foram cuidadosamente separadas, realizando-se a contagem do número de ovos. Parte destes ovos foram fixados em formol 10%, para posterior estudo morfométrico.

A distinção entre ovos fecundados e não fecundados era também facilitada pela maior embebição que sofrem as camadas gelatinosas superficiais dos primeiros (Prancha II). Esta camada mais externa de gelatina fixava os ovos à vegetação. A gelatina aderida com facilidade numerosos fragmentos e restos de vegetais presentes na água. A localização dos ovos ocorreu, principalmente, nas raízes e folhas submersas de Eichhornia crassipes (Aguape) e Salvina sp.

Amostras para análise citológica e biológica foram retiradas à medida que os animais se desenvolviam. Devido ao problema de não se poder reconhecer a espécie apenas através da desova e dos primeiros estágios larvais, vários exemplares de cada lote de girinos e desovas foram mantidos vivos até completarem a metamorfose, confirmando, deste modo, a espécie estudada. A alimentação dos girinos constituiu-se basicamente de folhas de alface e de elodia, sendo suplementada frequentemente com ração comercial para peixes.

M.2 - Descrição dos padrões de manchas

Para análise dos padrões de manchas dorsais em Hyla fuscovaria, 30 animais (metade machos e metade fêmeas) foram colocados em dois tipos de ambientes. Um dos ambientes foi iluminado com luz fluorescente, e o animal aí colocado sobre uma folha úmida de papel de filtro branca. O outro ambiente foi criado, utilizando-se uma caixa de papelão vedada à luz e umedecida como no caso anterior. Os mesmos animais analisados quanto ao padrão de manchas escuras e pontos brancos dorsais permaneceram cerca de 30 minutos em cada um destes ambientes. O sexo dos animais foi determinado após sacrifício, e os órgãos de interesse para estudos citológicos foram retirados, sendo o animal fixado em formol 10%.

M.3 - Método de obtenção dos espermatozoides de Hyla fuscovaria

Cinco machos adultos de Hyla fuscovaria, coletados em abrigos diurnos durante a estação reprodutiva (Setembro - Março), foram euterizados e abertos longitudinalmente. Procedeu-se a retirada dos testículos. Os espermatozoides foram obtidos dilacerando-se delicadamente, com o auxílio de pinça fina e bisturi, a cápsula que reveste os túbulos seminíferos.

Os espermatozoides liberados após a maceração dos testículos, foram diluídos em solução Hank * para anfíbios a 10% em água destilada. Os espermatozoides permaneceram na solução cerca de 15 minutos, até completarem sua ativação. Em seguida, uma gota da solução contendo os espermatozoides foi colocada sobre lâmina e recoberta com lamínula. Procedeu-se uma primeira análise, determinando a concentração, estágio de maturação e mobilidade dos espermatozoides.

A imobilização dos espermatozoides para fotografia do material ainda vivo, foi conseguida adicionando-se algumas gotas de solução ** de gelatina 4% (Merck), a 25°C, sobre a lâmina. Esta gelatina foi espalhada sobre a lâmina, e uma gota de solução contendo os espermatozoides, foi colocada sobre a gelatina, recobrindo-se o material com lamínula. A lâmina foi resfriada a 4°C cerca de 2 minutos para endurecimento da gelatina e imobilização completa dos espermatozoides.

Parte dos espermatozoides em solução Hank 10%, foi fixada adicionando-se igual volume de solução Formol 10% em tampão fosfato.

O material foi analisado e fotografado em Fotomicroscópio Zeiss de Contraste de Fase, não sendo realizada coloração diferencial para estruturas componentes dos espermatozoides.

As medidas do comprimento da região anterior e cauda dos espermatozoides foram realizadas em 10 ampliações fotográficas, escolhidas ao acaso, de cada um dos 3 indivíduos analisados.

* Solução de Hank (vide Humanson, 1972, pag.534)

** Entenda-se por solução aquosa em água destilada todas as menções de solução empregadas no texto, exceto quando houver indicação em contrário.

M.4 - Preparações citológicas para obtenção de cromossomos de adultos e girinos

A obtenção de cromossomos mitóticos e meióticos foi realizada, utilizando-se técnicas de esmagamento de fragmentos de tecido (Ohno e col., 1964) e de espalhamento de monocamadas celulares (Baimai, 1977).

Para análise citológica, 20 espécimens adultos foram injetados com solução Colquicina 1% (Serva - Feinbiochemica) na dosagem de 0,02 ml por grama de peso animal, cerca de 2 horas antes de serem sacrificados. Este tratamento foi suficiente para impedir a formação dos fusos mitóticos, resultando em aumento do número de células em metáfase. Para análise morfométrica foram aproveitados 9 indivíduos, selecionando-se 5 metáfases para cada um deles.

Após tratamento por colquicina e sob narcose por éter, os animais eram abertos longitudinalmente e fragmentos do intestino, estômago, fígado, baço e testículos eram retirados. Estes fragmentos eram submetidos à ação hipotônica da água destilada gelada, por 20 minutos. Seguia-se a fixação em Carnoy (6: 3: 1) * por 15 minutos. Depois de fixado, o material era transferido para a solução ácido acético 50%, por mais 15 minutos. Após este tratamento, os fragmentos eram transferidos para lâmina e esmagados com um bastão de vidro. Retirados os excessos, cobria-se o material com lamínula e continuava o processo de esmagamento pressionando-se a lamínula.

Após o resfriamento da preparação em Nitrogênio líquido, retirava-se a lamínula com o auxílio de uma lâmina de barbear, e deixava-se a lâmina secar à temperatura ambiente.

Quarenta girinos (estágio 23 - Taylor & Kollros, 1946) foram mergulhados em solução Colquicina 0,25%, cerca de 3 horas, sendo utilizados fragmentos de cauda, intestino, fígado e cabeça. Na preparação deste material procedeu-se do mesmo modo acima descrito. Para análise morfométrica foram aproveitados 11 indivíduos, selecionando-se 5 metáfases de cada um destes.

Outra técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos para análise de tecidos de anfíbios, empregada por Baimai (1977) para estudo de cromossomos de Drosophila, foi ligeiramente modificada. Consiste em administrar colquicina 1%, proceder o tratamento hipotônico dos fragmentos de tecidos com água destilada gelada 20 minutos, após o que efetua-se a fixação dos fragmentos em Carnoy, por 15 minutos. Depois da fixação, o material é transferido para solução de ácido acético 50%, por 15 minutos. Ainda dentro da solução, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, dissocia-se o fragmento de tecido, agitando-se com cuidado até obtenção de uma suspensão celular. Para obtenção de uma monocamada de células espalhadas, colocam-se algumas gotas da suspensão celular sobre uma lâmina limpa, previamente aquecida em bico de Bunsen ou placa aquecida a 50°C. É aconselhável retirar com a pipeta Pasteur a maior parte de líquido gotejado sobre a lâmina deixando-a secar ao ar. Esta técnica permite melhor espalhamento das células. e a visualização dos cromossomos metafásicos é superior em qualidade, sendo a técnica utilizada, principalmente, para bandamento cromossômico. A técnica tem o inconveniente de necessitar de grande número de células em divisão, bloqueadas pela colquicina, para serem observadas na lâmina já preparada.

* Fixador de Carnoy (6:3:1) 6 partes de álcool etílico, 3 de Clorofórmio e 1 de ácido acético (Humason 1972 pag. 18).

M.5 - Cariotipagem e análise morfométrica dos cromossomos de adultos e de girinos

Para estes estudos utilizou-se principalmente a técnica de esmagamento. Fragmentos de fígado, baço, intestino e estômago dos adultos e de cauda, fígado, intestino e cabeça de girinos foram esmagados junto com uma gota de corante orceína lacto-acética**, sendo as lâminas seladas com esmalte de unha para posterior análise. Outras preparações não coradas com Orceína após o esmagamento, foram tratadas com ácido clorídrico 1N por 10 minutos a 60 C. A reação foi bloqueada com água destilada gelada e após lavagem em água corrente foram coradas em Giemsa***, diluído a 2% em tampão fosfato (Sörensen) ****, pH 6.8, por 7 minutos. Depois de secagem ao ar, as lâminas foram montadas em resina sintética (Permout).

As preparações foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Zeiss, empregando-se objetiva de imersão 100X, utilizando-se filme Agfa Copex Pan (100 ASA) para as fotografias.

O estudo do cariótipo foi realizado por intermédio do emparelhamento dos homólogos, que foram recortados e dispostos em ordem decrescente de tamanho. Para a análise morfométrica, as medidas foram realizadas em fotografias ampliadas utilizando-se 5 metáfases de cada indivíduo. Metáfases meióticas (MI e MII) foram fotografadas para determinação do número haplóide de cromossomos da espécie.

A classificação dos cromossomos em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e acrocêntricos (a) seguiu a convenção adotada por Beçak, M. L. (1967). Esta classificação é determinada pela Relação de Braços (RB), que é a razão do comprimento dos braços maiores do cromossomo pelos braços menores, sendo também utilizado o Índice Centromérico (IC), determinado pela razão do comprimento do braço menor pelo comprimento total do cromossomo.

Segundo a autora, estabeleceu-se a classificação dos cromossomos seguindo-se as relações descritas na tabela V abaixo citada:

Tabela V

Classificação dos cromossomos utilizando a Relação dos Braços (RB) e o Índice Centromérico (IC).

$RB \leq 1,5$	e	$IC \geq 0,4$	:	Cromossomos Metacêntricos
$4 \geq RB \geq 1,5$	e	$0,4 \geq IC \geq 0,2$	:	Cromossomos Submetacêntricos
$RB \geq 4$	e	$IC \leq 0,2$	:	Cromossomos Acrocêntricos

** Orceína Lacto Acética (vide Humason, 1972, pag.466)

*** Giemsa - 1g de Giemsa em pó (Merck) 54 ml de Glicerina e 84 ml de Metanol.

**** Tampão Fosfato Sorensen (vide Humason, 1972, pag. 543).

M.6 - Técnica de Banda C

De vários indivíduos adultos e girinos foram selecionadas 15 metáfases de tecidos de adultos e 15 metáfases de tecidos de girinos, para o estudo da banda C.

Empregou-se a técnica de Sumner (1972), levemente modificada, para evidenciar a heterocromatina constitutiva associada a banda C. Esta consiste em:

- Incubação em HCl 0,2 N, a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Lavar em água desionizada, a temperatura ambiente.
- Incubação em hidróxido de bário 5% a 50°C por 5 a 10 minutos (Esta solução saturada é preparada e usada no mesmo dia).
- Lavagem rápida em HCl 0,2 N a temperatura ambiente.
- Lavagem rápida em água desionizada à temperatura ambiente.
- Incubação em 2x SSC* por 2 horas à temperatura de 65 C.
- Lavagem em água desionizada a temperatura ambiente.
- Coloração em Giemsa 2% recém diluída em tampão fosfato (Sorensen) pH 6,8, por 2 horas e meia, a temperatura ambiente.
- Secagem ao ar e montagem em resina sintética (Permount).

* 2X SSC - "Solução Salina-Citrato": Cloreto de Sódio 0,3 M + Citrato Trissódico 0,03 M.

M.7 - Núcleos interfásicos e metafásicos analisados com o emprego da técnica de Banda RON

De vários indivíduos adultos e girinos foram selecionados os mesmos tecidos já anteriormente citados e destes escolhidas 15 metáfases.

Foram observadas preparações de baço, testículo, fígado e intestino de animais adultos e fígado, intestino e cauda de girinos. Após a realização da técnica demonstrativa de banda RON (descrição abaixo) núcleos interfásicos foram analisados, quanto ao volume total, volume nucleolar e número de nucléolos; número e posição da banda RON.

As regiões organizadoras nucleolares foram evidenciadas pela técnica de Howell e Black (1980), empregada sem modificações e preparada a partir das soluções:

Solução A - Solução coloidal reveladora: 1g de gelatina (Merck) dissolvida em 50 ml de água desionizada, acrescida de 0,5 ml de ácido fórmico.

Solução B - Solução de nitrato de prata: 1g de AgNO_3 dissolvido em 2 ml de água deionizada.

Pingar diretamente sobre a preparação 1 gota de solução A e duas gotas de solução B, misturar, cobrir com lamínula e levar para estufa a 65°C. Deixar até a mistura tornar-se marrom-dourada (cerca de 5 a 7 minutos). Lavar a lâmina com jato de água desionizada, com a ajuda de uma pisseta, retirando-se assim a lamínula e os reagentes. Secar ao ar e montar em resina sintética (utilizaram-se luvas de borracha para o trabalho com o nitrato de prata).

As lâminas foram analisadas, e as metafases fotografadas no mesmo dia, uma vez que a impregnação pela prata pode tornar-se insatisfatória após certo tempo.

Foram utilizados tecidos provenientes da cauda, fígado e intestino para os girinos e de fígado e intestino para os adultos. Os tecidos foram preparados utilizando-se a técnica já descrita de obtenção de material para preparações citológicas.

Os núcleos interfásicos foram analisados e fotografados após o tratamento para obtenção de banda RON. A determinação do volume dos núcleos foi realizada, assumindo-se sua forma como esferóide. O volume foi obtido utilizando-se a seguinte fórmula: $V = (4/3) \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c$, onde "a" é o raio maior, "b" o raio menor e "c" a média entre o raio maior e menor. As medidas de a e b foram obtidas medindo-se o diâmetro dos núcleos em ampliações fotográficas (Wentworth & Roberts, 1979).

Os nucléolos, que também apresentam estrutura esférica, foram medidos, utilizando-se a mesma técnica descrita acima. As células com mais de dois nucléolos tiveram cada um de seus nucléolos medidos e os volumes obtidos foram somados para determinação do volume nucleolar total.

O volume do núcleo e do nucléolo foram determinados para células de adultos e girinos.

R - Resultados

R.1 - Dados referentes à criação de Hyla fuscovaria

A manutenção do animal foi bem sucedida, a espécie demonstra-se resistente a variações de umidade do terrário, não tendo ocorrido doenças ou mortes. Com relação à dieta oferecida, as pererecas não demonstraram preferências alimentares em cativeiro. Quanto aos girinos, o desenvolvimento normal dependeu do número de indivíduos por volume de água, verificando-se adequada, em média, a relação de um indivíduo por litro de água aerada.

Aquários superpovoados demonstraram seleção de indivíduos cujo desenvolvimento, até a metamorfose, completava-se durante três meses, enquanto outros permaneceram até oito meses em estado larval.

O tempo de desenvolvimento dependeu também da dieta adequada. Os animais que tiveram alimentação complementada com ração comercial de peixes desenvolveram-se em menor tempo.

Após a eclosão das patas dianteiras, Hyla fus-
covaria completava a metamorfose em três dias.

R.2 - Padrão de manchas e morfometria de ovos

A espécie estudada apresentou variações quanto ao padrão de manchas, coloração e presença de pequenos pontos claros na região dorsal.

Com relação aos machos, 54% apresentaram manchas dorsais claras e ausência de pontos brancos. Os restantes, mostraram manchas mais escuras, e os pontos brancos na região dorsal eram bem evidentes (Prancha I, fig. 4).

Com relação às fêmeas, 70% apresentaram manchas claras, sem pontos brancos evidentes, e as fêmeas restantes apresentaram manchas de coloração mais escura, com pontos brancos.

A experiência de coloração de machos e fêmeas em ambiente alternadamente claro e escuro revelou que os animais clareavam e escureciam como era o esperado, mas o importante da questão é que aqueles que não exibiam pontos claros em ambientes claros, não o possuíam também em ambiente escuro.

Estas variações quanto aos padrões de manchas e pontos em Hyla fuscovaria, não estão relacionados com diferenças ao nível cromossômico, nas amostras analisadas.

As desovas de Hyla fuscovaria seguiram o padrão do gênero, apresentando ovos pequenos, geralmente numerosos e mostrando um pólo escuro e outro mais claro, como já foi esclarecido no capítulo anterior. As desovas de Hyla fuscovaria, foram obtidas em coletas matinais. As fecundações destas desovas ocorreram durante a noite. Pela manhã, a maioria dos ovos, já fecundados, apresentavam o levantamento da membrana de fertilização (Prancha II) e, portanto, orientados com o pólo animal para cima, prosseguiram a fase de segmentação.

Duas posturas analisadas apresentaram cerca de 320 ovos (312 e 335). O diâmetro médio dos ovos foi de $1.27 + 0.0047$ mm, sendo estes envolvidos por duas cápsulas visíveis de gelatina transparente. A cápsula interna, mais próxima do ovo, apresentou $1.56 + 0.062$ mm, e a cápsula externa $1.79 + 0.16$ mm de diâmetro. Estes valores são relativos a medidas do diâmetro, realizadas em 28 ovos, com aproximadamente 15 horas de postura e fecundação.

R.3 - Espermatozoides de Hyla fuscovaria

A espécie apresentou espermatozoides com dois filamentos caudais. Na maioria dos casos observados apenas um dos filamentos caudais apresentou batimento do tipo ondulatório. A movimentação da cauda realizava-se como um todo, parecendo formar uma peça única, não ocorrendo, normalmente, movimentação independente e concomitante dos dois filamentos caudais (fig. 6, Prancha II).

A análise morfológica dos espermatozoides demonstrou a ocorrência de variações no comprimento da cauda e da região anterior dos espermatozoides maduros (tabela X). A região anterior do espermatozoide exibiu pequenas variações no comprimento, apresentando em média, $31.51 + 2.62$ μ m. O comprimento dos filamentos caudais apresentou maiores variações, com média de $61.21 + 11.23$ μ m. O comprimento total dos espermatozoides foi de $92.79 + 12.91$ μ m.

Tabela VI

Comparação entre o comprimento * dos espermatozoides de 3 indivíduos adultos de Hyla fuscovaria ** provenientes das proximidades do "campus" da Cidade Universitária de Campinas (UNICAMP)

		variações	$\bar{X} + D.P.$
Região anterior:			
Espécimen	I	29.47 - 35.26	31.31 $\pm$ 3.81
	II	21.05 - 34.74	31.95 $\pm$ 1.55
	III	25.26 - 33.68	31.26 $\pm$ 2.51
			total : 31.51 $\pm$ 2.62
Cauda:			
Espécimen	I	36.84 - 73.16	58.58 $\pm$ 11.88
	II	35.79 - 72.11	63.96 $\pm$ 10.37
	III	37.37 - 72.63	61.31 $\pm$ 11.45
			total : 61.21 $\pm$ 11.23
Comprimento total:			
Espécimen	I	66.31 - 103.68	89.89 $\pm$ 14.27
	II	56.84 - 104.68	95.91 $\pm$ 10.96
	III	62.63 - 105.79	92.58 $\pm$ 13.44
			total : 92.79 $\pm$ 12.91

* O comprimento médio ($\bar{X}$) e o desvio padrão (D.P.) são dados em μm (micrometro).

** Medidas realizadas em 10 espermatozoides de cada espécimen analisado. Estes dados incluem os espermatozoides considerados anômalos.

2.4 - Cariótipo

Determinou-se a constituição cromossômica de Hyla fuscovaria. O complemento diplóide da espécie é 24 cromossomos ($2n=24$). As variações do número de cromossomos serão comentadas oportunamente. O complemento haplóide é 12 cromossomos ($n=12$) e foi determinado através da contagem dos cromossomos de células da linhagem germinativa dos machos (Prancha III). Utilizando-se técnicas de banda C, banda RDN e técnicas convencionais de análise, não foi observado dimorfismo sexual cromossômico nos 20 espécimens adultos analisados.

O material genético de Hyla fuscovaria encontra-se distribuído em cromossomos maiores e menores, podendo ser divididos em um grupo composto de seis pares maiores e um segundo grupo, de seis pares restantes. Os pares cromossômicos são apresentados em ordem decrescente de tamanho (Pranchas IV e V).

A caracterização morfológica dos cromossomos mostrou predominância de cromossomos submetacêntricos e ausência de cromossomos acrocêntricos (tabela VII e Prancha XI).

Os pares cromossômicos 1 e 10 são metacêntricos, e os pares 7 e 8 são submetacêntricos, quase metacêntricos, e os pares 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11 e 12 são submetacêntricos (Prancha XI). Os pares foram identificados pelo comprimento relativo e pela localização do centrômero, utilizando-se a tabela V para classificação dos cromossomos. As medidas utilizadas constam na tabela VII. O número básico de braços cromossômicos, Número fundamental (N.F.) é 48.

Para comparação dos cromossomos mitóticos de girinos e de adultos, foram determinadas as principais características cromossômicas, tais como:

- Comprimento Relativo
- Relação de braços
- Índice Centromérico
- Número fundamental

Estas medidas estão presentes nas tabelas VIII e IX.

Não foram observadas diferenças morfológicas significativas nas características cromossômicas analisadas.

Os idiogramas foram determinados a partir das medidas presentes na tabela VII. Estas medidas foram obtidas em cerca de 5 metáfases, provenientes do mesmo indivíduo, englobando um total de 11 girinos e 9 indivíduos adultos.

Os cromossomos analisados nas células germinativas apresentaram na metáfase I da meiose 12 bivalentes e na metáfase II 12 díades (Prancha III, fig.1 e 2). A diacinese e a metáfase I apresentam bivalentes com formas anelares e dois quiasmas terminais.

As medidas realizadas nos cromossomos, de nove indivíduos adultos (cinco machos e quatro fêmeas, Tabela VIII) e onze girinos (Tabela IX), em média não mostraram heteromorfismo cromossômico entre adultos machos e fêmeas.

Estatisticamente, as medidas de comprimento dos doze pares cromossômicos (variáveis - braço curto e braço longo), de girinos e adultos, após análise de variância multivariada, não apresentaram diferenças significativas ^{ao nível} ~~em~~ de 95% das amostras ($p < 0,05$). A tabela VII reúne as características quantitativas dos cromossomos de girinos e adultos.

Tabela VII

Características quantitativas dos cromossomos * de indivíduos adultos e girinos de Hyla fuscovaria

Média dos Adultos

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	14.9 ± 0.84	1.15 ± 0.056	0.46 ± 0.022	m
2	12.3 ± 0.88	1.61 ± 0.16	0.38 ± 0.023	sm
3	11.3 ± 0.61	2.54 ± 0.48	0.28 ± 0.032	sm
4	10.3 ± 0.56	2.22 ± 0.52	0.32 ± 0.036	sm
5	8.8 ± 0.81	2.39 ± 0.29	0.29 ± 0.034	sm
6	7.7 ± 0.43	2.47 ± 0.30	0.29 ± 0.019	sm
7	6.9 ± 0.25	1.59 ± 0.076	0.36 ± 0.029	sm
8	6.4 ± 0.22	1.62 ± 0.12	0.35 ± 0.059	sm
9	6.0 ± 0.30	1.56 ± 0.13	0.35 ± 0.033	sm
10	5.5 ± 0.45	1.19 ± 0.11	0.46 ± 0.021	m
11	5.2 ± 0.33	1.63 ± 0.15	0.36 ± 0.021	sm
12	4.6 ± 0.30	1.87 ± 0.21	0.32 ± 0.022	sm

Média dos Girinos

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	15.6 ± 0.80	1.12 ± 0.052	0.47 ± 0.019	m
2	12.4 ± 0.73	1.68 ± 0.23	0.37 ± 0.037	sm
3	11.4 ± 0.78	3.04 ± 0.37	0.25 ± 0.023	sm
4	10.3 ± 0.43	2.14 ± 0.52	0.33 ± 0.019	sm
5	8.7 ± 0.45	2.73 ± 0.60	0.28 ± 0.050	sm
6	7.7 ± 0.38	2.49 ± 0.43	0.29 ± 0.035	sm
7	6.9 ± 0.54	1.57 ± 0.12	0.35 ± 0.023	sm
8	6.4 ± 0.65	1.55 ± 0.11	0.36 ± 0.030	sm
9	5.7 ± 0.25	1.54 ± 0.037	0.35 ± 0.027	sm
10	5.3 ± 0.25	1.14 ± 0.094	0.47 ± 0.022	m
11	5.0 ± 0.57	1.70 ± 0.26	0.36 ± 0.029	sm
12	4.5 ± 0.52	1.98 ± 0.27	0.33 ± 0.029	sm

* Médias $\pm$ Desvio padrão de todos os animais analisados

(1) NPC = Número do Par Cromossômico.

(2) CR = Comprimento Relativo = $\frac{\text{comprimento do cromossomo}}{\text{somatoria dos cromossomos}}$

(3) RB = Razão dos Braços = $\frac{\text{comprimento braço longo}}{\text{comprimento braço curto}}$

(4) IC = Índice Centromérico = $\frac{\text{comprimento braço curto} * 100}{\text{comprimento total do cromossomo}}$

(5) PC = Posição do Centrômero, de acordo com Beçak, 1967.

Tabela VIII

Características quantitativas dos cromossomos(*)
de indivíduos adultos de Hyla fuscovaria.

Indivíduo 1 - macho

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	15.3 + 0.74	1.08 + 0.12	0.48 + 0.039	m
2	12.4 + 0.34	1.54 + 0.20	0.41 + 0.031	sm
3	12.2 + 0.68	2.98 + 0.33	0.25 + 0.029	sm
4	10.8 + 0.83	2.95 + 0.46	0.33 + 0.021	sm
5	10.7 + 0.36	2.56 + 0.48	0.27 + 0.049	sm
6	7.9 + 0.47	2.61 + 0.27	0.32 + 0.022	sm
7	6.6 + 0.44	1.63 + 0.39	0.42 + 0.021	sm
8	6.4 + 0.38	1.53 + 0.31	0.45 + 0.052	sm
9	5.9 + 0.29	1.41 + 0.36	0.39 + 0.031	m**
10	5.3 + 0.45	1.19 + 0.33	0.45 + 0.061	m
11	4.5 + 0.41	1.49 + 0.38	0.38 + 0.026	sm
12	4.3 + 0.37	1.93 + 0.17	0.33 + 0.018	sm

Indivíduo 2 - macho

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	14.2 + 0.69	1.19 + 0.33	0.46 + 0.014	m
2	12.3 + 0.42	1.52 + 0.36	0.40 + 0.017	sm
3	11.3 + 0.49	1.98 + 0.41	0.34 + 0.039	sm
4	10.2 + 0.65	2.28 + 0.37	0.31 + 0.041	sm
5	8.5 + 0.25	2.23 + 0.36	0.31 + 0.037	sm
6	7.1 + 0.17	2.63 + 0.44	0.27 + 0.026	sm
7	6.9 + 0.29	1.58 + 0.43	0.39 + 0.039	sm
8	6.5 + 0.41	1.61 + 0.32	0.38 + 0.054	sm
9	6.5 + 0.37	1.53 + 0.27	0.32 + 0.025	sm
10	6.1 + 0.42	1.08 + 0.32	0.48 + 0.021	m
11	5.3 + 0.24	1.57 + 0.33	0.39 + 0.021	sm
12	5.3 + 0.29	1.92 + 0.15	0.34 + 0.025	sm

Indivíduo 3 - macho

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	16.1 + 0.48	1.10 + 0.10	0.48 + 0.022	m
2	12.4 + 0.54	1.59 + 0.31	0.40 + 0.027	sm
3	11.1 + 0.60	2.74 + 0.42	0.27 + 0.028	sm
4	9.7 + 0.48	1.88 + 0.44	0.34 + 0.019	sm
5	8.5 + 0.38	2.47 + 0.17	0.29 + 0.023	sm
6	7.7 + 0.26	2.71 + 0.42	0.29 + 0.033	sm
7	7.0 + 0.32	1.49 + 0.46	0.41 + 0.032	m**
8	6.3 + 0.33	1.63 + 0.42	0.40 + 0.044	sm
9	5.9 + 0.14	1.45 + 0.32	0.40 + 0.039	m**
10	5.5 + 0.21	1.14 + 0.22	0.44 + 0.031	m
11	5.1 + 0.27	1.88 + 0.29	0.35 + 0.033	sm
12	4.8 + 0.35	2.04 + 0.31	0.33 + 0.021	sm

Indivíduo 4 - fêmea

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	13.8 + 0.45	1.16 + 0.37	0.42 + 0.031	m
2	14.3 + 0.31	2.03 + 0.36	0.33 + 0.041	sm
3	10.7 + 0.43	3.03 + 0.48	0.25 + 0.032	sm
4	9.5 + 0.46	3.21 + 0.47	0.24 + 0.045	sm
5	8.6 + 0.35	2.71 + 0.26	0.28 + 0.034	sm
6	8.3 + 0.19	2.53 + 0.39	0.29 + 0.026	sm
7	6.9 + 0.28	1.55 + 0.32	0.39 + 0.041	sm
8	6.6 + 0.40	1.59 + 0.29	0.40 + 0.026	sm
9	6.0 + 0.38	1.40 + 0.23	0.33 + 0.041	sm**
10	5.7 + 0.35	1.35 + 0.31	0.46 + 0.025	m
11	5.0 + 0.49	1.78 + 0.27	0.36 + 0.019	sm
12	4.4 + 0.33	2.18 + 0.23	0.31 + 0.032	sm

Indivíduo 5 - fêmea

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	16.3 + 0.32	1.27 + 0.14	0.44 + 0.016	m
2	12.0 + 0.48	1.57 + 0.32	0.36 + 0.044	sm
3	11.6 + 0.36	1.73 + 0.61	0.31 + 0.026	sm
4	11.3 + 0.43	2.27 + 0.61	0.35 + 0.034	sm
5	9.1 + 0.30	2.25 + 0.34	0.32 + 0.041	sm
6	7.3 + 0.34	1.87 + 0.36	0.28 + 0.035	sm
/	6.7 + 0.31	1.49 + 0.41	0.39 + 0.042	m**
8	6.1 + 0.47	1.43 + 0.33	0.32 + 0.034	m**
9	5.4 + 0.22	1.53 + 0.21	0.35 + 0.023	sm
10	4.9 + 0.12	1.24 + 0.19	0.45 + 0.021	m
11	4.9 + 0.29	1.80 + 0.30	0.36 + 0.023	sm
12	4.4 + 0.26	1.95 + 0.33	0.34 + 0.017	sm

Indivíduo 6 - fêmea

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	14.9 + 0.27	1.16 + 0.14	0.48 + 0.023	m
2	12.2 + 0.30	1.58 + 0.44	0.38 + 0.032	sm
3	10.7 + 0.41	2.82 + 0.55	0.26 + 0.019	sm
4	10.6 + 0.36	1.74 + 0.52	0.36 + 0.023	sm
5	8.8 + 0.44	2.09 + 0.35	0.32 + 0.038	sm
6	7.8 + 0.28	2.15 + 0.48	0.31 + 0.034	sm
/	6.5 + 0.45	1.69 + 0.34	0.36 + 0.036	sm
8	6.4 + 0.37	1.86 + 0.28	0.33 + 0.025	sm
9	6.2 + 0.29	1.71 + 0.32	0.37 + 0.029	sm
10	5.7 + 0.44	1.05 + 0.23	0.42 + 0.041	m
11	5.4 + 0.28	1.43 + 0.24	0.36 + 0.048	m**
12	4.5 + 0.35	1.70 + 0.29	0.32 + 0.034	sm

Indivíduo 7 - fêmea

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	15.1 + 0.22	1.13 + 0.13	0.49 + 0.042	m
2	12.6 + 0.35	1.55 + 0.25	0.40 + 0.034	sm
3	11.5 + 0.44	2.37 + 0.47	0.29 + 0.027	sm
4	10.4 + 0.33	1.94 + 0.18	0.34 + 0.027	sm
5	7.9 + 0.28	2.39 + 0.49	0.30 + 0.034	sm
6	7.5 + 0.33	2.66 + 0.32	0.27 + 0.042	sm
7	7.1 + 0.45	1.69 + 0.42	0.36 + 0.042	sm
8	6.3 + 0.26	1.57 + 0.28	0.29 + 0.023	sm
9	6.1 + 0.38	1.63 + 0.26	0.33 + 0.034	sm
10	5.5 + 0.47	1.12 + 0.31	0.49 + 0.023	m
11	5.4 + 0.39	1.56 + 0.32	0.32 + 0.033	sm
12	4.6 + 0.25	1.64 + 0.35	0.27 + 0.021	sm

Indivíduo 8 - macho

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	14.3 + 0.41	1.12 + 0.13	0.47 + 0.035	m
2	11.2 + 0.27	1.57 + 0.25	0.39 + 0.047	sm
3	11.0 + 0.38	2.23 + 0.47	0.30 + 0.024	sm
4	10.0 + 0.094	1.92 + 0.18	0.34 + 0.038	sm
5	9.4 + 0.43	1.96 + 0.49	0.21 + 0.051	sm
6	8.0 + 0.16	2.41 + 0.32	0.31 + 0.029	sm
7	7.2 + 0.40	1.59 + 0.42	0.33 + 0.037	sm
8	6.3 + 0.44	1.64 + 0.28	0.33 + 0.041	sm
9	6.3 + 0.12	1.74 + 0.26	0.30 + 0.016	sm
10	6.1 + 0.48	1.23 + 0.31	0.45 + 0.026	m
11	5.4 + 0.34	1.61 + 0.32	0.35 + 0.029	sm
12	4.8 + 0.26	1.97 + 0.35	0.34 + 0.019	sm

Indivíduo 9 - macho

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	14.6 + 0.44	1.14 + 0.14	0.47 + 0.036	m
2	11.6 + 0.17	1.54 + 0.15	0.38 + 0.041	sm
3	11.4 + 0.21	3.01 + 0.23	0.25 + 0.030	sm
4	10.6 + 0.36	1.82 + 0.42	0.35 + 0.045	sm
5	8.7 + 0.43	2.84 + 0.24	0.30 + 0.041	sm
6	7.6 + 0.20	2.68 + 0.33	0.31 + 0.028	sm
7	7.2 + 0.25	1.65 + 0.21	0.37 + 0.038	sm
8	6.9 + 0.11	1.73 + 0.37	0.27 + 0.032	sm
9	6.2 + 0.19	1.65 + 0.34	0.35 + 0.027	sm
10	5.3 + 0.32	1.34 + 0.17	0.47 + 0.019	m
11	5.2 + 0.34	1.54 + 0.22	0.38 + 0.036	sm
12	4.5 + 0.27	1.51 + 0.27	0.32 + 0.026	sm

* Valores médios $\pm$ Desvio Padrão de 5 metafases mitóticas (1) , (2) , (3) , (4) e (5) - Vide Tabela VII.

m** - Cromossomo metacêntrico no animal analisado.

sm** - Cromossomo submetacêntrico. quase metacêntrico.

Tabela IX

Características quantitativas dos cromossomos (*)
de indivíduos girinos de Hyla fuscovaria.

Indivíduo 1

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	16.0 + 0.43	1.19 + 0.41	0.46 + 0.022	m
2	12.1 + 0.30	1.50 + 0.27	0.40 + 0.021	sm**
3	11.7 + 0.42	2.49 + 0.39	0.29 + 0.025	sm
4	10.7 + 0.35	1.72 + 0.42	0.36 + 0.032	sm
5	8.7 + 0.25	2.07 + 0.31	0.33 + 0.023	sm
6	7.7 + 0.19	2.18 + 0.23	0.31 + 0.020	sm
7	6.7 + 0.27	1.53 + 0.25	0.32 + 0.017	sm
8	6.4 + 0.23	1.54 + 0.27	0.36 + 0.021	sm
9	5.5 + 0.12	1.52 + 0.17	0.33 + 0.023	sm
10	5.3 + 0.25	1.21 + 0.14	0.45 + 0.019	m
11	4.8 + 0.23	1.53 + 0.21	0.38 + 0.022	sm
12	4.4 + 0.49	1.49 + 0.22	0.40 + 0.031	sm

Indivíduo 2

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	15.8 + 0.54	1.04 + 0.36	0.49 + 0.027	sm
2	11.5 + 0.38	1.68 + 0.43	0.37 + 0.019	sm
3	10.7 + 0.49	2.73 + 0.49	0.27 + 0.033	sm
4	10.2 + 0.29	1.91 + 0.51	0.34 + 0.026	sm
5	8.7 + 0.16	2.03 + 0.29	0.33 + 0.019	sm
6	7.9 + 0.20	2.14 + 0.27	0.32 + 0.021	sm
7	7.3 + 0.15	1.63 + 0.22	0.34 + 0.022	sm
8	6.5 + 0.29	1.49 + 0.23	0.37 + 0.018	sm**
9	6.0 + 0.27	1.57 + 0.19	0.32 + 0.022	sm
10	5.2 + 0.29	1.05 + 0.17	0.49 + 0.019	m
11	5.2 + 0.38	1.48 + 0.22	0.40 + 0.020	sm
12	4.7 + 0.27	1.54 + 0.23	0.35 + 0.014	sm

Indivíduo 3

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	15.3 + 0.44	1.11 + 0.45	0.47 + 0.018	m
2	12.2 + 0.54	1.63 + 0.28	0.38 + 0.026	sm
3	12.1 + 0.29	2.65 + 0.43	0.27 + 0.023	sm
4	10.1 + 0.41	2.02 + 0.45	0.33 + 0.037	sm
5	8.1 + 0.22	2.52 + 0.26	0.28 + 0.021	sm
6	7.5 + 0.11	2.37 + 0.31	0.35 + 0.026	sm
7	7.3 + 0.12	1.48 + 0.15	0.39 + 0.025	sm**
8	6.7 + 0.26	1.43 + 0.31	0.35 + 0.019	sm
9	5.7 + 0.28	1.50 + 0.25	0.35 + 0.026	sm
10	5.3 + 0.33	1.31 + 0.18	0.42 + 0.021	m
11	5.1 + 0.24	1.54 + 0.20	0.40 + 0.019	sm
12	4.6 + 0.26	2.00 + 0.22	0.33 + 0.025	sm

Indivíduo 4

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	15.8 + 0.35	1.13 + 0.34	0.47 + 0.030	m
2	12.3 + 0.42	1.54 + 0.31	0.27 + 0.031	sm
3	10.3 + 0.46	2.97 + 0.32	0.25 + 0.016	sm
4	10.0 + 0.48	1.69 + 0.48	0.34 + 0.033	sm
5	8.9 + 0.15	1.94 + 0.24	0.37 + 0.023	sm
6	8.2 + 0.24	2.27 + 0.35	0.31 + 0.019	sm
7	6.5 + 0.16	1.49 + 0.12	0.33 + 0.016	sm
8	6.0 + 0.34	1.74 + 0.29	0.36 + 0.021	sm
9	5.7 + 0.34	1.49 + 0.22	0.35 + 0.017	sm
10	5.7 + 0.27	1.21 + 0.23	0.45 + 0.022	m
11	5.5 + 0.49	1.93 + 0.19	0.34 + 0.026	sm
12	5.0 + 0.34	1.73 + 0.20	0.37 + 0.018	sm

Indivíduo 5

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	13.9 + 1.03	1.16 + 0.29	0.46 + 0.019	m
2	10.9 + 0.58	1.84 + 0.25	0.36 + 0.022	sm
3	10.9 + 0.45	2.99 + 0.33	0.25 + 0.023	sm
4	10.9 + 0.28	2.07 + 0.43	0.31 + 0.032	sm
5	8.1 + 0.29	3.48 + 0.41	0.22 + 0.016	sm
6	7.9 + 0.44	2.49 + 0.26	0.29 + 0.014	sm
7	7.5 + 0.48	1.46 + 0.19	0.34 + 0.019	sm
8	7.0 + 0.45	1.49 + 0.34	0.34 + 0.016	sm
9	6.3 + 0.35	1.49 + 0.23	0.33 + 0.019	sm
10	5.7 + 0.29	1.04 + 0.22	0.49 + 0.022	m
11	5.7 + 0.42	1.73 + 0.17	0.37 + 0.015	sm
12	5.3 + 0.47	2.23 + 0.19	0.31 + 0.026	sm

Indivíduo 6

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	16.9 + 0.48	1.12 + 0.19	0.45 + 0.021	m
2	12.5 + 0.36	1.73 + 0.38	0.34 + 0.023	sm
3	11.6 + 0.32	3.19 + 0.34	0.24 + 0.021	sm
4	9.8 + 0.42	2.13 + 0.47	0.34 + 0.031	sm
5	9.5 + 0.20	2.71 + 0.32	0.27 + 0.014	sm
6	6.8 + 0.24	1.86 + 0.21	0.35 + 0.021	sm
7	6.7 + 0.39	1.75 + 0.31	0.36 + 0.017	sm
8	6.3 + 0.25	1.47 + 0.26	0.40 + 0.019	sm**
9	5.9 + 0.42	1.56 + 0.19	0.34 + 0.022	sm
10	5.4 + 0.37	1.11 + 0.17	0.47 + 0.019	m
11	4.3 + 0.27	1.46 + 0.23	0.39 + 0.017	sm**
12	4.2 + 0.39	2.19 + 0.21	0.31 + 0.021	sm

Indivíduo 7

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	16.3 + 0.39	1.15 + 0.47	0.47 + 0.027	m
2	13.2 + 0.43	1.49 + 0.26	0.39 + 0.012	sm**
3	12.0 + 0.36	3.55 + 0.29	0.22 + 0.019	sm
4	9.9 + 0.26	2.08 + 0.49	0.33 + 0.026	sm
5	9.2 + 0.29	2.66 + 0.32	0.27 + 0.016	sm
6	7.7 + 0.34	2.92 + 0.20	0.25 + 0.019	sm
7	6.5 + 0.42	1.78 + 0.31	0.38 + 0.022	sm
8	6.4 + 0.37	1.54 + 0.30	0.41 + 0.021	sm**
9	5.8 + 0.39	1.57 + 0.28	0.33 + 0.024	sm
10	5.2 + 0.39	1.07 + 0.31	0.48 + 0.021	m
11	4.1 + 1.45	0.45 + 0.19	0.39 + 0.021	sm**
12	3.6 + 0.36	2.22 + 0.17	0.31 + 0.026	sm

Indivíduo 8

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	15.4 + 0.27	1.18 + 0.39	0.52 + 0.330	m
2	12.6 + 0.53	1.81 + 0.23	0.38 + 0.026	sm**
3	12.3 + 0.48	3.73 + 0.42	0.21 + 0.022	sm
4	10.7 + 0.36	2.24 + 0.33	0.31 + 0.025	sm
5	8.1 + 0.24	3.43 + 0.31	0.23 + 0.020	sm
6	7.8 + 0.41	3.40 + 0.31	0.23 + 0.020	sm
7	7.7 + 0.44	1.48 + 0.16	0.32 + 0.021	sm**
8	5.5 + 0.38	1.53 + 0.31	0.39 + 0.019	sm**
9	5.3 + 0.34	1.24 + 0.23	0.38 + 0.022	m
10	5.2 + 0.27	2.14 + 0.22	0.45 + 0.020	sm
11	4.7 + 0.24	2.19 + 0.26	0.32 + 0.017	sm
12	4.6 + 0.29	1.57 + 0.28	0.31 + 0.025	sm**

Indivíduo 9

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	14.8 + 0.48	1.09 + 0.41	0.48 + 0.036	m
2	13.0 + 0.33	1.52 + 0.29	0.40 + 0.019	sm**
3	10.3 + 0.42	3.03 + 0.26	0.25 + 0.031	sm
4	10.0 + 0.28	3.63 + 0.41	0.29 + 0.019	sm
5	8.6 + 0.42	3.73 + 0.25	0.21 + 0.020	sm
6	7.8 + 0.24	2.79 + 0.29	0.26 + 0.014	sm
7	7.1 + 0.38	1.48 + 0.14	0.35 + 0.030	sm
8	6.9 + 0.44	1.51 + 0.17	0.31 + 0.022	sm
9	5.9 + 0.48	1.58 + 0.31	0.34 + 0.024	sm
10	5.5 + 0.37	1.11 + 0.19	0.47 + 0.019	m
11	5.2 + 0.49	1.99 + 0.21	0.33 + 0.021	sm
12	4.9 + 0.36	2.07 + 0.31	0.33 + 0.017	sm

Indivíduo 10

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	16.0 + 0.25	1.13 + 0.31	0.49 + 0.031	m
2	13.2 + 0.43	2.25 + 0.36	0.39 + 0.021	sm
3	11.7 + 0.23	2.94 + 0.46	0.25 + 0.019	sm
4	10.9 + 0.34	1.93 + 0.35	0.32 + 0.027	sm
5	8.9 + 0.25	2.82 + 0.34	0.26 + 0.021	sm
6	8.0 + 0.39	2.31 + 0.23	0.30 + 0.016	sm
7	6.6 + 0.44	1.69 + 0.23	0.37 + 0.024	sm
8	6.6 + 0.41	1.54 + 0.21	0.33 + 0.020	sm
9	5.2 + 0.48	1.55 + 0.33	0.39 + 0.022	sm**
10	4.7 + 0.36	1.12 + 0.17	0.47 + 0.017	m
11	4.4 + 0.54	1.50 + 0.24	0.36 + 0.019	sm
12	3.8 + 0.37	2.05 + 0.22	0.32 + 0.025	sm

Indivíduo 11

NPC(1)	CR(2)	RB(3)	IC(4)	PC(5)
1	15.2 + 0.42	1.03 + 0.27	0.47 + 0.029	m
2	13.1 + 0.39	1.49 + 0.41	0.37 + 0.016	sm
3	12.0 + 0.31	3.16 + 0.34	0.24 + 0.025	sm
4	9.8 + 0.43	2.16 + 0.29	0.32 + 0.031	sm
5	8.8 + 0.27	2.67 + 0.33	0.27 + 0.023	sm
6	7.8 + 0.40	2.69 + 0.26	0.27 + 0.019	sm
7	6.4 + 0.24	1.50 + 0.17	0.34 + 0.015	sm
8	6.4 + 0.36	1.77 + 0.19	0.36 + 0.017	sm
9	5.6 + 0.44	1.58 + 0.24	0.33 + 0.019	sm
10	5.3 + 0.46	1.02 + 0.21	0.49 + 0.021	m
11	4.7 + 0.27	1.94 + 0.21	0.34 + 0.026	sm
12	4.8 + 0.31	2.05 + 0.19	0.34 + 0.024	sm

* Valores Medios $\pm$ desvio padrão.

(1), (2), (3), (4) e (5) - vide tabela VII.

m** - Cromossomo metacêntrico no animal analisado.

sm** - Cromossomo submetacêntrico, quase metacêntrico.

R.5 - Banda C

A técnica empregada evidenciou que tanto girinos como adultos apresentam o mesmo padrão de bandas (Prancha VI e VII).

Todos os cromossomos apresentaram bandamento centromérico. Os pares 1, 2 e 11 apresentaram heterocromatina constitutiva centromérica, geralmente mais corada do que o restante dos cromossomos (Prancha VI e VII). Os pares 1, 2, 3, 4, 8, 9 e 12 apresentaram bandamento telomérico, ligeiramente mais evidente do que o restante dos cromossomos. O par 5 apresentou bandamento telomérico menos evidente. O par 7 apresentou bandamento telomérico menos evidente nos braços curtos dos cromossomos, enquanto os braços longos não apresentaram bandamento conspicuo. Os pares 6 e 10 também não apresentaram bandamento telomérico. Os pares 11 e 12, cujo bandamento está no braço longo, não apresentaram bandamento telomérico nos braços curtos.

Alguns núcleos interfásicos (fig.3, Prancha III) apresentaram 8 blocos de heterocromatina constitutiva, 3 relativamente maiores do que o restante, corados pela técnica de Banda C.

O cromossomo 11 apresentou bandamento intercalar (ou intersticial) (fig.4, Prancha III), e esta relacionado com Região Organizadora Nucleolar (Prancha VIII), não sendo conspicua a presença de constrições secundárias.

R.6 - Banda RON : Estudo de núcleos interfásicos e metafásicos

Os resultados das análises morfométricas de núcleos e nucléolos interfásicos, efetuados em adultos e girinos, estão apresentados nas tabelas X, IX, XII e XIII. A análise dos núcleos interfásicos revelou a presença de mais de dois nucléolos, em 1.2% das células dos girinos (tabela IX). O número de nucléolos, encontrados nas células interfásicas de girinos e adultos está relacionada na tabela XI, de forma percentual.

As médias e desvios dos volumes de núcleos e nucléolos dos vários tecidos estão apresentados na tabela XII.

Os volumes totais médios de núcleos e nucléolos interfásicos de girinos e adultos foram analisados estatisticamente através dos dados da tabela XI. Os volumes totais médios dos nucléos de girinos e adultos não mostraram diferenças significativas. Os volumes totais médios dos nucléolos de girinos mostraram-se significativamente maiores que os de adultos (tabela XII).

Quanto ao tamanho, número e localização das bandas RON em núcleos metafásicos de indivíduos adultos, verifica-se a presença de bandamento Ag-positivo no par cromossômico 11, em todas as metáfases analisadas (Prancha VIII, fig.1). Os girinos analisados apresentaram também bandamento no par cromossômico 11 (Prancha VIII, fig.2). Nestes, a variação do tamanho das bandas RONS foi maior do que nos indivíduos adultos (Prancha VIII, fig.4).

Nos girinos, uma das metáfases analisadas mostrou, além da banda nos homólogos do par 11, uma banda a mais nos 2 homólogos do par 12 (Prancha IX). Outro animal (Prancha VIII, fig.3) apresentou banda RON em um homólogo do par 11 e outro do par 12. Estas observações apresentam frequência baixa, sendo confirmadas pela presença de mais de dois nucléolos, impregnados pela prata, em células interfásicas (Prancha X). As metáfases com os pares 11 e 12, impregnados pela prata, foram observadas em preparações provenientes do intestino e cauda.

O bandamento pela prata realizado nas células de linhagem germinativa, evidenciou atividade transcripcional dos genes ribossômicos durante as primeiras fases da espermatogênese. Observou-se RON impregnada pela prata, durante a profase meiótica, zigôteno e paquíteno, com diminuição gradativa da granulação, até o desaparecimento total da marcação na metáfase I e II da meiose, voltando muitas vezes a ser demonstrada nos núcleos das espermátides, durante as primeiras fases do desenvolvimento, desaparecendo nos estágios finais da espermátide, antes ou durante a elongação do núcleo.

Tabela X

Número de campos analisados e média de células por campo, total de células, número e percentual de células com mais de dois nucléolos nos vários tecidos.

fígado : 26 campos $\bar{X} = 18.8 \pm 5.8$ células por campo, com um total de 488 células, 7 células apresentaram mais de 2 nucléolos (1.43%)

cauda : 39 campos $\bar{X} = 23.7 \pm 8.1$ células por campo, com um total de 926 células, 11 células apresentaram mais de 2 nucléolos (1.18%)

intestino : 18 campos $\bar{X} = 8.5 \pm 8.9$ células por campo, com um total de 358 células, 4 células apresentaram mais de 2 nucléolos (1.12%)

Tabela XI

Percentual do número de nucléolos em núcleos interfásicos * de vários tecidos de girinos e adultos.

Girino

Número de nucléolos	-	1	-	2	-	3	-	4
fígado		60%		18%		4%		18%
intestino		84%		11%		5%		-
cauda		49%		44%		4%		3%

Adulto

Número de nucléolos	-	1	-	2
fígado		80%		20%
intestino		88%		12%

* Utilizou-se 383 amostras do total de 1772 células de girinos e 131 amostras do total de 985 células de adultos.

Tabela XI

Volume nuclear e nucleolar * em células interfásicas de vários tecidos de girinos e adultos.

Girino		Núcleo	Nucléolo
fígado	total	$\bar{X} = 15122.8 \pm 5478.2$	$\bar{X} = 161.4 \pm 108.3$
	1 nucléolo	$\bar{X} = 15488.8 \pm 5498.9$	$\bar{X} = 184.8 \pm 127.9$
	2 nucléolos	$\bar{X} = 18803.3 \pm 1997.7$	$\bar{X} = 96.9 \pm 36.1$
	3 nucléolos	$\bar{X} = 11435.4$	$\bar{X} = 110.5 \pm 79.0$
	4 nucléolos	$\bar{X} = 10293.9 \pm 7112.4$	$\bar{X} = 110.5 \pm 79.0$
cauda	total	$\bar{X} = 12059.9 \pm 8573.3$	$\bar{X} = 448.4 \pm 452.0$
	1 nucléolo	$\bar{X} = 13484.2 \pm 10429.9$	$\bar{X} = 596.7 \pm 575.3$
	2 nucléolos	$\bar{X} = 11087.9 \pm 7144.7$	$\bar{X} = 329.1 \pm 370.0$
	3 nucléolos	$\bar{X} = 7582.8 \pm 4644.6$	$\bar{X} = 162.9 \pm 70.0$
	4 nucléolos	$\bar{X} = 5818.0 \pm 3728.7$	$\bar{X} = 112.2 \pm 100.5$
intestino	total	$\bar{X} = 15717.4 \pm 8925.7$	$\bar{X} = 160.9 \pm 131.9$
	1 nucléolo	$\bar{X} = 15717.4 \pm 8925.7$	$\bar{X} = 160.9 \pm 131.9$
	2 nucléolos	$\bar{X} = 16873.2 \pm 9729.8$	$\bar{X} = 76.2 \pm 146.2$
	3 nucléolos	$\bar{X} = 8048.6 \pm 2075.1$	$\bar{X} = 84.7 \pm 36.8$
Adulto		núcleo	nucléolo
fígado	total	$\bar{X} = 12604.7 \pm 7900.1$	$\bar{X} = 161.3 \pm 99.3$
	1 nucléolo	$\bar{X} = 11687.5 \pm 5498.9$	$\bar{X} = 165.9 \pm 104.9$
	2 nucléolos	$\bar{X} = 22967.4 \pm 13233.0$	$\bar{X} = 105.8 \pm 32.0$
intestino	total	$\bar{X} = 9927.1 \pm 5660.9$	$\bar{X} = 195.6 \pm 127.3$
	1 nucléolo	$\bar{X} = 9799.7 \pm 5255.1$	$\bar{X} = 208.2 \pm 139.4$
	2 nucléolos	$\bar{X} = 11030.9 \pm 10069.7$	$\bar{X} = 81.9 \pm 17.9$

* Os volumes apresentam-se em mm^3 , devendo ser multiplicados por 10^{-9} para obtenção dos valores em μm^3 .

Tabela XII

Volume nuclear e nucleolar * médio de girinos e adultos **

	núcleo	nucléolo
Girino	$\bar{X} = 14300.0 \pm 7659.1$ (55.9%)	$\bar{X} = 256.9 \pm 230.7$ (69.5%)
Adulto	$\bar{X} = 11265.9 \pm 6780.5$ (44.1%)	$\bar{X} = 178.5 \pm 113.3$ (30.5%)

* Os volumes apresentam-se em mm, devendo ser multiplicado por 10^9 para obtenção dos valores em μm .

** Análise de variância realizada utilizando-se, o programa MINITAB, para análise estatística.

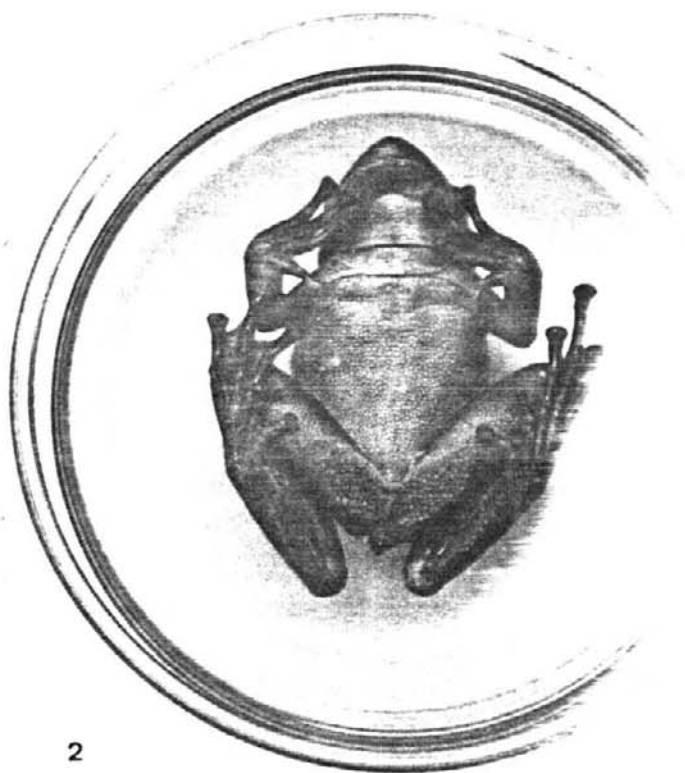
Prancha I

Hyla fuscovaria, aspectos morfológicos utilizados no reconhecimento da espécie. Aumento = escala natural.

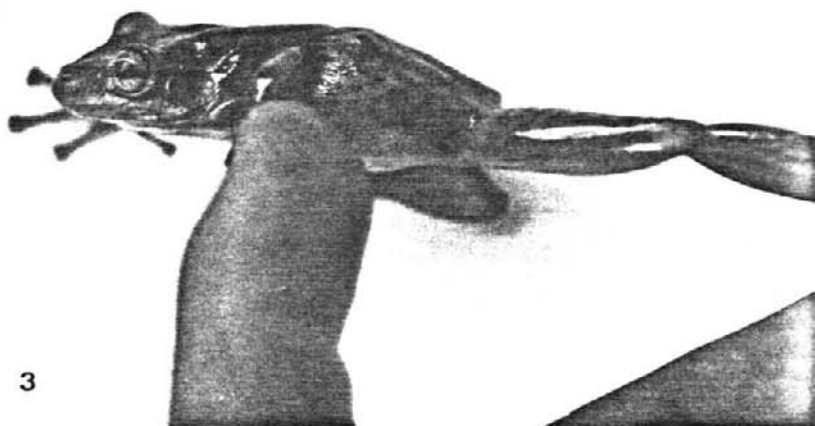
- fig. 1 - Macho adulto, animal vivo. Vista dorsal. Aspecto geral mostrando os padrões de coloração com algumas pintas.
- fig. 2 - Mesmo animal, vista ventral.
- fig. 3 - Mesmo animal, rosto em perfil. Coloração amarelada nos flancos e face interna das coxas.
- fig. 4 - Macho adulto, animal vivo. Vista dorsal. Aspecto geral mostrando variabilidade de coloração após permanência em câmara escura.



1



2



3



4

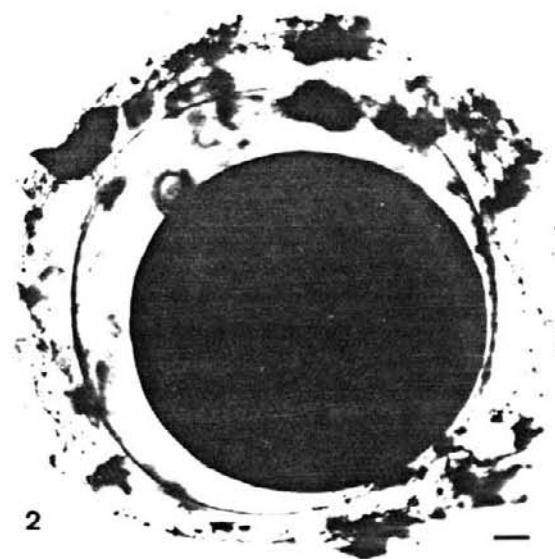
Prancha II

Ovos e espermatozoides de Hyla fuscovaria. Ovos coletados cerca de 15 horas após a postura. Duas cápsulas gelatinosas envolvem o ovo. Os espermatozoides foram analisados através de microscopia de contraste de fase, escala = 1µm.

- fig. 1 - Ovo não fecundado. O ovo apresenta-se com a segunda cápsula de gelatina pouco embebida. Restos vegetais prendem-se à camada mais externa de gelatina. Escala = 0,1 mm.
- fig. 2 - Ovo fecundado. O ovo apresenta-se com a segunda cápsula de gelatina muito estendida e delgada. Restos vegetais prendem-se à camada mais externa de gelatina. Escala 0,1 mm.
- fig. 3 - Espermatozoides maduros. Os filamentos caudais apresentam comprimento normal.
- fig. 4 - Espermatozoide não completamente maduro. Ainda estão presentes restos citoplasmáticos, na altura da peça intermediária.
- fig. 5 - Espermatozoide maduro. Os filamentos caudais apresentam comprimento reduzido.
- fig. 6 - Detalhe da região intermediária e peça principal. Apenas um dos filamentos caudais apresenta batimento ondulatório.



1



2



3



4



5



6



Prancha III

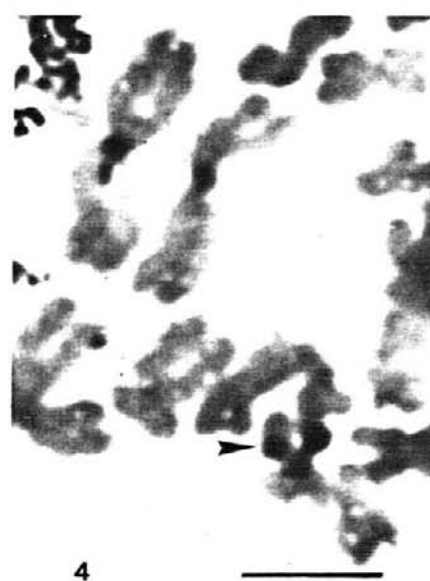
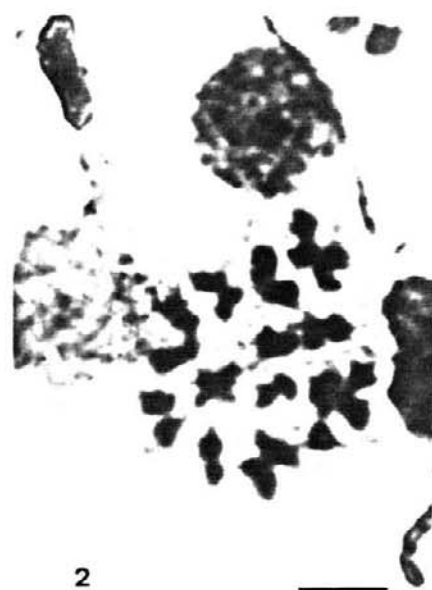
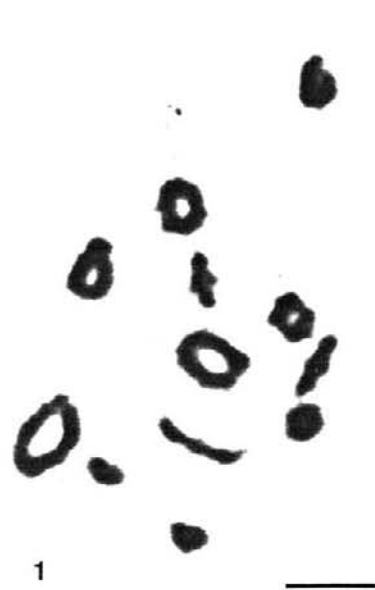
Meiose e Banda C em núcleos metafásicos e inter-
fásicos de Hyla fuscovaria. Escala = 5µm.

- fig. 1 - Meiose de Hyla fuscovaria: 12 bivalentes na meta-
fase I. Alguns bivalentes apresentam formas anelares
e quiasmas terminais visíveis nos cromossomos maio-
res.

- fig. 2 - Meiose de Hyla fuscovaria: 12 díades na metafase
II.

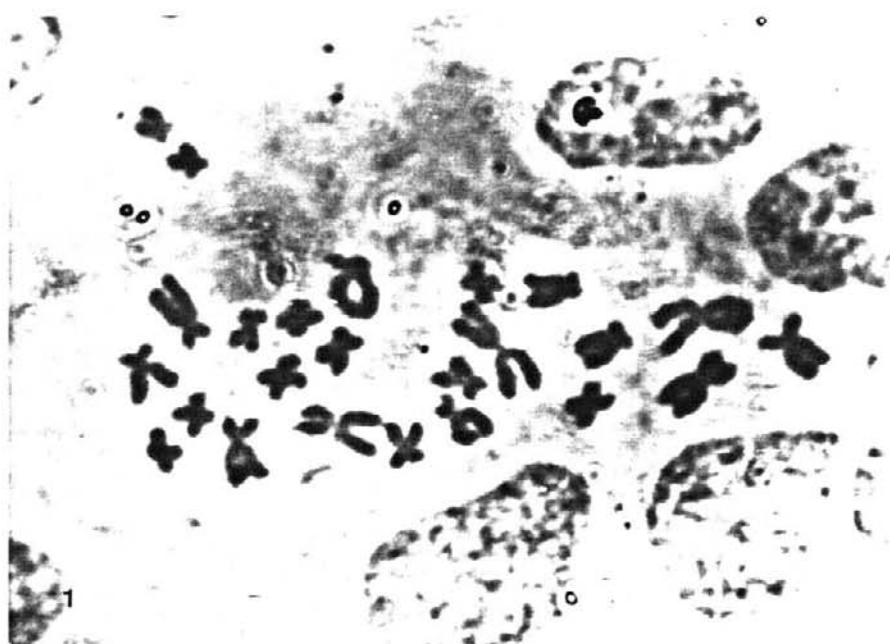
- fig. 3 - Núcleo interfásico de célula do baço de macho a-
dulto. Coloração pela técnica de Banda C. A prepa-
ração apresenta 8 regiões de heterocromatina cons-
titutiva.

- fig. 4 - Núcleo metafásico de célula do baço de macho adul-
to. Coloração pela técnica de Banda C. Detalhe da
banda intersticial do cromossomo 11.



Prancha IV

- fig. 1 - Cromossomos de macho adulto de Hyla fuscovaria.
Metáfase mitótica apresentando 24 cromossomos. Co-
loração com Giemsa. Escala = 5 um.
- fig. 2 - Cariótipo da metafase mitotica acima apresentada.



1



2



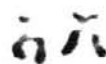
3



4



5



6



7



8



9



10



11



12

Prancha V

- fig. 1 - Cromossomos de girino de Hyla fuscovaria.
Metáfase mitótica apresentando 24 cromossomos. Co-
loração com Giemsa. Escala = 5 um.
- fig. 2 - Cariótipo da metafase mitótica acima apresentada.



1



2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



12

2

Prancha VI

- fig. 1 - Padrão de banda C em macho adulto de Hyla tus-
 covaria. Metáfase mitótica apresentando 24 cro-
 mossomos. Escala 5 um.
- fig. 2 - Cariótipo bandado da metafase mitótica. acima
 apresentada. A banda C e centromérica em todos
 os cromossomos.



1



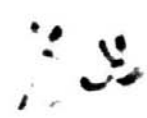
1



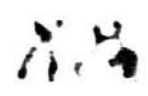
2



3



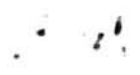
4



5



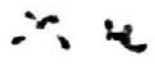
6



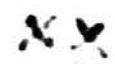
7



8



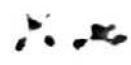
9



10



11



12

Prancha VII

- fig. 1 - Padrão de banda C em girino de Hyla fuscovaria.
Metáfase mitótica apresentando 24 cromossomos.
Escala 5 um.
- fig. 2 - Cariótipo bandado da metáfase mitótica acima
apresentada. A banda C é centromérica em todos
os cromossomos.



1



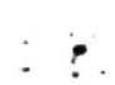
1



2



3



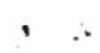
4



5



6



7



8



9



10



11



12

Prancha VIII

- fig. 1 - Padrão de banda RON em macho adulto de Hyla fuscovaria. Metáfase mitótica apresentando 24 cromossomos, com marcação no par cromossômico 11.
 escala = 5 um.

- fig. 2 - Banda RON em girino. A metáfase mitótica apresenta
 marcação no par 11.

- fig. 3 - Padrão de banda RON em girino de Hyla fuscovaria
 Metáfase mitótica apresentando 24 cromossomos.
 banda RON marcando um cromossomo do par 11 e outro
 do par 12.

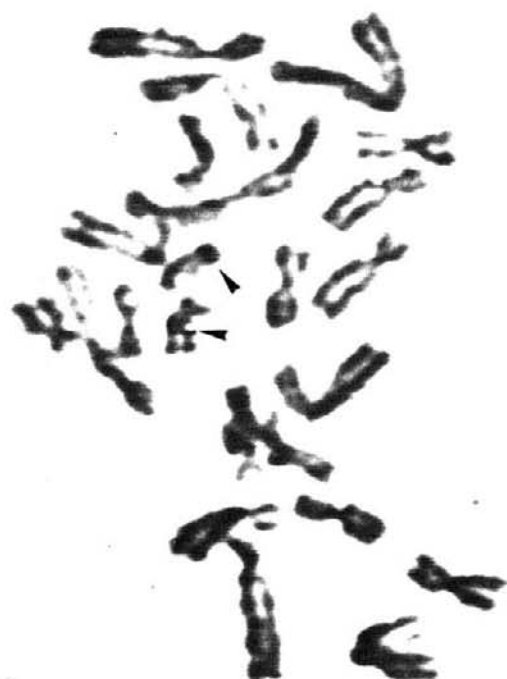
- fig. 4 - Detalhe da banda RON em girino, mostrando os cromos-
 somos do par 11 marcados. com diferença de tamanho
 da banda entre os cromossomos homólogos.



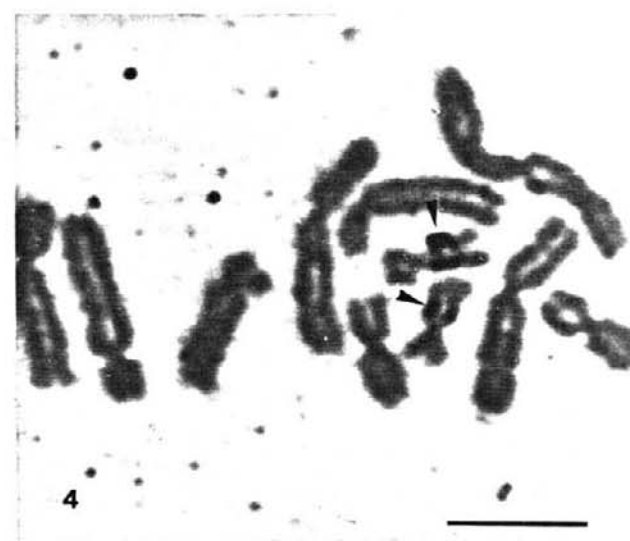
1



2



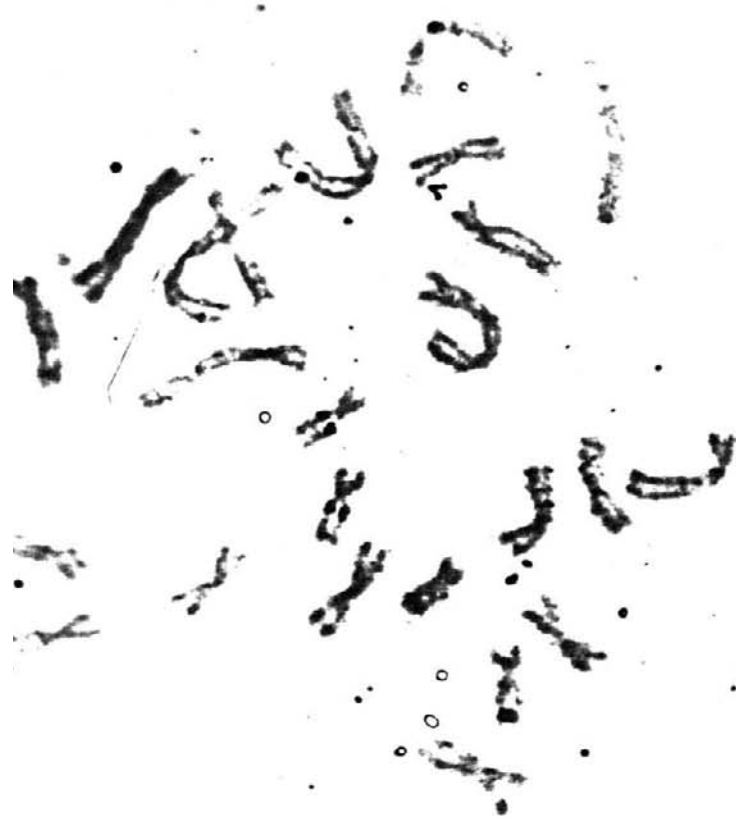
3



4

Prancha IX

- fig. 1 - Padrão de banda RDN em girino de Hyla fuscovaria.
Metáfase mitótica apresentando 24 cromossomos, com
marcações nos pares 11 e 12. Escala = 1 um.
- fig. 2 - Cariótipo bandado da metáfase, acima apresentada.



1



2



3



4



5



6



7



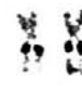
8



9



10



11

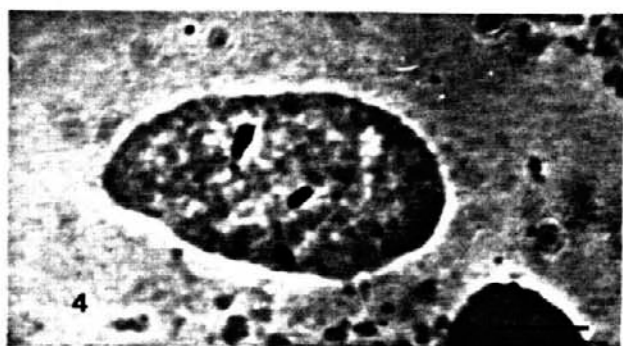
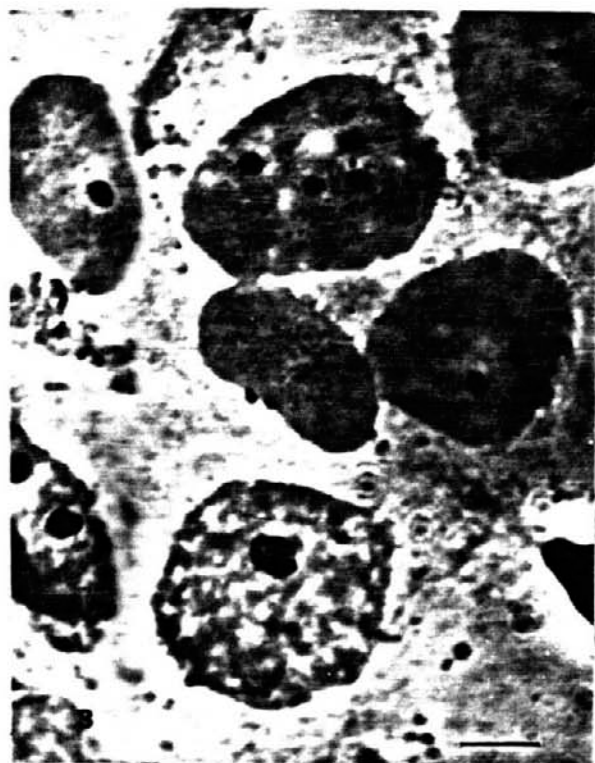
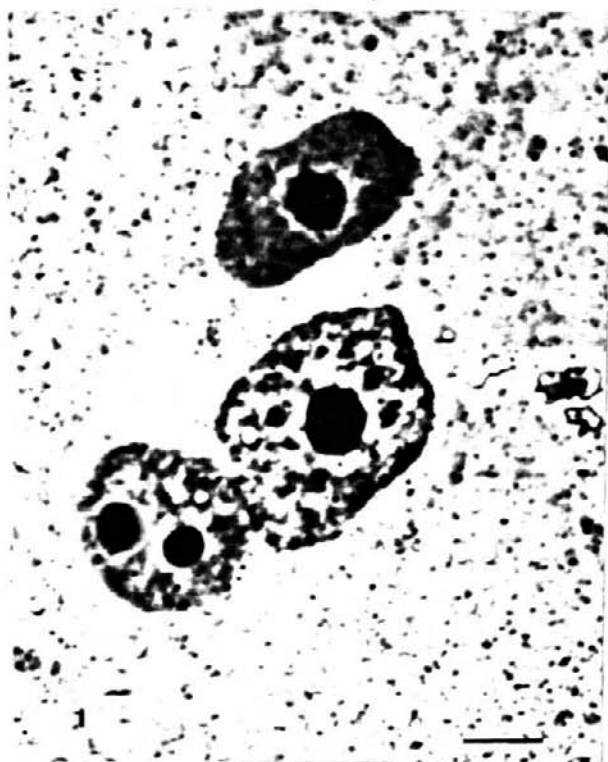


12

Prancha X

Nuclêolos marcados pela técnica de banda RUN em girinos e adultos de Hyla fuscovaria. Escala = 5 um.

- fig. 1 - Célula da cauda de girino em interfase, apresentando de 1 a 2 nuclêolos marcados pela prata.
- fig. 2 - Célula da cauda de girino em interfase, apresentando de 1 a 3 nuclêolos marcados pela prata.
- fig. 3 - Célula da cauda de girino em interfase, apresentando de 1 a 4 nuclêolos marcados pela prata.
- fig. 4 - Célula do intestino de girino em interfase, apresentando 3 nuclêolos marcados pela prata.
- fig. 5 - Células do intestino de macho adulto, em interfase, apresentando 1 e 2 nuclêolos.



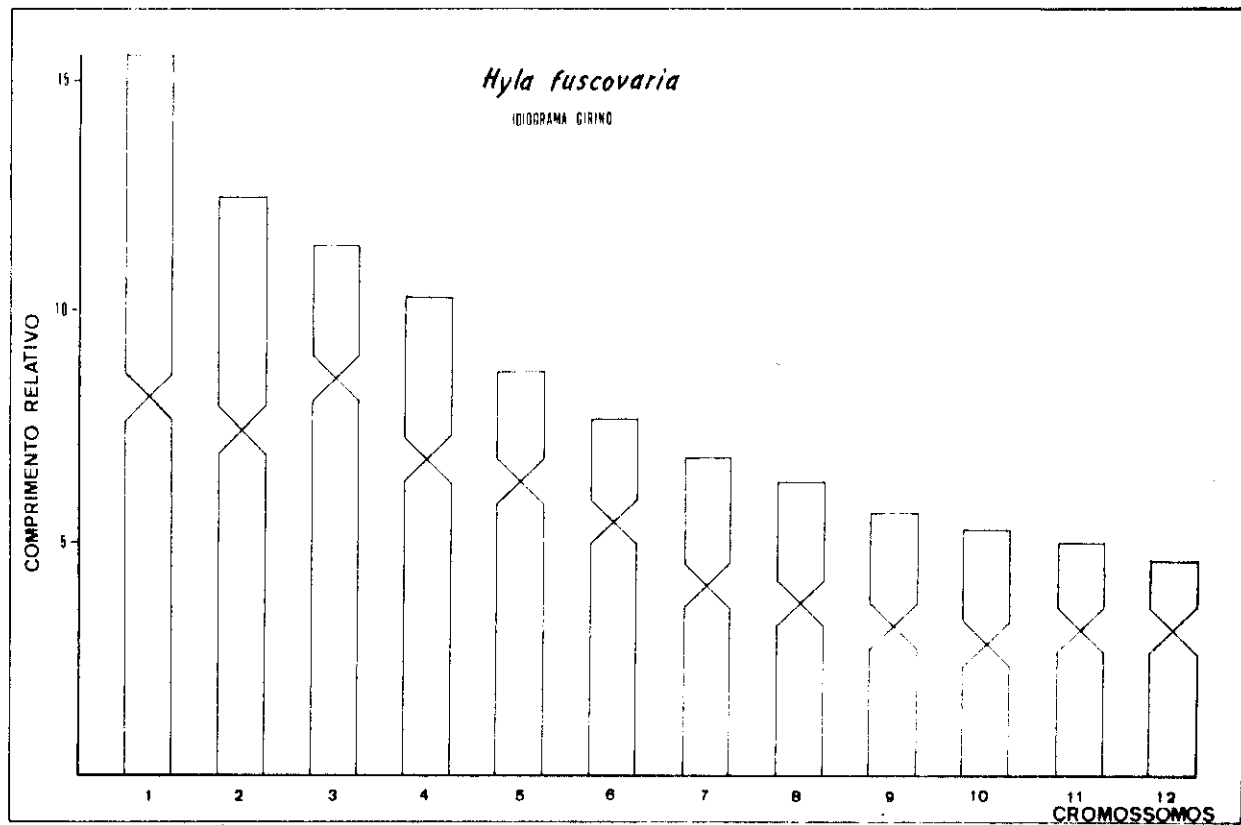
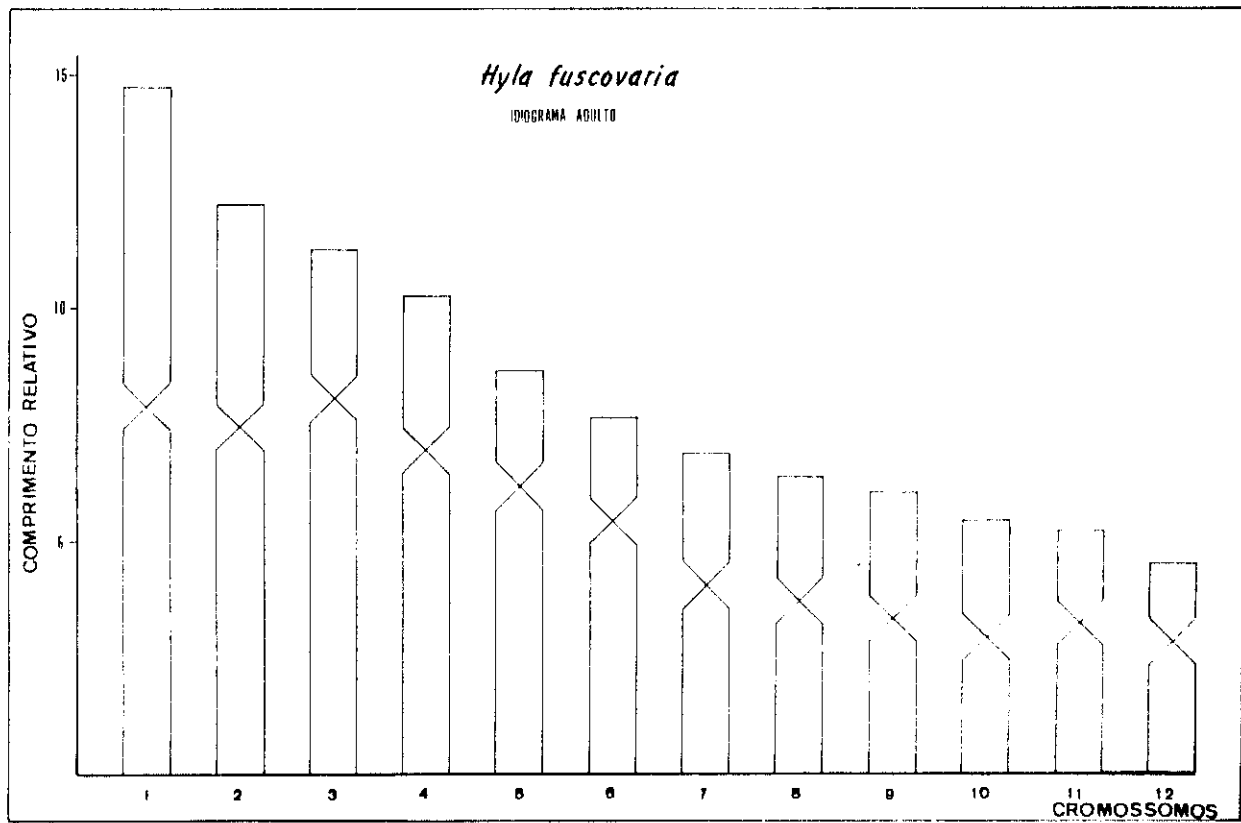
Prancha XI

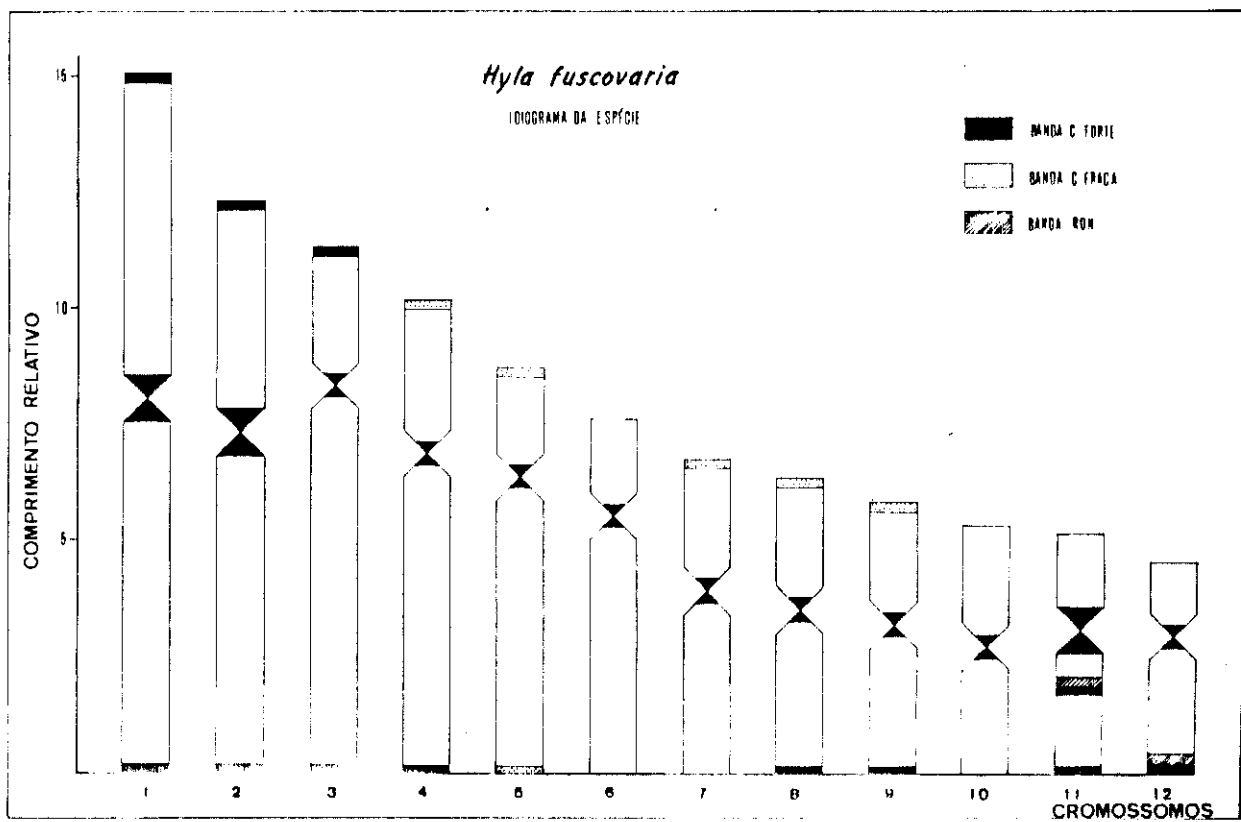
Idiograma para Hyla fuscovaria, a partir dos dados sumari-
zados na tabela VII e pranchas VI, VII, VIII e IX.

ig. 1 - Idiograma dos indivíduos adultos.

ig. 2 - Idiograma dos girinos.

ig. 3 - Idiograma da espécie, com marcação da banda C e banda RON.





D - Discussão

D.1 - Hyla fuscovaria em laboratório

As características de resistência e a boa adaptabilidade dos indivíduos adultos mantidos em terrário e dos girinos em aquário, tornam a espécie, material de fácil criação, com qualidades adequadas ao trabalho científico.

A manutenção dos girinos em aquários super-povoados, mesmo com suprimentos adequados de alimento e oxigênio, prejudica o desenvolvimento. Nestas condições, apenas uma parte da população desenvolveu-se normalmente, atingindo a metamorfose após cerca de 3 meses. O restante dos girinos, têm seu período de desenvolvimento atrasado, levando 8 meses para atingir a metamorfose. Vizotto (1967), realizando experimento sobre a alimentação e o crescimento de Leptodactylus labyrinthicus em aquário, também observou diferenças no crescimento durante o período larvário. O grande número de larvas por aquário torna maior a competição entre os espécimens, aumentando a colisão entre os indivíduos e o acúmulo de catabólitos. Todos estes fatores agravariam as dificuldades de obtenção de alimentos, atrasando o crescimento e a metamorfose.

O diâmetro dos ovos e o número de cápsulas são informações taxonômicas até agora não devidamente consideradas nos estudos biológicos. Vizotto (1967), em seu estudo sobre o desenvolvimento de anuros da região norte-ocidental de São Paulo, julga importante a caracterização dos ovos como elemento auxiliar no estudo taxonômico.

A morfometria dos ovos de Hyla fuscovaria não tinha sido, até o momento, apresentada e o valor médio de 1,27 mm situa-se próximo ao de outros Hylidae, como Hyla parkeri com 0,70 mm e Hyla raniceps com 1,70 mm (Vizotto, 1967).

D.2 - Padrões de coloração dorsal

A ocorrência de 70% de fêmeas claras é significativa. Entretanto a ocorrência de metade dos machos quase tão claros quanto às fêmeas, e ainda a possibilidade de causar descoloração nos animais, quando submetidos a ambientes claros, torna duvidosa a afirmação de dimorfismo sexual. A coloração das manchas e dos pontos claros parece não estar relacionada com a maturidade sexual, pois cerca de uma semana após a metamorfose, fica estabelecido o padrão de coloração do animal.

Análises cariotípicas de 20 animais adultos de Hyla fuscovaria, com variabilidade de coloração, não revelaram diferenças significativas, o que torna desejável o aprofundamento do estudo desta espécie para elucidar o problema da variação colorimétrica. Estas variações de coloração, dificilmente estarão relacionadas com diferenças cariotípicas, parecendo estarem relacionadas com diferenças gênicas da população.

Na prática, quando se necessitou trabalhar com machos, escolhiam-se os mais escuros com pontos claros bem definidos. Este procedimento mostrou-se eficaz ao se fazer a seleção de machos para estudo dos espermatozoides, não ocorrendo erros na escolha dos animais durante o período dedicado a estas análises.

D.3 - Morfologia dos espermatozoides de Hyla fuscovaria

Os espermatozoides de anfíbios apresentam estruturas semelhantes às descritas para os espermatozoides dos mamíferos. Os espermatozoides dos anfíbios diferenciam-se por não apresentar na região anterior da cabeça o capuz cefálico. A ausência desta membrana nos espermatozoides dos anfíbios, faz com que o acrossomo forme apenas uma capa afilada e delgada que reveste a região anterior do núcleo.

Um aspecto estrutural dos espermatozoides de Hyla fuscovaria e dos demais componentes do grupo rubra, e a presença de dois filamentos caudais, responsáveis pela movimentação dos espermatozoides (Fouquette & Delahoussaye, 1977).

A análise a fresco do material, não mostrou maiores detalhes das estruturas internas dos espermatozoides. Este fato leva-nos a denominar como região anterior do espermatozoide, a capa acrossomal, o núcleo e a peça média. A distinção entre núcleo, pescoço e peça média do espermatozoide é difícil de ser visualizada, e em apenas algumas preparações esta diferenciação foi possível.

Além da dificuldade de distinção da peça média, os filamentos caudais são visivelmente duplos somente a partir desta região. Por esta razão, a denominação de cauda do espermatozoide utilizada neste trabalho, refere-se à peça principal e a peça terminal que são duplas e caracterizam os espermatozoides do gênero Hyla pertencentes ao grupo rubra.

Foram observados espermatozoides ainda não totalmente maduros, podendo estes serem diferenciados pela presença de uma pequena quantidade de citoplasma margeando estruturas como o núcleo e a peça média. Outras estruturas como a peça intermediária e peça terminal (cauda) podem apresentar restos citoplasmáticos, que parecem se movimentar do núcleo do espermatozoide para a cauda, até serem finalmente destacados.

Não obstante a presença de dois filamentos caudais, apenas um dos filamentos apresentou movimento "ondulatório". A movimentação da cauda era realizada normalmente como um todo, parecendo formar uma peça única. Não se observou, em espermatozoides intactos, movimentação independente e concomitante nos dois filamentos.

Apesar da facilidade e acuidade da observação "in vivo", através da microscopia de contraste de fase, a individualização de algumas estruturas como o acrossomo e a peça média dos espermatozoides, foi prejudicada nos espermatozoides que se apresentavam inclinados, dificultando sua focalização.

A morfologia dos espermatozoides tem recebido crescente aceitação nos estudos taxonômicos de alguns grupos de anfíbios.

As análises morfológicas dos espermatozoides realizadas por Fouquette e Delahoussaye, abrangeram entre outros, três espécies do gênero Hyla. Estas espécies foram consideradas por Lutz (1973), como sinonímia de Hyla fuscovaria - A. Lutz, 1925. São estas:

Hyla fuscovaria - A. Lutz, 1925. (sintipo pertence a coleção do "Museu Natural dos Estados Unidos", sob o n 96994 e coletado em Minas Gerais - Brasil).

Hyla trachytorax - Muller & Hellmich, 1936 (Paratipo pertencente à coleção "Coleção Zoológica de Munique", n 153/1933, coletado em São Luiz - Argentina); (o outro exemplar pertence à coleção do "Museu de Carnegie, USA, n 46042, coletado em São Paulo - Brasil).

Hyla megapodia - Miranda Ribeiro, 1926; tide Gans, 1960 (pertencente à coleção do "Museu Carnegie", USA, n 3878, coletado em Santa Cruz - Bolívia).

Os espermatozoides de Hyla fuscovaria A. Lutz, 1925. Coletados nas proximidades do "campus" da Cidade Universitária de Campinas - São Paulo - Brasil, são objeto de estudo nesta tese e dados serão logo abaixo comparados com os obtidos por Fouquette e Delahoussaye (1977).

Segundo os autores, os espermatozoides do grupo Hyla rubra, podem ser subdivididos em três tipos principais dependendo da forma e tamanho da cabeça dos espermatozoides.

Os espermatozoides de Hyla fuscovaria são descritos pelos autores como pertencentes ao tipo RUBRA, apresentando cabeça cuneiforme com terminalização contínua da peça média mais larga, afilando até a região da capa acrossomal.

Os espermatozoides de Hyla trachytorax e Hyla megapodia são descritos como pertencentes ao tipo CATHARINAE, apresentando cabeça muito longa e afilada (vermiforme). O acrosso-
mo e a peça média são difíceis de serem diferenciados do núcleo dos espermatozoides, que são muito finos e delgados. Os espermatozoides do tipo CATHARINAE são os mais longos, apresentando cerca de 85 a 100 µm. Os outros tipos de espermatozoides, RUBRA e ROSTRATA, apresentam cerca de 70 µm de comprimento.

A terceira subdivisão dos espermatozoides, denominada como tipo ROSTRATA, apresenta o diâmetro do núcleo e da peça média uniforme, não havendo muita variação ao longo do comprimento da cabeça do espermatozoide. Este tipo de espermatozoide não foi encontrado nas amostras analisadas, nas três sinonímias acima relatadas.

Delahoussaye, ainda neste trabalho, afirma que a variabilidade morfológica encontrada nos espermatozoides dos anuros é grande entre espécies distintas, permitindo sua utilização como caráter taxonômico, não obstante as pequenas variações dentro da espécie e entre espécies próximas.

Os espécimens de Hyla fuscovaria aqui estudados, são reconhecidamente muito próximos dos tipos descritos por A. Lutz (1925) encontrado em Água Limpa, Minas Gerais.

Os dados morfológicos dos espermatozoides de Hyla fuscovaria, obtidos no presente trabalho demonstram que as variações são maiores do que já foi relatado para a espécie. Os espermatozoides apresentam comprimento total médio de 92,79 + 12.91 µm, valores que os enquadrariam como pertencentes ao tipo CATHARINAE, e não do tipo RUBRA como foi classificado por Fouquette e Delahoussaye (1977). Os autores não apresentaram no trabalho, citado as variações nos comprimentos dos espermatozoides, não sendo possível determinar se as figuras apresentadas representam valores médios ou danificados durante a preparação.

Os espermatozoides analisados pelos autores são, na sua totalidade, provenientes de coleções de museu e certamente apresentam inconvenientes que prejudicam as análises e visualização.

A fixação dos espermatozôides em solução de formol 10%, mostrou-se insatisfatória, tornando o material rijo e quebradiço.

A técnica de análise dos espermatozoides utilizada por Fouquette e Delahoussaye não foi descrita, o que dificulta, sobremaneira, as comparações a serem realizadas.

As análises estatísticas das variações no comprimento da região anterior e cauda dos espermatozoides de Hyla fuscovaria sugerem que cerca de 6,7 a 20 % dos espermatozoides poderiam ser considerados como morfologicamente anômalos ou alterados durante a preparação. No homem, a morfologia anormal dos espermatozôides é cerca de 20 a 25% (Macleod, 1970); e cerca de 1 a 16% em camundongos, dependendo da raça ou linhagem analisada (Miestrich e col., 1973).

Worthan e col., (1977) realizaram estudos comparativos de morfologia dos espermatozoides de salamandras pertencentes a família Plethodontidae. Neste trabalho, os autores encontraram, entre 7 populações de Desmognathus ochrphaeus, procedentes de diversas localidades geográficas, diferenças significativas no comprimento dos espermatozoides de uma das populações estudadas. A população que apresentou maiores diferenças no comprimento dos espermatozôides, estava separada das outras populações por barreira geográfica, sugerindo que o isolamento fosse responsável pela ocorrência de variações.

Fato semelhante poderia estar ocorrendo entre a Hylidae do grupo Hyla rubra e as diferenças nos espermatozoides encontradas entre exemplares estudados por Fouquette e Delahoussaye representam variações geográficas, já que os exemplares de Hyla fuscovaria são de Minas Gerais, os de Hyla trachytrax são de São Paulo e de São Luiz (Argentina) e Hyla megapodia de Santa Cruz (Bolívia).

Estes fatos indicam que maiores estudos devem ser realizados entre os Hylidae, utilizando de preferência preparações a fresco para a análise morfológica dos espermatozoides, para obter-se então dados com maior confiabilidade. Concorde, contudo, com a inclusão de Hyla fuscovaria dentro do grupo rubra, utilizando-se da morfologia dos espermatozoides como elemento taxonômico auxiliar.

Um estudo correlacionando a presença de dois filamentos caudais nos espécimens do grupo rubra, associado a outras variações na morfologia dos espermatozoides, poderia, junto com dados já conhecidos da biologia, bioacústica, citogenética, etc, elucidar a posição taxonômica dos Hylidae, ora denominados como pertencentes ao grupo Hyla rubra.

D.4 - Cariótipo de Hyla fuscovaria

D.4.1 - Variações cromossômicas numéricas.

As técnicas empregadas, ainda que suficientemente consagradas, impõem a discussão dos percalços mais comuns, o que se fará a seguir.

Explicam-se as variações comumente observadas, quanto ao número básico de cromossomos ($2n=24$) de Hyla fuscovaria, como perda ou ganho de cromossomos decorrentes da técnica de preparação utilizada. No processo de esmagamento, os fragmentos de tecidos apresentam-se amolecidos pela ação do ácido acético, e da solução hipotônica, e várias células serão rompidas pela pressão exercida sobre a lamínula que recobre o material. No esmagamento algumas células rompem-se antes que outras, podendo o conteúdo cromossômico ser carregado pelo fluxo de líquidos existente entre a lâmina e a lamínula, transportando, assim, alguns cromossomos de um local para outro. A ocorrência de não-disjunções ocasionais também deve ser considerada, sendo contudo este um evento comparativamente menos comum do que a perda e ganho de cromossomos, por problemas técnicos na preparação do material. Ambos podem levar a diferenças no número modal dos cromossomos. No nosso caso o cromossomo que aparece a mais ou que falta na preparação pode ser qualquer um dos 12 pares cromossômicos. Este fato parece não ter ocorrido em Hyla trachitorax, sinonímia de Hyla fuscovaria, analisada por Rabello (1970), que encontrou um cromossomo supernumerário em 16.2% das metáfases mitóticas e em 14.6% das metáfases I. O cromossomo supernumerário observado pela autora apresentava tamanho próximo ao dos pares 10, 11 e 12.

D.4.2 - Comparações morfométricas dos cromossomos de girinos e adultos

As medidas realizadas nos cromossomos de girinos e adultos de Hyla fuscovaria, não demonstraram após análise estatística, diferenças significativas no comprimento dos cromossomos, nos estágios estudados. Para análise de variância (multi-variada), utilizaram-se duas variáveis, média do braço longo e média do braço curto, e dois grupos, girinos e adultos. As diferenças encontradas para cada par cromossômico, não foram significativas, variando de $p = 0,01$ e $p = 0,05$ nas amostras estudadas. Estas diferenças, mesmo não sendo significativas, foram maiores ($p = 0,05$) nos cromossomos grandes, e menores nos cromossomos pequenos. Esta observação pode ser devida a maior área dos cromossomos grandes, que sofreriam maiores distorções durante a preparação. Se as alterações provocadas na preparação são iguais para os cromossomos grandes e pequenos, outro fator que poderia influenciar nas diferenças, seria a própria ampliação utilizada, que poderia comparativamente, mostrar maiores diferenças nos cromossomos grandes.

Em Hyla fuscovaria, as constrições secundárias não são conspícuas; quando aparecem, localizam-se no par XI. Beçak e Beçak (1973) observaram um maior número de constrições secundárias em cromossomos de embriões e recém-nascidos de mamíferos, répteis e no anfíbio Odontophrynus. A análise do cariótipo dos girinos de Hyla fuscovaria não demonstrou um maior número de constrições secundárias, e as observadas não são notáveis, aparecendo raramente no par 11. Esta observação parece demonstrar que não é regra geral, o aumento do número de constrições secundárias em embriões e girinos de anfíbios.

D.4.3 - Banda C

Os estudos, até agora reunidos sobre a heterocromatina, não elucidaram completamente o papel que esta entidade representaria nos sistemas biológicos. Os vários estudos bioquímicos, citológicos e estruturais da heterocromatina parecem evocar certa tendência a relacioná-la com as evoluções ocorridas a nível morfológico dos cromossomos, levando diversos grupos de organismos à especiação.

Os padrões de bandamento C tem o facilitado estudo dos processos de especiação em diversos grupos. Várias espécies muito próximas e com cariótipos idênticos apresentam diferentes padrões de banda C, revelando distribuição desigual da heterocromatina constitutiva de espécies próximas (Hsu & Arrighi, 1968; Pathak & col., 1973). A heterocromatina constitutiva, analisada através das técnicas de banda C, apresenta, dentro de diversos grupos, variações muito grandes quanto aos padrões de distribuição. As variações heterocromáticas nem sempre expressam-se em variações acentuadas das características externas do grupo. Contudo, a presença de regiões heterocromáticas no cariótipo, pode taxonomicamente representar importante dado na identificação e análise de diversos grupos, como por exemplo, no estudo dos dípteros drosophilídeos (Gall & col., 1971; Hsu, 1971; Baimai, 1977) e nos dípteros califórídeos (Ullrich, 1976).

Os trabalhos abrangendo estudos de banda C em anfíbios anuros são recentes e começaram nos meados da década de 70 com Ubara & col. (1975), que determinaram a distribuição da heterocromatina constitutiva, em Bufo bufo japonicus, com a técnica de banda C. Ruiz & Beçak (1976) realizaram estudos em Odontophrynus americanus (2n e 4n) e Odontophrynus cultripes (2n), analisando a distribuição da heterocromatina com a técnica de banda C. Heppich (1978) analisando os padrões de banda C em Rana esculenta, Rana ridibunda e Rana lessonae, confirmou os estudos de Tunner (1974), de que mecanismos de hibridogênese teriam dado origem à Rana esculenta, a partir de ovos de Rana ridibunda e espermatozoides de Rana lessonae. Schmid (1978, 1980) realizou amplos estudos sobre bandamento cromossômico em anfíbios anuros, analisando 11 famílias, englobando 48 espécies. Todos estes estudos mostram que a distribuição da banda C podem ocorrer nos centrômeros, telômeros e em regiões intersticiais dos cromossomos. As variações encontradas ocorrem de acordo com a espécie analisada.

A heterocromatina constitutiva requer condições de tratamento, muitas vezes diferentes, para evidenciar as regiões de banda C (Schnedl e Czaker, 1974). Diferentes tratamentos podem ocasionar padrões de banda C com apreciáveis modificações (Schmid, 1978 e 1980; Ruiz, 1980). Com a utilização de hidróxido de bário para denaturação dos cromossomos, pode-se evidenciar novas bandas cromossômicas alterando-se o tempo de hidrólise. Schmid (1980), conseguiu evidenciar bandas C teloméricas e centroméricas no anuro Pyxicephalus adspersus, modificando o tempo de hidrólise neste material, de 5-10 minutos para 2 minutos, propondo haver heterocromatina constitutiva nas diferentes regiões cromossômicas.

A resolução da banda C está associada com a condensação dos cromossomos. Nos anfíbios, o grau de empacotamento da cromatina é muito grande e regiões heterocromáticas podem ficar mascaradas ou serem reunidas em bandas C agregadas, devido a compactação dos cromossomos.

Estes fatos tornam possível o estudo da evolução cariotípica dentro de determinados grupos, através da análise dos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva, necessitando contudo, de grande número de informações complementares, tais como a distribuição geográfica, amplo levantamento cariotípico da espécie e de espécies próximas, até atingir o grau de conhecimento adequado para determinação das tendências evolutivas destes grupos.

D.4.3.1 - Banda C em Hyla fuscovaria

O estudo da banda C, comparando os padrões de distribuição em indivíduos jovens (girinos) e adultos de anfíbios e mesmo em outros organismos, não tinham sido realizados até o momento.

Os resultados obtidos revelam diferenças na extração dos materiais dos cromossomos, na dependência do tempo de hidrólise utilizado. As regiões de heterocromatina constitutiva, evidenciadas com tratamento menos drástico de hidrólise, apresentaram-se muito coradas. Tratamentos mais prolongados afetaram a visualização de alguns cromossomos. As variações de banda C encontradas em alguns cromossomos podem estar relacionadas com particularidades do método ou com sua eficiência em determinar regiões heterocromáticas nos cromossomos (Sumner, 1972).

As preparações obtidas a partir de esmagamento de fragmentos de tecidos, quando submetidas ao tratamento para banda C, apresentaram maior heterogeneidade de resposta. Este fato é devido principalmente a variações de espessura de material que podem influenciar o ataque de todas as soluções empregadas nas preparações.

Outro fator causador de heterogeneidade de respostas pode ser a diferente forma de associação entre as proteínas nucleares e os vários tipos de DNA repetido presentes nos cromossomos, possibilitando conformações variadas da heterocromatina constitutiva, que reagiria de maneira diferenciada, frente aos diversos tempos de hidrólise utilizados.

O conservacionismo dos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva observado em girinos e adultos de Hyla fuscovaria e que responde positivamente ao tratamento para banda C, seria esperado, visto que estas regiões heterocromáticas podem estar mantendo, nas células do organismo, funções essenciais, durante o ciclo celular.

Outros fatores poderiam estar condicionando o conservacionismo da heterocromatina constitutiva em girinos e adultos, estando relacionados com outras funções da heterocromatina. Citam-se a estabilidade conferida às regiões teloméricas dos cromossomos. Além da proteção assegurada às regiões vitais do genoma, tais como os organizadores do nucléolo, os centrômeros e determinadas regiões eucromáticas, que estariam resguardadas do impacto de agentes mutagênicos, clastogênicos, vírus e radiações (Hsu, 1975). É bem verdade que esta hipótese não é abrangente, porque banda C não é exclusivamente encontrada nos centrômeros e telômeros.

Outra função exercida por estas sequencias gênicas repetitivas pode estar relacionada com sistemas de regulação gênica, através do seu caráter estrutural e regulatório, expresso nos diferentes tecidos e nos estágios de diferenciação embrionária (Davidson & Britten, 1973).

Comparando-se os padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva, demonstrada pela técnica de banda C, entre Hyla fuscovaria e outros Hylidae do gênero, observamos algumas homologias nos padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva. Estas comparações dependem ainda de um maior número de informações para outras espécies, antes de se delinear um padrão de distribuição das regiões heterocromáticas do gênero Hyla.

A banda C centromérica, que ocorre em todos os cromossomos de Hyla fuscovaria, também apresenta este mesmo padrão de distribuição em Hyla septentrionalis e Hyla cinerea (Schmid, 1978a). Os dois Hylidae estudados por Schmid, apresentam banda C nos braços longos e curtos dos cromossomos 1, 2 e 3. Este padrão é similar ao encontrado em Hyla fuscovaria. A banda C intersticial que é encontrada no braço longo do par 11 e está associada aos organizadores do nucléolo em H. fuscovaria, tem correspondência a banda encontrada no braço longo do par 10 em H. cinerea. O braço longo do par 10 de H. septentrionalis, também apresenta organizadores do nucléolo, contudo, não se observa banda C intersticial neste cromossomo. O par 12 de H. septentrionalis e H. cinerea, apresentam similaridade com o par 12 de H. fuscovaria.

Os pares restantes, apresentam como em H. fuscovaria, heterocromatina fracamente corada pela técnica de banda C, com exceção do par 4 de H. septentrionalis, o par 6 de H. cinerea e uma banda intersticial próxima ao centrômero no par 1 de H. cinerea.

D.4.4 - Banda RON

O desenvolvimento da técnica de impregnação argêntica das regiões organizadoras do nucléolo, banda RON, permitiu a localização rápida e segura dos cistrons de rDNA. Contudo a técnica não demonstra o rDNA ou rRNA, mas sim proteínas ácidas nucleares, representadas provavelmente pelas histonas (Black & col., 1966; Utsumi & Takehisa, 1974) ou por proteínas ribonucleídas produzidas e reunidas ao redor da RON ativa (Schwarzacher e col., 1978). A técnica evidencia apenas as RONS transcricionalmente ativas na metáfase precedente.

Estes fatos levam a analisar a dinâmica da banda RON, permitindo relacionar os aspectos funcionais dos genes que codificam para RNA ribossômicos, com a atividade celular. Os aspectos funcionais da banda RON não são encontrados nas bandas C e bandas G, o que leva a analisar a banda RON de modo especial.

Os resultados obtidos utilizando a técnica de banda RON merecem a discussão dos seguintes fatos:

- Por que algumas células dos girinos teriam dois pares cromossômicos marcados pela prata?
- Por que uma das metafases analisadas apresentou cromossomos homólogos do par 11 e outro do par 12, também marcados?
- Por que as bandas da cromátide de um dos cromossomos homólogos é maior que a outra, e com maior intensidade no girino do que no adulto?

Antes de respondê-las, será necessário relatar os trabalhos abaixo.

Schmid (1982), em estudo englobando 260 espécies pertencentes a 5 subordens, 11 famílias e 23 gêneros de anuros, determinou a localização das RONS em dois pares cromossômicos e

constatou que em três animais pertencentes a três espécies ocorria apenas uma região organizadora nucleolar em todas as metáfases analisadas de cada indivíduo [espécies: Bombina variegata (Discoglossidae), Xenopus laevis (Pipidae), e Bufo fowleri (Bufonidae)]. A região correspondente nos cromossomos homólogos, que não exibia RON, nunca apresentou constrição nucleolar, não reagindo com a prata, utilizada na impregnação argêntica das RONS. Segundo Schmid (1982) a deleção completa de uma das RONS, demonstrada em 1% dos animais analisados, é mais rara do que sua duplicação.

A ausência de uma das RONS em determinado par cromossômico, estudada por Schmid, é comparável a mutação oxford em Xenopus laevis, em que a deleção de uma das RONS torna o animal heterozigoto para a presença destes genes, sendo o animal completamente viável (Elsdale e col., 1958).

Os animais heterozigotos para a mutação, apresentam uma única constrição nucleolar e apenas um único nucléolo, apresentando ainda cerca da metade da quantidade normal de DNA que hibridiza com rRNA (ou rDNA). O mutante homozigoto não apresenta constrições nucleolares, nem nucléolo, ou rDNA, e seu desenvolvimento vai até o estágio de gástrula, quando o rRNA materno não é mais funcional (Brown & Gurdon, 1964; Wallace & Birnsteil, 1966; Knowland & Miller, 1970).

Com relação a pergunta formulada quanto à presença de um par de cromossomos a mais, marcados pela prata, sugere-se uma desrepressão do gene responsável pela síntese de rRNA, supostamente presente no cromossomo 12. Quanto ao fato do girino apresentar banda RON em um cromossomo do par 11 e um outro do par 12, sugere-se a ocorrência de uma mutação, do tipo oxford, em um dos homólogos do par 11, que implicaria em não formação do nucléolo. Esta diminuição em 50% dos genes de DNA ribossômicos poderia levar a desrepressão dos genes de DNA ribossômicos situados no cromossomo 12. Neste caso citado, apenas um dos cromossomos homólogos do par 12 parece ter sido desreprimido. Um sistema como este poderia, em caso de necessidade de grande quantidade de RNA ribossômico, vir a ser utilizado, agora com a desrepressão total dos genes de DNA ribossômicos presentes no par cromossômico 12. Esta desrepressão se daria durante períodos de premente necessidade metabólica, como durante o crescimento larval.

Outra alternativa, que explicaria a criação de nova região nucleolar no cromossomo 12, seria a translocação de parte dos genes de DNA ribossômicos, tendo sua atividade regulada por algum sistema de regulação gênica.

Estudos de hibridização "in situ" com rDNA-rRNA, em Hyla fuscovaria, poderiam elucidar esta situação. Entretanto pode-se sugerir, novamente, que na dependência de maior atividade metabólica, a necessidade de rRNA para síntese proteica poderia levar a desrepressão do rDNA presentes em outros cromossomos. Algo similar ocorre no caso da replicação do DNA de Rana pipiens, onde regiões cromossômicas podem ter alterados seus padrões de replicação tardia do DNA, na dependência da diferenciação e determinação celular (Stambrook & Flickinger, 1970).

Ainda com relação a banda RON supranumérica representada por 4 nucléolos, encontrada em células interfásicas de girinos, as medidas realizadas nestes núcleos parecem não indicar tratar-se de poliploidia. Neste caso, Ruiz (1980) em extenso levantamento da heterocromatina constitutiva e organizadores nucleolares em Odontophrynus, determinou polimorfismo intrapopulacional, principalmente das bandas RONS em espécimens diplóides e tetraplóides, que apresentavam diferentes localizações dos cis-trons ribossômicos, na dependência da região geográfica e do nível de ploidia.

As diferenças de tamanho das RONS presentes nos cromossomos de girinos e adultos de Hyla fuscovaria, podem refletir maior atividade transcripcional nos organizadores nucleolares, presentes nos cromossomos dos girinos. Esta poderia ser uma forma de compensar a necessidade de maior quantidade de rRNA durante o desenvolvimento dos girinos. O fato tem apoio nos trabalhos de Schmid (1980) e McGregor e col. (1977) quando descrevem o rDNA dos anfíbios como sendo heterozigotos para o número de genes de rDNA presentes em cada bivalente.

Quanto as diferenças de tamanho das RONS, estas são vistas por Schmid (1982) apenas como aspectos da duplicação diferenciada que os cromossomos podem manifestar. Machos e fêmeas podem apresentar duplicações e mesmo triplicações em uma das RONS. Entretanto, a condição de homozigose para a duplicação ou triplicação não foram encontradas. Tal fato poderia indicar letalidade para estas condições, embora não haja explicação plausível para que uma dose em excesso de um rDNA, que já é redundante, traga distúrbios as primeiras fases do desenvolvimento.

A maior atividade de uma das RONS em girinos, quando comparadas com a atividade igual das RONS dos adultos, leva-nos a supor que devido a fatores externos, pelo menos nas gerações analisadas de girinos, esteja sendo selecionada uma das RONS maior que a outra, embora o fato não ocorra nos adultos. Ou então, uma das RONS maiores em um dos homólogos dos girinos, pode indicar, maior atividade, ou necessidade de rRNA. O aprofundamento no estudo das RONS, com técnicas de hibridização, seria de interesse no esclarecimento dos aspectos funcionais dos genes codificadores de RNA ribossômicos.

S - Sumário

Hyla fuscovaria (Amphibia - Anura), espécie pertencente à família Hylidae, e estudada com o objetivo de melhor conhecimento de sua biologia e citogenética. Alguns aspectos biológicos, como manutenção em laboratório, criação, estudo morfométrico de ovos e espermatozoides são examinados neste trabalho. A análise citogenética é apresentada para espécimens adultos e girinos. Utilizam-se técnicas convencionais de coloração e técnicas atuais de bandamento para o estudo dos cromossomos dos animais.

A espécie demonstra excelente adaptabilidade às condições de laboratório.

A análise morfométrica dos ovos e cápsulas gelatinosas é apresentada pela primeira vez nesta espécie.

As posturas coletadas na natureza e os girinos criados em aquários aerados completaram o desenvolvimento em 3 meses.

A análise morfométrica dos espermatozoides diferem dos valores encontrados na literatura, certamente devido ao estudo realizado a fresco.

Adultos e girinos, após tratamento de banda C, apresentam o mesmo padrão de distribuição das regiões de heterocromatina constitutiva. O padrão geral de distribuição das bandas, compreendem as regiões centroméricas de todos os cromossomos, várias regiões teloméricas e a região intersticial do par cromossômico 11.

As regiões organizadoras do nucléolo foram estudadas com a técnica de banda RON. Adultos e girinos apresentam uma banda no par cromossômico 11. Contudo, algumas metáfases de girinos apresentaram banda RON em outro cromossomo, o par 12.

A análise do número de nucléolos de células de girinos em interfase, com a mesma técnica de banda RON, revela pequena porcentagem, porém constante, de células com mais de 2 nucléolos. Os indivíduos adultos apresentam 1 a 2 nucléolos por célula. Os volumes dos núcleos de girinos e adultos não são significativamente diferentes.

O volume dos nucléolos dos girinos mostram-se significativamente maiores que o volume dos nucléolos dos adultos.

C - Conclusões

1. Hyla fuscovaria tem potencialidades de criação em laboratório, demonstrando-se material de fácil manipulação.

2. É esclarecida a morfologia dos espermatozoides da espécie. Propõe-se a sua utilização como elemento auxiliar nos estudos taxonômicos da família Hylidae.

3. Os cromossomos metafásicos de adultos e girinos não apresentam diferenças no comprimento relativo, índice centromérico e na relação de braços. Em relação aos adultos, esta espécie não apresenta maior número de contrações secundárias nos cromossomos dos girinos.

4. O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva é semelhante para adultos e girinos.

5. A análise das regiões organizadoras do nucléolo de cromossomos metafásicos demonstra a localização destas regiões no par cromossômico 11 de adultos. Nos girinos, esta banda também está presente no par cromossômico 11, contudo, uma banda a mais aparece no par 12. A análise de nucléolos interfásicos revela a presença de núcleos com mais de 2 nucléolos em vários tecidos de girino. Este fato, não observado até o momento em indivíduos adultos, sugere a desrepressão dos cistrons de DNA ribossômicos nos girinos, causada possivelmente por maior atividade metabólica. Os dados de volume nucleolar parecem confirmar a hipótese, porque este é 10% maior do que nos adultos.

Espera-se que os dados biológicos e citogenéticos apresentados neste estudo venham auxiliar o posicionamento de Hyla fuscovaria dentro do complexo rubra x-signata.

B. - Bibliografia

ANASTASSOVA-KRISTEVA, M. 1977.

The nucleolar cycle in man.

J. Cell Sci., 25: 103-110.

ANDRADE, G.V. e CARDOSO, A.J. 1983.

Reconhecimento do grupo Rizibilis e descrição de uma nova espécie de Hyla (Amphibia-Anura).

Rev. Brasil. Biol. - no prelo.

ARRIGHI, F.E. e HSU, T.C. 1971.

Localization of heterochromatin in human chromosomes.

Cytogenetics, 10: 81-86.

ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; PATHAK, S. e SAWADA, H. 1974.

The sex chromosomes of chinese hamster: constitutive heterochromatin deficient in repetitive DNA sequences.

Cytogenet. Cell. Genet., 13: 268-274.

ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; SAUNDERS, P. e SAUNDERS G.F. 1970.

Localization of repetitive DNA in the chromosomes of Microtus agrestis by means of in situ hybridization.

Chromosoma (Berl.), 32: 224-236.

ATCHLEY, W.R. 1972.

The chromosome karyotype in estimation of lineage relationships.

Syst. Zool., 21: 199-209.

BAIMAI, V. 1977.

Chromosomal polymorphism of constitutive heterochromatin and inversions in Drosophila.

Genetics, 85: 85-93.

BATISTIC, R.F. 1984.

Comunicação pessoal.

BATISTIC, R.F.; SOMA, M.; BEÇAK, M.L. e BEÇAK W. 1975.
Further studies on polyploid amphibians. A diploid population of
Phyllomedusa burmeisteri.
J. hered., 66: 160-162.

BATISTIC, R.F.; SOMA, M.; BEÇAK, M.L. e BEÇAK, W. 1979.
Estudo cariotípico e conteúdo de DNA em anfíbios dos gêneros
Phyllomedusa e Gastrotheca (Hylidae).
Ciência e Cultura (Supl.), 31: 559.

BAVERSTOCK, P.R.; GELDER, M. e JAHNKE, A. 1982.
Cytogenetic studies of the australian rodent, Uromys caudimaculatus,
a species showing extensive heterochromatin variation.
Chromosoma (Berl.), 84: 517-533.

BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W. e RABELLO, M.N. 1966.
Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual south
american frog Odontophrynus americanus.
Chromosoma (Berl.), 19: 188-193.

BEÇAK, M.L. e RABELLO, M.N. 1967.
Further studies on polyploid amphibians. I mitotic and meiotic aspect.
Chromosoma (Berl.), 22: 192-201.

BEÇAK, M.L. 1968.
Chromosomal analysis of eighteen species of anura.
Caryologia, 21(3): 191-208.

BEÇAK, M.L. e BEÇAK, W. 1970.
Further studies on polyploid amphibians (Ceratophrydidae). III Meiotic
aspects of the interspecific triploid hybrid: U. cultripes (2n=22) x
O. americanus (4n=44).
Chromosoma (Berl.), 31: 377-385.

BEÇAK, M.L., DENARO, L. e BEÇAK, W. 1970.
Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in amphibian.
Cytogenetics 9: 225-238.

BEÇAK, M.L. e BEÇAK, W. 1973.
Chromosome secondary constrictions in different stages of development.
Experientia, 29: 359-361.

BEÇAK, M.L. e BEÇAK, W. 1974.

Studies on polyploid amphibians karyotype evolution and phylogeny of the genus Odontophrynus.

J. Herpet., 8/4: 337-341.

BLACK, M.M. e ANSLEY, H.R. 1966.

Histone specificity revealed by ammoniacal silver staining.

J. Histochem. Cytochem., 14: 177-181.

BLAIR, W.F. 1976.

In : the amphibian visual system: amphibians, their evolutionary history, taxonomy and ecological adaptations.

Academic Press.

BLOOM, S.E. e GOODPASTURE, C. 1976.

An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes.

Hum. Genet., 34: 199-206.

BOGART, J.P. 1970.

Cromosomas em alguns gêneros de anuros.

Act. IV Congr. Latin. Zool., 1: 79-86.

BOGART, J.P. 1971.

Afinidades entre los generos de anuros en las familias pelobatidae y ceratophrynidae como se muestra por analisis cromosomico.

Act. Zool. Lilloana, 28: 19-29.

BOGART, J.P. 1973.

In: Evolutionary biology of anurans: "Evolution of anuran karyotypes".

Univ. Missouri Press. Kansas City. 337-349.

BOGART, J.P. e NELSON, C.E. 1976.

Evolutionary implications from karyotypic analysis of frogs of the families Microhylidae and Rhynophrynidae.

Herpetologica, 32/2: 199-208.

BOGART, J.P. e WASSERMAN, A.C. 1972.

Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians.

Cytogenet., 11: 1-24.

-
- BRANDON, R.A.; MARTAN, J.; WORTHAN, J.W.E. e ENGLERT, D.C. 1974.
The influence of interspecific hybridization on the morphology of the
spermatozoa of Ambystoma (Caudata, Ambystmatidae).
J. Reprod. Fert., 41: 275-284.
- BREUER, C. e PAVAN, C. 1955.
Behavior of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at
different stages of larval development.
Chromosoma, 1: 371-386.
- BRITTEN, R.J. e DAVIDSON, E.H. 1969.
Gene regulation for higher cells: a theory.
Science, 165: 349-357.
- BRITTEN, R.J. e KOHNE, D.E. 1968.
Repeated sequences in DNA.
Science, 161: 529-540.
- BROWN, S.W. 1966.
Heterochromatin.
Science 151: 417-425.
- BROWN, S.W. e GURDON, J.B. 1964.
Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolated mutant of
X. laevis.
Proc. Nat. Acad. Sci., 51: 139-146.
- BROWN, S.W. e NUR, U. 1964.
Heterochromatin chromosomes in the coccids.
Science, 145: 130-136.
- BURKHOLDER, G.D. e COMINGS, D.E. 1972.
Do the giemsa-banding patterns of chromosomes change during embryonic
development?
Exp. cell res. 75: 268-271.
- CARDOSO, A.J. 1984.
Comunicação pessoal.
- CARDOSO, A. J. e HADDAD, E.F.B. 1982.
Nova espécie de Hyla da Serra da Canastra (Amphibia, Anura, Hylidae).
Rev. brasil. biol., 42/3:499-503.

CARDOSO, A. J. e SAZIMA, I. 1980.

Nova espécie de *Hyla* do sudeste brasileiro (Amphibia, Anura, Hylidae)
Rev. brasil. biol., 40/1:75-79.

COLE, C.J. 1974.

Chromosome evolution in selected tree frogs, including casque-headed species (Pternohyla, Triprion, Hyla e Smilisca).
Amer. Museum Novitates, 2541: 1-10.

COCHRAN, 1955.

Frogs of south-eastern Brasil.
Bull. U.S. Nat. Mus., 206: 1-76.

COMINGS, D. E. 1971.

Heterochromatin of the indian muntjac.
Exp. Cell. Res., 67:441-460.

COMINGS, D. E. 1978.

Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure.
Annual Reviews Genetic, 12: 25-46.

COMINGS, D. E., AVELINO, E. e BEÇAK, W. 1973.

Heavy shoulder dna in snakes.
Cytogenet. Cell Genet., 12:2-7.

COMINGS, D. E., AVELINO, E., OKADA, T. A. e WYANDT, H.E. 1973.

The mechanisms of C- and G- banding of chromosomes.
Exp. Cell. Res., 77:469-493.

CRUZ, C.A.G. e PEIXOTO, O.L. 1982.

Uma nova espécie de *Hyla* do estado do Espírito Santo, Brasil
(Amphibia, Anura, Hylidae).
Rev. Brasil. Biol., 42: 721-724.

CZAKER, R. 1978.

Silver staining in transcriptionally active NORs of meiotic and mitotic cells in Acheta domesticus (L.) (Orthoptera).
Chromosoma (Berl.), 68:187-193.

DAVIDSON, E. H. 1969.

Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences.
Science 204:1052-1059.

- DAVIDSON, E.H. e BRITTEN, R.J. 1973.
Organization, transcription and regulation in the animal genome.
Quat. Rev. Biol., 48: 565-612.
- DOERSCHUG, E.B., MIKSCH, J.P. e STERN, H. 1976.
DNA variation and ribosomal DNA constancy in two Crepis species and
the interspecific hybrid exhibiting nucleolar organizer suppression.
Heredity, 37/3:441-450.
- DRETS, M.E. e STALL, M. 1974.
C-banding and non-homologous associations in Gryllus argentinus.
Chromosoma, 48: 367-390.
- DUELLMAN, W.E. 1963.
A review of the middle american tree frogs of the genus Ptychohyla.
Univ. Kansas Publ., Mus. Natl. Hist., 15: 205-249.
- DUELLMAN, W.E. e COLE, C.J. 1965.
Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and
Centrolenidae).
Syst. Zool., 14:139-143.
- DUELLMAN, W.E. 1967.
Additional studies of chromosomes of anuran amphibians.
Syst. Zool., 16:38-43.
- DUMERIL, A.M.C. 1806.
Zoologie analytique. Paris.
Apud Griffiths. 1963.
- DUMERIL, A.M.C. 1807.
Elements de l'histoire naturelle. Paris.
Apud Griffiths. 1963.
- DUMERIL, A.M.C. e BIBRON, G. 1841.
Erpétologie générale ou Histoire naturelle complète des
reptiles. Paris.
Apud Griffiths. 1963.
- ELLISON, J.R. e BARR, H.J. 1972.
Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late
replication and high A:T content in Samoaia leonesis.
Chromosoma (Berl.), 36: 375-390.

- ELSDALE, T.R., FISCHBERG, M. e SMITH, S.A. 1958.
A mutation that reduces nucleolar number in Xenopus laevis.
Exp. Cell. Res., 14: 642-643.
- FLAMM, W.G. 1972.
Highly repetitive sequences of DNA in chromosomes.
Int. Rev. Cytol., 32: 1-52.
- FLAMM, W.G.; WLALKER, P.M.B. e MAC CALLUM, M. 1969.
Some properties of the single-strands isolated from the DNA of the
nuclear satellite of the mouse (Mus musculus).
J. mol. Biol., 40:423-443.
- FLICKINGER, R.A., GREENE, R., KOHL, D.M. e MIYAGI, M. 1966.
Patterns of synthesis of DNA like RNA in parts of developing frog
embryos.
Proc. Natl. Acad. Scie. 56:1712-1718.
- FOUQUETTE, M.J. e DELAHOUSSEY, A.J. 1977.
Sperm morphoLogy in the Hyla rubra group (Amphibia, Anura,
Hylidae) and its bearing on generic status.
Journal of Herpetology, 11/4:387-396.
- FRENTER, J.H. 1965.
Nuclear polyanions as de repressors of synthesis of ribonucleic acid.
Nature, 206: 680-683.
- FUNAKI, K., MATSUI, S. e SASAKI, M. 1975.
Localization of nucleolar organizers in animal and plant chromossomes
by means of an improved N-banding technique.
Chromosoma (Berl.) , 49: 357-370.
- GALL, J.G.; COHEN, E.H. e POLAN, M.L. 1971.
Repetitive DNA sequences in Drosophila.
Chromosoma, 33: 319-344.
- GALL, J.G. e PARDUE, M.L. 1971.
Nucleic acid hybridization in cytological preparations. In methods
in enzymology, Academic Press, NY, 12.
- GALL, J.G. 1968.
Differential synthesis of the genes for rRNA during amphibian
oogenesis.
Proc. Nat. Acad. Sci., 60: 553-560.

GALL, J.G. e PARDUE, M.L. 1969.

Formation and delection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations.

Proc. Nat. Acad. Sci., 63: 378-383.

GANNER, E. e EVANS, H.J. 1971.

The relationship between patters of DNA replications and of quinacrine fluorescence in the human chromosome complement.

Chromosoma (Berl.), 35: 326-341.

GOIN, O.B. e GOIN, C.J. 1968.

DNA and the evolution of the vertebrates.

American Midland Naturalistic, 80/2: 289-298.

GOIN, O.B.; GOIN, C.J. e BACHMANN, K. 1968.

DNA and amphibian life history.

Copeia, 3: 532-540.

GRIFFTHS, I. 1963.

The phylogeny of the salientia.

Biol. Rev., 38: 241-292.

GOODPASTURE, C. e BLOOM, S.E. 1975.

Visualization of nucleolar organizer region in mammalian chromosomes using silver staning.

Chromosoma (Berl.), 53: 37-50.

HEITZ, E. 1928.

Jahrb. Wiss. Bot., 69: 762. Apud Yunis e Yasmineh. 1971.

HEITZ, E. 1932.

Planta 28: 571. Apud Yunis e Yasminesh. 1971.

HEITZ, E. 1933.

Z. Zellforsch. Mikrosk. Anal. Abt. Histochem., 20: 237. Apud Yunis e Yasmineh. 1971.

HENNING, W. 1972a.

Highly repetitive DNA sequences in the genome of the D. hylei. I preferencial localization in the X chromosomal heterocromatin.

J. Mol. Biol., 71: 407-417.

HENNING, W. 1972b.

Highly repetitive DNA sequences in the genome of the D. hydei. II
ocurrence in polytene tissues.

J. Mol. Biol., 71: 419-431.

HENNING, W. 1973.

Molecular hybridization of DNA and RNA in situ.

Int. Rev. Cytol., 36: 1-44.

HEPPICH, S. 1978.

Hybridogenesis in Rana esculenta: C-band karyotypes of Rana
ridibunda, Rana lessonae and Rana esculenta.

Z. Zool. Syst. Evol., 16: 27-39.

HOWELL, W.M. 1977.

Visualization of ribosomal gene activity: silver stain proteins
associated with rRNA transcribed from cloocyte chromosomes.

Chromosoma, (Berl.), 62: 361-367.

HOWELL, W.M. e BLACK, M.M. 1980.

Experientia, 36: 1014-1015.

HSU, T.C. 1971.

Heterochromatin pattern in metaphase chromosome of Drosophila
melanogaster.

Journal Heredity, 162: 285-287.

HSU, T.C. 1973.

Longitudinal differentiation of chromosomes.

Ann. Rev. Genet., 7: 153-176.

HSU, T.C. e ARRIGHI, F.E. 1971.

Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian
chromosomes.

Chromosoma, 34: 243-253.

HSU, T.C. 1975.

Chromosome structure a possible function of constitutive
heterochromatin: the bodyguard hypothesis.

Genetics, 79: 137-150.

HUMASON, G.L. 1972.

Animal tissue techniques.

3 Edition W.H. Freeman and Company.

JACKSON, R.C. 1971.

The karyotype in systematics.

Annual Review Ecology Systematics, 2: 327-368.

JOHN, H.A.; BIRNSTIEL, M.L. e JONES, K.W. 1969.

RNA-DNA hybrids at the cytological level.

Nature, 223: 582-587.

JOHN, B. e KING, M. 1982.

Meiotic effects of supranumerary heterochromatin in Heteropternis
obscura.

Chromosoma (Berl.), 85: 39-65.

JONH, B. e KING, M. 1977.

Heterochromatin variation in Cryptonbothrus chrysophorus II.

Patterns of C-banding.

Chromosoma, 65: 59-79.

JONH, B e MIKLOS, G.L.G. 1979.

Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin.

Int. Rev. Cytol, 58: 1-114.

KING, M. 1980.

C-banding studies on australian hylid frogs: secondary constriction
structure and the concept of euchromatin transformation.

Chromosoma (Berl.), 80:

KING, M. e JONH, B. 1980.

Regularities and restrictions governing C-band variation in Acridoid
grasshoppers.

Chromosoma (Berl.), 76: 123-150.

KNOWLAND, J. e MILLER, L. 1970.

Reduction of ribosomal RNA synthesis and ribosomal RNA genes in a
mutant of X. laevis which organizers only a partial nucleolus.

1. Ribosomal RNA synthesis in the embryos of different nucleolar
types.

J. Mol. Biol., 53: 321-328.

LAURENT, J.N. 1768.

Specimen medicum exhibens Synopsin Reptilium emendatumcum experientis circa venena et antidota Reptilium austriacorum. Vienna.

Apud Griffths, 1963.

LEE, J.C. e YUNIS, J.J. 1970.

Consttutive heterochromatin during early embryogenesis of Microtus agrestis.

Exp. Cell. Res., 5: 339-341.

LEE, J.C. e YUNIS, J.J. 1970.

A developmental study of coconstitutive heterochromatin in Microtus agrestis.

Chromosoma, 35: 117-124.

LEWIN, B. 1974.

Gene expression. Eucaryotic chromosomes.

Wiley-Interscience Publ. London. 467 pp.

LYON, M.F. 1961.

Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.).

Nature, 190: 372-373.

LYON, M.F. 1962

Sex chromatin and gene action in the ammalian X-chromosome.

Amer. J. human Genet., 14: 135-148.

LYON, M.F. 1968.

Chromosomal and subchromosomal inactivation.

Ann. Rev. Genet., 2: 31-52.

LYON, M.F. 1974.

Gene and chromosome inactivation.

Genetics, 78: 305-309.

LUTZ, A. 1925.

Batracies du Bresil.

Compt. Rend. Soc. Biol. Paris, 93/22: 211-224.

LUTZ, B. 1973.

Brasilian species of hyla.

Univer. Texas Press.

MACGREGOR, H.C. 1979.

"In situ" hybridization of highly repetitive DNA to chromosomes of *triturus cristatus*.

Chromosoma (Berl.), 71: 57-64.

MACGREGOR, H.C. e KEZER, J. 1971.

The chromosomal localization of a heavy satellite DNA in the testis of *Plethodon c. conereus*.

Chromosoma (Berl.), 33: 167-182.

MACGREGOR, H.C. e KEZER, I. 1973.

The nucleolar organizer of *Plethodon c. cinereus*.

Chromosoma (Berl.), 42: 415-426.

MACGREGOR, H.C.; HORNER, H.; OWEN, C.A. e PARKER, I. 1973.

Observation on centromeric heterocromatin and satellite DNA in salamanders of the genus *Plethodon*.

Chromosoma (Berl.), 43: 329-348.

MACGREGOR, H.C.; VLAD, M. e BARNETT, L. 1977.

An investigation of some problems concerning nucleolus organizers in salamanders.

Chromosoma (Berl.), 59: 283-299.

MACLEOD, J. 1970.

The significance of derivations in human sperm morphology. In: "The human testis".

Plenum Press, New York. 481 pp.

MATSUI, S. 1974.

Structural proteins associated with ribosomal cistrons in *Xenopus laevis* chromosomes.

Exp. Cell. Res., 88: 88-94.

MATSUI, S. e SASAKI, M. 1973.

Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes.

Nature, 246: 148-150.

MEISTRICH, M.L.; ENG, V.W.S. e LOIR, M. 1973.

Temperature effects on the kinetics of spermatogenesis in the mouse.

Cell. Tissue Kinet., 6: 379-384.

MENZIES, J.I. e TIPPETT, J. 1976.

Chromosome numbers of Papuan hylid frogs and the karyotype of Litoria infrafronata (Amphibia, Anura, Hylidae).
Journal of Herpetology, 10/3: 167-173.

MIGEON, B.R.; DER KALOUSTIAN, V.M.; NYHAN, W.L.; YOUNG, W.J. e CHILDS, X linked HGPRT deficiency: heterozygote has two clonal population.
Science, 160: 425-427. 1968.

MILLER, O.L. 1965.

Fine structure of lampbrush chromosomes.
Nat. Can. Inst. Monogr., 18: 79-99.

MIRANDA-RIBEIRO, A. 1926.

Notas para servirem ao estudo dos gymnobatrachios (Anura) brasileiros.
Arch. Mus. Nac., Rio de Janeiro, 27: 1-227.

MORESCALCHI, A. 1968.

Hypothesis on the phylogeny of the salientia, based on karyological data.
Experientia, 24: 964-966.

MORESCALCHI, A.; OLMO, E. e STINGO, V. 1977.

Trends of karyological evolution in pelobatoid frogs.
Experientia, 33/12: 1577-1578.

NICHOLLS, G.C. 1916.

The structure of the vertebral column in Anura Phaneroglossa and its importance as a bases of classification.
Proc. Linn. Soc. Lond., 80-92. Apud Griffiths, 1963.

NOBLE, G.K. 1931.

The biology of amphibia.
Mac Graw Hill - Book Company, Inc.

OBARA, Y., KUGANE, K. e SAITOH, K. 1975.

Distribution pattern of the constitutive heterochromatin in the chromosomes of Bufo bufo japonais Schegel.
Chrom. Inform, Serv., 18: 15-17.

OHNO, S. 1970.

Evolution by gene Duplication.
Spring-Verlag. Berlin, Heidelberg, H.Y. pp 160.

- OHNO, S.; KAPLAN, W.D. e KINOSITA, R. 1961.
X-chromosome behaviour in germ and somatic cell of
Rattus norvegicus.
Exp. Cell. Res., 22: 532-544.
- OHNO, S.; MURAMOTO, J.; CHRISTIAN, L. e ATKIN, N.D. 1967.
Diploid-tetraploid relationship among old world member of the
fish family Cyprinidae.
Chromosoma (Berl.), 23: 1-9.
- OHNO, S.; STENIUS, C.; CHRISTIAN, L.C.; BEÇAK, W. e BEÇAK, M.L. 1964.
Chromosomal uniformity in the avian subclass Carinatae.
Chromosoma (Berl.), 15: 280-288.
- OHNO, S.; WOLF, V. e ATKIN, N.B. 1968.
Evolution from fish to mammals by gene duplication.
Hereditas, 56: 169-187.
- PARDUE, M.L. e BRINSTIEL, M.L. 1972.
Cytological localization of repeated gene sequences. In moderns
aspectes of Cytogenetics: Constitutive heterochromatin in man.
Symposium SchloB. Rein hartshausen/Rein, June: 75-85.
- PARDUE, M.L. e GALL, J.G. 1970.
Chromosomal localization of mouse satelite DNA.
Science, 168: 1356-1358.
- PARDUE, M.L. e GALL, J.G. 1975.
Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparation.
Meth. Cell. Biol., 10: 1-16.
- PATHAK, S. e ARRIGHI, F.E. 1973.
Loss of DNA following C. banding procedures.
Cytogenet Cell Genet. 12 : 414-422 (1973).
- PATHAK, S.; HSU, T.C. e UTAKOJI, T. 1973.
Relationships between patters of chromosome banding and DNA synthetic:
a study on the chromosomes of the Seba s fruit bat, Carollia
perspicillata.
Cytogent. Cell. Genet., 12: 157-164.

PATTON, J.L. 1977.

B-chromosome systems in the pocket mouse, Perognathus baileyi:
meiose and C-band studies.

Chromosoma (Berl.), 60: 1-14.

PATTON, J.L. e SHERWOOD, S.W. 1982.

Genome evolution in pocket gophers (Genus Thomomys)

I-heterochromatin variation and speciation potential.

Chromosoma (Bull), 85: 149-162.

RABELLO, M.N.I. 1969.

Estudo Cromossômico de alguns Anuros brasileiros.

Tese de Mestrado. Departamento de Biologia F.F.C.L. da USP

RABELLO, M.N.I. 1970.

Chromossomal studies in Brazilian anurans.

Carylogya, 23: 45-59.

RITOSSA, F.M. e SPIELGELMAN, S. 1965.

Location of DNA Complementary to ribosomal RNA in the nucleolus
organizer region of D. melanogaster.

Proc. Nat. Acad. Sci., 53: 737-745.

RUIZ, I.R.G. 1980.

Heterocromatina constitutiva e organizadores nucleolares em
anfíbios do gênero Odontophrynus.

Tese de Doutorado. Inst. Biociências - USP.

RUIZ, I.R.G. e W. BEÇAK 1976.

Further Studies on Polyploid Amphibians. V- C Banding in diploid
and tetraploid species of Odontophrynus.

Chromosoma (Berl.), 54: 69-74.

RUIZ, I.R.G.; M.F.BONALDO e W. BEÇAK 1980.

In situ localization of ribosomal genes in a natural triploid of
Odontophrynus.

J. Hered., 71: 55-57.

RUIZ, I.R.G.; M. SOMA e W. BEÇAK 1981.

Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in
polyploid species of the genus Odontophrynus (Amphibia, Anura).

Cytogenet. Cell Genet., 29: 84-98.

SANTOS, I.L. e GIRALDEZ, R. 1982.

C-heterochromatin polymorphism and variation in chiasma localization in eurochorthippus pulvinatus gallicus (Acrididae, Orthoptera).

Chromosoma (Berl.), 85: 507-518.

SAVAGE, J.M. 1973.

In: Evolutionary biology of anurans: "The geographic distribution of frogs: patterns and predictions".

Univ. Missouri Press. Kansas City. 351-445.

SCHEMPP, W. e SCHMID, M. 1981.

Chromosome banding in amphibia VI Brd. U-replication patterns in anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in Rana esculenta.

Chromosoma (Berl.), 83: 697-710.

SCHNEIDL, W. e CZAKER, R. 1974.

centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat and sheep chromosomes (Bovidae).

Cytogenet. Cell. Genet., 13: 246-255.

SCHMID, M. 1978.

Chromosome banding in amphibia I-constitutive heterochromatin and nucleolus organizer region in Bufo and Hyla.

Chromosoma (Berl.), 66: 361-388.

SCHMID, M. 1979.

Chromosome banding in amphibia III-sex chromosomes in triturus.

Chromosoma (Berl.), 71: 29-55.

SCHMID, M. 1979.

On the Arrangement of Chromosomes in the elongated Sperm Nuclei of Anura (Amphibia).

Chromosoma (Berl.), 75: 215-234.

SCHMID, M. 1980.

Chromosome banding in amphibia IV-differentiation of GC and AT-rich chromosome regions in anura.

Chromosoma (Berl.), 77: 83-103.

SCHMID, M. 1980.

Chromosome banding in amphibia V-highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in Pyxicephalus adspersus (Anura, Ranidae).

Chromosoma (Berl.), 80: 69-96.

- SCHMID, M.; LOSER SCHMIDTKE e ENGEL W. 1982.
Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. Chromosoma (Berl.), 86: 149-179.
- SCHMID, W. 1982.
Chromosome banding in amphibia VII-analysis of the structure and variability of NORs in anura. Chromosoma (Berl.), 87: 327-344.
- SIEGER, M.; GARWEG, G. e SCHWARZACHER, H.G. 1971.
Constitutive heterochromatin in *Microtus agrestis*: binding of actinomycin-D and transcriptional inactivity. Chromosoma, 35: 84-98.
- SIEGER, M.; PERA, F. e SCHWARZACHER, H.G. 1970.
Genetic inactivity of heterochromatin in *Microtus agrestis*. Chromosoma, 29: 349-364.
- SMITH, S.G. 1965.
Heterochromatin, colchicine and karyotype. Chromosoma, 16: 162-165.
- SOMA, M. 1981.
Variabilidade do conteúdo de DNA nuclear em alguns anfíbios anura. Iese de Doutorado. Inst. de Biociências - USP - SP.
- SCHWARZACHER, H.G.; MIKELSAAR, V. e SCHNEDD, W. 1978.
The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Cytogenet. Cell. Genet., 20: 24-39.
- STAMBROOK, P.J. e SLICKINGER, R.A. 1970.
Changes in chromosomal DNA replication patterns in developing frog embryos. J. Exp. Zool., 174: 101-114.
- STEPHENSON, E.M. e STEPHENSON, N.G. 1970.
Karyotypes of two Australian hylids. Chromosoma (Berl.) 30, 38-50 (1970)
- SUMNER, A.T. 1972.
A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Expt. Cell. Res., 75: 304-306.

TAYLOR, E.F. e KOLLROS

Stages in the normal developement of Rana pipiens larvae.
Anat. Rec., 94: 7-14.

TAYLOR, E.F. e MARTIN-DeLEON, P.A. 1980.

Comparison of N banding and silver staining of human NORs.
Hum. Genet. 54: 217-219.

TUNNER, H.C. 1974.

Die Klonale struckurliner Wasserfrosch population.
Z. Zool. Syst. Evolut., 12: 309-314. Apud heppich, 1978.

ULLERICH, F.H. 1976.

Chromosomen verhaltnisse, konstitutives. Heterochromatin und
Geschlechtsbestimmung bei einigen. Artender Gattung Chrysomya
(Calliphoridae, Diptera).
Chromosoma, 58: 113-136.

UTSUMI, S. e TAKEHISA, S. 1974.

Heterochromatin deifferentiation in Irillium kantschatieum by
ammoniacal silver reaction.
Exp. Cell. Res., 86: 398-401.

VIZOTTO, L.D. 1967.

Desenvolvimento de anuros da regioao norte-ocidental do estado de São
Paulo.
Fac. Fil. Cie. Let. São Jose do Rio Preto Zoologia, especial, 161pp.

VLAD, M. 1977.

Quantitativa studies of rDNA in amphibions.
J. Cell. Sci. 24: 109-188.

WALKER, P.M.B. e McCLAREN, A. 1965.

Nature, 208: 1175. apud Yunis e Yasmineh, 1971.

WALLACE, H. e BIRNSTIEL, M.L. 1966.

Ribosomal cistrans and the nucleolar organizer.
Biochem. Biophys. Acta, 114: 296-310.

WANGLES, J. 1830.

Naturliches System der Amphibien. Munich.
Apud Griffths, 1963.

WARD, O.G. 1977.

Dimorphic nucleolar regions in the frog Rana blairi.

Canad. J. Genet. Cytol., 19: 51-57.

WENTWORTH, S.L. e ROBERTS, B. 1979.

Measure of volume changes in the nucleus and nucleolus of Sarcophaga bullata (Diptera sarcophagicae).

Aust. J. Zool., 27: 205-211.

WHITE, M.J.D. 1973.

Animal cytology and evolution.

Cambridge University Press. London, 961 pp.

WOODDRUFF, D.S. 1972.

Australian anuran chromosome numbers.

Herpetological reviews, 4/6: 208.

WORTHAN, J.W.E.; BRANDON, R.A. e MARTAN, J. 1977.

Comparative morphology of some plethodontid salamander spermatozoa.

Copeia, 4: 666-680.

YASMINEH, W.G. e YUNIS, J.J. 1969.

Satellite DNA in mouse autosomal heterochromatin.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 35: 779-782.

YASMINEH, W.G. e YUNIS, J.J. 1970.

Localization of mouse satellite DNA in constitutive heterochromatin.

Exp. Cell. Res., 5: 69-75.

YASMINEH, W.G. e YUNIS, J.J. 1971.

Repetitive DNA of *Microtus agrestis*.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 43: 580-587.

YUNIS, J.J.; ROLDAN, L.; YASMINEH, W.G. e LEE, J.C. 1971.

Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes.

Nature New Biol., 231: 535-533.

YUNIS, J.J. e YASMINEH, W.G. 1971.

Heterochromatin satellite DNA and cell function.

Science, 174: 1200-1209.