



FERNANDO ANANIAS

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA  
DE ESPÉCIES E SUBESPÉCIES DO GRUPO  
*pulchella* (AMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE)**

Este exemplar corresponde à redação final da tese de Fernando Ananias (candidato a) *Fernando Ananias*  
e aprovada pela Comissão Julgadora. *02/7/96 S. Recco-Pimentel*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular.

Orientadora  
Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

Campinas, 1996



CM-00090905-8

DATA:	BC
CHAMADA:	f/UNICAMP
	An14c
Ed.	
PROB.	28.268
C.	667/96
	<input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/> X
CO.	R\$ 11,00
A.	15/08/96
CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

An14c

Ananias, Fernando

Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo *pulchella* (Anura, Hylidae) / Fernando Ananias.  
-- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Shirlei Maria Recco-Pimentel.

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

1. Heterocromatina. 2. Cromossomos. 3. Cariotipos.
4. Anfíbio. 5. Citogenética. I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 22 de Julho de 1996

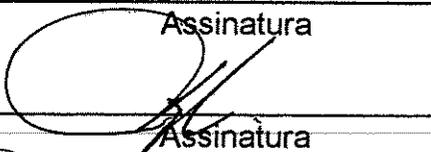
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

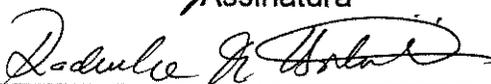
Profa.Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

  
Assinatura

Prof. Dr. Jorge Jim

  
Assinatura

Profa.Dra. Radenka Francisca Batistic

  
Assinatura

SUPLENTE:

Profa.Dra. Maria Lúcia Furlan Wada

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## *DEDICATÓRIA*

*“ O segredo da existência humana, consiste não somente em viver, mas ainda em encontrar um motivo de viver ”*

Dostoi Evisk

Dedico esta tese a minha mãe (*in memoriam*), pelo incentivo ao conhecimento e pela determinação e persistência que deixou como lição. Ofereço ainda, aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Shirlei M. Recco-Pimentel, pela sua paciência, orientação, apoio e amizade, indispensáveis à realização deste trabalho.

Ao Prof. Adão J. Cardoso, pela proposta de trabalho, apoio nas coletas e identificação dos espécimes.

À Profa. Radenka Francisca Batistic, ao Prof. Jorge Jim e à Profa. Maria Lúcia Furlan Wada, pelas discussões e sugestões feitas na análise deste trabalho.

Aos zoólogos Giovanni Vinciprova, Paulo Cristiano Garcia, Jorge Jim, Ariovaldo S. Giaretta e Geisa Amadio, pela ajuda durante as coletas dos espécimes estudados.

À Klélia, técnica Departamento de Biologia Celular pelos ensinamentos, apoio e amizade fortalecida durante esses anos.

À Profa. Heide Dolder pela simpatia e eficiência com que sempre atendeu aos pedidos de revisão os textos em inglês.

À Profa. Ligia Krauzi do Laboratório de Herpetologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Prof. Maurício L. V. Amaral do Laboratório de Biologia Celular e Embriologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, por cederem espaço no laboratório para o processamento de alguns espécimes.

Aos motoristas do Instituto de Biologia, Toninho e Elcio pela eficiência condução até os locais de coleta.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica por ter permitido algumas vezes o uso da câmara escura.

Ao técnico do Departamento de Parasitologia, Rubens e ao amigo Celso, pela ajuda e ensinamentos prestados na utilização dos computadores.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular pela amizade adquirida nestes anos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, Cidinha, Liliam, Sidney e Irma, pela simpatia, atenção e eficiência com que sempre me atenderam, além da amizade conquistada.

Aos colegas de laboratório: Luciana, Maurício, Patricia, Klélia, Guido, Márcio, Marta, Jairo, Odair, Rafael e Josi, pela descontração no dia-a-dia.

Aos amigos de pós-graduação, principalmente: Luciana, Patricia, Paula, Maurício, Estela, Márcio, Dani e Silvia pelo agradável convívio destes anos.

Aos estagiários Odair e Rafael pela contribuição prestada, amizade e companheirismo.

Aos amigos de graduação: Sô, Pati, Dito, Lú e Terezinha, pelas rizadas e momentos inesquecíveis que vivemos juntos.

À amiga Sô pelo grandioso apoio prestado em todos os momentos desta caminhada, sempre induzindo a busca de uma paz interior.

À CAPES e FAEP-UNICAMP, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

---

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	III
<b>ABSTRACT</b>	V
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
1.1. Panorama geral dos Anfíbios	01
1.2. A ordem Anura	02
1.3. A família Hylidae: características gerais	03
1.3.1. Grupo <i>pulchella</i> de <i>Hyla</i>	04
1.3.2. As espécies em estudo	05
1.4. O estudo do cariótipo em Hylidae	11
1.5. Citogenética do grupo <i>pulchella</i>	15
1.6. A região organizadora nucleolar (NOR)	16
1.6.1. Aspectos gerais da morfologia e fisiologia	16
1.6.2. Métodos utilizados para evidenciar a NOR	18
1.6.3. NOR em anuros	21
1.7. Heterocromatina	24
1.7.1. Aspectos gerais	24
1.7.2. Método de banda C	27
1.7.3. Heterocromatina em anuros	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
3.1. Obtenção das espécies	33
3.2. Obtenção de células mitóticas e meióticas	34
3.2.1. Processamento dos espécimes	34
3.2.2. Preparação de lâminas	34
3.3. Coloração convencional com Giemsa	36
3.4. Banda C	36
3.4.1. Banda C para intestino	37
3.4.2. Banda C para medula	37
3.5. Impregnação pela prata (Ag-NOR)	38
3.6. Montagem das lâminas e observação	38
3.7. Fotografias	38
3.8. Montagem dos Cariótipos	39

<b>4. RESULTADOS</b>	41
4.1. <i>Hyla prasina</i>	41
4.1.1. Descrição do cariótipo	41
4.1.2. Banda C	41
4.1.3. NOR	42
4.2. <i>Hyla caingua</i>	43
4.2.1. Descrição do cariótipo	43
4.2.2. Banda C	43
4.2.3. NOR	44
4.3. <i>Hyla pulchella pulchella</i>	44
4.3.1. Descrição do cariótipo	44
4.3.2. Banda C	45
4.3.3. NOR	45
4.4. <i>Hyla semiguttata</i>	46
4.4.1. Descrição do cariótipo	46
4.4.2. Banda C	46
4.4.3. NOR	47
4.5. <i>Hyla pulchella joaquini</i>	47
4.5.1. Descrição do cariótipo	47
4.5.2. Banda C	48
4.5.3. NOR	48
4.6. Comparação entre as espécies estudadas	48
4.7. NOR na espermatogênese	49
<b>5. DISCUSSÃO</b>	75
5.1. Cariótipo	75
5.2. Constrição secundária e NOR	78
5.3. NOR na espermatogênese	81
5.4. Banda C e heterocromatina	83
5.5. Implicações taxonômicas	85
<b>6. CONCLUSÕES</b>	87
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	89

## RESUMO

O complexo *pulchella* de *Hyla*, anteriormente conhecido genericamente como *Hyla raddiana*, consiste de populações encontradas no Brasil, Uruguai e Argentina, e tem sido dividido em várias formas geograficamente bem definidas. Fazem parte deste grupo: *Hyla pulchella pulchella*, *H. pulchella joaquinii*, *H. semiguttata*, *H. prasina*, *H. caingua*, *H. pulchella cordobae*, *H. pulchella riojana* e *H. pulchella andina*, sendo que as cinco primeiras foram analisadas neste trabalho através do estudo do cariótipo, do padrão de banda C e da localização da NOR em células do epitélio intestinal, medula óssea e testículo.

Todas as espécies analisadas neste trabalho possuem  $2n = 24$  cromossomos, com padrão morfológico constante sendo que os pares 1, 8, 11 e 12 são metacêntricos; os pares 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10 submetacêntricos e o par 6 acrocêntrico, com exceção de *H. p. joaquinii* que apresenta o par 11 submetacêntrico e o par 10 metacêntrico. Não foi encontrado nenhum heteromorfismo cromossômico nos exemplares analisados.

Em *H. caingua* e *H. p. pulchella* foi encontrada constrição secundária coincidindo com a localização da NOR. A não detecção de constrição secundária nas demais espécies pode ser atribuída ou a sua ausência ou ao grau de empacotamento dos cromossomos. Todas as espécies apresentaram apenas uma NOR ativa e não foi encontrada heterocromatina associada a esses cístrons. Na espermatogênese, a marcação pela prata foi observada até o paquíteno e em espermátide em espermição. A marcação em espermátides pode ser atribuída a "vacúolos" contendo material resultante da desintegração nucleolar.

Todas as espécies, com exceção de *H. p. pulchella*, apresentaram heterocromatina centromérica em quase todos os cromossomos, e algumas bandas intersticiais comuns à maioria das espécies analisadas. Foram também encontradas

diferenças inter e intrapopulacionais em *H. prasina* quanto à distribuição da heterocromatina.

As características cariotípicas e os padrões de banda C e de NOR obtidos permitiram-nos verificar que tais espécies e subespécies podem ser reconhecidas por esses padrões. Porém, *H. prasina* (as três populações) e *H. semiguttata* podem ser consideradas mais próximas entre si e *H. p. joaquina*, pode ser considerada uma espécie não pertencente ao grupo *pulchella*, uma vez que também sua morfologia e padrão de canto são bastante diferenciados em relação às demais espécies aqui estudadas.

## ABSTRACT

The *pulchella* group of *Hyla*, previously generically known as *Hyla raddiana*, consists in populations found in Brazil, Uruguai and Argentina. This group has been divided in others geografically in well defined groups: *H. pulchella pulchella*, *H. p. joaquina*, *H. semiguttata*, *H. prasina*, *H. caingua*, *H. p. cordobae*, *H. p. riojana* and *H. p. andina*. The former five were analysed in this study through karyotype analysis, heterochromatin patterns and NOR localization in gut epithelium, bone marrow and testis.

All species analysed in this work have  $2n = 24$  chromosomes, with a similar morphological pattern. They present the pairs 1, 8, 11 and 12 as metacentric; 2, 3, 4, 5, 7, 9 and 10 as submetacentric and the pair 6 as acrocentric, excepting *H. p. joaquina* whose pair 11 is submetacentric and pair 10 metacentric. Heteromorphism indicating the presence of sex chromosomes in males was not found.

The chromosomes of *H. caingua* and *H. p. pulchella* showed a secondary constriction coincident with the NOR position. Secondary constriction were not detected in the others species, possibly due to the degree of chromosome compacting or because they really do not occur. All species presented only one active NOR and absence of heterochromatin associated to this site. During spermatogenesis a positive Ag-impregnation of the nucleolus was observed up to the pachytene and in spermatid during spermiation. The Ag-impregnation in spermatids may be attributed to the nuclear "vacuole" which contains desintegrated nucleolar material.

All species, except *H. p. pulchella*, showed centromeric heterochromatin and common interstitial bands in common among them. Inter- and intrapopulational differences in the heterochromatin distribution were found in *H. prasina*.

The karyotypes, C-band and NOR patterns permitted the recognition of these species and subspecies. However, through these cytogenetic analysis, we concluded

that *H. prasina* ( the three populations) and *H. semiguttata* would be considered more related to each other, and that *H. p. joaquini*, do not belong to the *pulchella* group. This result is reinforced by the difference in the morphology and calls patterns of this species in relation to the other species.

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1. Panorama geral dos Anfíbios

A classe Amphibia está dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (DUELMAN & TRUEB, 1986).

As subclasses Labyrinthodontia e Lepospondyli foram as pioneiras sobre a face da Terra há cerca de 350 milhões de anos, tendo se extinguido após 200 milhões de anos (POUGH *et al.*, 1993).

Acredita-se que a subclasse Lissamphibia (liss = liso) apareceu no período Jurássico da era Mesozóica, há cerca de 200 milhões de anos (POUGH *et al.*, 1993). Até pouco tempo, acreditava-se que o mais antigo fóssil relativamente completo de anfíbio poderia ser *Triadobatrachus*, um possível anuro do Triássico inferior. Recentemente SHUBIN *et al.* (1995) confirmaram a existência de fósseis do período Jurássico inferior, indicando que *Prosalirus bitis* é o mais antigo fóssil de anura, sendo tão especializados quanto as formas modernas

Recentemente, dois estudos independentes propuseram que os Lissamphibia são um grupo-irmão monofilético dos Branchiosauria (Temnospondyli) (deQUEIRÓS & CANNATELLA, 1987; TRUEB e CLOUTIER, 1987).

Segundo DUELLMAN e TRUEB (1986), a subclasse Lissamphibia possui cerca de 4.000 espécies distribuídas em três ordens: Urodela (ou Caudata), que representa as salamandras com aproximadamente 350 espécies; Gymnophiona que representa as cobras-cegas, com cerca de 170 espécies e Anura, representada pelos sapos, rãs e pererecas com cerca de 3.500 espécies.

## 1.2. A ordem Anura

Em contraste com o número limitado de espécies de salamandras e cobras-cegas e com a distribuição geográfica restrita destes animais, os anuros incluem cerca de 3.500 espécies e ocorrem em todos os continentes, exceto na Antártida, apresentando 77% de suas famílias com centro de distribuição tropical e 14% em áreas subtropicais do Hemisfério Norte (ALMEIDA, 1984; POUGH *et al.*, 1993).

De acordo com FROST (1985), a ordem Anura é dividida em 26 famílias: Leiopelmatidae, Ascaphidae, Discoglossidae, Bombinatoridae, Rhinophrynidae, Pipidae, Pelobatidae, Pelodytidae, Myobatrachidae, Leptodactylidae, Heleophrynidae, Bufonidae, Brachycephalidae, Rhinodermatidae, Dendrobatidae, Pseudidae, Hylidae, Pelodyadidae, Centrolenidae, Microhylidae, Sooglossidae, Ranidae, Hemisiiidae, Arthroleptidae, Hyperoliidae e Rhacophoridae.

Os anuros apresentam distribuição geográfica muito variada. Alguns ranídeos e hílídeos habitam, por exemplo, a Serra Nevada da Califórnia, acima de 3.650 metros e a região dos Andes, acima de 4.870 metros (STORER *et al.*, 1989; POUGH *et al.*, 1993).

Na ordem Anura de maneira geral, o encontro entre os sexos dá-se por orientação sonora. O macho vocaliza com o intuito de atrair a fêmea e, às vezes, também para afastar os machos de sua própria espécie (DIOTTO, 1989). O canto é diversificado, variando de acordo com a espécie, sendo que, a maioria possui dois ou três tipos diferentes de canto, utilizando-os em diferentes situações. As características do canto servem para identificar a espécie e o sexo do animal que o emite (LUTZ, 1973; STORER *et al.*, 1989; POUGH *et al.*, 1993).

Um canto específico da espécie é considerado um caráter evolutivo conservativo e táxons aparentados frequentemente apresentam cantos similares (POUGH *et al.*, 1993).

A fêmea é quem escolhe o macho para o amplexo, sendo esta forma de acasalamento diferente da cópula por não ter órgão introdutório. A fêmea deposita os ovos em um local apropriado, por exemplo na água, sob folhiço de mata ou armazenados em câmaras especiais do corpo (marsúpio). Até 10.000 ovos podem ser postos em uma única desova (DIOTTO, 1989; STORER *et al.*, 1989; POUGH *et al.*, 1993).

### 1.3. A família Hylidae: características gerais

Esta família compreende anuros arborícolas, que usualmente possuem cabeça e olhos grandes e, frequentemente, cintura delgada e patas longas. Muitas espécies das famílias Hylidae e Rhacophoridae possuem discos digitais aumentados e são denominados pererecas (POUGH *et al.*, 1993). É um grupo recente que apareceu primeiramente no Paleoceno e acredita-se ser derivado dos leptodactídeos (CHANTELL, 1964).

De acordo com DUELLMAN (1970) a família Hylidae foi primeiramente dividida em quatro subfamílias: Amphignathodontinae, Hemiphractinae, Hyalinae e Phyllomedusinae. Porém, TRUEB (1974) demonstrou que as subfamílias Amphignathodontinae e Hemiphractinae possuem relações muito próximas, sugerindo que sejam incluídos em apenas uma subfamília, Hemiphractinae (Apud FROST, 1985), totalizando, portanto três.

A subfamília Hyalinae é constituída pelos gêneros: *Hyla*, *Acris*, *Limnaoedus*, *Osteopilus*, *Parapseudacris*, *Allophryne*, *Anotheca*, *Aparasphenodon*, *Argentohyla*, *Calyptahyla*, *Corynthomantis*, *Nyctimantis*, *Osteocephalus*, *Phrynohyas*, *Phyllodytes*, *Plectrohyla*, *Pternohyla*, *Ptychohyla*, *Sphaenorynchus*, *Trachycephalus*, *Triprion*, *Scarthyla*, *Scinax*, *Pseudacris* e *Smilisca*, todos possuindo uma distribuição geográfica bastante variável, habitando a América do Norte e do Sul, oeste da Índia,

região Australo-Papua, Eurásia incluindo o extremo norte da África e o Arquipélago japonês (FROST, 1985).

Segundo FROST (1985), a família Hylidae é constituída por 37 gêneros, com pelo menos 635 espécies. Porém, DUELLMAN (1988) revisando a classificação e distribuição das espécies, indicou 36 gêneros e aproximadamente 660 espécies. Entre essas, 40% fazem parte do gênero *Hyla* sendo que destas, somente 28 espécies ocorrem na região Holoártica (ANDERSON, 1991).

ANDERSON (1991) supõe que o gênero *Hyla* tenha surgido na América do Sul e se expandido rapidamente por todo o continente; porém, com o aumento do nível do mar, o grupo do norte foi separado do grupo do sul por aproximadamente 65 milhões de anos, sendo em seguida reestabelecida a ligação.

### 1.3.1. Grupo *pulchella* de *Hyla*

LUTZ (1973) e CEI (1980) descreveram as espécies deste grupo como tendo tamanho médio e formas largas, assim como cabeça curta, dentes vomerianos, rudimento tubercular de um polegar mais ou menos reduzido e dedos levemente palmados.

De acordo com BARRIO (1965) e LUTZ (1973), o complexo *pulchella*, anteriormente conhecido genericamente como *Hyla raddiana*, consiste de populações encontradas no Brasil, Uruguai e Argentina, e tem sido dividido em várias formas geograficamente bem definidas. Fazem parte deste grupo: *Hyla pulchella pulchella*, *H. pulchella joaquina*, *H. pulchella cordobae*, *H. pulchella riojana*, *H. pulchella andina* e *H. semiguttata* (Apud CEI, 1980), *H. prasina* (LUTZ, 1973) e *H. caingua* (CARRIZO, 1990). KLAPPENBACH e LANGONE (1992), consideram que *H. guentheri*, tendo como localidade tipo Rio Grande, possa fazer parte deste grupo.

### 1.3.2. As espécies em estudo.

#### *Hyla prasina* Burmeister, 1856. (Figura 1A e B)

*H. prasina* foi descrita por Burmeister em 1856, e foi considerada durante algum tempo como sinônimo de *H. p. pulchella*, porém alguns caracteres como por exemplo o padrão de canto que em *H. prasina* é parecido com *carará, carará*, difere do encontrado para *H. p. pulchella*. Possui tamanho relativamente grande comparado às outras do grupo, aproximadamente 55 mm, apresentando um padrão de coloração diferenciado entre os espécimes, variando do marrom ao verde, com uma lista dorso-lateral prateada e pontos escuros nos membros inferiores (LUTZ, 1973).

Possui uma distribuição geográfica moderada, sendo encontrada na região Sudeste do Brasil (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), tendo como localidade tipo Nova Friburgo no Rio de Janeiro (FROST, 1985).

#### *H. caingua* Carrizo, 1990. (Figura 2A)

Devido à grande similaridade morfológica, tanto *H. caingua* quanto *H. semiguttata* são confundidas entre si e com *H. p. pulchella*. É uma espécie relativamente pequena com aproximadamente 34 mm, com extremidades delgadas, discos digitais pouco desenvolvidos e com coloração marrom-claro. Apresentam três linhas longitudinais tortuosas com bordas irregulares e às vezes difusas, parecido com *H. semiguttata* e *H. p. pulchella*. O canto tem padrão complexo que lembra *H. p. pulchella*, constituído de sons metálicos e agudos enquanto *H. semiguttata* o som é grave e monossilábico (CARRIZO, 1990).

Sua distribuição é bastante localizada, ocorrendo no noroeste da província de Misiones e nordeste de Corrientes, na Argentina (CARRIZO, 1990). No Brasil, de

acordo com o trabalho desenvolvido por ROSSA-FERES e JIM (1994), *H. caingua* ocorre na região de Botucatu, São Paulo, e também no oeste dos Estados de São Paulo e Paraná (A.J. CARDOSO, comunicação pessoal). Sua localidade tipo é Misiones, Argentina.

*Hyla semiguttata* Lutz, 1925. (Figura 2B)

Esta espécie foi descrita com base em um espécime recebido das Serras do norte de Santa Catarina e se caracteriza pela presença de três bandas longitudinais escuras, possuindo uma coloração parda. Esta espécie possui tamanho médio, corpo levemente robusto parecido com *H. p. pulchella*, porém seus membros são mais finos e pernas longas. Sua coloração em vida é marrom esverdeada, com três bandas longitudinais escuras na superfície dorsal, sendo que às vezes as bandas mostram-se fragmentadas em grandes manchas, semelhante a *H. caingua*. (LUTZ, 1973; CEI, 1980). CARRIZO (1990) descreve em alguns espécimes a presença de bandas fragmentadas e em outros ausência das mesmas. Apresentam também, uma banda lateral escura, encontrada nas outras espécies do grupo.

Possui tamanho de aproximadamente 40 mm, sendo encontrada em Misiones (Argentina), Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Brasil) (LUTZ, 1973; CEI, 1980; FROST, 1985). Sua localidade tipo é São Bento do Sul, Santa Catarina (FROST, 1985).

Esta espécie foi considerada erroneamente como um sinônimo de *H. polytaenia*, porém sua ecologia e muitas outras características lhe conferem uma similaridade muito grande com *H. p. pulchella*, tendo sido agrupada como tal (LUTZ, 1973; CEI, 1980; CARRIZO, 1990). *H. pulchella pulchella* Duméril e Bibron, 1841. (Figura 3A)

*H. pulchella* é uma espécie politípica que se caracteriza pela sua grande dispersão e potencial biótico. Sua variabilidade intraespecífica levou a sua redescritção com diferentes denominações (BARRIO, 1965).

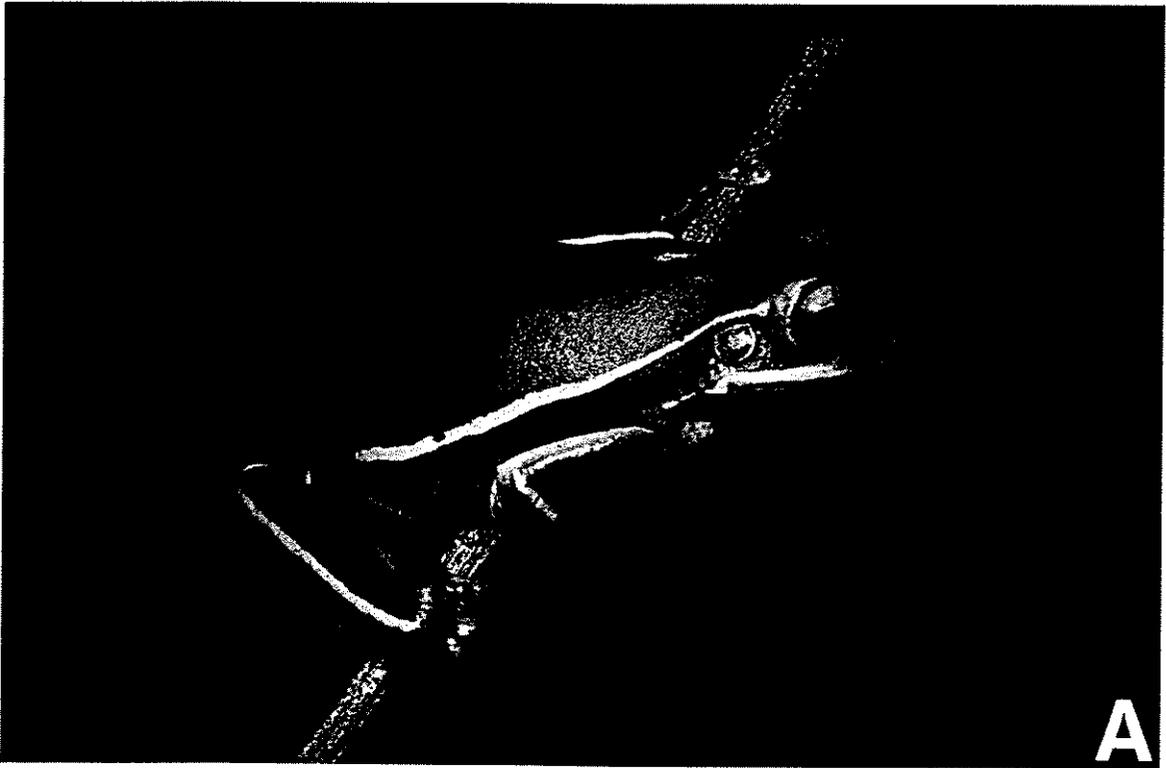
Possui tamanho que varia de 37 a 50 mm, apresentando coloração entre o pardo e o verde. Distribui-se de Santa Catarina até o Rio Grande do Sul (Brasil) e Uruguai. Na Argentina pode ser encontrada em Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fé, na província de Buenos Aires e norte da província de Río Negro (CEI, 1980). FROST (1985) se refere ainda a esta mesma subespécie na Bolívia e Sul do Paraguai, tendo como localidade tipo Montevideo, Uruguai.

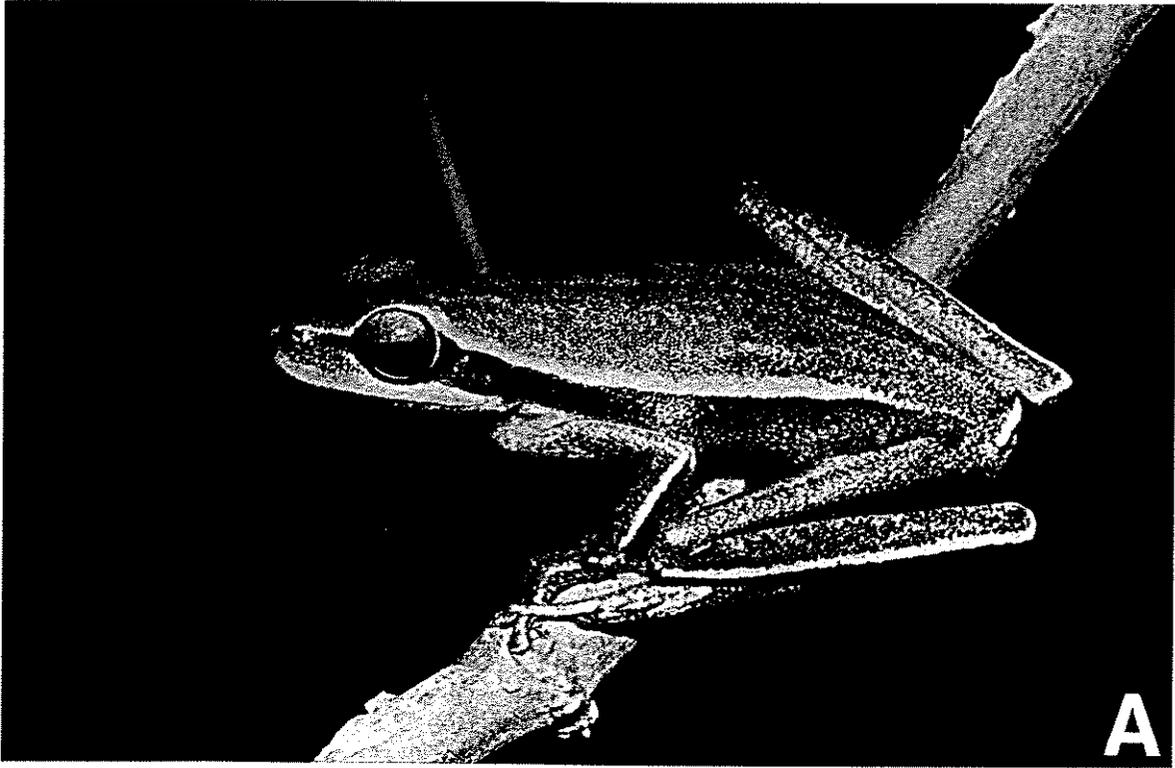
De acordo com CARRIZO (1990), esta espécie possui padrão de canto complexo muito próximo de *H. caingua*, constituindo-se de sons metálicos agudos. Além de ser confundida com *H. caingua*, muitas vezes confunde-se também com *H. semiguttata*, pela similaridade morfológica.

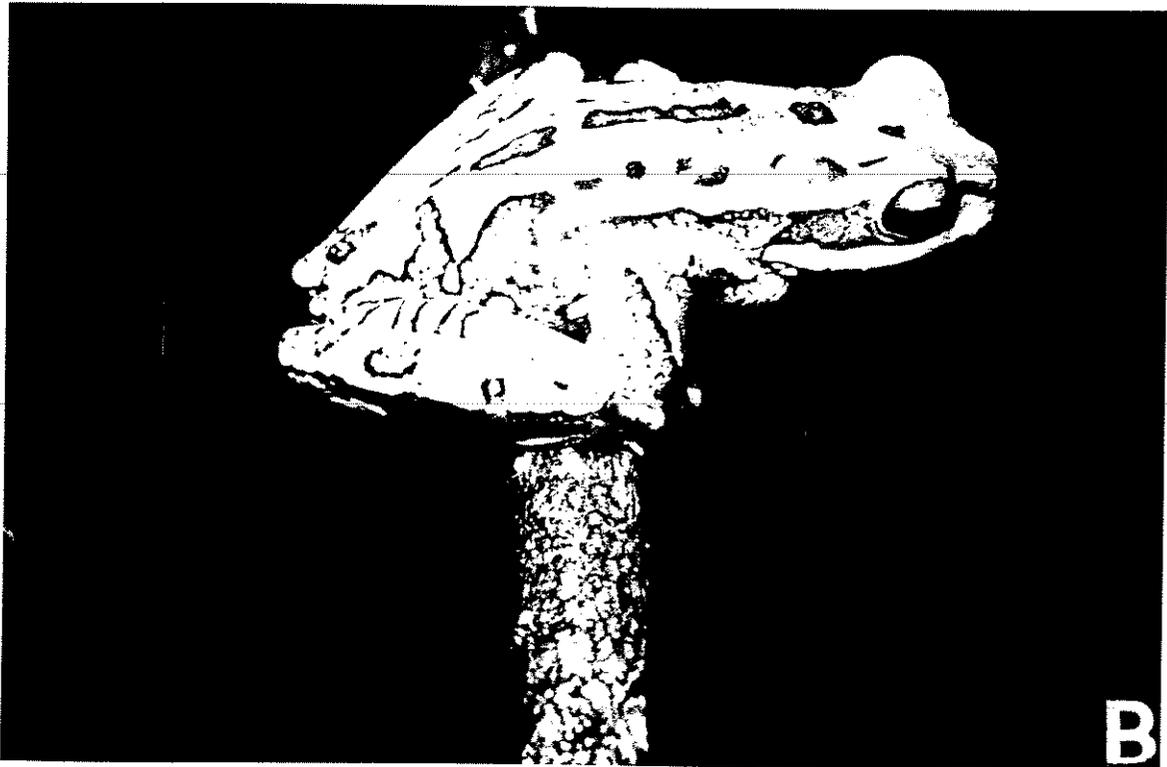
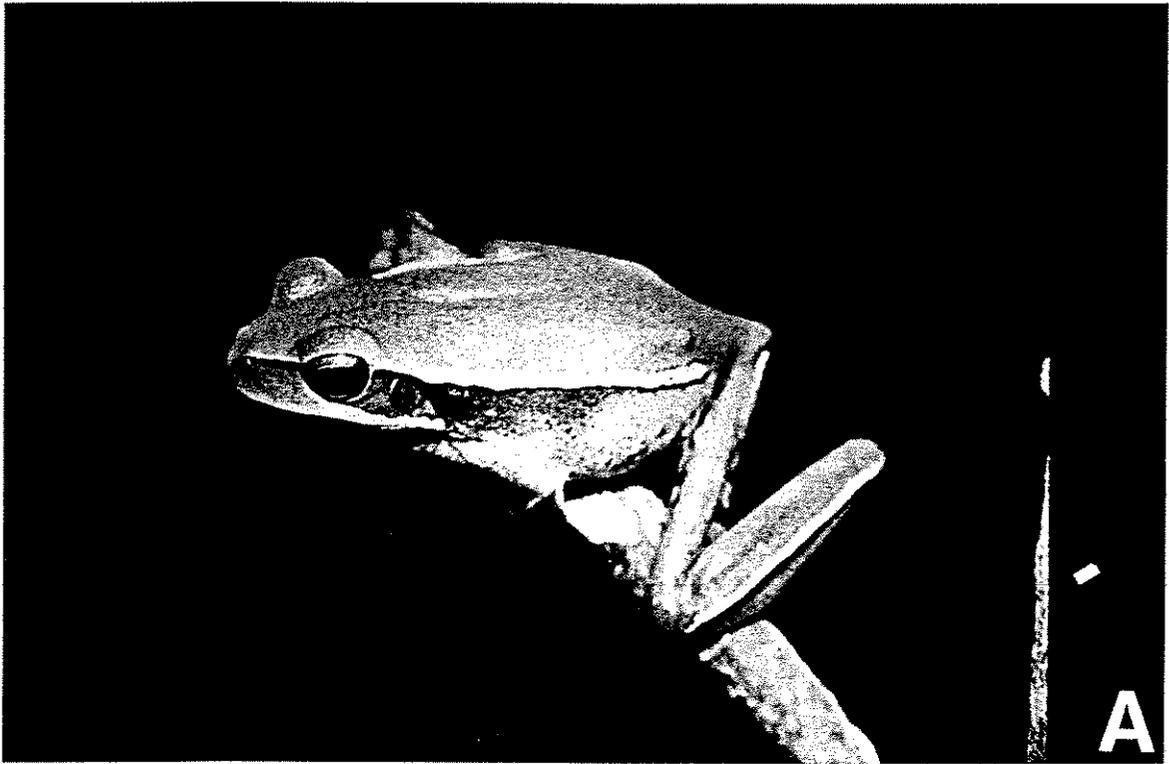
#### *H. p. joaquini* Lutz, 1968. (Figura 3B)

Segundo a descrição original, esta subespécie do grupo *pulchella* possui grande similaridade com *H. p. pulchella*, pela presença de uma lista dorso-lateral diferindo, entretanto, pela ausência de um padrão de coloração dorsal mais complexo.

Possui tamanho que varia de 40 a 50 mm com corpo robusto e coloração entre o verde e o pardo, apresentando uma lista dorso-lateral prateada. Habita regiões com aproximadamente 1.400 m de altitude, sendo encontrada no sudeste do estado de Santa Catarina, sendo sua localidade tipo São Joaquim (LUTZ, 1973).







#### 1.4. O estudo do cariótipo em Hylidae.

Os anuros apresentam grande similaridade no número de cromossomos. De acordo com a lista de KURAMOTO (1990), 816 (83%) das 983 espécies de anuros estudadas possuem número diplóide de  $2n = 22$  a  $2n = 26$  cromossomos. Esses números cromossômicos são encontrados em espécies dos gêneros *Rana*, *Bufo* e *Hyla* (BEÇAK, 1967; 1968; RABELLO, 1970; BOGART, 1973; SCHMID, 1978a;b; KING, 1980; WILEI, 1982; 1983; ANDERSON, 1991; BALDISSERA Jr. *et al.*, 1993; MIURA, 1995; MIURA *et al.*, 1995).

Na opinião de MORESCALCHI (1968), as espécies de anuros com caracteres morfológicos primitivos têm, geralmente, um cariótipo com um alto número de cromossomos, enquanto que cariótipos com baixo número seriam encontrados principalmente nas espécies mais recentes, de acordo com a evolução cromossômica. Por outro lado, BOGART (1973) propõe que as chamadas famílias de anuros superiores foram derivadas de um cariótipo com  $2n = 26$ , podendo ser um ancestral para *Hyla*, pois este número é encontrado dentro deste gênero.

A análise do padrão de bandas tem sido usada para elucidar possíveis mecanismos de evolução cromossômica. Neste sentido, MIURA (1995) mostrou através de bandamento de replicação tardia em espécies de *Rana*, *Bufo* e *Hyla*, que há grande homologia entre os cromossomos dos três gêneros. Os resultados indicaram que *Hyla* está mais relacionada citogeneticamente com *Bufo* do que com *Rana*, havendo grande conservação nos pares de cromossomos grandes através da história evolutiva dos anuros. De acordo com BOGART (1973) o número diplóide pode ter sido mudado por fusão cêntrica ou fissão.

MIURA *et al.* (1995), estudando a origem de espécies do gênero *Rana* com 24 cromossomos por bandamento de replicação tardia, sugerem que espécies com  $2n = 24$  originaram-se de espécies com  $2n = 26$  por fusão telomérica.

O número de cromossomos das espécies pertencentes a família Hylidae é bastante homogêneo, sendo mais comum  $2n = 24$  e  $2n = 26$  (tabela 1) KURAMOTO (1990). Nota-se que o gênero *Hyla* é o que apresenta maior variação.

Entre os hílideos, o cariótipo básico é o de  $2n = 24$ , simétrico e unimodal, característico de famílias avançadas (MORESCALCHI, 1990) e de acordo com CHANTELL (1964) a origem estaria nos leptodactílideos. Segundo BOGART (1973) um cariótipo com  $2n = 26$  pode ser um ancestral para *Hyla*. Por outro lado, cariótipo com  $2n = 26$  é encontrado na maioria das famílias de anuros (KURAMOTO, 1990).

A presença de cromossomos acrocêntricos pode sugerir um possível caminho evolutivo, seja ele por fissão ou fusão. Desta forma, alguns hílideos neotropicais com  $2n = 24$ , 26 ou 30, apresentam cromossomos acrocêntricos. É o caso de *H. prasina* (BEÇAK, 1967; 1968; BALDISSERA Jr. *et al.* 1993), *H. faber*, *H. albomarginata* (BEÇAK, 1967; 1968), *H. crepitans* (RABELLO, 1970) *H. polytaenia*, *H. p. pulchella* e *H. pardalis* (BOGART, 1973) que possuem  $2n = 24$  com 1 ou 2 pares de cromossomos acrocêntricos; *Fritziana goeldii* (BEÇAK, 1967; 1968) com  $2n = 26$  e 3 pares de cromossomos acrocêntricos; e, *H. rubicundula* (RABELLO, 1970), *H. leucophyllata*, *H. nana*, *H. decipiens*, *H. microps*, *H. parviceps*, *H. marmorata*, *H. labialis* (BOGART, 1973), *H. baileyi*, *H. berthalutzae*, *H. sanborni* (SKUK e LANGONE, 1992) com  $2n = 30$  e 4 pares de cromossomos acrocêntricos.

Entre os hílideos, o padrão morfológico dos cromossomos é bastante conservado entre as espécies com 24 cromossomos. Foi observado por BOGART (1973) que *H. crepitans* e *H. pardalis* do grupo *faber* possuem cariótipo muito próximo ao de *H. polytaenia* e *H. pulchella*, sendo também muito próximo de todas as *Hyla* com  $2n=24$  cromossomos.

BOGART (1973) sugere que *H. sordida* e *Phrynohyas venulosa* do Panamá façam parte do grupo de *Hyla* da região holoártica por apresentarem cariótipo parecido com a maioria daqueles hílideos, podendo ser consideradas como importantes ligações entre os hílideos neotropicais e holoárticos. Neste sentido, ANDERSON (1991) compara o cariótipo de espécies de *Hyla* holoárticas e neotropicais, sugerindo que de acordo com a similaridade no número e morfologia dos cromossomos, *Hyla* holoárticas possam ter se originado por invasão de *Hyla* neotropicais naquela região.

Os estudos cromossômicos são bastante extensos dentro da família Hylidae. Além da análise do cariótipo por coloração convencional (BEÇAK, 1967, 1968; RABELLO, 1970; BOGART, 1973; BEÇAK *et al.*, 1973; BATISTIC *et al.*, 1975; SCHMID, 1978a; KING, 1980; SCHMID, 1980, 1982; SCHMID *et al.*, 1983; WILEY, 1983; ANDERSON & MOLER, 1986; SCHMID *et al.*, 1986, 1990; ANDERSON, 1991; SKUK & LANGONE, 1993; BALDISSERA Jr. *et al.*, 1993; FEITOSA *et al.*, 1995; SCHMID *et al.*, 1995), a estrutura e morfologia dos cromossomos tem sido estudadas através de bandamento C (SCHMID, 1978a, 1980, 1982; KING, 1980; SCHMID *et al.*, 1983, 1986, 1990; BATISTIC, 1989; ANDERSON, 1991; BALDISSERA Jr., 1993; SCHMID *et al.*, 1995), bandamento G (WILEY, 1982), Ag-NOR (SCHMID, 1978a, 1980, 1982; SCHMID *et al.*, 1983, 1986; WILEY, 1983; BATISTIC, 1989; WILEY *et al.*, 1989; ANDERSON, 1991; BALDISSERA Jr., 1993; SCHMID *et al.*, 1995), corantes fluorescentes (SCHMID, 1978a, 1980, 1982; SCHMID *et al.*, 1983, 1986, 1990; SCHMID *et al.*, 1995), hibridização *in situ* (SCHMID *et al.*, 1986; WILEY *et al.*, 1989; KING *et al.*, 1990; WILEY *et al.*, 1992; SCHMID *et al.*, 1995), bandamento de replicação tardia (WILEY *et al.*, 1989; SCHMID *et al.*, 1994; MIURA, 1995) e bandamento por enzimas de restrição (BEÇAK, *et al.*, 1988; ANDERSON, 1991).

TABELA 1: Número de cromossomos da família Hylidae (baseada em dados de revisão de KURAMOTO (1990)).

Gênero	2n
<i>Cyclorana</i>	26
<i>Litoria</i>	24, 26 e 30
<i>Nyctmystes</i>	26
<i>Agalychnis</i>	26
<i>Pachymedusa</i>	26
<i>Phyllomedusa</i>	26 e 52*
<i>Cryptobatrachus</i>	26
<i>Flectonotus</i>	28
<i>Fritziana</i>	26, 28 e 30
<i>Gastrotheca</i>	26 e 28
<i>Stefania</i>	26
<i>Acris</i>	22
<i>Anotheca</i>	24
<i>Aparasphenodon</i>	24
<i>Hyla</i>	18, 20, 22, 24, 30 e 48*
<i>Ololygon</i>	24
<i>Phrynohyas</i>	24
<i>Plectrohyla</i>	24
<i>Pseudacris</i>	24
<i>Pternohyla</i>	24
<i>Ptychohyla</i>	24
<i>Smilisca</i>	24
<i>Trachycephalus</i>	24
<i>Triprion</i>	24

\* espécies poliplóides

### 1.5. Citogenética do grupo *pulchella*.

Dentro do grupo *pulchella*, apenas para *H. prasina* e *H. p. pulchella* podem ser encontrados dados de citogenética na literatura.

O cariótipo de *H. prasina* foi descrito por BEÇAK (1967, 1968), que até então a denominava de *H. pulchella prasina*, possuindo  $2n = 24$ . Esta autora classificou os cromossomos como metacêntricos (4 pares), submetacêntricos (7 pares) e acrocêntricos (1 par) e analisou também a meiose dos machos.

RABELLO (1970), fazendo um estudo de revisão cromossômica de alguns anuros, relata resumidamente os dados cariotípicos de espécies já estudadas e omite a presença de um par acrocêntrico nesta espécie.

BALDISSERA *et al.* (1993), trabalhando com esta mesma espécie proveniente da Serra do Japi, Jundiaí, Estado de São Paulo, adicionou mais alguns dados citogenéticos. Confirmou o número diplóide  $2n = 24$  descrito por BEÇAK (1967, 1968) e detectou a NOR no telômero do braço longo do par 12 e em alguns indivíduos uma NOR adicional no par 9. Através de bandamento C, detectou também heterocromatina constitutiva em regiões centroméricas, teloméricas e intersticiais.

A subespécie *H. p. pulchella* foi estudada por SAEZ e BRUM (1960) como *H. raddiana*. Estes autores apenas citam o número de cromossomos como  $2n = 24$ , mas não apresentam o cariótipo da espécie. Indicam ainda que todos os cromossomos são metacêntricos sem, no entanto, mostrar qualquer dado morfométrico para tal classificação.

RABELLO (1970), fazendo um levantamento do número de cromossomos de hílideos até então estudados e baseando-se na citação mencionada anteriormente, cita *H. p. pulchella* como possuindo  $2n = 24$ .

## 1.6. A região organizadora nucleolar (NOR)

### 1.6.1. Aspectos gerais da morfologia e fisiologia.

No núcleo celular encontra-se uma estrutura distinta, chamada nucléolo responsável pela síntese das partículas pré-ribossomais, possuindo toda a maquinaria necessária para tal (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1983, 1993; JORDAN, 1991; HERNANDES-VERDUM *et al.*, 1993; ALBERTS *et al.*, 1994).

O nucléolo contém os genes de rRNA, proteínas ribossomais, fatores e componentes necessários para a transcrição e processamento do rRNA e a maturação das partículas pré-ribossomais (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993).

As regiões dos cromossomos contendo genes de rRNA e de cuja atividade de síntese se origina o nucléolo, são denominadas Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs). Nos últimos anos, muitos estudos foram realizados com relação a estrutura e função dos organizadores nucleolares, bem como sobre o nucléolo (SMETANA & BUSCH, 1974; GHOSH, 1976; GOESSENS & LEPOINT, 1979; SUMNER, 1990; JORDAN, 1991; FISCHER *et al.*, 1991; WEBB & MOUGEY, 1991; Revisão: SCHWARZACHER & WACHTLER, 1983, 1993).

Células eucarióticas sintetizam grandes quantidades de rRNA que corresponde a cerca de 80% do total de RNA celular. Acima de 100 cópias de genes rRNA são necessários para sintetizar milhares de novos ribossomos por ciclo celular, necessários para manter a capacidade sintética das células filhas (WEBB & MOUGEY, 1991).

A NOR é constituída por dezenas de unidades repetidas *in tandem* e cada uma é composta basicamente por sequências que correspondem ao transcrito primário de rRNA, separadas por sequências que não são transcritas (Figura 1) (FEDEROFF, 1979; LONG & DAWID, 1980; WEBB & MOUGEY, 1991).

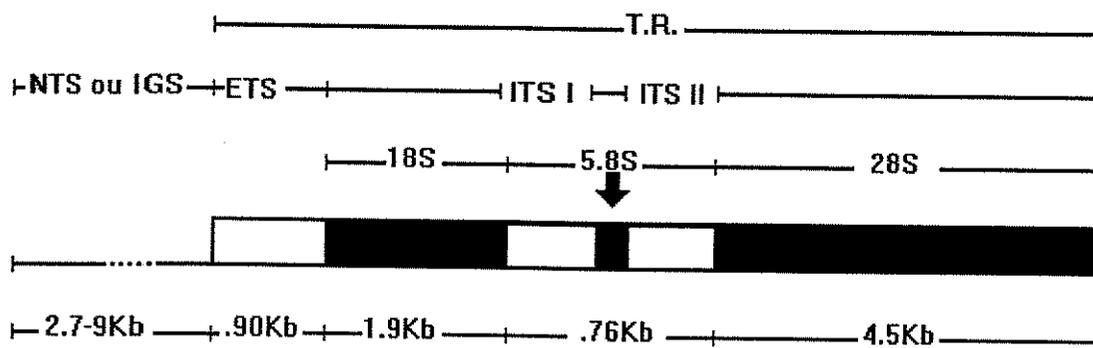


Figura 4. Esquema mostrando o arranjo dos genes 18S, 5.8S e 28S em uma unidade repetitiva do rDNA de *Xenopus laevis*, com os respectivos tamanhos em kilobases (Kb). ETS = espaçador transcrito externo; ITS I e ITS II = espaçador transcrito interno; NTS = espaçador não-transcrito, (atualmente conhecido como IGS = espaço intergênico); TR = região transcrita, que compreende o ETS; ITS I e II e os genes 18S, 5.8S e 28S.

Em geral, o número de genes rRNA está relacionado ao tamanho do genoma, embora grandes diferenças possam ocorrer entre espécies muito próximas, com tamanho do genoma parecido, havendo também evidências de heteromorfismo em uma mesma espécie. Em certas plantas e anfíbios com extenso genoma, há milhares de genes ribossomais (LONG & DAWID, 1980).

Os estudos da atividade dos genes rRNA durante a espermatogênese de vertebrados demonstram síntese pré e pós-meiótica, sendo que HOFGARTNER *et al.* (1979) demonstraram um padrão comum de atividade dos genes rRNA durante os estágios da espermatogênese em vários mamíferos. SCHMID (1982) descreveu um padrão de atividade nucleolar durante a espermatogênese de várias classes de vertebrados (pássaros, répteis, anfíbios e peixes) através do método de impregnação pela prata. Em seu estudo demonstrou que a síntese de rRNA e as regiões prata positiva aumentam simultaneamente com as fases da espermatogênese, sendo estas regiões detectadas desde a espermatogônia em crescimento até os estágios

avançados de paquíteno, diminuindo durante este último estágio e tornando-se indetectáveis durante as outras fases da divisão meiótica. Há reativação pós-meiótica da NOR nos estágios iniciais de espermatíde, durante a espermiogênese, desaparecendo inteiramente durante as fases de alongamento das espermatídes. Em espermatozóides maduros esta atividade nunca foi detectada.

Segundo SCHMID *et al.* (1982), a espermiogênese pode ser controlada por duas etapas, uma em que a atividade gênica pré-meiótica pode produzir no espermatócito moléculas de RNA estáveis que serão traduzidas no estágio pós-meiótico (controle diplóide), e a outra etapa seria a possibilidade de atividade gênica no núcleo das espermatídes (controle haplóide).

#### **1.6.2. Métodos utilizados para evidenciar a NOR**

Os métodos existentes para detectar a NOR através de coloração são dependentes de proteínas específicas. O primeiro método utilizado foi o bandamento N (MATSUI & SASAKI, 1973), que consiste em coloração com Giemsa após extração das histonas e ácidos nucleicos, resultando em uma forte coloração somente dos sítios de rDNA. Dois anos depois descobriu-se que as NORs poderiam ser marcadas especificamente com prata amoniacal (Ag-AS) (HOWELL *et al.*, 1975; GOODPASTURE & BLOOM, 1975).

WANG e JURLINK (1979) descreveram um método para corar NORs que utiliza uma solução metanólica acidificada e o corante "Coomassie blue". Embora este processo seja simples, o contraste do material corado é muito menor do que o obtido pela prata.

O método de impregnação pela prata tem envolvido, ao mesmo tempo, a complexidade e a simplicidade. A técnica original de HOWELL *et al.* (1975) envolve vários estágios: fixação dos cromossomos com formalina, tratamento com

uma solução de pré-impregnação com prata amoniacal, tratamento com hidróxido de sódio diluído e finalmente impregnação com uma mistura de formalina e prata amoniacal. GOODPASTURE e BLOOM (1975) descreveram uma técnica mais simples que utiliza solução de nitrato de prata 50% que é colocada sobre o material, coberta com lamínula, exposta a uma lâmpada, e em seguida utiliza-se uma mistura de prata amoniacal e formalina. Este processo foi modificado por HOWELL e BLACK (1980), que propuseram a utilização de uma solução coloidal, adicionando ácido fórmico em uma solução de gelatina diluída. Esta solução é imediatamente misturada à solução de prata antes do uso, e as lâminas são incubadas em uma estufa a 50°C. Este método recebeu o nome de "Ag-NOR", e é o mais utilizado desde então.

Várias alternativas foram propostas na tentativa de melhorar o resultado final da impregnação por prata. GOLD e ELLISON (1983) e MEHRA *et al.* (1985) utilizaram tiosulfato de sódio como uma maneira de estabilizar a impregnação pela prata. Esta alternativa também é usada em estudos ultraestruturais (PLOTON *et al.*, 1984). Nestes estudos, muitos ainda utilizam variantes do método de prata amoniacal (Ag-AS) (BOURGEOIS *et al.*, 1979; HERNANDEZ-VERDUN *et al.*, 1980; ANGELIER *et al.*, 1982; MEDINA *et al.*, 1986).

Um dos problemas encontrados com a impregnação por prata é o depósito não específico da mesma. Muitas alternativas foram propostas para minimizar o problema, como utilizar cianeto de potássio (FERRARO *et al.*, 1982) e reagente de Schiff's (THIEBAUT *et al.*, 1984). Por outro lado, GOSÁLVEZ *et al.* (1986) propuseram um pré-tratamento com 2xSSC à 60°C por 15 minutos para melhorar o resultado com a impregnação pela prata.

O método de Ag-NOR é baseado na afinidade argirófila específica das proteínas associadas a NOR, chamadas genericamente de "proteínas Ag-NOR". Considera-se que somente as NORs nas quais a transcrição está ocorrendo é que

apresentam essas proteínas associadas, e portanto, as NORs inativas não respondem ao método de Ag-NOR (SCHWARZACHER *et al.*, 1978; BUYS & OSINGA, 1980; SCHMID *et al.*, 1986; SUMNER, 1990; HERNANDEZ-VERDUN, 1993). Além disso, vários pesquisadores vêm tentando estabelecer a natureza dos grupamentos que poderiam reduzir a prata. BUYS & OSINGA (1980) mostraram que mesmo depois de fazerem extração de histonas ocorre impregnação, concluindo que proteínas não histônicas são responsáveis pela reação. Estes mesmos autores concluíram que grupos sulfidrilas e dissulfetos estão envolvidos na reação, pois, o uso de sulfato cúprico abole a impregnação pela prata, sugerindo que este agente oxidativo lisa as pontes dissulfetos convertendo os grupos sulfidrilas em tiosulfitos. Outra hipótese levantada é o envolvimento dos grupos carboxilas carregados negativamente, que ligariam inicialmente aos íons de prata, causando sua redução e formando pontos submicroscópicos de prata metálica que atuariam como foco para outros depósitos. Outra hipótese levantada por HERNANDEZ-VERDUN (1993) é que o domínio ácido da porção amino terminal dessas proteínas estaria relacionado com a reação. Apesar dessas evidências, o mecanismo exato do método ainda não se encontra totalmente elucidado.

As proteínas AgNOR encontradas durante a mitose fazem parte da transcrição do rDNA, porém, ainda é incerto se todas elas participam diretamente. Neste sentido, outros trabalhos são necessários para desvendar a relação entre as proteínas AgNOR e a cromatina (HERNANDEZ-VERDUN *et al.*, 1993).

Uma outra forma de detecção da NOR é através de substâncias fluorescentes como a mitramicina e a cromomicina A3. Esses corantes são dois antibióticos estruturalmente parecidos que formam um complexo estável com regiões do DNA rico em G-C, tendo sido proposto que sejam corantes intercalantes da hélice do DNA (WARD *et al.*, 1965; BEHR *et al.*, 1969).

Em anuros, ambos fluorocromos marcam as NORs independentemente do seu estado de atividade, porém, outras regiões no genoma que apresentem seqüências ricas em G-C também são marcadas, o que confere a este método uma certa inespecificidade, embora a região da NOR fluoressa muito mais (SCHMID, 1982; SCHMID *et al.*, 1986; SCHMID *et al.*, 1993).

SCHMID (1982) utilizou esses corantes para detectar o nucléolo e a NOR também nas fases da espermatogênese em que não é possível detectá-los pelo método de Ag-NOR.

As regiões organizadoras do nucléolo podem também ser identificadas pelo método de hibridização *in situ*, que independe do estado de atividade da mesma (MILLER & BROWN, 1969; VITELLI *et al.*, 1982; WILEY *et al.*, 1989; KING *et al.*, 1990).

### 1.6.3. NOR em anuros

As NORs aparecem muito frequentemente na mesma posição onde se encontra a constrição secundária (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1983). Muitos trabalhos têm demonstrado que esta é uma característica que quase sempre está presente no genoma de anuros (SCHMID, 1978a e b; SCHMID, 1982; SCHMID *et al.*, 1983; WILEY, 1983; ANDERSON & MOLER, 1986; SCHMID *et al.*, 1986; GREEN & SHARBEL, 1988; KING *et al.*, 1990; SCHMID, *et al.*, 1990; ANDERSON, 1991; SCHMID *et al.*, 1993; BALDISSERA Jr. *et al.*, 1993; MELO *et al.*, 1995; SCHMID *et al.*, 1995).

De acordo com KING (1980) as constrições secundárias podem ser classificadas em 5 tipos em função de características de coloração convencional, banda C e impregnação por prata: I, II, III, IV e V. Os tipos I, II e V apresentam uma frequência variável de heterozigose no tamanho da constrição, enquanto no tipo IV

há uma baixa frequência. O tipo III nunca apresenta cístron ribossomal, tanto na impregnação pela prata (KING, 1980) quanto por hibridização "in situ" (KING *et al.*, 1990).

A hipótese de que as diferenças observadas no tamanho da constrição entre homólogos é devido ao empacotamento cromossômico (KING, 1980) não se justifica uma vez que com a hibridização "in situ" há diferenças profundas na marcação, indicando diferenças na quantidade de rDNA (KING, 1990).

SCHMID (1978a e b) detectou várias NORs nas espécies da família *Ranidae* e em algumas delas uma das NORs se destaca pelo seu tamanho maior, sempre localizada em uma grande constrição secundária no mesmo local do cromossomo. Segundo este autor, espécies que não apresentam outras NORs em seu genoma detectável pela prata, pode ser devido ao tamanho pequeno ou condição inativa. Além disso, a posição da maior NOR em dos cromossomos do par de várias espécies foi mantida durante a evolução das espécies de *Rana* com 26 cromossomos. HSU *et al.* (1975) consideram que cariótipos com baixo número de NORs são mais primitivos do que aqueles com várias, sendo um estado ancestral.

A grande maioria das espécies de anuros possui um único par de NORs em seu cariótipo. Esta observação tem sido confirmada em muitos casos pela técnica de Ag-NOR (KING, 1980; VITELLI *et al.*, 1982; SCHMID, 1982; MAHONY & ROBINSON, 1986; SCHMID *et al.*, 1991b; ANDERSON, 1991; MIURA, 1994; SCHMID *et al.*, 1995).

ANDERSON (1991) identificou apenas um cístron ribossomal ativo nas espécies de *Hyla* da região Holoártica, presente no par 6 ou 10 ou 11, e dividiu essas espécies em dois grupos: aquele com NOR no par 6 e aquele com NOR no 10 ou 11.

Por outro lado, algumas espécies apresentam mais de uma NOR em seu genoma. BATISTIC (1989) detectou a presença de dois pares de homólogos com NOR em *Phyllomedusa*, sendo uma no par 1 e outra no par 8 ou 9, dependendo da

espécie. KING *et al.* (1990) detectou duas NORs em *Litoria raniformis*, uma ocorrendo intersticialmente no par 8 e outra subterminalmente no par 13, tendo sugerido que o sítio adicional no par 8 é uma condição derivada e que este possa ser um estado evolutivo dentro dos anuros. ANDERSON (1991) também descreveu o cariótipo de algumas espécies de hilídeos que apresentam NORs adicionais. Para explicar a presença destes sítios adicionais, várias hipóteses foram levantadas. Uma delas é a ocorrência de translocação de pequenas subunidades de rDNA de um cístron para outro cromossomo. Uma segunda possibilidade seria a amplificação de um cístron latente (KING *et al.*, 1990). SCHUBERT e WOBUS (1985) sugerem uma terceira possibilidade a partir de estudos de NORs em diferentes cromossomos de *Allium cepa*, a de que esses sítios adicionais podem ter sido causados por elementos de mobilidade gênica. Já WILEY *et al.* (1989) discutem as hipóteses de translocação, inversão, elementos de mobilidade gênica e até mesmo uma combinação destas para explicar o polimorfismo populacional na localização dos genes de rRNA detectados por hibridização "in situ", em *H. chrysoyelis* e *H. versicolor*.

Além da presença de sítios adicionais de NOR, ocorrem ainda os heteromorfismos de tamanho. SCHMID (1982) propõe que o aparecimento de NORs heteromórficas pode ser causado por deleção parcial ou por duplicação e triplicação de um dos cístrons. Por outro lado, KING *et al.* (1990) considera que a maioria dos heteromorfismos observados envolve amplificação do rDNA em um cromossomo do par de homólogos. Considera ainda que, primeiro ocorre a amplificação de certas sequências de DNA ribossomal e depois a amplificação inteira da NOR.

KING *et al.* (1990), em uma recente revisão sobre citogenética de anfíbios, destaca que somente 12 dentre as 833 espécies analisadas até o momento, apresentam cromossomos sexuais possíveis de serem detectados microscopicamente (SCHMID *et al.*, 1991a, 1992, 1993). Em alguns casos, esses cromossomos, quando

carregam uma constrição secundária, onde se localiza também a NOR ativa, detectada pela prata (SCHMID *et al.*, 1983, 1986, 1993).

## 1.7. Heterocromatina

### 1.7.1. Aspectos gerais

O termo heterocromatina é usado genericamente para descrever a cromatina ou segmentos cromossômicos que permanecem condensados durante todo ciclo celular, sendo transcricionalmente inativos (BABU & VERMA, 1987; ALBERTS *et al.*, 1994). Atualmente, a definição de heterocromatina leva em consideração a composição do DNA e sua resposta às técnicas específicas de bandamento (ANDERSON, 1991; SUMNER, 1994).

Segundo HEITZ (1928), este estado condensado da cromatina geralmente resulta em uma propriedade heteropicnótica durante o ciclo celular (Appud BABU & VERMA, 1987).

De acordo com SUMNER (1994), a heterocromatina geralmente compreende pequena proporção do genoma, mas em casos excepcionais pode perfazer até 50% do total de DNA da célula. Em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, os três pares de autossomos possuem blocos grandes de heterocromatina e ainda o Y e parte do X totalmente heterocromático. Desta forma, as fêmeas (XX) apresentam 29% e os machos (XY) 35% do genoma, formado por heterocromatina (JOHN, 1988).

Portanto, a cromatina condensada é transcricionalmente inativa ou porque está em estado reprimido com seu DNA inativo temporária e reversivelmente ou porque pode ser constituída de DNA não codificador e assim ser permanentemente incapaz de transcrever (JOHN, 1988). Assim, pode-se considerar dois tipos de heterocromatina: a facultativa, que pode variar em seu estado de condensação em

diferentes tipos celulares e estágios de desenvolvimento; e a constitutiva, em estado permanentemente inativo, localizada em posições específicas nos cromossomos homólogos em todas as células.

Heterocromatina constitutiva caracteriza-se por apresentar DNA satélite, isolado repetido "*in tandem*" (PARDUE & HENNIG, 1990). A heterocromatina quase sempre está associada com centrômero, telômero, podendo estar associada também na região organizadora nucleolar (NOR) (SCHMID, 1978a e b) ou na região intersticial do cromossomo. Em alguns casos o cromossomo inteiro é composto de heterocromatina (JOHN, 1988).

Em *Drosophila*, a heterocromatina contém poucos genes comparada à eucromatina (PIMPINELLI *et al.*, 1986) e grandes perdas ou adições de heterocromatina ocorrem sem efeito aparente. Estas e outras observações levaram muitos pesquisadores a considerarem o DNA satélite como "lixo", mas a inexistência de genes na fita de DNA não exclui a possibilidade deste DNA ter outras funções, que podem não depender diretamente da sequência precisa de DNA (SUMNER, 1994). Foi demonstrado que a heterocromatina do cromossomo Y em *Drosophila* possui várias "funções" que aparentemente não são as dos genes convencionais (GATTI & PIMPINELLI, 1992).

Atribui-se aos segmentos heterocromáticos propriedades como: estabilizar regiões especializadas dos cromossomos (centrômeros e telômeros); facilitar o rearranjo cromossomal (BABU & VERMA, 1987); estabelecer uma proteção para a eucromatina, quando localizada na periferia do envoltório nuclear (HSU *et al.*, 1975); replicar tardiamente no ciclo celular quando comparados com a eucromatina; corar-se positivamente pela técnica de bandamento C; riqueza em DNA altamente repetitivo; e reduzir a recombinação meiótica (JOHN, 1988; SUMNER, 1990; 1994; GATTI & PIMPINELLI, 1992), embora a natureza deste último possa variar de uma espécie para outra (LOIDL, 1982; JOHN e KING, 1985; BERGER &

GREILHUBER, 1991). Em alguns organismos que possuem grandes quantidades de heterocromatina nas células da linhagem germinativa, a quantidade de heterocromatina é regulada em certos tecidos somáticos por mecanismos que envolvem endoreplicação ou eliminação de DNA heterocromático (JOHN, 1988; PARDUE & HENNIG, 1990). SUMNER (1994) sugere que deve haver alguma função ou funções especiais da heterocromatina na oogênese e na espermatogênese, uma vez que, a heterocromatina pode ser totalmente eliminada ou amplificada em células somáticas, enquanto é retida na linhagem germinativa.

Uma outra característica da heterocromatina é a inatividade dos genes situados em suas proximidades (REUTER e SPIERES, 1992). Neste fenômeno, conhecido como “efeito de posição”, a expressão gênica é reduzida pela heterocromatina adjacente (PARDUE & HENNIG, 1990; SUMNER, 1994). O silenciamento dos genes eucromáticos no efeito de posição ocorre através de indução estrutural, pela aposição ou proximidade da heterocromatina à eucromatina em um relacionamento mútuo normal, que controla e/ou reprime sua atividade, de acordo com a concentração de determinados fatores (ZUCKERKANDL & HENNIG, 1995).

Outras funções da heterocromatina podem estar relacionadas à sua posição (geralmente centromérica) e a sua composição (geralmente grandes quantidades de DNA repetido "*in tandem*") (SUMNER, 1990). Porém, uma vez que a composição de bases do DNA heterocromático é variável, sua função pode estar relacionada ao centrômero (SUMNER, 1994). Algumas evidências dão suporte a tal idéia, pois MASUMOTO *et al.* (1989) descreveram uma proteína centromérica do tipo B (CENP-B) que se liga a 17 bp da sequência alfaíde centromérica do homem ou a sequência satélite do rato. Tal proteína foi identificada utilizando anti-CENP-B (MASUMOTO *et al.*, 1989; MITCHELL *et al.*, 1992). Desta forma, SUMNER (1994) propõe que a função da heterocromatina centromérica esteja relacionada com

função do cinetocóro, ou seja, ela teria a função de prender as cromátides irmãs durante a divisão celular e promover sua eficiente segregação na anáfase.

### 1.7.2. Método de banda C

Um grande número de métodos são utilizados para produzir uma resposta diferencial nas regiões heterocromáticas dos cromossomos metafásicos (JOHN, 1988). Destes, o principal é o bandamento C que surgiu a partir das observações de PARDUE e GALL (1970) de que os centrômeros dos cromossomos coravam fortemente quando pré-tratados para hibridização "in situ". Nesse pré-tratamento era utilizado HCl 0,2N, digestão com RNase, desnaturação com hidróxido de sódio (NaOH) e reassociação em 2xSSC (solução salina concentrada - cloreto de sódio 0,3 M e citrato de sódio 0,03M). A técnica foi adaptada e utilizada pela primeira vez por ARRIGHI e HSU (1971) em cromossomos humanos. Porém, como o tratamento com NaOH era muito destrutivo para os cromossomos, SUMNER (1972) substituiu-o por hidróxido de bário ( $Ba(OH)_2$ ), sendo esse o mais utilizado até o momento.

A técnica descrita por SUMNER (1972) envolve tratamento do material com HCl 0,2N; solução saturada de  $Ba(OH)_2$  a 50 °C e 2 x SSC a 60 °C, seguido por coloração com Giemsa.

Desde que o método foi proposto, vários autores tentam explicar o real mecanismo para o bandamento C. Desta forma, COMINGS *et al.* (1973) e PATHAK e ARRIGHI (1973) verificaram que o método envolve uma remoção preferencial do DNA das regiões banda C negativa. HOLMQUIST (1979) propôs que as reações químicas responsáveis pela perda de DNA durante o bandamento C, ocorrem por  $\beta$ -eliminação do DNA. Nesse processo ocorre depurinação causada pelo HCl deixando os resíduos de desoxirribose na forma de aldeídos; em seguida, os sítios apurínicos

seriam quebrados pelo tratamento alcalino e finalmente a solução salina manteria a cadeia quebrada, resultando em uma coloração diferencial da cromatina.

Muitos autores utilizam para caracterização dos cromossomos, além do bandamento C, o bandamento diferencial com uso de fluorocromos com especificidade por regiões ricas em AT (quinacrina - "Q", Hoechst 33258 - "H" e DAPI) ou CG (cromomicina A<sub>2</sub> - "CMA" e mitramicina - "MM") que podem em alguns casos indicar a natureza do material banda C positivo (JOHN, 1988).

### 1.7.3. Heterocromatina em anuros

De acordo com uma revisão feita por KING *et al.* (1990), aproximadamente 837 espécies de anuros foram analisados cariotipicamente, sendo que destes 252 utilizando alguma técnica de bandamento. Entretanto, 92 destas espécies foram analisadas somente pela técnica de Ag-NOR ou por hibridização *in situ* com sondas de DNAr 18S+28S, e 160 espécies foram estudadas por técnicas como as de bandamento C, Q e DAPI, que de alguma forma indicam a evolução da heterocromatina em anfíbios (Apud KING, 1991).

Espécies muito próximas podem diferir não somente na quantidade de heterocromatina em seus genomas, mas também no número de bandas, na localização e nas propriedades de coloração da heterocromatina (SUMNER, 1990).

Diferenças nos padrões heterocromáticos entre espécies são encontradas tanto nos anuros primitivos quanto nos mais evoluídos (KING, 1991). Porém, nos anuros primitivos de 7 famílias pertencentes aos Archaeobatrachia foram detectadas pequenas quantidades de heterocromatina através das técnicas de bandamento, enquanto que os Neobatrachias (anuros modernos) mostram uma grande diversidade interespecífica na distribuição e quantidade de heterocromatina. KING (1980, 1991) considera que a evolução da heterocromatina no genoma dos anfíbios possa ocorrer

ou por adição de heterocromatina ou por transformação da eucromatina em heterocromatina ou ainda, por uma evolução combinada de múltiplos sítios de heterocromatina.

SCHMID (1978a) detecta três classes de heterocromatina em bufonídeos e em hilídeos, diferenciadas pela resposta aos métodos de bandamento: banda C positiva e fortemente fluorescente; banda C positiva com um grau de fluorescência menor que a eucromatina e heterocromatina telomérica com uma fraca banda C. Tais diferenças na propriedade de coloração da heterocromatina, principalmente em relação ao bandamento C foi encontrado em alguns hilídeos dos gêneros *Litoria* (KING, 1980) e *Hyla* (ANDERSON, 1991), nos leiopelmatídeos do gênero *Leiopelma* (GREEN e SHARBEL, 1988; GREEN, 1988), e em ranídeos do gênero *Rana* (SCHMID, 1978b; GREEN, 1985; 1986; MIURA et al., 1995).

Além das diferenças mencionadas quanto à resposta aos métodos de bandamento, a heterocromatina pode se apresentar também em estado heteromórfico, tanto no tamanho da banda quanto na intensidade de coloração. Tais diferenças podem ocorrer entre cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo, entre indivíduos de uma mesma população e entre diferentes populações de uma mesma espécie (SUMNER, 1990).

SCHMID (1978a) encontrou diferenças no tamanho dos blocos heterocromáticos em 7 espécies de bufonídeos e hilídeos; KING (1980) detectou heteromorfismo em uma banda telomérica no par 12 de *Litoria meireiana* e MIURA et al. (1995) encontraram uma variação intra-populacional no padrão de banda heteromórfica em *Rana ornativentris* de Hirosaki - Japão. Uma hipótese para explicar as diferenças no tamanho dos blocos heterocromáticos é o crossing-over somático que foi proposta por SUMNER (1990).

KING (1980) encontrou diferentes padrões de banda C em todas as espécies do gênero *Litoria* estudadas, porém algumas bandas são comuns a todas as espécies,

como por exemplo, um bloco telomérico no braço longo do par 3. GREEN (1985,1986) encontrou diferentes padrões de banda C entre espécies de *Rana* e também diferenças entre as duas subespécies *R. aurora aurora* e *R. aurora draytonii*, sendo consideradas como uma característica diferencial entre elas. Já MIURA *et al.* (1995) descrevem diferenças significativas entre espécies de *Rana* com  $2n = 24$  e espécies com  $2n = 26$ , destacando que *R. tshushimensis*,  $2n = 26$ , não apresenta heterocromatina centromérica em nenhum dos cromossomos. MIURA (1995) descreveu a presença de um padrão de banda C característico entre várias espécies e subespécies, o que permite caracterizar e diferenciar as espécies do leste e do oeste da região Paleártica, indicando variação interpopulacional.

SUMNER (1990) propõe que pelo menos três mecanismos possam estar relacionados ao aparecimento de novas bandas heterocromáticas: translocação ou inversão de bandas já existentes, transformação da eucromatina e amplificação de sequências de DNA.

Em anfíbios, há alguns casos em que a diferença na quantidade de heterocromatina foi associada à diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais, que sofrem heterocromatinização (SCHMID *et al.*, 1991a). Em salamandras do gênero *Triturus*, por exemplo, os 12 pares de cromossomos são considerados homomórficos, porém quando submetidos à coloração específica para heterocromatina constitutiva, os cromossomos sexuais XY podem ser reconhecidos, devido ao aparecimento de uma região telomérica heterocromática em somente um cromossomo do par homólogo (SCHMID *et al.*, 1979).

ANDERSON (1991) mostrou através de dados citogenéticos, que o cromossomo 1 de fêmeas de *H. squirella* apresenta uma fraca região heterocromática que pode representar um estágio inicial de diferenciação dos cromossomos sexuais do tipo WZ/ZZ.

Em *Gastrotheca pseustes*, um hílideo marsupial da América do Sul, duas formas de cromossomo Y foram encontrados. Em alguns indivíduos machos o par sexual XYa possui o mesmo padrão de heterocromatina dos cromossomos XX das fêmeas. Porém, outros machos da mesma espécie apresentam uma região telomérica heterocromática no braço longo do cromossomo Yb. Estes achados foram interpretados como estágios distintos de diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais (SCHMID *et al.*, 1990).

GREEN e SHARBEL (1988) sugerem que o aparecimento de cromossomos sexuais em anfíbios está relacionado com a adição de heterocromatina, podendo ser de duas formas: através da heterocromatinização de genes, com perda de eucromatina e função gênica ou através de acumulação de heterocromatina já existente sem perda de eucromatina. Porém SCHMID *et al.* (1991a) consideram que o aparecimento de tais cromossomos envolve duas etapas, com mudanças estruturais: inversões pericêntricas e heterocromatinização.

Indícios da presença de cromossomos sexuais podem ser obtidos da observação do pareamento dos bivalentes em meiose uma vez que o crossing-over é reduzido ou totalmente suprimido, não formando quiasmas e, conseqüentemente, não formando anéis quando a heterocromatina está presente no telômero de um dos homólogos. (SCHMID *et al.*, 1990; SCHMID *et al.*, 1991a).

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1) Comparar espécies de *Hyla* incluídas no grupo *pulchella* que ocorrem no Brasil, utilizando os seguintes parâmetros:

- Análise dos cariótipos das espécies;
- O padrão de banda C, isto é, a localização da heterocromatina constitutiva;
- Localização dos cístrons ribossomais ativos nos cromossomos mitóticos metafásicos e nas diferentes fases da espermatogênese, nas diversas, espécies através do método de Ag-NOR.

2) Com a utilização destes parâmetros nosso objetivo principal é contribuir para o conhecimento das relações de parentesco entre as espécies em estudo e destas com outras pertencentes a grupos taxonômicos próximos.

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das espécies.

Os animais foram obtidos através de coletas feitas diretamente no campo em seus habitat naturais e transportados até o laboratório. As coletas geralmente foram acompanhadas por zoológicos que identificavam as espécies através do padrão de vocalização. O total de exemplares coletados para cada espécie e a procedência encontram-se indicados na tabela 2.

TABELA 2: Relação das espécies coletadas, número de espécimes e procedência. Identificação feita por Adão J. Cardoso.

Espécie	Nº de Espécimes	Procedência
<i>H. prasina</i>	05 machos	Botucatu, SP
	13 machos	Jundiaí, SP
	08 machos	São Joaquim, SC
<i>H. caingua</i>	19 machos	Botucatu, SP
<i>H. p. pulchella</i>	16 machos	Torres, RS
<i>H. semiguttata*</i>	4 machos	Ponta Grossa, PR
<i>H. p. joaquini</i>	2 machos	Urubici, SC

Obs. Os espécimes estão depositados no Museu de História Natural da UNICAMP (ZUEC - 9659 a 9702). \* Análise morfométrica está sendo realizada por Adão J. Cardoso para confirmação da identificação prévia destes espécimes.

## **3.2. Obtenção de células mitóticas e meióticas.**

### **3.2.1. Processamento dos espécimes.**

Em todos os espécimes foi injetada intraperitonealmente uma solução aquosa de colchicina (Merck) 1% , na proporção de 0,02 ml por grama de peso do animal. Após duas horas no mínimo, os animais foram submetidos à narcose com éter e sacrificados.

Foram removidos fígado, intestino, testículo e quando possível os membros posteriores para retirada da medula óssea.

### **3.2.2. Preparação de lâminas.**

#### **a. de intestino**

O intestino removido foi aberto com uma tesoura para expor o epitélio e colocado em uma placa de Petri siliconizada contendo cerca de 5 ml de citrato de sódio 0.9% e deixado no mínimo 15 minutos para que ocorresse a hipotonia das células. Em seguida, foi transferido para outra placa contendo solução fixadora de metanol-ácido acético 3:1 e em seguida, o epitélio foi raspado delicadamente.

O material em suspensão foi transferido para um tubo de centrifuga, sendo descartado os restos da parede intestinal, e homogeneizado várias vezes para dissociar os grumos celulares. Em seguida, a suspensão foi centrifugada à 500 r.p.m. por 5 minutos sendo descartado o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 5 ml do mesmo fixador.

Esta suspensão foi gotejada em lâminas limpas e secas, que foram posteriormente armazenadas em caixas e conservadas na geladeira.

**b. de testículo.****b.1. por esmagamento**

Os testículos foram retirados do animal e cortados em pedaços com cerca de 1mm e colocados em água destilada gelada por no mínimo 20 minutos. Logo após, foram colocados em fixador de Carnoy (metanol, clorofórmio e ácido acético - 6:3:1) por aproximadamente 15 minutos e transferidos para uma solução de ácido acético 50%, por 15 minutos.

Os fragmentos do testículo foram esmagados entre lâmina e lamínula, sendo esta removida após congelamento com nitrogênio líquido. As lâminas foram secas e armazenadas à 4°C.

**b.2. por suspensão**

Os testículos foram retirados e cortados ao meio, colocado em água destilada gelada por 20 minutos e logo após, transferido para uma solução fixadora de metanol-ácido acético na proporção de 3:1, na qual o mesmo foi dissociado. Após 15 minutos a suspensão foi centrifugada a 500 r.p.m. por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 5 ml do mesmo fixador.

A suspensão foi gotejada em lâminas limpas e secas, que posteriormente foram armazenadas à 4°C.

### **c. de medula.**

Os ossos longos dos membros posteriores do animal foram retirados e as epífises cortadas com lâmina ou tesoura. Para retirada da medula foram injetados 8 a 10 ml de cloreto de potássio 0,075M no canal medular, permanecendo o material nesta mesma solução por 45 a 60 minutos, à temperatura ambiente.

Após este tempo, a suspensão foi centrifugada a 500 r.p.m. por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado foi fixado em metanol-ácido acético na proporção de 3:1.

A suspensão de células foi gotejada sobre as lâminas, as quais foram deixadas secar e armazenadas à 4°C.

### **3.3. Coloração convencional com Giemsa.**

As lâminas obtidas com material de medula, intestino e testículo foram coradas com uma solução de Giemsa à 10%, em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8 por aproximadamente 15 minutos, lavadas em água destilada, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá ou Entelan.

### **3.4. Banda C.**

Foram testados vários métodos de Banda C os quais apresentavam pequenas modificações em relação ao proposto por SUMNER (1972), como por exemplo o utilizado por SCHMID (1978a e b, 1979). Os métodos que deram resultado melhor foram os propostos por KING (1980) para intestino e testículo, e por SCHMID (1982) para medula.

### **3.4.1. Banda C para intestino (KING, 1980).**

As lâminas foram tratadas com HCl 0,02N por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e secas ao ar.

Em seguida, as lâminas foram submetidas ao tratamento com solução saturada de Ba(OH)<sub>2</sub> (5%) previamente aquecida e deixadas em banho-Maria à 50°C de 1 a 5 minutos. Após este tempo, foi adicionado rapidamente HCl 0,02N e em seguida água destilada até eliminar totalmente a solução de Ba(OH)<sub>2</sub>. Foi então adicionada uma solução de NaCl 0,3N e citrato de sódio 0,03N (2xSSC) o material foi deixado em estufa à 65°C por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com Giemsa conforme descrito no ítem 3.3.

### **3.4.2. Banda C para medula (SCHMID, 1982).**

As lâminas foram tratadas com solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente, por 30 minutos, lavadas em água destilada e em seguida foi adicionada a solução saturada de Ba(OH)<sub>2</sub> previamente aquecida. As lâminas foram deixadas em banho-Maria à 30°C, por cerca de 5 minutos. Logo após, foi adicionada água destilada até que o excesso de Ba(OH)<sub>2</sub> fosse eliminado e, em seguida as lâminas foram lavadas com HCl 0,2N.

Foi então adicionada uma solução de 2xSSC e as lâminas deixadas em estufa à 65°C por 1 hora. Em seguida, foram lavadas em água destilada, coradas com Giemsa 8% (pH 6.8), passadas em água, secas ao ar livre e montadas em bálsamo do Canadá ou Entelan.

### **3.5. Impregnação pela prata (Ag-NOR) (HOWELL & BLACK, 1980).**

O método de HOWELL e BLACK (1980), utiliza duas soluções:

- A → gelatina à 2% em água bidestilada e ácido fórmico à 1% .
- B → nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 50% em água bidestilada. Esta solução foi sempre mantida em geladeira por 18 horas antes do uso para diminuir a deposição inespecífica de prata na lâmina.

As soluções A e B foram pingadas sobre o material, na proporção de 1:2, respectivamente. Com ajuda de uma lamínula as soluções foram misturadas e em seguida as lâminas foram levadas à estufa à 60°C até que o material adquirisse uma coloração amarelo-ouro. A seguir, as lâminas foram lavadas com água bidestilada, secas ao ar e montadas.

### **3.6. Montagem das lâminas e observação.**

As lâminas foram diafanizadas em xilol por no mínimo 10 minutos e em seguida montadas com bálsamo do Canadá ou Entelan.

Para observação das lâminas foi utilizado microscópio Zeiss, sendo as melhores metáfases marcadas e fotografadas.

### **3.7. Fotografias.**

Foi utilizado microscópio Zeiss com câmara fotográfica acoplada e filme Agfa Copex Pan, branco e preto.

### 3.8. Montagem dos cariótipos.

As metáfases obtidas a partir de intestino e de medula óssea foram fotografadas, ampliadas e o comprimento dos cromossomos medido com paquímetro convencional.

O número diplóide de cada espécie foi reconhecido após contagem de no mínimo 50 metáfases somáticas e comparado com o número haplóide, observado na meiose da gônada masculina.

A identificação dos cromossomos foi baseada nas medidas do tamanho relativo do cromossomo, índice centromérico e relação de braços de cada elemento. O tamanho relativo (TR) do cromossomo expressa em porcentagem a proporção entre o tamanho absoluto do cromossomo individual (TI) e o tamanho total (TTn) dos cromossomos de um complemento haplóide:  $TR = TI \times 100/TTn$ . O índice centromérico (IC) indica a posição do centrômero e é a relação do braço menor (Bm) com o tamanho absoluto do cromossomo (TI):  $IC = Bm/TI$ . A relação de braços (RB) é função do centrômero. É obtida pela relação do braço maior (BM) com o braço menor (Bm):  $RB = BM/Bm$ .

Estes dados foram obtidos diretamente das ampliações fotográficas de pelo menos 5 metáfases de cada espécime. Procurou-se utilizar no mínimo 5 animais de cada espécie. Com essas medidas foi possível a construção dos idiogramas e a montagem dos cariótipos. As fotografias foram recortadas e os cromossomos dispostos em pares, de acordo com a posição do centrômero e a ordem decrescente de tamanho.

Os valores utilizados para classificar os cromossomos estão indicados na tabela 3.

TABELA 3: Valores para classificação dos cromossomos de acordo com BEÇAK (1967).

MORFOLOGIA	RELAÇÃO DOS BRAÇOS	ÍNDICE CENTROMÉRICO
Acrocêntrico	$> 4,0$	$< 0,20$
Submetacêntrico	1,5 à 4,0	0,20 à 0,40
Metacêntrico	$< 1,5$	$> 0,40$

## 4. RESULTADOS

### 4.1. *H. prasina*

#### 4.1.1. Descrição do cariótipo

Foram analisados os cromossomos de *H. prasina* das populações de Jundiá (Figs. 5A e B), de Botucatu (Figs. 7A e B) e de São Joaquim (Figs. 9A e B).

O número diplóide encontrado foi de 24 cromossomos nas metáfases mitóticas e número haplóide de 12 cromossomos nas metáfases meióticas (Figs. 5A,B e C; 7A,B e C e 9A,B e C).

Os pares 1, 8, 11 e 12 são metacêntricos; os pares 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10 são submetacêntricos e o par 6 é acrocêntrico (Figs. 5A,B e C; 7A,B e C; 9A,B; 11A, B e C e tabela 4).

Não foi encontrada constrição secundária em nenhum dos cromossomos e também nenhum par heteromórfico no machos (Fig. 11).

A tabela 4 mostra os dados morfométricos das populações de Jundiá, de Botucatu e de São Joaquim respectivamente. Não houve grandes diferenças na relação de braços entre as 3 populações.

#### 4.1.2. Banda C

Todas as populações de *H. prasina* apresentaram heterocromatina constitutiva em todos os centrômeros, com exceção do par 12 (Figs. 6A, 8A e 10A). No par 7 foi encontrada uma quantidade maior de heterocromatina que se estende do centrômero em direção ao braço maior (Figs. 6A, 8A e 10A). O par 10 também apresentou heterocromatina quase que em todo braço longo nas três populações (Fig. 6A, 8A e

10A), sendo observado heteromorfismo no tamanho do bloco heterocromático em apenas um espécime da população de Jundiá (Fig. 6A).

Bandas heterocromáticas intersticiais foram encontradas no braço curto do par 1 e no braço longo dos pares 3 e 4 na população de Jundiá e de Botucatu (Figs. 6A e 8A). Por outro lado, a população proveniente de São Joaquim, apresentou bandas intersticiais apenas nos pares 1 e 3 (Fig. 10A). Todas as bandas intersticiais estão localizadas na mesma posição (Fig 11).

Uma notável banda telomérica no braço longo do par 1 foi encontrada somente nas populações de Botucatu e de São Joaquim (Figs. 8A e 10A).

O padrão de bandas heterocromáticas das três populações está representado nos ideogramas da figura 11.

#### **4.1.3. NOR**

Os exemplares analisados desta espécie mostraram atividade dos cístrons ribossomais em apenas um par de cromossomos homólogos. Nas três populações, o par 12, um pequeno metacêntrico, carrega no telômero do braço longo a marcação da NOR (Figs. 6B, 8B e 10B).

Não foi encontrado heteromorfismo no tamanho da NOR e também nenhuma NOR adicional está presente (Figs. 6B, 8B e 10B).

Os ideogramas representados na figura 11 indicam a localização e posicionamento da NOR no par 12 da população de Jundiá, de Botucatu e de São Joaquim.

Nesta espécie, os núcleos interfásicos também possuem 1 ou 2 nucléolos evidenciados pelo método de Ag-NOR, em todas as populações analisadas (Figs. 6C, 8C e 10C).

## **4.2. *H. caingua*.**

### **4.2.1. Descrição do cariótipo**

Os exemplares analisados desta espécie apresentaram número diplóide de 24 cromossomos (Figs. 12A e B). Esse número foi confirmado pela contagem de 12 bivalentes na metáfase I da meiose (Fig. 12C).

A morfologia dos cromossomos foi analisada através do pareamento dos homólogos e medição de cada um. Todos os espécimes apresentaram cariótipo semelhante. Os pares 1, 8, 11 e 12 são metacêntricos; os pares 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10 são submetacêntricos e o par 6 é acrocêntrico. O par 7 apresenta uma constrição secundária na região pericentromérica do braço maior (Figs. 12A e B).

Não foi encontrado, com o uso de coloração convencional, nenhum par heteromórfico no cariótipo dos machos (Fig. 12A e B). A classificação dos cromossomos com relação à posição do centrômero, com respectivos dados morfométricos e o ideograma são mostrados na tabela 5 e na figura 14, respectivamente.

### **4.2.2. Banda C**

O padrão de banda C apresentado por esta espécie foi evidenciado em metáfases mitóticas de intestino (Fig. 13A).

Todos os cromossomos mitóticos apresentaram heterocromatina centromérica. Os pares 3 e 11 apresentaram também bandas heterocromáticas intersticiais nos braços longos dos mesmos (Fig. 13A).

O padrão de heterocromatina constitutiva está representado no ideograma (Fig. 14).

### 4.2.3. NOR

Nos exemplares analisados desta espécie, o método de prata detectou NOR ativa em apenas um par de cromossomos mitóticos. Localiza-se na região pericentromérica no braço longo do par 7 e coincide com a constrição secundária (Figs. 13B e 14).

Os núcleos interfásicos das células do epitélio intestinal apresentaram um ou 2 nucléolos, sempre bastante evidentes (Fig. 13C).

## 4.3. *H. p. pulchella*.

### 4.3.1. Descrição do cariótipo

Os exemplares analisados apresentaram número diplóide de 24 cromossomos em suas metáfases mitóticas e número haplóide de 12 cromossomos nas metáfases meióticas (Figs. 15A-C e 16A-C).

Os pares 1, 8 e 11 são metacêntricos; os pares 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10 submetacêntricos; e o par 6 acrocêntrico. O par 12 apresentou heteromorfismo: em algumas metáfases os dois cromossomos do par apareceram como metacêntricos e em outras, um era metacêntrico e o outro submetacêntrico. Esta característica ocorreu devido a presença de uma grande constrição secundária no braço longo de um dos cromossomos (Figs. 15A e B; 16 A e B; e 18).

Não foi verificada a presença de cromossomos heteromórficos através de coloração convencional (Figs. 15B e 16B).

### 4.3.2. Banda C

Os exemplares analisados desta espécie apresentaram um padrão de banda C diferenciado em relação às outras espécies analisadas. Os pares 3 e 8 apresentaram heterocromatina centromérica fracamente corada, enquanto nos pares 1, 2 e 10 foi observada heterocromatina mais fortemente corada ( Fig. 17A e 18).

O par 10 mostrou uma forte marcação que se estende do centrômero ao braço maior (Fig. 17A).

Heterocromatina intersticial foi encontrada apenas no braço curto dos cromossomos do par 1 (Fig. 17A).

### 4.3.3. NOR

Foi detectado apenas um par de cístrons ribossomais ativos nos cromossomos mitóticos de intestino, localizado no telômero do par 12, coincidindo com a constrição secundária (Fig. 17B). Este par de homólogos apresenta um heteromorfismo no tamanho da NOR, já que um dos cromossomos possui a NOR com tamanho maior que a do outro cromossomo (Figs. 17B e 18). Este heteromorfismo ocorreu em apenas 4 espécimes dos 14 analisados, ou seja, em aproximadamente 28%.

As células do epitélio intestinal apresentaram 1 ou 2 nucléolos sempre bastante evidentes ( Fig. 17C).

#### **4.4. *H. semiguttata*.**

##### **4.4.1. Descrição do cariótipo**

Os exemplares desta espécie proveniente de Ponta Grossa, PR, apresentaram número diplóide de 24 cromossomos e 12 bivalentes na metáfase I da meiose (Figs. 19A, B e C).

Todos os espécimes apresentaram cariótipo semelhante. Os pares 1, 8, 11 e 12 são metacêntricos; os pares 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10 são submetacêntricos e o par 6 acrocêntrico (Figs. 19B e 21).

Não foi possível detectar através de coloração convencional, nenhum par heteromórfico e também nenhuma constrição secundária aparente (Fig. 19B).

##### **4.4.2. Banda C**

O padrão de banda C apresentado pelos exemplares desta espécie foi evidenciado em células mitóticas de intestino e de testículo.

Foi detectada heterocromatina centromérica em todos os cromossomos com exceção do par 12 (Figs. 20A e 21).

Heterocromatina intersticial foi observada no braço curto do par 1 e no braço longo do par 3. O par 7 mostrou uma marcação heterocromática evidente na região pericentromérica do braço longo e o par 10 apresentou o braço longo quase totalmente heterocromático (Figs. 20A e 21).

### 4.4.3. NOR

Assim como os demais exemplares das espécies analisadas neste trabalho, os espécimes de *H. semiguttata* apresentaram atividade dos cístrons ribossomais em apenas um par de cromossomos homólogos. Este se localiza no telômero do par 12, um pequeno metacêntrico (Figs 20B e 21).

Não foi encontrado, talvez devido à pequena amostra, nenhum heteromorfismo no tamanho da NOR entre os espécimes analisados e também nenhuma NOR adicional (Fig. 21).

Nos núcleos interfásicos, o método de AgNOR evidenciou 1 ou 2 nucléolos (Fig. 20C).

## 4.5. *H. p. joaquini*.

### 4.5.1. Descrição do cariótipo

Os exemplares desta espécie, coletados na região de Urubici, SC, apresentaram número diplóide de 24 cromossomos em suas metáfases mitóticas e número haplóide de 12 bivalentes na meiose I (Figs. 22A, B e C).

O cariótipo apresenta os pares 1, 8, 10 e 12 metacêntricos; os pares 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 11 submetacêntricos e o par 6 acrocêntrico. Nesta espécie, os dados morfométricos indicam que o par 10 é metacêntrico e o 11 submetacêntrico, o contrário do encontrado nas outras espécies analisadas (Figs. 22B e 24; tabela 8).

Os dois espécimes analisados não apresentaram constrição secundária em nenhum dos cromossomos do complemento e também nenhum par heteromórfico que indicasse par sexual nos machos, através de coloração convencional (Figs. 22A, B e 24).

#### 4.5.2. Banda C

Os exemplares desta subespécie do grupo *pulchella*, apresentaram heterocromatina centromérica em todos os cromossomos, exceto no par 12 (Figs. 23A e 24)

Banda intersticial foi detectada apenas no braço longo dos cromossomos do par 11 e uma forte banda telomérica está presente no braço longo do par 1 (Fig. 23A).

#### 4.5.3. NOR

Foi detectado apenas um cístron ribossomal ativo, localizado no telômero do par 1 metacêntrico. Não foi observada nenhuma NOR adicional e também nenhum heteromorfismo de tamanho da NOR (Figs. 23B e 24).

Através do método de AgNOR foi possível detectar 1 ou 2 nucléolos nos núcleos interfásicos das células do epitélio intestinal (Fig. 23C).

#### 4.6. Comparação entre as espécies estudadas

As principais diferenças e semelhanças, em termos citogenéticos, entre as espécies do grupo *pulchella* estudadas neste trabalho estão resumidas na tabela 9. Verifica-se que há grande semelhança nos cariótipos, à exceção de *H. p. joaquini*.

Algumas bandas intersticiais são comuns em algumas das espécies estudadas, como é o caso de uma banda localizada no braço curto do cromossomo 1 presente em *H. p. pulchella*, *H. prasina* e *H. semiguttata* e de heterocromatina pericentromérica abundante no braço longo do cromossomo 7 presente em *H. prasina* e *H. semiguttata*.

A banda intersticial no braço longo do cromossomo 3 está presente em *H. prasina* (as três populações), em *H. caingua* e em *H. semiguttata*. *H. p. joaquini*, apresenta uma banda telomérica acentuada no braço longo do par 1, presente também nas populações de *H. prasina* de Botucatu e de São Joaquim.

A NOR aparece no par 12 em três das espécies e só houve heteromorfismo de tamanho em *H. p. pulchella*, e em *H. caingua* e *H. p. pulchella* coincide com a constrição secundária.

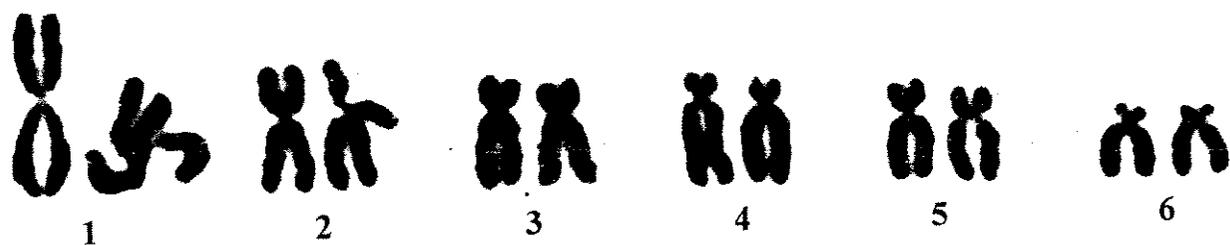
#### 4.7. NOR na espermatogênese.

Todos os exemplares analisados apresentaram o mesmo padrão de atividade dos genes ribossomais durante a espermatogênese (Figs. 25 a 29)

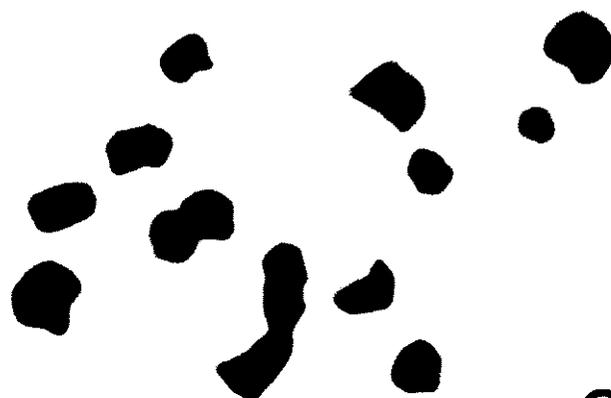
Observou-se o nucléolo nas fases iniciais da prófase até o paquíteno. Após esta fase, não é mais detectado até o final da meiose. A marcação prata-positiva só foi detectada novamente nas fases iniciais da espermiogênese e em espermátides em espermição.



A

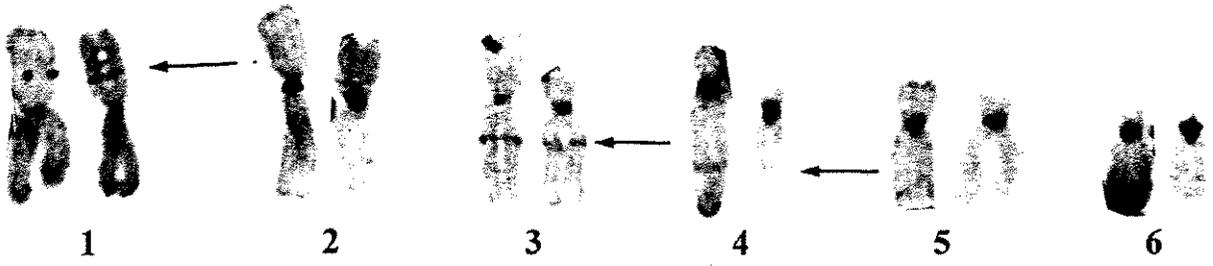


B

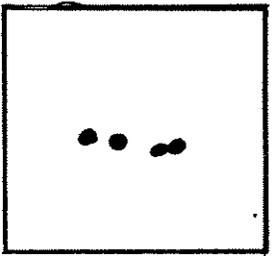
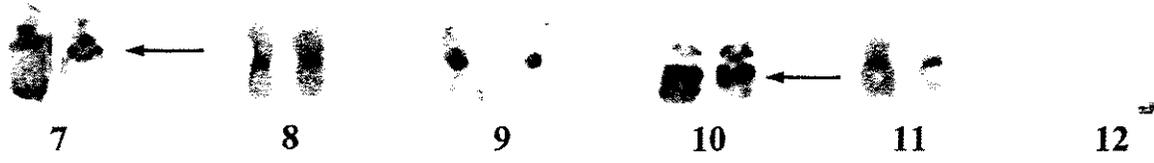


C

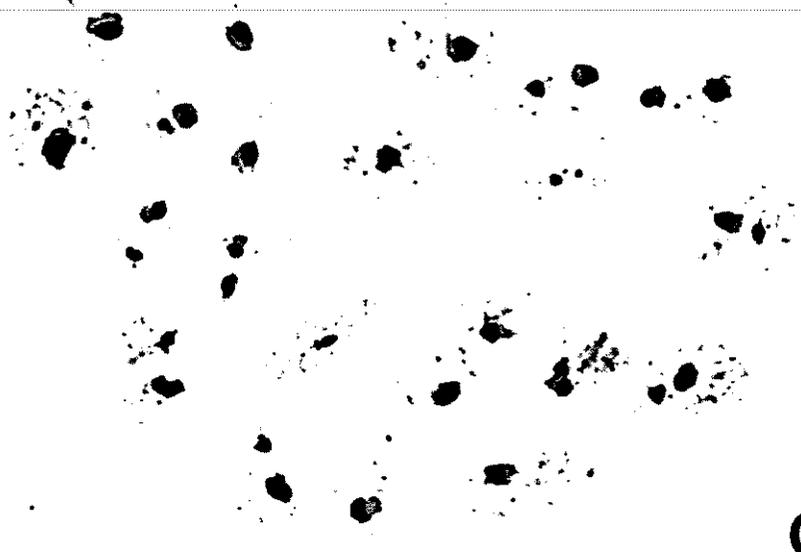




A



B

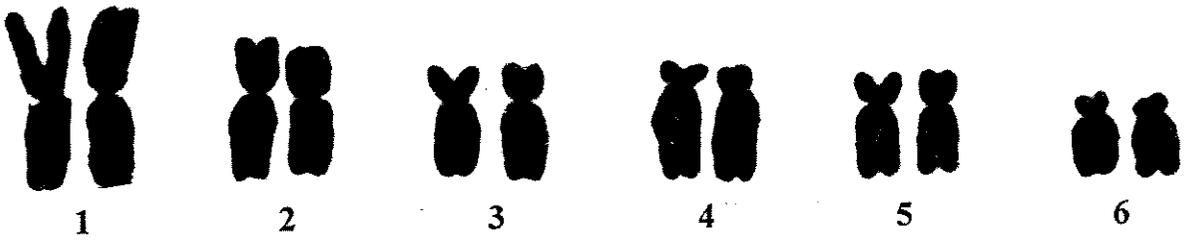


C 

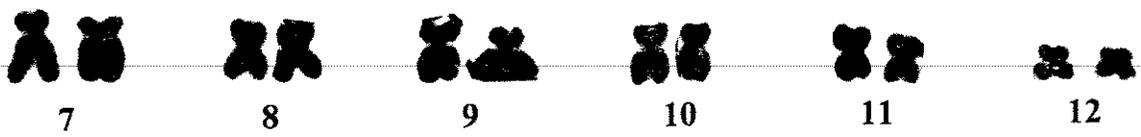
---



A

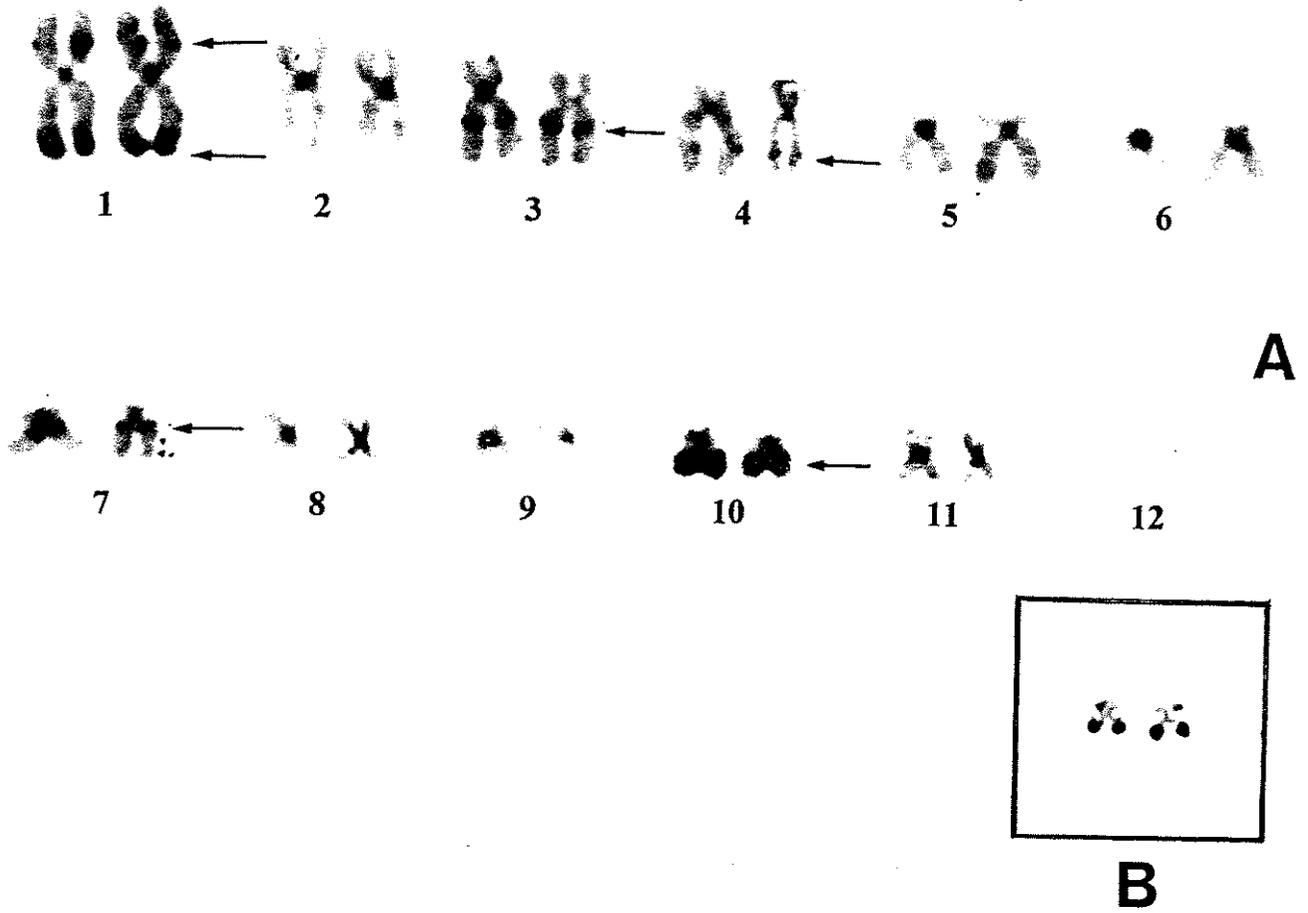


B



C

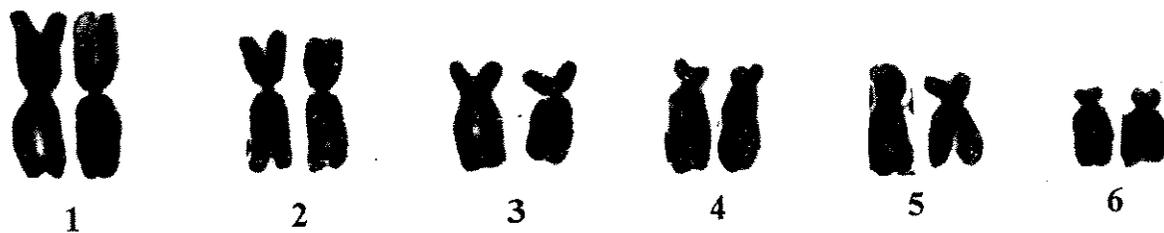




C



A

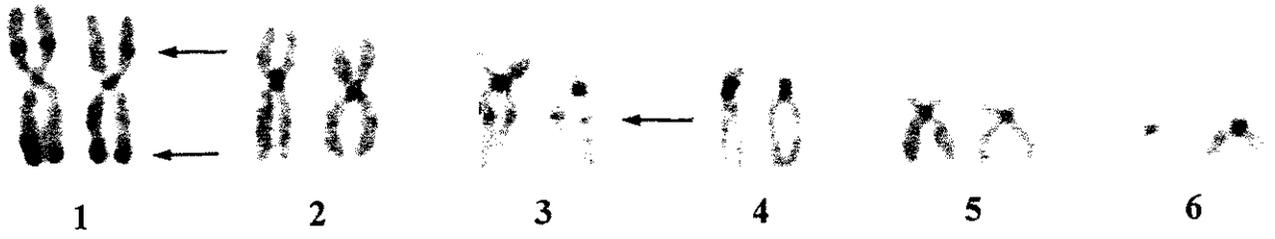


B

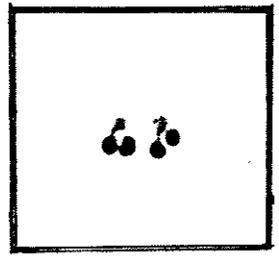


C





A



B



C ———

TABELA 4: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *H. prasina*.  
Classificação segundo Beçak (1967).

CROMOSSOMO	<i>H. prasina</i> (população de Jundiaí, SP)			<i>H. prasina</i> (população de Botucatu, SP)			<i>H. prasina</i> (população de São Joaquim, SC)			P.C
	R.B. X ± S	T.R.% X ± S	I.C. X ± S	R.B. X ± S	T.R.% X ± S	I.C. X ± S	R.B. X ± S	T.R.% X ± S	I.C. X ± S	
01	1,15± 0,05	18,95± 0,15	0,49 ± 0,005	1,07± 0,05	18,17± 0,35	0,48± 0,010	1,10± 0,03	19,05± 0,10	0,49± 0,009	M
02	1,65± 0,05	12,80± 0,20	0,38 ± 0,009	1,60± 0,15	13,72± 0,42	0,38± 0,020	1,55± 0,10	12,95± 0,30	0,39± 0,010	SM
03	3,15± 0,10	11,35± 0,23	0,31 ± 0,005	2,30± 0,03	10,91± 0,28	0,30± 0,000	3,00± 0,15	11,20± 0,45	0,30± 0,010	SM
04	3,45± 0,15	10,52± 0,20	0,23 ± 0,001	3,18± 0,19	10,53± 0,31	0,24± 0,010	3,38± 0,06	10,33± 0,26	0,25± 0,005	SM
05	2,90± 0,07	9,41± 0,10	0,28 ± 0,006	2,10± 0,23	9,25± 0,16	0,32± 0,020	2,80± 0,20	9,52± 0,15	0,29± 0,015	SM
06	4,15± 0,20	7,52± 0,20	0,19 ± 0,010	4,14± 0,18	7,40± 0,34	0,19± 0,005	4,20± 0,10	7,33± 0,13	0,19± 0,003	A
07	1,83± 0,15	6,41± 0,13	0,38 ± 0,005	1,89± 0,18	6,78± 0,29	0,35± 0,020	1,90± 0,12	6,54± 0,11	0,38± 0,005	SM
08	1,12± 0,10	5,97± 0,20	0,48 ± 0,005	1,08± 0,02	5,86± 0,33	0,48± 0,005	1,06± 0,05	5,71± 0,09	0,48± 0,003	M
09	1,94± 0,12	5,10± 0,05	0,38 ± 0,015	1,83± 0,19	5,28± 0,12	0,35± 0,020	1,80± 0,09	5,15± 0,18	0,37± 0,002	SM
10	1,3± 0,05	4,63± 0,10	0,37 ± 0,003	1,73± 0,14	4,71± 0,04	0,37± 0,020	1,75± 0,10	4,52± 0,18	0,38± 0,020	SM
11	1,10± 0,03	4,10± 0,15	0,49 ± 0,006	1,04± 0,05	4,14± 0,21	0,49± 0,010	1,05± 0,03	4,05± 0,12	0,48± 0,010	M
12	1,05± 0,03	3,20± 0,15	0,49 ± 0,005	1,02± 0,02	3,24± 0,29	0,49± 0,005	1,03± 0,02	3,12± 0,10	0,49± 0,005	M

R.B. = Relação de braços; T.R. = Tamanho relativo; I.C. = Índice centromérico; P.C. = Posição do centrômero; S = Desvio padrão; M = metacêntrico; SB = Submetacêntrico e A = Acrocêntrico.

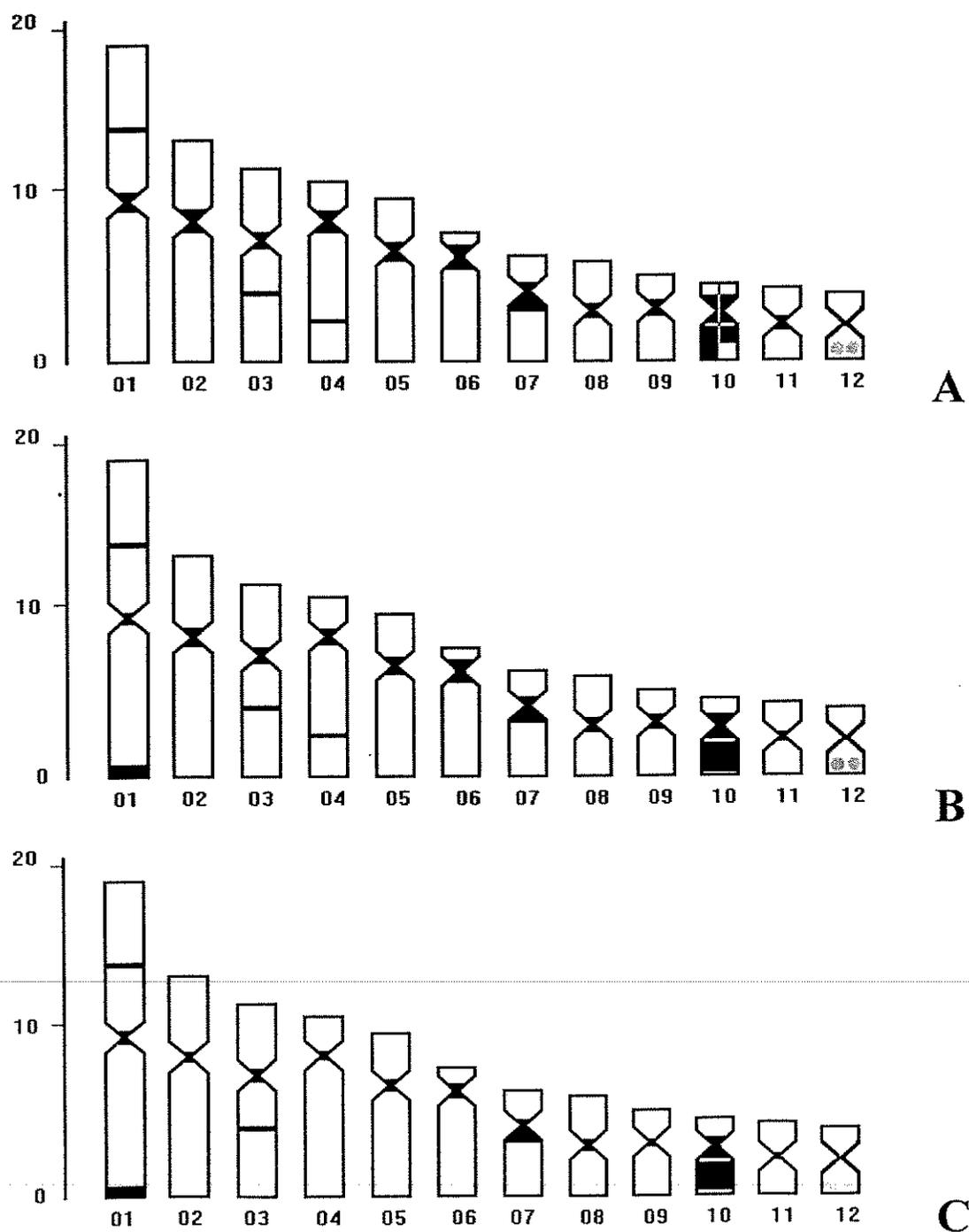
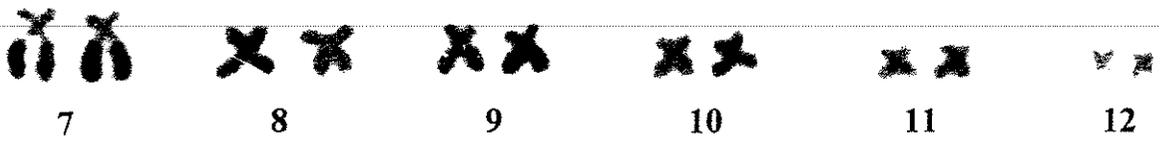
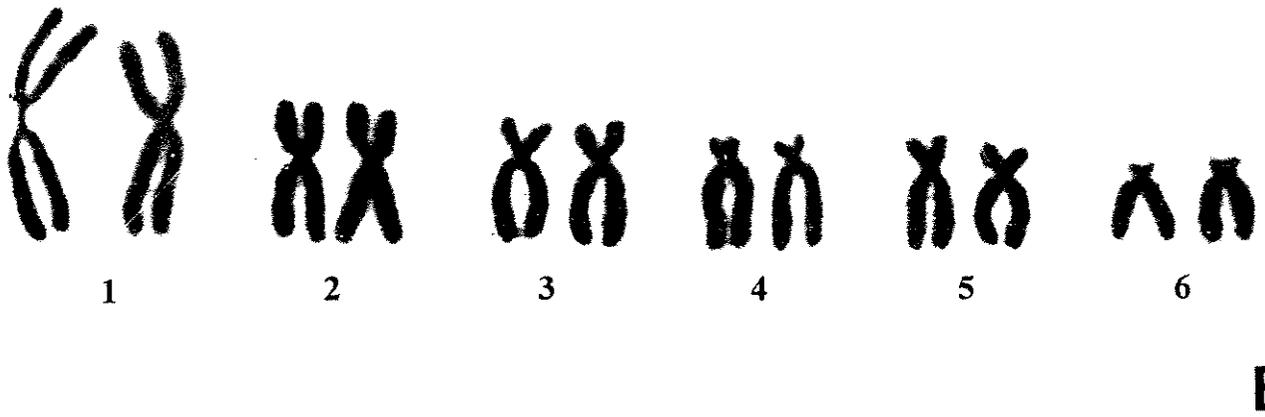
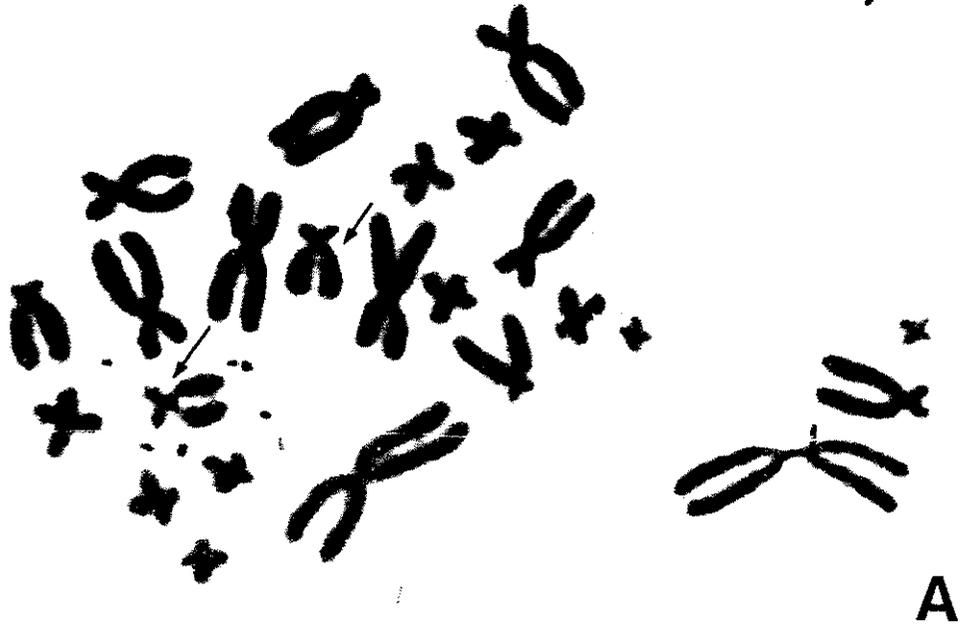
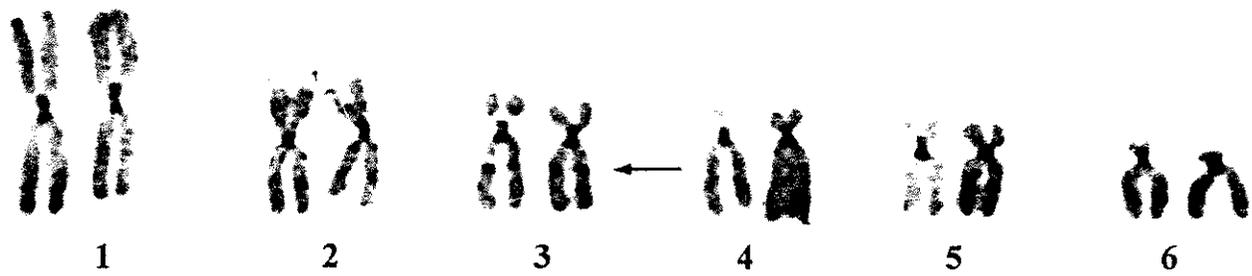
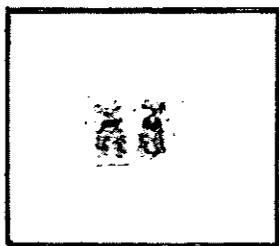


Figura 11: Ideogramas representativos do número de cromossomos, padrão de banda C (áreas escuras) e localização de NOR (áreas cinzas) de *H. prasina*. A: população de Jundiaí, SP; B: Botucatu, SP e C: São Joaquim, SC. Em A o heteromorfismo no par 10.





A



B



C

TABELA 5: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *H. caingua*.

Classificação segundo Beçak (1967)

CROMOSSOMO	R.B. X ± S	T.R.% X ± S	I.C. X ± S	P.C.
01	1,17 ± 0,03	19,52 ± 0,11	0,46 ± 0,005	M
02	1,57 ± 0,04	12,86 ± 0,34	0,38 ± 0,004	SM
03	2,21 ± 0,17	11,15 ± 0,75	0,31 ± 0,010	SM
04	3,36 ± 0,13	10,49 ± 0,50	0,23 ± 0,008	SM
05	2,45 ± 0,11	9,56 ± 0,12	0,29 ± 0,008	SM
06	4,34 ± 0,19	7,64 ± 0,19	0,18 ± 0,008	A
07	2,16 ± 0,13	6,71 ± 0,13	0,35 ± 0,010	SM
08	1,05 ± 0,05	5,62 ± 0,19	0,48 ± 0,010	M
09	1,70 ± 0,08	4,85 ± 0,24	0,36 ± 0,010	SM
10	1,56 ± 0,16	4,59 ± 0,20	0,38 ± 0,020	SM
11	1,09 ± 0,06	3,93 ± 0,12	0,47 ± 0,010	M
12	1,03 ± 0,01	2,97 ± 0,25	0,49 ± 0,004	M

R.B. = Relação de braços; T.R. = Tamanho relativo; I.C. = Índice centromérico; P.C. = Posição do centrômero; S = Desvio padrão; M = metacêntrico; SB = Submetacêntrico e A = Acrocêntrico.

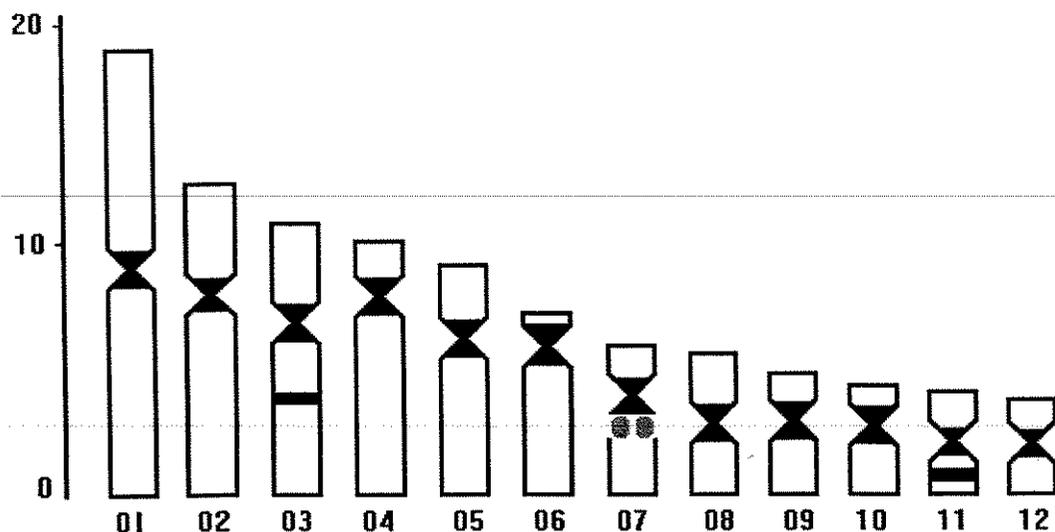
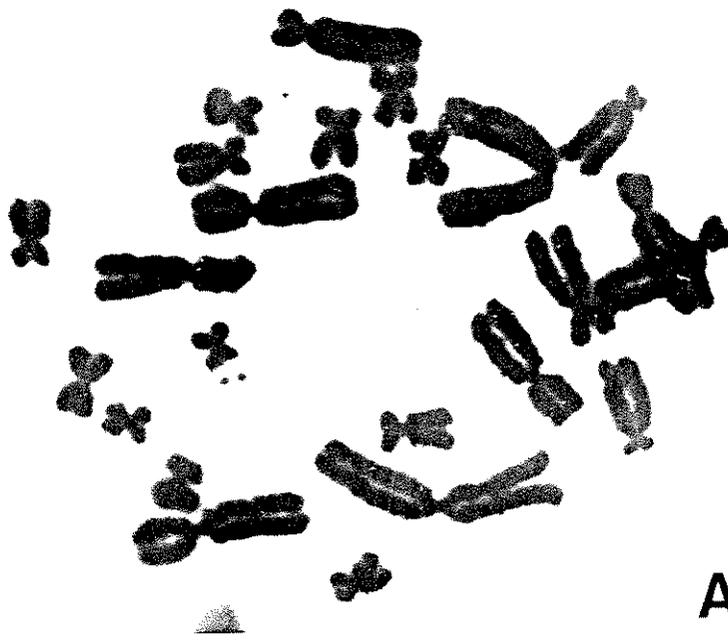
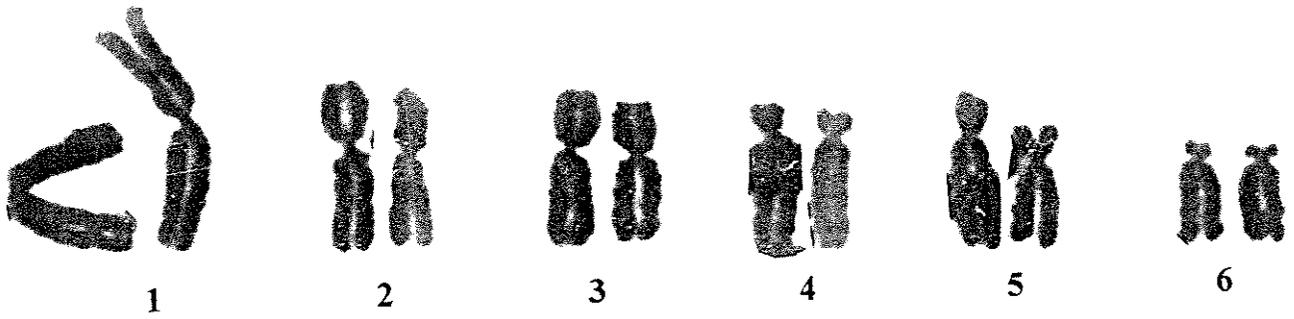


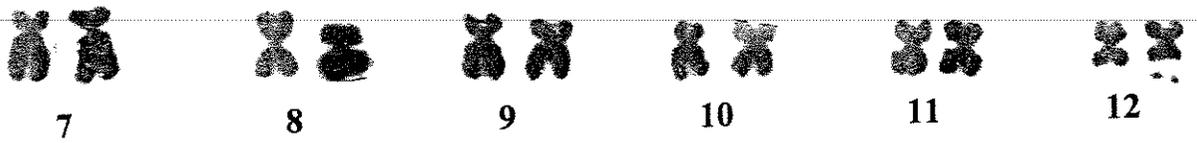
Figura 14: Ideograma representativo do número de cromossomos, padrão de banda C (áreas pretas) e localização da NOR (áreas cinzas) de *H. caingua*.



A



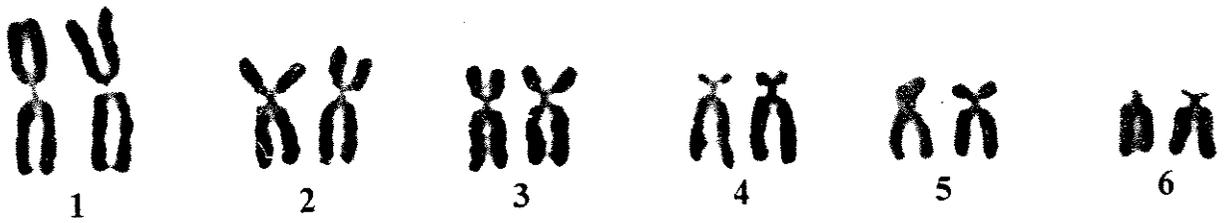
B



C ———



A

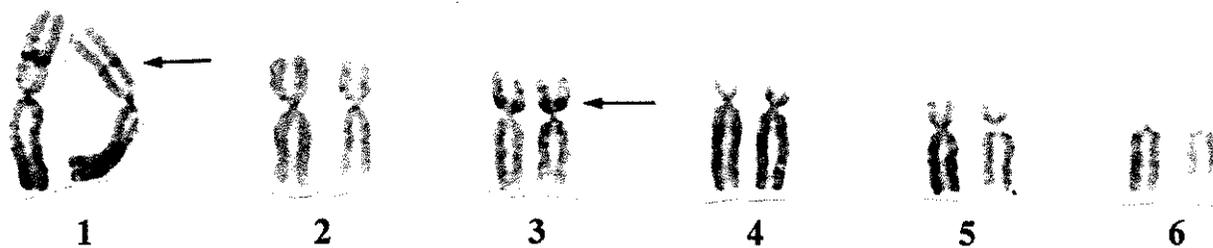


B

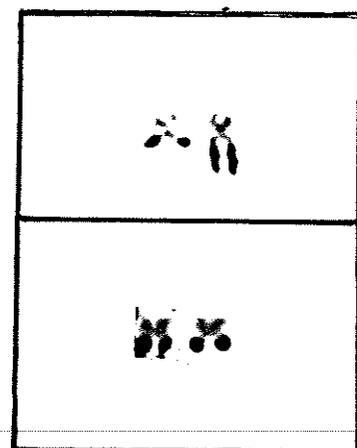


C





**A**



**B**



**C**



TABELA 6: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *H. pulchella*.  
Classificação segundo Beçak(1967)

CROMOSSOMO	R.B. X ± S	T.R. (%) X ± S	I.C. X ± S	P.C.
01	1,03 ± 0,02	18,13 ± 0,43	0,49 ± 0,00	M
02	1,62 ± 0,02	12,72 ± 0,19	0,37 ± 0,00	SM
03	1,66 ± 0,14	11,15 ± 0,44	0,37 ± 0,01	SM
04	3,22 ± 0,34	10,42 ± 0,22	0,23 ± 0,01	SM
05	2,06 ± 0,28	9,47 ± 0,48	0,33 ± 0,03	SM
06	4,19 ± 0,24	7,52 ± 0,23	0,19 ± 0,00	A
07	1,85 ± 0,14	6,26 ± 0,28	0,34 ± 0,01	SM
08	1,00 ± 0,00	5,92 ± 0,49	0,49 ± 0,00	M
09	1,67 ± 0,06	5,15 ± 0,40	0,37 ± 0,01	SM
10	1,63 ± 0,12	4,66 ± 0,17	0,37 ± 0,02	SM
11	1,02 ± 0,02	4,41 ± 0,18	0,49 ± 0,01	M
12a	1,10 ± 0,06	3,13 ± 0,20	0,48 ± 0,03	M

R.B. = relação de braços; T.R. = tamanho relativo; I.C. = índice centromérico; P.C. = posição do centrômero; S = desvio padrão; M = metacêntrico; SB = submetacêntrico e A = acrocêntrico.

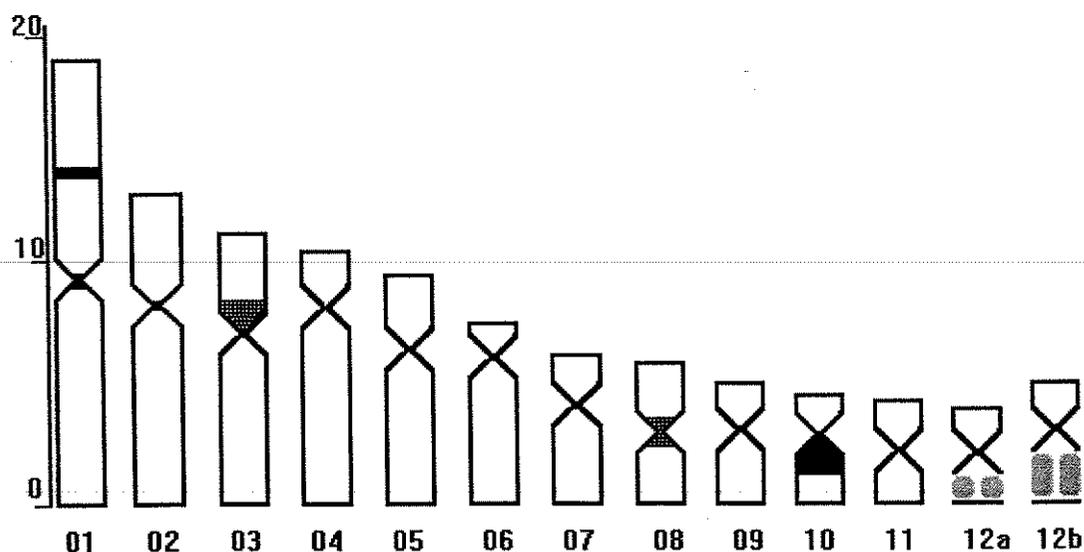
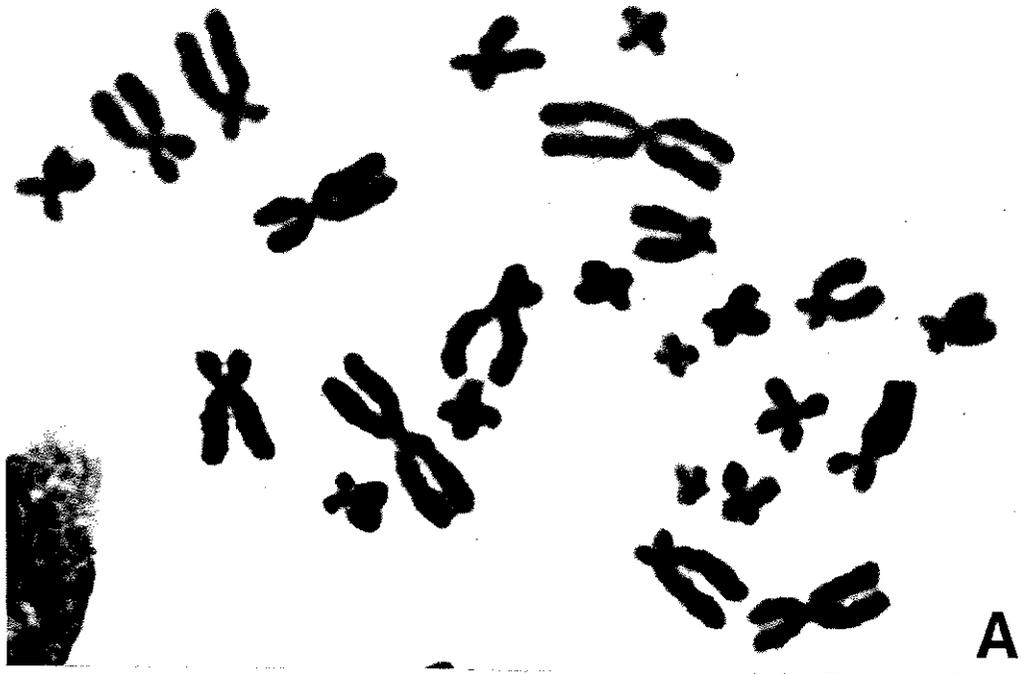
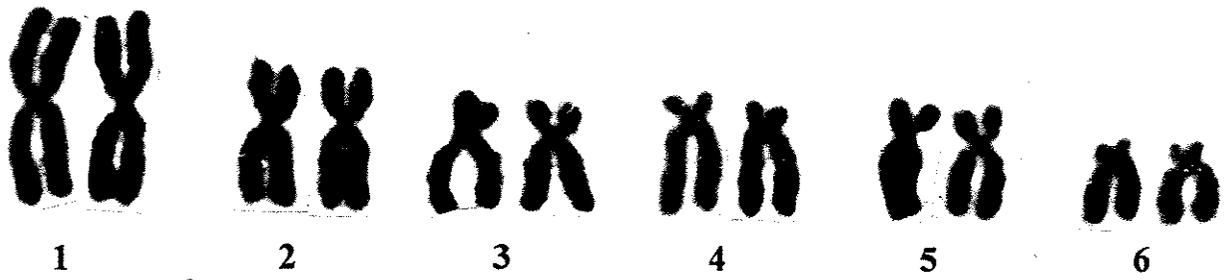


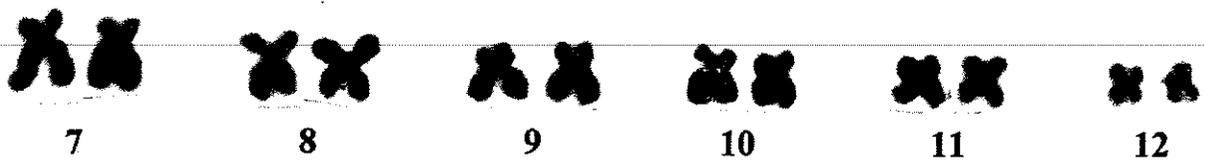
Figura 18: Ideograma de *H. pulchella*. Heterocromatina fortemente corada (áreas escuras) e fracamente corada (áreas hachuradas). NOR heteromórfica indicada no par 12 (áreas cinzas).



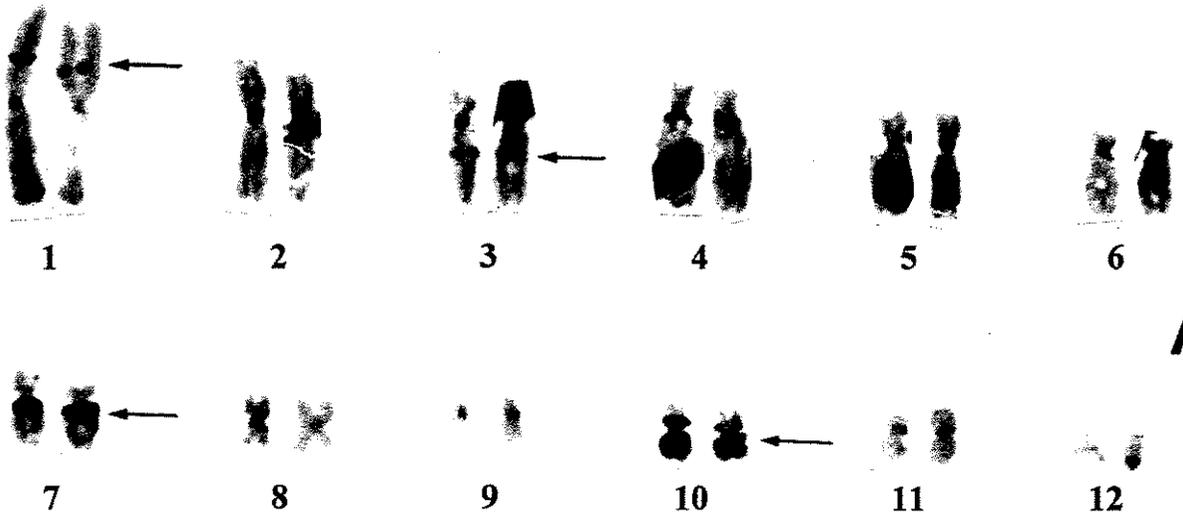
A



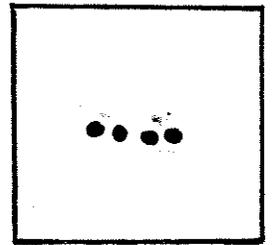
B



C



**A**



**B**



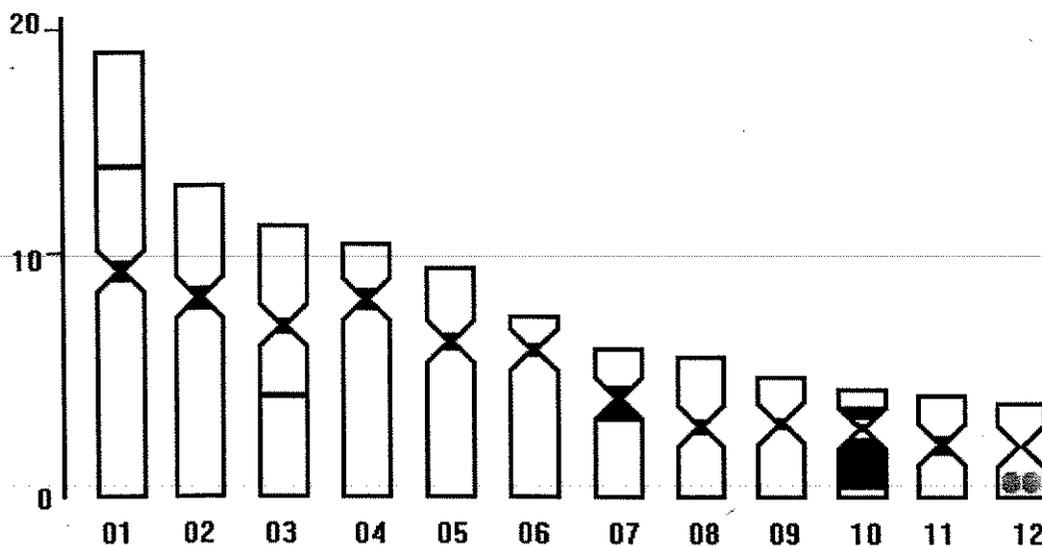
**C**

TABELA 7: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *H. semiguttata*.

Classificação segundo Beçak (1967)

CROMOSSOMO	R.B. $X \pm S$	T.R. (%) $X \pm S$	I.C. $X \pm S$	P.C.
01	1,05 $\pm$ 0,04	17,32 $\pm$ 0,24	0,48 $\pm$ 0,00	M
02	1,52 $\pm$ 0,01	12,49 $\pm$ 0,45	0,39 $\pm$ 0,00	SM
03	2,48 $\pm$ 0,31	11,35 $\pm$ 0,35	0,28 $\pm$ 0,03	SM
04	3,18 $\pm$ 0,10	9,70 $\pm$ 0,23	0,23 $\pm$ 0,00	SM
05	2,69 $\pm$ 0,22	9,28 $\pm$ 0,14	0,27 $\pm$ 0,01	SM
06	4,17 $\pm$ 0,06	7,60 $\pm$ 0,25	0,19 $\pm$ 0,00	A
07	2,06 $\pm$ 0,16	7,00 $\pm$ 0,30	0,32 $\pm$ 0,01	SM
08	1,01 $\pm$ 0,01	6,77 $\pm$ 0,27	0,48 $\pm$ 0,02	M
09	1,68 $\pm$ 0,16	5,52 $\pm$ 0,12	0,37 $\pm$ 0,02	SM
10	1,73 $\pm$ 0,25	5,00 $\pm$ 0,32	0,36 $\pm$ 0,03	SM
11	1,02 $\pm$ 0,03	4,42 $\pm$ 0,18	0,49 $\pm$ 0,00	M
12	1,01 $\pm$ 0,02	3,47 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,00	M

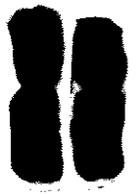
R.B. = relação de braços; T.R. = tamanho relativo; I.C. = índice centromérico; P.C. = posição do centrômero; S = desvio padrão; M = metacêntrico; SB = submetacêntrico e A = acrocêntrico.

Figura 21: Ideograma representativo dos cromossomos de *H. semiguttata*.

As áreas escuras correspondem a heterocromatina e as áreas cinzas a NOR.



A



1



2



3



4



5



6

B



7



8



9



10



11

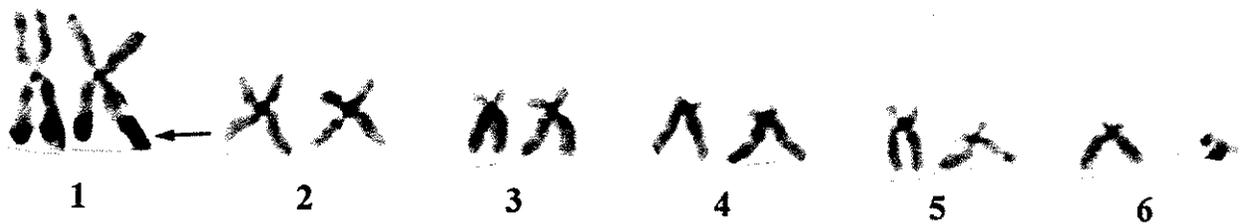


12

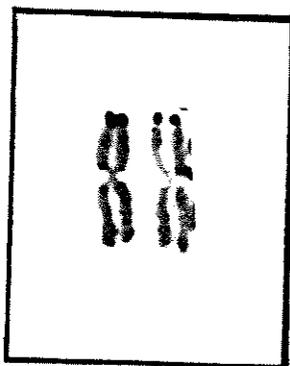
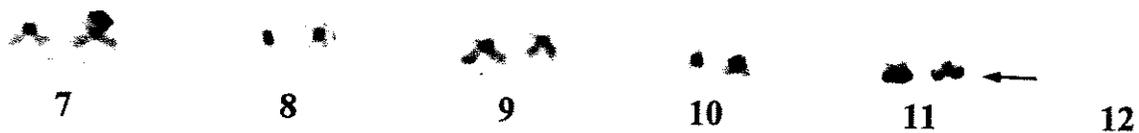


C





**A**



**B**

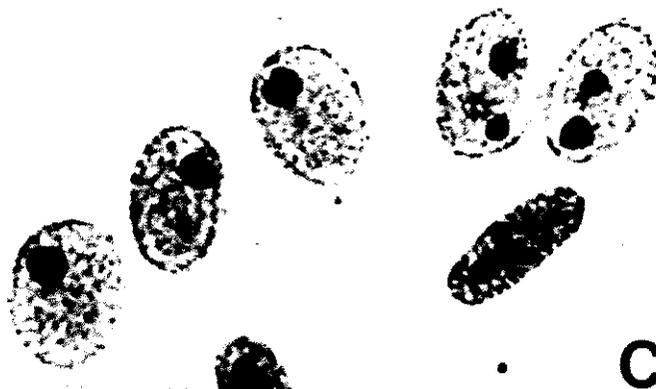


TABELA 8: Dados morfométricos de cromossomos mitóticos de *H. p joaquini*.  
Classificação segundo Beçak (1967)

CROMOSSOMO	R.B. $X \pm S$	T.R.% $X \pm S$	I.C. $X \pm S$	P.C.
01	$1,12 \pm 0,05$	$19,20 \pm 0,10$	$0,47 \pm 0,002$	M
02	$1,50 \pm 0,03$	$12,71 \pm 0,21$	$0,40 \pm 0,003$	SM
03	$2,29 \pm 0,10$	$11,15 \pm 0,30$	$0,30 \pm 0,005$	SM
04	$3,61 \pm 0,07$	$10,55 \pm 0,25$	$0,22 \pm 0,008$	SM
05	$2,02 \pm 0,12$	$10,00 \pm 0,15$	$0,33 \pm 0,010$	SM
06	$4,38 \pm 0,04$	$8,22 \pm 0,10$	$0,18 \pm 0,006$	A
07	$1,98 \pm 0,08$	$6,31 \pm 0,13$	$0,33 \pm 0,010$	SM
08	$1,01 \pm 0,13$	$5,30 \pm 0,20$	$0,49 \pm 0,006$	M
09	$1,62 \pm 0,07$	$5,00 \pm 0,25$	$0,38 \pm 0,004$	SM
10	$1,00 \pm 0,05$	$4,00 \pm 0,12$	$0,50 \pm 0,001$	M
11	$2,01 \pm 0,02$	$4,00 \pm 0,16$	$0,32 \pm 0,008$	SM
12	$1,02 \pm 0,02$	$3,60 \pm 0,25$	$0,49 \pm 0,005$	M

R.B. = Relação de braços; T.R. = Tamanho relativo; I.C. = Índice centromérico; P.C. = Posição do centrômero; S = Desvio padrão; M = metacêntrico; SM = Submetacêntrico e A = Acrocêntrico.

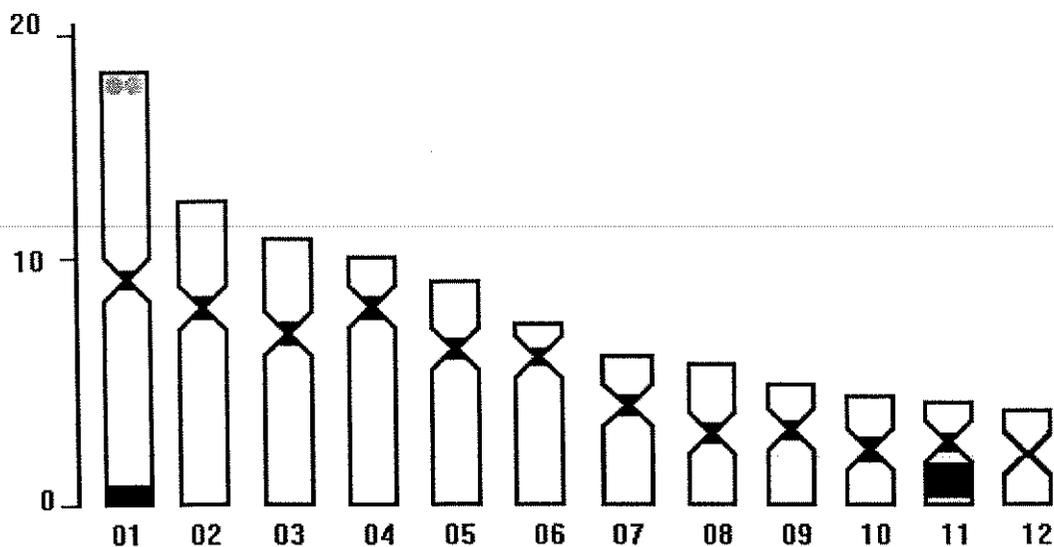
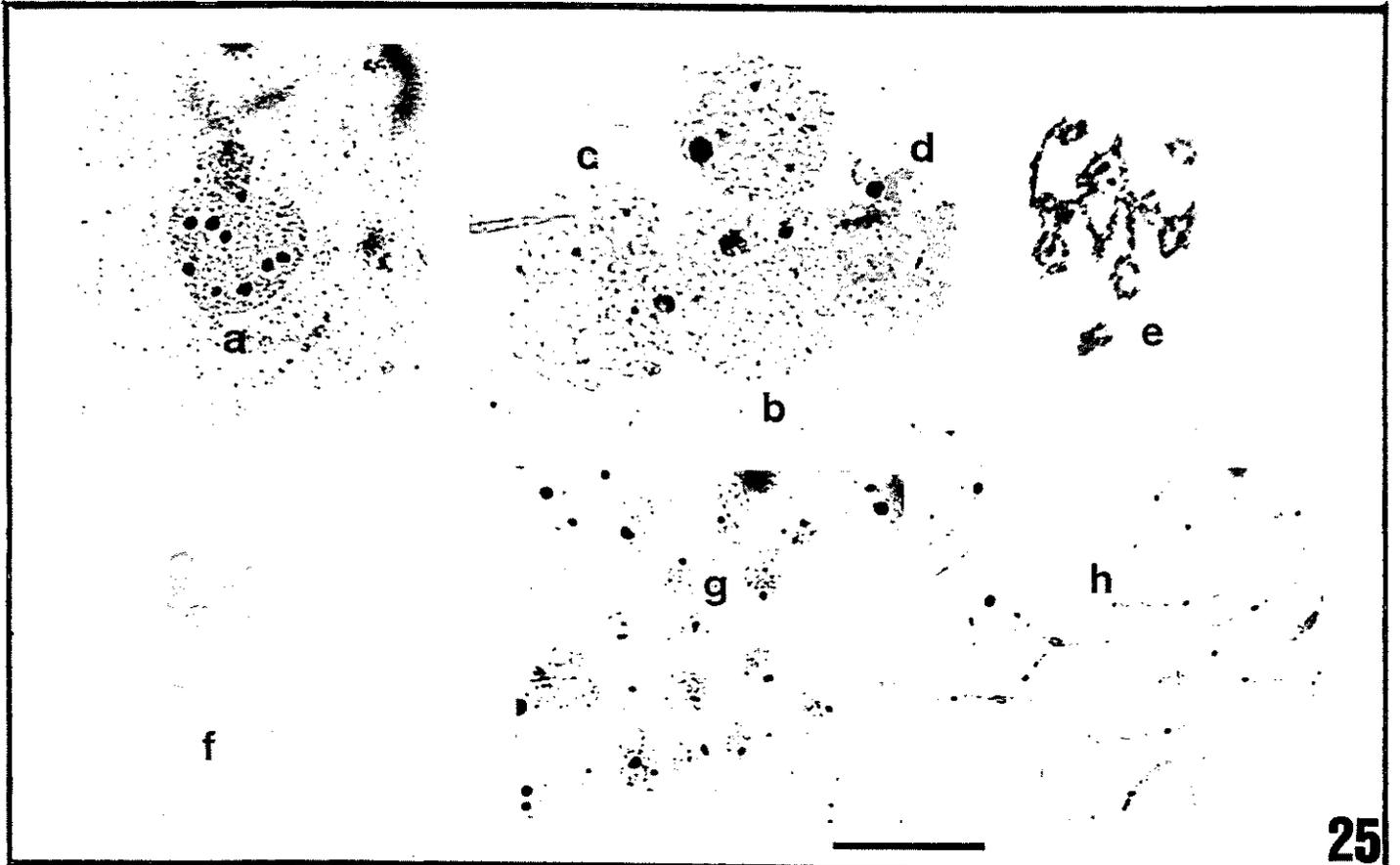


Figura 24: Ideograma representativo dos cromossomos mitóticos de *H. p joaquini*.  
Áreas escuras representam ao padrão de heterocromatina e os círculos cinzas a NOR.

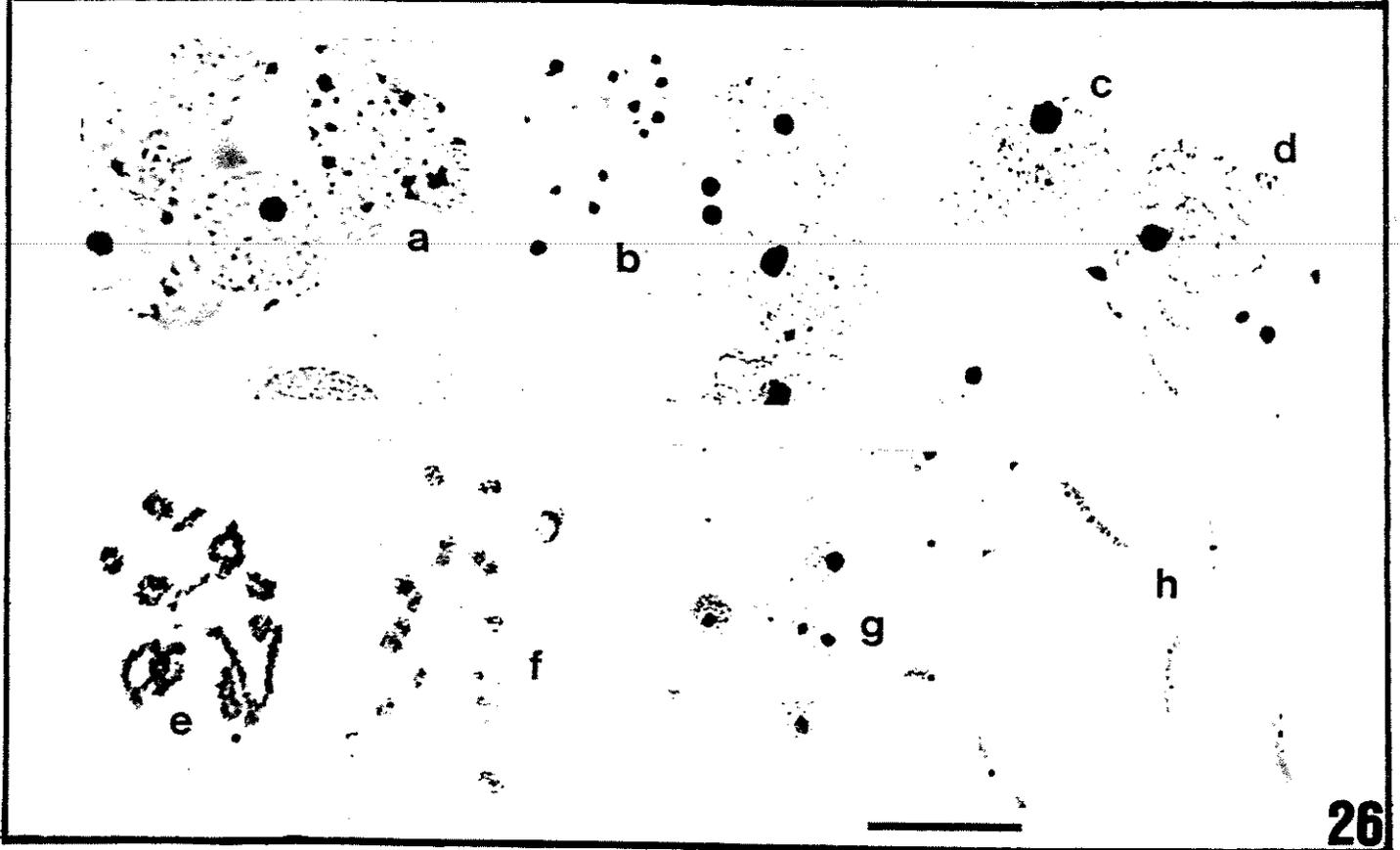
TABELA 9: Comparação de dados citogenéticos entre as espécies em estudo.

Características analisadas	ESPÉCIES						
	<i>H. prasina</i> (Botucatu, SP)	<i>H. prasina</i> (Jundiá, SP)	<i>H. prasina</i> (São Joaquim, SC)	<i>H. caingua</i>	<i>H. pulchella</i> <i>pulchella</i>	<i>H.</i> <i>semiguttata</i>	<i>H. p. joaquinai</i>
Nº cromos (2n)	24	24	24	24	24	24	24
Diferença no cariótipo	par 10 submetacêntrico e 11 metacêntrico	idem anterior	idem anterior	idem anterior	idem anterior	idem anterior	par 10 metacêntrico e 11 submetacêntrico
Construção secundária	não detectada	não detectada	não detectada	par 7	par 12	não detectada	não detectada
NOR	par 12	par 12	par 12	par 7	par 12	par 12	par 1
localização	(telômero*)	(telômero*)	(telômero*)	(pericentromérica*)	(telômero*)	(telômero*)	(telômero**)
NOR heteromórfica	ausente	ausente	ausente	ausente	presente	ausente	ausente
Banda C centromérica	exceto par 12	exceto par 12	exceto par 12	todos os pares	forte: 1, 2 e 10 fraca: 3 e 8	exceto par 12	exceto par 12
Banda C intersticial.	pares 1, 3, 4 e 10	pares 1, 3, 4 e 10	pares 1, 3 e 10	pares 3 e 11	pares 1 e 10	pares 1, 3 e 10	par 11
Banda C telomérica	par 1	ausente	par 1	ausente	ausente	ausente	par 1
Banda C pericentromérica	par 7	par 7	par 7	ausente	par 3	par 7	ausente
Banda C heteromórfica	ausente	presente (par 10)	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente

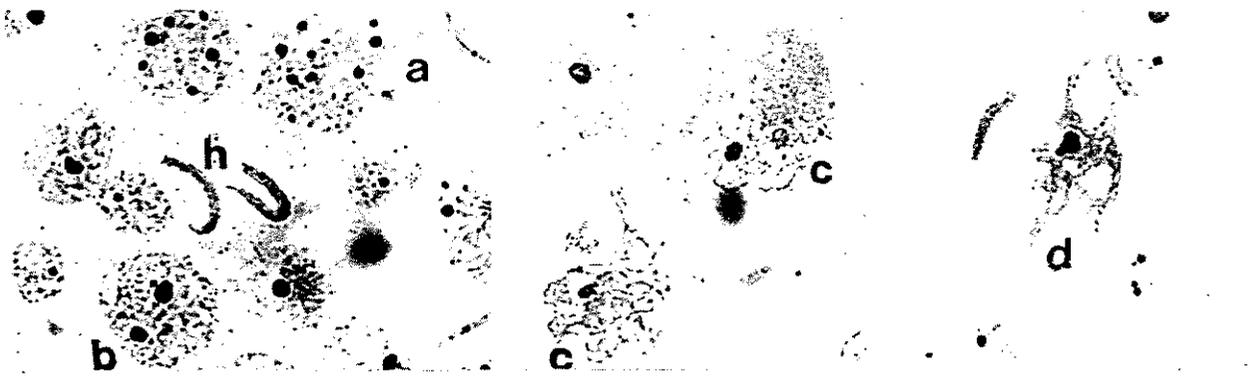
Regiões hachuradas referem-se às semelhanças encontradas entre as espécies. \* braço longo; \*\* braço curto



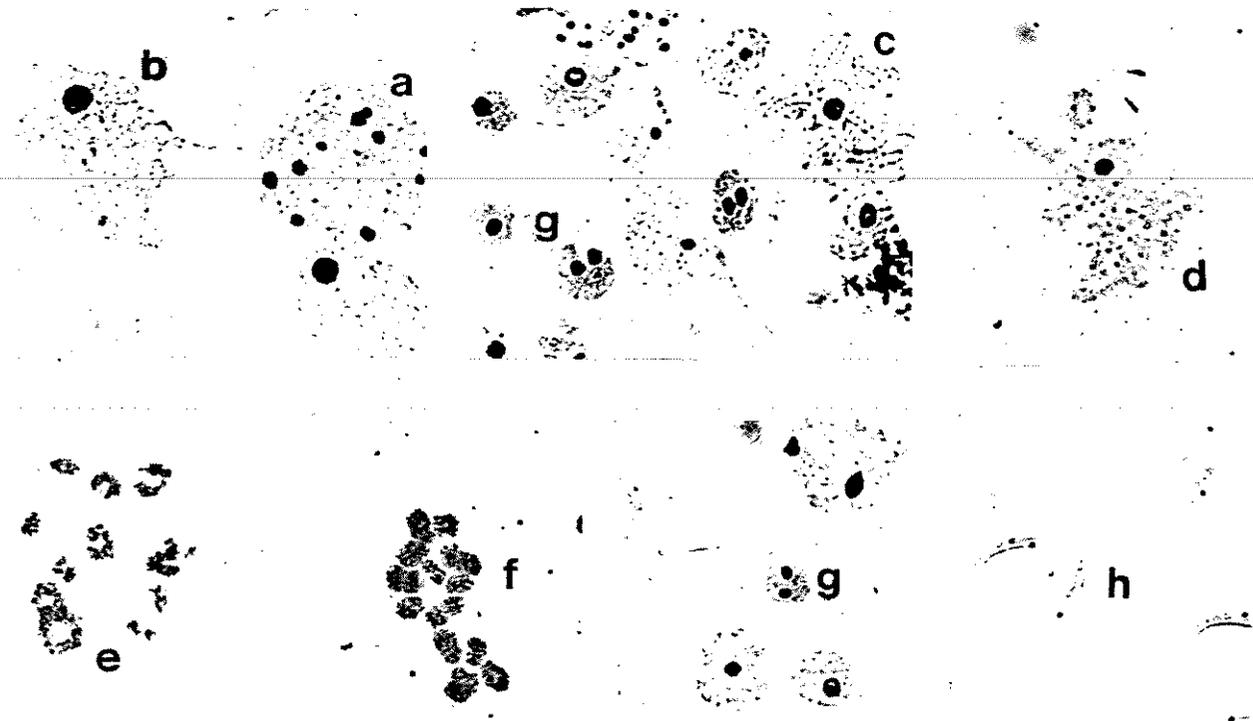
25



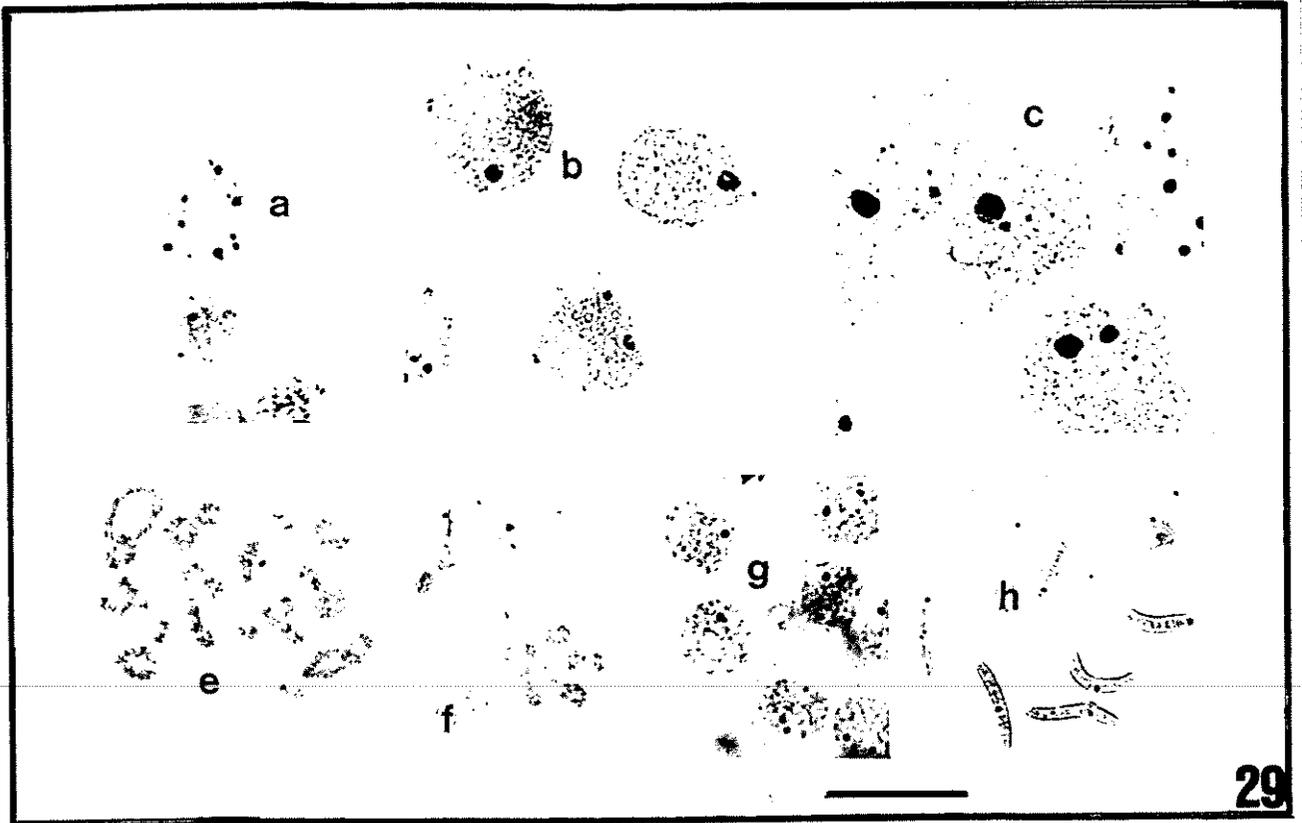
26



27



28



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Cariótipo

Dentre as espécies do grupo *pulchella* analisadas neste trabalho apenas para *H. prasina* e *H. p. pulchella* existem informações sobre os cromossomos na literatura. Assim, com relação a *H. prasina*, comparando-se os dados deste trabalho aos obtidos por BEÇAK (1967, 1968) nota-se grande semelhança quanto à morfologia cromossômica. Porém os dados diferem daqueles obtidos por BALDISSERA Jr. *Et al.* (1993) para a população de Jundiá com relação à classificação de dois pares de cromossomos. As medidas feitas neste trabalho indicam que os pares 3 e 8 correspondem ao que aqueles autores consideraram como 4 e 10, respectivamente. Como BALDISSERA Jr. *et al.* não apresentaram dados morfométricos para comparação, é possível que na montagem visual do cariótipo tenha havido a troca, já que a diferença de tamanho é pequena.

O número de cromossomos de *H. p. pulchella* foi indicado por SAEZ & BRUM (1960), porém esses autores não mostraram o cariótipo, e classificaram todos os cromossomos como metacêntricos. BOGART (1973) apresentou o cariótipo desta espécie mas não publicou os dados morfométricos utilizados para montagem. Desta forma, o número de cromossomos ( $2n = 24$ ) e o cariótipo estão de acordo com o encontrado neste trabalho.

Todas as espécies analisadas neste trabalho possuem número diplóide de  $2n = 24$  cromossomos. Este número é comum dentro da ordem Anura, sendo encontrado em espécies das famílias Discoglossidae, Pelodytidae, Miobatrachidae, Leptodactylidae, Pseudidae, Hylidae, Microhylidae, Dendrobatidae, Ranidae e Hyperoliidae (KURAMOTO, 1990). A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Hyla*, possui  $2n = 24$  ou  $2n = 30$  cromossomos (BEÇAK, 1967, 1968; RABELLO,

1970; BOGART, 1973; KURAMOTO, 1990; SKUK e LANGONE, 1990; ANDERSON, 1991; BALDISSERA Jr. *et al*, 1993), indicando uma dicotomia dentro do gênero *Hyla*, embora existam também outros números diplóides como  $2n = 18, 20, 26, 32$  e  $34$  (KURAMOTO, 1990; BALDISSERA Jr. *et al*, 1993)

Segundo MIURA (1995) o surgimento de espécies de *Hyla* com  $2n = 24$  cromossomos pode estar relacionado a um ancestral comum com  $2n = 26$  e BOGART (1973) sugere que espécies com cariótipos morfologicamente semelhantes podem ser consideradas como tendo um ancestral comum.

Um dos mecanismos possíveis para explicar a mudança do número de  $2n = 26$  para  $2n = 24$  cromossomos pode estar relacionado à fusão telomérica de dois cromossomos ou à fusão cêntrica. BOGART (1973) relata a possibilidade de fusão telomérica de dois cromossomos pequenos para dar origem a um cariótipo com  $2n = 22$  encontrado em *H. albopunctata*. Em outros grupos também foram encontradas evidências que suportam esta hipótese. MIURA *et al.* (1995), comparando espécies de *Rana* com  $2n = 26$  e  $2n = 24$ , através do padrão de replicação tardio, verificou que o cromossomo 11 das espécies com  $2n = 26$  corresponde à metade do cromossomo número 6 das espécies com  $2n = 24$  e que o cromossomo 13 corresponde a outra porção do cromossomo 6, envolvendo portanto, uma fusão telomérica de dois cromossomos pequenos (11 e 13) no ancestral com  $2n = 26$ . Já GREEN (1983), examinando o cariótipo e o padrão de banda C de *Rana dybowskii*, supõe que a redução de  $2n = 26$  para  $2n = 24$  surgiu como resultado da produção de um pequeno cromossomo telocêntrico por inversão pericêntrica e sua subsequente fusão. Tal explicação já tinha sido sugerida por MORESCHALCHI (1981) como o possível mecanismo de redução cromossômica em ranídeos africanos (Apud MIURA *et al.*, 1995).

Uma outra hipótese é a de que os hilídeos ter-se-iam originado a partir dos leptodactilídeos (CHANTELL, 1964), a qual seria corroborada pela presença do

número diplóide de  $2n = 26$  em ambas as famílias. Por outro lado, de acordo com a revisão de KURAMOTO (1990) o número diplóide de  $2n = 26$  é encontrado na maioria das famílias, sugerindo a origem dos anuros a partir de um cariótipo ancestral com  $2n = 26$ .

MIURA (1995) destaca uma homologia intergenérica (interfamília) em *Rana* (*Ranidae*), *Hyla* (*Hylidae*) e *Bufo* (*Bufonidae*) no padrão de replicação tardio, encontrando semelhanças entre os 6 cromossomos grandes de *Hyla* e *Bufo* e destes, 4 apresentando homologia com os 4 cromossomos grandes de *Rana*, indicando que *Hyla* está mais relacionada citogeneticamente com *Bufo* do que com *Rana*.

O cariótipo das espécies analisadas no presente trabalho possuem baixo número cromossômico ( $2n = 24$ ) e apenas 1 par de cromossomo acrocêntrico. Tal situação também já foi encontrada em várias espécies de *Hyla*, tanto Holoárticas como Neotropicais (BOGART, 1973; BEÇAK 1967, 1968; RABELLO, 1970; ANDERSON, 1991). Este tipo de cariótipo pode ser considerado unimodal e simétrico e é encontrado nas 3 ordens dos Lissamphibia (MORESCHALCHI, 1990), sendo sugerido que ou fusão cêntrica ou telomérica pode ter ocorrido para dar origem ao cariótipo com 24 cromossomos.

A morfologia dos cromossomos das espécies do grupo *pulchella* é muito similar ao encontrado em outras espécies de *Hyla*, tanto entre espécies Holoárticas quanto Neotropicais (ANDERSON, 1991).

Todas as espécies estudadas neste trabalho possuem o mesmo padrão cariológico (cromossomos metacêntricos os pares 1, 8, 11 e 12, submetacêntricos os pares 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10 e acrocêntrico o par 6), com exceção de *H. p. joaquini* que apresenta o par 11 submetacêntrico e o par 10 metacêntrico. ANDERSON (1991), comparando espécies de hílideos Holoárticas e Neotropicais com  $2n = 24$  cromossomos, destaca que os pares 7, 9, 10 e 11 são sempre submetacêntricos ou

metacêntricos. Na opinião de MORESCHALCHI (1973) as espécies de anuros com caracteres morfológicamente primitivos têm um cariótipo com alto número de cromossomos e as mais recentes tem cariótipos com baixo número, de acordo com a evolução cromossômica (Apud MIURA, 1995).

BEČAK (1967, 1968) discute que quanto menor o número de cromossomos menor será a quantidade de pares acrocêntricos, sugerindo que o processo de fusão cêntrica estaria relacionado à evolução dos anuros.

Comparando a morfologia cromossômica das espécies do grupo *pulchella* entre si e com os cariótipos de espécies de grupos relacionados (e.g. *polytaenia*, *albopunctata*) e com outras espécies neotropicais apresentados por BOGART (1973), e espécies holoárticas (ANDERSON, 1991), percebe-se que há grande semelhança na morfologia dos cromossomos. O grupo *albopunctata* é considerado próximo de *pulchella* por características morfológicas. *H. albopunctata*, possui  $2n = 22$  enquanto as espécies do grupo *pulchella* possuem  $2n = 24$ . A maioria das espécies do gênero *Hyla* possui  $2n = 24$  ou  $2n = 30$  cromossomos, e BOGART (1973) supôs a ocorrência de algum mecanismo de redução cromossômica em *H. albopunctata*, o que parece não ter acontecido no grupo *pulchella*. Porém, como são semelhantes provavelmente se originaram de um ancestral comum.

## 5.2. Constrição secundária e NOR

Enquanto a morfologia e o tamanho dos cromossomos nas espécies do grupo *pulchella* permaneceram relativamente constante, a localização da constrição secundária, quando presente, variou nas espécies estudadas. Assim, em *H. caingua* foi possível observar a presença de constrição secundária na região pericentromérica do braço longo dos cromossomos do par 7 e em *H. p. pulchella* observou-se no telômero do braço longo do par 12. Grande variação na localização de constrição

secundária foi verificada por exemplo entre espécies do gênero *Litoria*. Por outro lado, pequena variação foi detectada em hilídeos holoárticos (ANDERSON, 1991) e em espécies de *Rana* (MIURA *et al.* 1995). Esses autores justificam ser esta uma característica de espécies próximas.

Nas espécies *H. prasina*, *H. semiguttata* e *H. p. joaquina* não foi possível identificar constrição secundária através de coloração convencional. A não detecção da constrição secundária pode, em alguns casos, estar relacionada ao grau de condensação cromossômica que pode se refletir no tamanho da constrição (KING, 1980). Isto poderia explicar a ausência de constrição secundária em *H. prasina* uma vez que BALDISSERA Jr. *et al.* (1993) encontraram uma constrição no par 12 da população proveniente de Jundiá.

Apesar de *H. caingua* apresentar uma constrição secundária na região pericentromérica do braço longo do par 7, nem sempre pôde ser observada com clareza em todas as metáfases. Devido ao seu pequeno tamanho não foi possível correlacionar a presença da mesma com algum aumento significativo no tamanho do cromossomo.

A constrição secundária geralmente é o sítio dos genes rRNA. Nas duas espécies, *H. caingua* e *H. p. pulchella*, em que foram observadas as constrições também se detectou a NOR naqueles locais. A maioria dos anfíbios anuros apresenta apenas um cístron ribossomal, seja este identificado pelo método de AgNOR (HOWELL e BLACK, 1980) ou por hibridização "in situ" coincidindo com a constrição secundária (SCHMID, 1978a e b; SCHMID, 1982; VITELLI *et al.*, 1982; SCHMID *et al.*, 1983; WILEY, 1983; ANDERSON & MOLER, 1986; SCHMID *et al.*, 1986; GREEN & SHARBEL, 1988; KING *et al.*, 1990; SCHMID *et al.*, 1990; ANDERSON, 1991; SCHMID *et al.*, 1991; SCHMID *et al.*, 1993; BALDISSERA *et al.*, 1993; MIURA, 1994; SCHMID *et al.*, 1995).

Por outro lado, há casos em que o cariótipo apresenta mais de um par cromossômico com constrição secundária, sendo que apenas uma delas corresponde a NOR. Isto foi demonstrado através de coloração convencional e AgNOR em *Hyla versicolor*, *H. arenicolor*, *H. avivoca*, *Pseudacris triseriata*, *H. savignyi*, *H. chinensis*, *H. regilla*, *H. cadaverina* (ANDERSON, 1991), *R. japonica* (MIURA, 1994; MIURA *et al.*, 1995) e *Agalychnis callidryas* (SCHMID *et al.*, 1995), e através de hibridização “in situ”, em *R. catesbeiana* e *Alytes obstetricans* (VITELLI *et al.*, 1982). Este sítio negativo pelo método de AgNOR e o de hibridização “in situ” é considerado como um sítio frágil quando eles ocorrem na região intersticial e como “knobs” quando ocorrem na região telomérica (ANDERSON, 1991).

Todas as espécies analisadas neste trabalho apresentaram apenas um sítio contendo os genes rRNA ativos, podendo estas serem divididas em dois subgrupos, ou seja, aquele com espécies contendo NOR no par 12 (*H. prasina*, *H. semiguttata* e *H. p. pulchella*) e aquele com NOR no 7 (*H. caingua*) ou 1 (*H. p. joaquini*). Apenas uma NOR ativa parece ser a condição mais comum entre os anuros, já que foi detectado em várias espécies como *Xenopus laevis* e *X. borealis* (PARDUE, 1974) em espécies do gênero *Bufo* e *Hyla* (SCHMID, 1978a) em outros 23 gêneros de anuros (SCHMID, 1982), em *H. chrysoscelis* (WILEY, 1982), em *H. chrysoscelis* e *H. versicolor* (WILEY *et al.*, 1989), em várias espécies de *Hyla* holoárticas (ANDERSON, 1991), em *X. laevis* (SCHMID *et al.*, 1991), em *R. japonica* (MIURA, 1994) e em *Agalychnis callidryas* (SCHMID *et al.*, 1995). Por outro lado, a presença de mais de um cístron ribossomal ativo por complemento diplóide já foi descrito em várias espécies de hilídeos (ANDERSON, 1991; BALDISSERA Jr. *et al.*, 1993; SCHMID *et al.*, 1995).

HSU *et al.* (1975) consideram mais evoluídas aquelas espécies com mais de uma NOR em seu cariótipo. Na maioria dos anfíbios a presença de apenas uma NOR é considerado um estado constante e o aparecimento de outros

cístrons ativos ocorreria através de translocações ou inversões (SCHMID, 1978a), translocações e amplificação latente (KING, 1990).

Além das NORs adicionais, é comum encontrar heteromorfismo no tamanho destas regiões. Das espécies analisadas neste trabalho, apenas a população de *H. pulchella* apresentou heteromorfismo no tamanho da constrição secundária presente no par 12 e conseqüentemente diferença no tamanho da marcação da NOR pelo método de impregnação pela prata. SCHMID (1982) encontrou heteromorfismo de tamanho de NOR em 67% dos 260 espécimes de anuros analisados e KING (1990) em hílideos do gênero *Litoria* e *Cyclorana* e BATISTIC (1989) em *Phyllomedusa*. SCHMID (1982) propôs que NORs heteromórficas podem surgir por deleção ou por duplicação e triplicação de um dos cístrons. Porém, KING (1990) considera que os heteromorfismos ocorrem por amplificação de determinadas sequências do rDNA ou de todo o cístron.

A NOR em anuros pode estar ou não associada à heterocromatina. Os resultados deste trabalho indicam a não associação da heterocromatina com a NOR. Esta associação foi observada por exemplo em *H. arenicolor*, *H. chrysoyelis* e *H. andersoni* (ANDERSON, 1991). KING *et al.* (1990) considerou como estado primitivo a associação de heterocromatina à NOR, baseando-se em análise de espécies pertencentes aos Archaeobatrachia (anfíbios primitivos). Porém, em espécies do gênero *Phyllomedusa*, consideradas primitivas dentro da família Hylidae, esta associação nem sempre foi observada (BATISTIC, 1989).

### 5.3. NOR na espermatogênese

O método de AgNOR também foi utilizado em material proveniente de testículo. Os resultados obtidos são constantes para todas as espécies estudadas, ou seja, há marcação pela prata em espermatogônias, espermatócitos I (até paquíteno) e

espermátides em espermiacão. Estes resultados discordam dos obtidos por HOFGÄRTNER *et al.* (1979) em humanos, SCHMID *et al.* (1977) em ratos, SCHMID *et al.* (1982) com vários vertebrados inclusive anfíbios anuros do gênero *Bufo*, HIRAI (1988) em tremátodas e PALOMEQUE *et al.* (1990) em formigas, os quais sugerem uma inativação das NORs durante a fase de alongamento das espermátides e de espermatozóides maduros, além daquela observada após o paquíteno.

SCHMID *et al.* (1982) propuseram que o reaparecimento das NORs nas espermátides jovens indica uma reativação dos genes rRNA no genoma haplóide e de acordo com TATA (1968) os novos rRNAs sintetizados podem ser um pré-requisito para a tradução dos mRNAs que foram transcritos durante o início da espermiogênese.

Por outro lado, a presença de estruturas marcadas pelo método de AgNOR nas espermátides em alongamento e espermatozóides já foi detectada em estudos ultraestruturais de espermatogênese humana por SOUZA e CARVALHEIRO (1994), correspondendo a estruturas relacionadas ao nucléolo que persistem durante a desintegração final dos componentes nucleolares, formando os vácuolos nucleares dos espermatozóides. Estes surgiriam nas fases iniciais de espermátide, aumentando o volume em espermátide alongada e espermatozóide, tendo em seu interior proteínas argirófilas associadas à região fibrilar intravacuolar.

Na opinião de SOUZA e CARVALHEIRO (1994), tais estruturas serviriam para ajudar a cromatina a iniciar sua atividade transcricional depois da incorporação do núcleo do espermatozóide ao citoplasma do oócito.

A detecção desta marcação prata-positiva em espermátides em espermiacão nas espécies do grupo *pulchella* e a não observação da mesma em outras espécies de anuros pode estar, talvez, relacionada ao grau de compactação diferencial da

cromatina no núcleo das espermatídes em espermição, das espécies analisadas neste trabalho.

#### 5.4. Banda C e heterocromatina

O método de bandamento C detecta heterocromatina e, portanto, permite verificar a sua distribuição, localização e quantidade relativa no genoma das espécies. Essas características permitem a comparação e algumas vezes a distinção entre as espécies estudadas.

O interesse em se re-analizar a população de *H. prasina* de Jundiaí foi devido ao fato de termos encontrado diferenças no padrão de heterocromatina e NOR na população de Botucatu quando comparados aos dados de BALDISSERA Jr *et al.* (1993). Essas diferenças poderiam ser explicadas por duas possibilidades gerais: variação interpopulacional ou variação devida aos métodos utilizados por cada um dos autores. Para se excluir ou admitir a segunda hipótese, analisamos exemplares de Jundiaí pelo mesmo método utilizado para a população de Botucatu. Surpreendentemente, obtivemos outro padrão, diferente daquele de BALDISSERA e daquele de Botucatu e de São Joaquim. Portanto, foram encontrados quatro padrões de heterocromatina nessa espécie.

Assim, no caso de *H. prasina*, encontrou-se diferenças inter e intrapopulacionais. Diferença intrapopulacional foi encontrada em *Rana ornativentris* (MIURA *et al.*, 1995). As diferenças no padrão de heterocromatina encontradas entre as populações de Botucatu, Jundiaí e São Joaquim, provavelmente, possam refletir diferenças interpopulacionais nesta espécie. Variação no padrão de banda C entre populações de anuros já foi relatada para *R. ornativentris*, *R. japonica* e *R. chensinensis* (MIURA *et al.*, 1995) e *R. ishikawae* (SETO *et al.*, 1984). Para outros grupos, inclusive hilídeos, não há dados na literatura.

Dos espécimes de *H. prasina* provenientes de Jundiaí, encontrou-se ainda heteromorfismo no tamanho da banda C nos cromossomos do par 10 em apenas um espécime. Isso indica que os cariótipos destas espécies estão sofrendo modificações que se refletem em polimorfismo, como os discutidos anteriormente. Esta diferença no tamanho daquele bloco heterocromático não refletiu mudanças no tamanho do cromossomo como ocorre em algumas espécies do gênero *Litoria* (KING, 1980). Heteromorfismo como o encontrado em *H. prasina* é comum em humanos, peixes, répteis, pássaros, insetos, plantas e anfíbios (SUMNER, 1990).

Todas as espécies, exceto *H. p. pulchella*, apresentaram heterocromatina centromérica em quase todos os cromossomos. Em *H. p. pulchella* foi encontrada pequena quantidade de heterocromatina centromérica, apesar de existirem bandas intersticiais comuns com as demais espécies. Inexistência de heterocromatina centromérica já foi descrita por MIURA *et al.* (1995) em espécies de *Rana*. Além disso, *H. p. pulchella* apresentou diferente resposta ao método de banda C, com a maioria das bandas fortemente coradas e algumas outras pouco coradas. Este resultado talvez indique uma diferença na natureza das seqüências de DNA presentes neste local (JOHN, 1988; SUMNER, 1990) a qual poderá ser melhor esclarecida no futuro com a utilização de corantes fluorescentes específicos.

Considerando que os anfíbios primitivos pertencentes a Archaeobatrachias possuem quantidade relativamente pequena de heterocromatina e que de acordo com a teoria da evolução da heterocromatina, o aumento desta seria característico de espécies de anfíbios mais evoluídos (KING, 1980, 1990), é de se supor que as espécies estudadas se encaixem nesses grupos.

Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, já que nos anfíbios considerados avançados como bufonídeos, hilídeos, leptodactilídeos e miobatrachídeos há grande diversidade interespecífica na distribuição da heterocromatina (KING, 1990). Entretanto, as mudanças na distribuição da

heterocromatina não estão necessariamente relacionadas com diferenças no tamanho dos cromossomos (SCHMID, 1978a; MATSUI *et al.*, 1985), sendo sugerido que possa ocorrer transformação da eucromatina em heterocromatina e não adição de heterocromatina (KING, 1990). Apesar disso, admite-se que o gênero *Litoria* apresente tanto a adição de blocos heterocromáticos alterando o tamanho dos cromossomos quanto transformação de eucromatina em heterocromatina (KING, 1980)

Diferenças na quantidade de heterocromatina entre espécies e subespécies, como é o caso das do grupo *pulchella*, já foram detectadas entre subespécies de camundongo, *Mus musculus* e *M. m. molossinus* (RICE e STRAUSS, 1973), em bufonídeos, hylídeos, ranídeos, microhylídeos e rhacophorídeos (SCHMID 1978a e b), em espécies do gênero *Litoria* (KING, 1980), em subespécies de *Rana* (*R. aurora aurora* e *R. a. draytoni*) (GREEN, 1985), em *Gastrotheca pseuste* (SCHMID *et al.*, 1990), em várias espécies de *Hyla* holoárticas e neotropicais (ANDERSON, 1991) e em espécies de *Rana* (MIURA *et al.*, 1995). Essas diferenças podem servir, em alguns casos, para caracterizar a espécie e ajudar a solucionar problemas sistemáticos.

### 5.5. Implicações taxonômicas

De acordo com CARRIZO (1990), *H. caingua*, *H. semiguttata* e *H. p. pulchella* são geralmente confundidas entre si morfológicamente, podendo indicar uma maior proximidade. No entanto, de acordo com o padrão de banda C obtido neste trabalho, verifica-se que tais espécies são distintas e podem ser reconhecidas pelos padrões apresentados.

O padrão de banda C das três populações de *H. prasina* e de *H. semiguttata* é bastante semelhante, podendo indicar uma maior proximidade entre estas duas

espécies. Além disso, estas espécies possuem a NOR na mesma região do mesmo cromossomo.

Os dados citogenéticos em geral, indicam uma proximidade entre as populações de *H. prasina* de São Joaquim, SC, com as outras duas populações de Jundiá, SP, e de Botucatu, SP, embora tenha sido detectado algum polimorfismo de banda C confirmando também as diferenças entre a população de *H. prasina* de São Joaquim, SC, e de *H. p. joaquini* de Urubici, SC, uma vez que estas duas espécies já foram confundidas pelo padrão de canto.

Já *H. p. joaquini*, que LUTZ (1973) considerou como uma subespécie de *H. pulchella*, não apresentou o padrão de banda C e a localização da NOR parecidos com o das outras espécies sendo a única com NOR no cromossomo 1.

Dada a importância do padrão de bandamento C e da localização de NOR para o reconhecimento de relações filogenéticas entre anuros, evidências desta natureza reforçam a interpretação de que *H. p. joaquini* seja considerada como uma espécie não pertencente ao grupo *pulchella*, uma vez que tanto sua morfologia quanto o padrão de canto (CARDOSO, comunicação pessoal) são bastante diferenciados em relação às demais espécies aqui estudadas.

## 6. CONCLUSÕES

- 1- O grupo *pulchella* se caracteriza por apresentar o mesmo número de cromossomos,  $2n = 24$ , e cariótipo semelhante, sendo os pares 1, 8, 11 e 12 metacêntricos, os pares 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10 submetacêntricos e o par 6 acrocêntrico; com exceção de *H. p. joaquini* que apresentou o par 11 submetacêntrico e o par 10 metacêntrico.
- 2- As pequenas variações no padrão de banda C intrapopulacional podem ser considerados como variações geográficas.
- 3- As constrições secundárias presentes em *H. caingua* e *H. p. pulchella* são coincidentes com NOR, e não associadas à heterocromatina, não se enquadrando na classificação proposta por **KING (1980)**.
- 4- A presença de heteromorfismo no tamanho da NOR em 28% dos espécimes de *H. p. pulchella* analisados, deve-se provavelmente à duplicações do cístron ribossomal.
- 5- A marcação por prata observada nas espermátides em espermição pode ser atribuída aos 'vacúolos nucleares' (estruturas provenientes da desintegração nucleolar).
- 6- A ausência de banda C em alguns cromossomos de *H. p. pulchella* pode ser devido ou a uma diferença na natureza da heterocromatina presente nestes locais, ou a quantidade muito pequena não detectável pelo método.

7- Os padrões de banda C e NOR permitem distinguir todas as espécies entre si, com exceção de *H. semiguttata* e *H. prasina*, cujos padrões são muito semelhantes.

8- A diferença no cariótipo associada às outras características sugerem que *H. p. joaquina* pode ser considerada como uma espécie não pertencente ao grupo *pulchella*, reforçando os dados de morfologia e padrão de canto que são bastante diferenciados em relação às demais espécies aqui estudadas.

9- As espécies do grupo *pulchella* ( $2n = 24$ ) apresentam cariótipo semelhante à *H. albopunctata* ( $2n = 22$ ), espécie considerada próxima por características morfológicas, apesar da redução no número e da provável ocorrência de outros rearranjos que levaram à pequenas alterações na morfologia de alguns cromossomos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**, 1994, pp. 352-4, 378-80.
- ALMEIDA, C.G. Aspectos biológicos e citogenéticos de *H. fuscovaria* (Amphibia-Anura). **Tese de mestrado - UNICAMP**, 1984.
- ANDERSON, K. & MOLER, P. E. Natural hybrids of the pine barrens treefrogs, *Hyla andersoni* with *H. cinerea* and *H. femoralis* (Anura, Hylidae). Morphological and chromosomal evidence. **Copeia** 1986:70-6.
- ANDERSON, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. In: GREEN, M. G. & SESSIONS, S. K eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. 1991, pp. 299-331.
- ANGELIER, N.; HERNANDEZ-VERDUN, D. & BOUTEILLE, M. Visualization of Ag-NOR proteins on nucleolar transcriptional units in molecular spreads. **Chromosoma** 86:661-72, 1982.
- ARRIGHI, F. E. & HSU, T. C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. **Cytogenetics** 10:81-6, 1971.
- BABU, A. & VERMA, R. S. Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. **Int. Rev. Cytol.** 108:1-60, 1987.
- BALDISSERA Jr. F. A.; OLIVEIRA, P.S.L. & KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Bras. Genet.** 16(2): 335-34, 1993.
- BARRIO, A. Las subespecies de *Hyla pulchella* DUMÉRIL Y BIBRON (Anura, Hylidae). **Physis** 69:115-28, 1965.
- BATISTIC, R. F. Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura, Amphibia). Tese de Doutorado. F.M. USP - Ribeirão Preto - SP, 1989.

- BATISTIC, R. F.; SOMA, M.; BEÇAK, M. L. & BEÇAK, W. Further studies on polyploid amphibians. A diploid population of *Phyllomedusa burmeisteri*. **J. Hered.** **66**:160-2, 1975.
- BEÇAK, M.L. Cariótipos e evolução cromossômica em Amphibia - Anura. **Tese de mestrado - USP Ribeirão Preto**. 1967.
- BEÇAK, M.L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia** **21**(3):191-208, 1968.
- BEÇAK, M. L.; dos SANTOS, R.C.; SOARES-SCOTT, M. D.; BATISTIC, R. F. & COSTA, H. Chromosome structure in man and Amphibia-Anura, restriction enzymes. **Rev. Brasil. Genet.****11**(4):939-48, 1988.
- BEHR, W.; HONIKEL, K. & HARTMANN, G. Interaction of the RNA polymerase inhibitor chromomycin with DNA. **Eur. J. Bioch.** **9**:82-92, 1969.
- BERGER, R. & GREILHUBER, J. C-bands and chiasma distribution in *Scilla siberica* (Hyacinthaceae). **Genome** **34**:179-89, 1991.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. In: VIAL, J. L. eds. **Evolutionary biology of anurans**. Univ. Missouri Press. 1973, pp. 337-49.
- BOURGEOIS, C. A.; HERNANDEZ-VERDUM, D.; HUBERT, J. & BOUTEILLE, M. Silver staining of NORs in electron microscopy. **Exp. Cell Res.** **123**:449-52, 1979.
- BUYS, C.H.C.M. & OSINGA, J. Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing region. **Chromosoma** **77**:1-11, 1980.
- CARRIZO, G.R. Sobre los hilidos de Misiones, Argentina, con la descripción de una nueva especie, *Hyla caingua* n.sp. (Anura, Hylidae). **Cuadernos de Herpetologia** **5**(6): 32-9, 1990.
- CEI, J.M. Amphibians of Argentina. **Monitore Zool. Ital.**, 1980, pp. 468-77.

- CHANTELL, C. J. Some mio-pliocene hylids from the valentine formation of Nebraska. **Am. Midl. Nat.** 72:211-25, 1964.
- COMINGS, D. E.; AVELINO, E.; OKADA, T. A. & WYANDT, H. E. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. **Exp. Cell Res.** 77:469-93, 1973.
- DE QUEIROS, K. & CANNATELLA, D. C. The monophyly and relationships of the Lissamphibia. **American Zoologist.** 27:60A, 1987.
- DIOTTO, J. E. Desenvolvimento dos Anfíbios. In: **Embriologia Comparada e Humana.** Livraria Atheneu Ed., São Paulo. 1989, pp. 157-74..
- DUELLMAN, W.E. In: Amphibian Species of the World: Additions and corrections. **Report of the World Congress of Herpetology (not published)**, 1988, pp.2-3.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. In: **Biology of Amphibians.** McGraw-Hill, New York, 1986.
- FEDEROFF, N. V. On spacers. **Cell** 16:697-710, 1979.
- FEITOSA, V. L.; RECCO-PIMENTEL, S. M. & CARDOSO, A. J. Structural chromosomal alterations in *Hyla albopunctata* and *Aplastodiscus perviridis* (Anura, Hylidae) from the Morro do Ferro region of Minas Gerais. **Rev. Brasil. Genet.** 18(2):191-7, 1995.
- FERRARO, M.; LAVIA, P.; PELLICCIA, F. & DE CAPOA, A. Effects of potassium cyanide on silver stainability of specific cell structures. **Stain Technology** 57:259-63, 1982.
- FISCHER, D.; WEISENBERGER, D. & SCHEER, U. Assigning functions to nucleolar structures. **Chromosoma** 101:133-40, 1991
- FROST, D.R. **Amphibian Species of the World.** Association of Systematics Collections and Allen Press, Lawrence, Kansas, 1985, pp. 110-203.

- GATTI, M. & PIMPINELLI, S. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Annu. Rev. Genet.** 26:239-75, 1992.
- GHOSH, S. The nucleolar structure. **Int. Rev. Cytol.** 44:1-28, 1976.
- GOESSENS, G. & LEPOINT, A. The nucleolus organizing regions (NORs): Recent data and hypothesis. **Biol. Cellulaire**, 35:211-20, 1979.
- GOLD, J.R. & ELLISON, J.R. Silver staining for nucleolar organizing region of vertebrate chromosomes. **Stain Technology** 58:51-5, 1983.
- GOSÁLVEZ, J.; DE LA TORRE, J.; GARCIA DE LA VEGA, C. & LÓPEZ-FERNANDEZ, C. The effect of double-strength standard saline citrate on silver staining I. Nucleoli and micronucleoli in the somatic and germ line of the grasshopper *Arcyptera fusca* (Orthoptera). **Canadian J. Genet. Cytol.** 28:219-26, 1986.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** 53:37-50, 1975
- GREEN, D.M. Differentiation in amount of centromeric heterochromatin between subspecies of the redlegged frog, *Rana aurora*. **Copeia** 1985(4):1071-74.
- GREEN, D.M. Systematics and of Western North American frogs allied to *Rana aurora* and *Rana boylei*: Karyological evidence. **Syst. Zool.** 35:273-282, 1986.
- GREEN, D.M. Heteromorphic sex chromosomes in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zealand. **J. Heredity** 79:165-9, 1988.
- GREEN, D.M. & SHARBEL, T.F. Comparative cytogenetics of the primitive frog, *Leiopelma archeyi* (Anura, Leiopelmatidae). **Cytogenetics Cell Genet.** 47:212-6, 1988.
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; HUBERT, J. BOURGEOIS, C.A. & BOUTEILLE, M. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus

- during the cell cycle and in other nucleolar structures. **Chromosoma** 79:349-62, 1980.
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; ROUSSEL, P. & GAUTIER, T. Nucleolar proteins during mitosis, In: SUMNER, A. T. & CHANDLEY, A. C., eds. **Chromosomes Today**. Chapman and Hall Ed. London, vol. 11, 1993, pp 79-90.
- HIRAI, H. *Paragonimus ohirai*: identification of nucleolar organizers regions (NORs) and silver nitrate staining pattern in spermatogenesis. **Exp. Parasitology** 67:281-6, 1988.
- HOFGÄRTNER, F. J.; SCHMID, M.; KRONE, W.; ZENZES, M.T. & ENGEL, W. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analysed by silver-staining. **Chromosoma** 71:197-216, 1979.
- HOLMQUIST, G. The mechanism of C-banding: depurination and  $\beta$ -elimination. **Chromosoma** 72:203-24, 1979.
- HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer:1-step method. **Experientia** 36:1014-5, 1980.
- HSU, T.C.; SPIRITO, S.E. & PARDUE, M.L. Distribution of 18S+28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma** 53:23-36, 1975.
- JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: VERMA, R. S. Ed..**Heterochromatin Molecular and Structural Aspects**. Cambridge University Press, Cambridge. 1988, pp. 1-147.
- JOHN, B. & KING, M. The inter-relationship between heterochromatin distribution and chiasma distribution. **Genetica** 66:183-94, 1985.
- JORDAN, E.G. Interpreting nucleolar structure: Where are the transcribing genes? **J. Cell Science**, 98:437-42, 1991.

- KING, M. C-banding studies in Australian Hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** 80:191-207, 1980.
- KING, M. Evolution of heterochromatin in the Amphibia genome. In: GREEN, M. G. & SESSIONS, S. K., eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. 1991, pp. 359-91.
- KING, M.; CONTRERAS, N. & HONEYCUTT, R.L. Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. **Genetica** 80:17-29, 1990.
- KING, M. & JOHN, B. Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers. **Chromosoma** 76:123-50, 1980.
- KLAPPENBACH, M.A. & LANGONE, J.A. Lista sistemática y sinonímica de los Anfibios del Uruguay. **Annales Del Museo Nacional de História natural de Montevideo**. Vol.VIII, 2ª série, 1992.
- KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education** 39:83-127, 1990.
- LOYDL, J. Further evidence for a heterochromatin-chiasma correlation in some *Allium* species. **Genetica** 60:31-5, 1982.
- LONG, E.O. & DAWID, I.B. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Bioch.**, 49:727-64, 1980.
- LUTZ, B. **Brasilian species of Hyla**. Universidade do Texas press, Austin & London, 1973, pp. 74-85.
- MAHONY, M. J. & ROBINSON, E.S. Nucleolar organizer region (NOR) location in karyotypes of Australian ground frogs (family Myobatrachidae). **Genetica** 86:119-27, 1986.

- MASUMOTO, H.; SUGIMOTO, K. & OKAZAKI, T. Alphoid satellite DNA is tightly associated with centromere antigens in human chromosomes throughout the cell cycle. **Exp. Cell Res.** **181**:181-96, 1989.
- MATSUI, M.; SETO, T.; KOHSAKA, Y. & BORKIN, L. J. Bearing of chromosome C-banding patterns on the classification of Eurasian toads of the *Bufo bufo* complex. **Amphibia-Reptilia** **6**:23-33, 1985.
- MEDINA, F.J.; SOLANILLA, E.L. SÁNCHEZ-PINA, M.A. & FERNANDEZ-GOMEZ, M.E. A study on nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. **Chromosoma** **88**:149-55, 1986.
- MEHRA, R.C.; BREKRUS, S. & BUTLER, M.G. A simple two-step procedure for silver staining nucleolus organizer regions in plant chromosome. **Canadian J. Genet. Cytol.** **27**:255-7, 1985.
- MELO, A.S.; RECCO-PIMENTEL, S. M. & GIARETA, A. A. The karyotype of the stream dwelling *Megaelosia massarti* (Anura, Leptodactylidae, Hylodinae). **Cytologia** **60**:49-52, 1995.
- MILLER, L. & BROWN, D.D. Variation in the activity of nucleolus organizers and their ribosomal gene content. **Chromosoma** **28**:430-44, 1969.
- MITCHELL, A.; JEPPESEN, P.; HANRATTY, D. & GOSDEN, J. The organization of repetitive DNA sequences on human chromosomes with respect to the kinetochore analysed using a combination of anticentromere serum. **Chromosoma** **101**:333-41, 1992.
- MIURA, I. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog, *Rana japonica* II. Sex-linkage analyses of the nucleolar organizer regions in chromosomes nº 4 of the Hiroshima and Saeki populations. **Zool. Science** **11**:807-15, 1994.

- MIURA, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). **Chromosoma** 103:567-74, 1995.
- MIURA, I.; NISHIOKA, M; BORKIN, L. J. & WU, Z. The origin of the brown frogs with  $2n = 24$  chromosomes. **Experientia** 51:179-88, 1995.
- MORESCALCHI, A. Hypotheses on the phylogeny of the salientia, based on karyological data. **Experientia** 24:964-6, 1968.
- MORESCALCHI, A. Cytogenetics and the problem of Lissamphibian relationships. In: OLMO, E. Ed.. **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**. Birkhäuser Verlag, Basel, 1990, pp. 1-19.
- PALOMEQUE, T.; CHICA, E.; CANO, M.A. & DÍAS DE LA GUARDIA, R. Development of silver stained structures during spermatogenesis in different genera of Formicidae. **Genetica** 81:51-8, 1990.
- PARDUE, M.L. & GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science** 168:1356-8, 1970.
- PARDUE, M.L. & HENNING, W. Heterochromatin:junk or collectors item? **Chromosoma** 100:3-7, 1990.
- PATHAK, S. & ARRIGHI, F. E. Loss of DNA following C-banding procedures. **Cytogenet Cell Genetics** 12:414-22, 1973.
- PIMPINELLI, S.; BONACCORSI, S.; GATTI, M. & SANDLER, L. The peculiar organization of *Drosophila* heterochromatin. **Trends Genet.** 2:17-20, 1986.
- PLOTON, D; MENAGER, M. & ADNET, J-J. Simultaneous high resolution localization of Ag-NOR proteins and nucleoprotein in interphase and mitotic nuclei. **Histochemical Journal** 16:891-906, 1984.
- POUGH, F. H.; HEISER, J. B. & McFARLAND, W.N. Salamandras, Anuros e Cecílias. In: **A vida dos vertebrados**. Atheneu Editora, São Paulo, 1993.

- RABELLO, M.N. Chromosomal studies in brazilian anurans. **Caryologia** 23(1):45-59, 1970.
- REUTER, G. & SPIERER, P. Position effect variegation and chromatin protein. **Bioessays** 14:605-12, 1992.
- RICE, N. R. & STRAUSS, N. A. Relatedness of mouse satellite deoxyribonucleic acid to desoxyribonucleic acid of various *Mus* species. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 70:3746-50, 1973.
- ROSSA-FERES, D.C. & JIM, J. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios Anuros na região de Botucatu, São Paulo. **Rev. Brasil. Biol.** 54(2):323-34, 1994.
- SAEZ, F. A. & BRUM, N. Chromosome os South American amphibians. **Nature** 185:945, 1960.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** 66:361-388, 1978a.
- SCHMID, M. Chromosome Banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma** 68:131-48, 1978b.
- SCHMID, M. Chromosome Banding in Amphibia IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosome regions in anura. **Chromosoma** 77:83-103, 1980.
- SCHMID, M. Chromosome Banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87:327-44, 1982.
- SCHMID, M. & KLEH, R. Chromosome banding in Amphibia XX. Dna replication patterns in *Gastrotheca riobombae* (anura, Hylidae). **Cytogenet cell Genet** 65:122-6, 1994.

- SCHMID, M. & STEINLEI, C. Chromosome Banding in Amphibia XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. **Chromosoma** 101:123-32, 1991b.
- SCHMID, M.; OLERT, J. & KLETT, C. Chromosome Banding in Amphibia III. Sex chromosome in *Triturus*. **Chromosoma** 71:29-55, 1979.
- SCHMID, M.; STEINLEIN, C. & FEICHTINGER, W. Chromosome Banding in Amphibia XVII. First demonstration of multiple sex chromosome in amphibiam: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma** 101:284-92, 1992.
- SCHMID, M.; HAAF, T.; GEILE, B. & SIMS, S. Chromosome Banding in Amphibia VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). **Chromosoma** 88:69-82, 1983.
- SCHMID, M.; HOFGÄRTNER, F. J.; ZENZES, M. T. & ENGEL, W. Evidence for postmeiotic expression of ribosomal RNA genes during male gametogenesis. **Hum. Genetics** 38(3):279-84, 1977.
- SCHMID, M.; LÖSER, C.; SCHMIDTKE, J. & ENGEL, W. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. **Chromosoma** 86:149-79, 1982.
- SCHMID, M.; OHTA, S.; STEINLEIN, C. & GUTTENBACH, M. Chromosome Banding in Amphibia XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Burgeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). **Cytogenet. Cell Genet.** 62:238-46, 1993.
- SCHMID, M.; SIMS, S.H.; HAAF, T. & MacGREGOR, H.C. Chromosome Banding in Amphibia X. 18S and 28S ribosomal RNA genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrotheca riobambae*. **Chromosoma** 94:139-45, 1986.
- SCHMID, M.; FEICHTINGER, W.; WEIMER, R.; MAIS, C.; BOLANÖS, F. & LEÓN, P. Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism

- and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenet Cell Genet* 69:18-26, 1995.
- SCHMID, M.; NANDA, I.; STEINLEI, C.; KAUSCH, K. & HAAF, T. Sex-determining mechanism and sex chromosome in Amphibia. In: GREEN, M. G. & SESSIONS, S. K., eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. 1991a, pp. 393-430.
- SCHMID, M.; STEINLEI, C.; FRIEDL, R.; DE ALMEIDA, C.G.; HAAF, T.; HILLIS, D.M. & DUELLMAN, W.E. Chromosome Banding in Amphibia XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). **Chromosoma** 99:413-23, 1990.
- SCHUBERT, I. & WOBUS, U. *In-situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma** 92:143-8, 1985.
- SCHWARZACHER, H.G. & WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. **Human Genet.** 63:89-99, 1983.
- SCHWARZACHER, H.G. & WACHTLER, F. The nucleolus. **Anat. Embryol.** 188:515-536, 1993.
- SCHWARZACHER, H.G. & MIKELSAAR, A. V. & SCHNEDL, W. The nature of Ag-staining of nucleolus organizer region. Electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis, and meiosis. **Cytogenet. Cell Genet.** 20:24~39, 1978.
- SETO, T.; UTSUNOMIYA, T. & UTSUNOMIYA, Y. Interpopulation variation of the C-banded karyotypes in *Rana ishikawae* from Okinawa-jima and Amamioshima in the Ryukyu Islands (Japan). **Japanese J. Herpetology** 10(3):67-72, 1984.
- SHUBIN, N. H. & JENKINS Jr., F. A. An jurassic jumping frog. **Nature**(377) 7:49-52, 1995.

- SKUK, G. & LANGONE, J. A. Los cromosomas de cuatro especies del género *Hyla* (Anura: Hylidae) con número diploide de  $2n = 30$ . **Acta Zool. Lilloana** 41:165-171, 1990.
- SMETANA, K. & BUSCH, H. The nucleolus and nucleolar DNA. In: **The cell nucleus**. Vol.I, H. Busch Ed. New York Academic Press, 1974, pp. 73-147.
- SOUZA, M. & CARVALHEIRO, J.A. A cytochemical study of the nucleolus and nucleolus-related structures during human spermatogenesis. **Anat. Embryol.** 190:479-87, 1994.
- STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R.C. & NYBAKKEN, J. W. Classe Amphibia: Anfíbios. In: **Zoologia Geral**. Companhia Ed. Nacional. 1989, pp. 618-41.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** 75:304-6, 1972.
- SUMNER, A.T. C-banding and related methods. In: **Chromosome banding**. Unwin Hyman Ed. London, 1990, pp.39-69.
- SUMNER, A.T. Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem** 38:91-109, 1994.
- TATA, J.R. Hormonal regulation of growth and protein synthesis. **Nature** 219:331'7, 1968.
- THIEBAUT, F.; RIGANT, J. P. & PEITH, A. Improvement in the specificity of the silver staining technique for AgNOR-associated acidic proteins in paraffin sections. **Stain Technology** 59:181-5, 1984.
- TRUEB, L. & CLOUTIER, R. Historical constraints on Lissamphibian osteology. **American Zoologist.** 27:33A, 1987.
- VITELLI, L.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F.; NARDI, I. & BARSACCHI-PILONE, G. Chromosomal localization of 18S+28S and 5S ribosomal RNA

- genes in evolutionary diverse anuran Amphibians. **Chromosoma** 84:475-91, 1982.
- WARD, D.C.; REICH, E. & GOLDBERG, I.H. Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs. **Science** 149:1259-63, 1965.
- WEBB, B.S. & MOUGEY, E.B. News from the nucleolus: rRNA gene expression. **TIBS** 16:58-62, 1991.
- WILEY, J. E. Chromosome banding patterns of treefrogs (Hylidae) of the eastern United States. **Herpetológica** 38:507-20, 1982.
- WILEY, J.E. Chromosome polymorphism in *Hyla chrysoscelis*. **Copeia** 1:273-5, 1983.
- WILEY, J. E.; MEYNE, J.; LITTLE, M.L. & STOUT, J. C. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs. **Cytogenet Cell Genet** 61:55-7, 1992.
- WILEY, J. E.; LITTLE, M. L.; ROMANO, M. A.; BLOUNT, D.A. & CLINE, G. R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Chromosoma** 97:481-7, 1989.
- ZUCKERKANDL, E. & HENNIG, W. Tracking heterochromatin. **Chromosoma** 104:75-83, 1995.