

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

EDUARDO RONDELLI FAVERO



**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES E POPULAÇÕES
DE *PSEUDOPALUDICOLA* (LEIUPERIDAE, ANURA)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eduardo Rondelli Favero
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

A handwritten signature in black ink, reading "Shirlei Maria Recco Pimentel".

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

CAMPINAS, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F278c

Fávero, Eduardo Rondelli

Caracterização citogenética de espécies e populações de *Pseudopaludicola* (Leiuperidae, Anura) / Eduardo Rondelli Fávero. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Shirlei Maria Recco-Pimentel, Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello.

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

1. *Pseudopaludicola*. 2. Cariótipos. 3. Ag-NOR. 4. Amphibia. I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria. II. Veiga-Menoncello, Ana Cristina Prado. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Cytogenetic characterization of species and populations of *Pseudopaludicola* (Leiuperidae, Anura).

Palavras-chave em inglês: *Pseudopaludicola*; Karyotypes; Ag-NOR; Amphibia.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel, Carmen Sílvia Busin, Odair Aguiar Junior.

Data da defesa: 28/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 28 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Carmen Sílvia Busin


Assinatura

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior


Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini


Assinatura

Dedico esta tese aos meus pais, José Fernando e Margarida, aos meus irmãos Flávia e Bruno, aos meus avôs Derville e Inês e a minha namorada Bruna.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a todos, que de certa forma, contribuíram à realização deste trabalho, em especial:

- À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel pela total dedicação, orientação, apoio e confiança, indispensáveis à concretização deste trabalho. Por ter me oferecido uma oportunidade de ouro ao me aceitar como seu aluno, sempre acreditando no meu trabalho e no meu esforço e que absolutamente contribuiu com o meu amadurecimento e minha formação.

- À Profa. Dra. Ana Cristina C. P. Veiga-Menoncello, como minha co-orientadora e amiga, sempre estando ao meu lado me auxiliando, tendo paciência quando eu mais precisava, dispondo do seu valioso tempo pra se dedicar aos meus resultados, incentivando há todo momento minha melhora e acreditando em meu potencial. Aninha, sua dedicação a minha pessoa renderão frutos valiosos, não apenas profissionalmente, mas sim pelo lado humano e forte que adquiri de você por todo esse tempo juntos.

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo total apoio financeiro.

- Agradeço imensamente às pessoas que participaram das coletas dos exemplares para que o trabalho fosse realizado, pois sei da dificuldade de trabalho em campo.

- Agradeço aos professores do Depto. Biologia Celular pela minha formação, e pela paciência durante as disciplinas.

- Gostaria de agradecer do fundo do meu coração a técnica do laboratório de Citogenética do Depto. de Biologia Celular da UNICAMP, Klélia A. Carvalho, que me ensinou tudo que hoje conheço sobre a parte prática de um laboratório e aos momentos de descontração que foram fundamentais para aliviar o peso de tamanha responsabilidade e que sem dúvida alguma culminaram com uma amizade sincera.

- Agradeço imensamente ao companheiro de todas as horas Sérgio Siqueira Junior, pela ajuda em todos os momentos de dificuldades, pela parte gráfica da minha tese e pelas divertidas coletas que realizamos juntos, que com toda certeza estarão guardadas em minha memória.

- Gostaria de agradecer aos queridos amigos de laboratório, a Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço (Lu), Cíntia, Gisele Introíni (Gi), Mônica, Thiago. Agradeço ainda as pessoas que já passaram pelo laboratório da Profa. Shirlei, Lílian Ricco Medeiros, Odair Aguiar Junior, Yeda,

Samantha, Gabriel Egito e Paula Rodrigues (Paulinha), pela amizade e cumplicidade dentro e fora do ambiente de trabalho.

- Agradeço a todos os funcionários do Depto. Biologia Celular e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, em especial à secretária Lílíam Panagio, durante todo esse tempo se tornou minha agenda, ou ainda mais, minha memória, pois se preocupou com os meus compromissos, algumas vezes esquecidos; pela extrema dedicação, paciência e compreensão, e fundamental eficiência.

- A toda minha família que são a minha base o meu caminho, meu tudo. São estas pessoas que me ensinaram a ter honestidade, sinceridade a lutar pelos meus ideais e o mais importante, amor ao próximo. José Fernando (pai), Margarida (mãe), Flávia (irmã), Bruno (irmão), aos meus avôs Derville e Inês, agradeço a Deus todas as noites por vocês fazerem parte da minha vida.

- Gostaria de agradecer imensamente uma pessoa pequenininha que chegou e dominou o espaço, que ilumina o meu caminho e que me faz sentir grande e orgulhoso. Bruna, muito obrigado por estar comigo, por ser minha cúmplice, minha namorada e minha companheira, muito obrigado por cuidar de mim e fazer com que cada dia valha a pena.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. A CLASSE AMPHIBIA E A ORDEM ANURA: ASPECTOS GERAIS	5
1.2. A FAMÍLIA LEIUPERIDAE E A PROBLEMÁTICA DE INTERESSE.....	5
1.2.1. CITOGENÉTICA EM ANUROS, COM ÊNFASE NO GÊNERO <i>PSEUDOPALUDICOLA</i>	8
1.3. REGIÃO ORGANIZADORA NUCLEOLAR	10
1.4. HETEROCROMATINA.....	13
2. OBJETIVOS	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
4. ARTIGO I.....	29
RESUMO	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAIS E MÉTODOS	34
PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS	34
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	56

RESUMO

O gênero *Pseudopaludicola*, pertencente à família Leiuperidae, compreende atualmente 12 espécies de rãs de pequeno tamanho, distribuídas pela América do Sul, sendo a ocorrência de oito delas foi relatada para o Brasil. Devido à grande semelhança morfológica entre espécies, algumas ocorrendo em simpatria, confusões taxonômicas são freqüentes. Alguns estudos morfológicos acerca deste gênero foram realizados, mas as relações de parentesco inter- e intra-genéricas de *Pseudopaludicola* permanecem pouco esclarecidas. As poucas informações citogenéticas para o gênero *Pseudopaludicola* restringiam-se apenas à determinação do número de cromossomos e análise do cariótipo por métodos de coloração convencional. Para *Pseudopaludicola falcipes*, em especial, foi descrita uma variação intra-específica do número de cromossomos, de $2n=16$ à $2n=20$. O presente estudo visa contribuir com dados citogenéticos para a caracterização de espécies de *Pseudopaludicola* e para o entendimento dos processos envolvidos na evolução cariotípica do gênero. Foram analisados os cariótipos de exemplares de *Pseudopaludicola falcipes*, *P. ameghini* (sensu Cope, 1887) e *P. mystacalis* de suas respectivas localidades-tipo (região de Porto Alegre, RS e Chapada dos Guimarães, MT), de *P. mystacalis* e de *P. ternetzi*, de Uberlândia (MG), de *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* I, II, III e IV, da região noroeste do estado de São Paulo (municípios de Santa Fé do Sul, Vitória Brasil, Palestina e Icém), de *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I, II, III e IV, dos municípios de Icém (SP), Barreirinhas (MA) e Urbano Santos (MA) e *Pseudopaludicola* sp. 1, 2 e 3, sendo as duas primeiras provenientes de Poconé (MT) e a terceira de Santa Terezinha (MT). As metáfases foram obtidas de suspensões de células de epitélio intestinal e testículo, e coradas com Giemsa ou submetidas às técnicas impregnação por prata (Ag-NOR) para detecção de NOR e de bandamento C, para a localização de heterocromatina. Os dados obtidos revelaram uma variação interespecífica quanto ao número de cromossomos. Dentre os espécimes provenientes de Poconé, MT, havia dois cariótipos distintos, com $2n=22$ e com $2n=16$ cromossomos (*Pseudopaludicola* sp. 1 e 2) e os de Icém, SP, com indivíduos $2n=20$ e $2n=16$ cromossomos (*Pseudopaludicola* aff. *mystacalis*, respectivamente I e II). *Pseudopaludicola falcipes* e *Pseudopaludicola* sp.1, de Poconé, apresentaram $2n=22$ e a NOR localizada na região pericentromérica do braço longo do par 8. Estas espécies diferiram, na morfologia da NOR, sendo heteromórfica em *P. falcipes* e homomórfica em *Pseudopaludicola* sp. 1, e na localização

de algumas bandas heterocromáticas. *Pseudopaludicola ameghini* (*sensu* Cope, 1887), *P. ternetzi* e *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I de Icém apresentaram $2n=20$ cromossomos e a NOR localizada na região telomérica do braço longo do par 9. O cariótipo de *P. ternetzi* diferiu do de *P. ameghini* tanto pela classificação morfológica distinta do par 7 quanto pelo padrão de distribuição de heterocromatina. *Pseudopaludicola mystacalis*, bem como todos os espécimes de *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* I, II, III e IV, *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* II, III e IV e *Pseudopaludicola* sp. 2 e 3 apresentaram $2n=16$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com a NOR localizada na região pericentromérica do braço curto do par 4. Vários espécimes apresentaram um heteromorfismo de tamanho em relação aos homólogos do par 4 (morfo 4 e morfo 4'), alterando a classificação desse cromossomo para metacêntrico em algumas populações. Em *P. mystacalis*, *P. aff. falcipes* I, II, III e IV, *P. aff. mystacalis* II, III e IV e *Pseudopaludicola* sp 2 e 3 foram detectados blocos de heterocromatina fortemente marcados nas regiões pericentroméricas no braço curto do par 1 e longo do par 2. Os resultados obtidos mostram que *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) com $2n=20$ e *P. mystacalis* com $2n=16$, são unidades taxonômicas distintas e que os espécimes tidos como *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*) e como *Pseudopaludicola* sp. mostraram-se citogeneticamente relacionados à *P. mystacalis* e não à *P. falcipes* que possui $2n=22$ cromossomos. Desta forma, os nossos dados sugerem a retirada de *P. ameghini* da sinonímia de *P. mystacalis* e reforçam a necessidade de uma revisão taxonômica no gênero.

ABSTRACT

The genus *Pseudopaludicola* (family Leiuperidae) comprises 12 species of small sized frogs, which are widely distributed in South America. In Brazil, eight species are described within this genus, and several of them are sympatric. The relevant morphological similarities among the *Pseudopaludicola* species have contributed to the still poor understanding of many aspects of their taxonomy, including inter- and intrageneric relationships. Cytogenetic data on *Pseudopaludicola* have been restricted to karyotype analyses using conventional Giemsa staining. Variation in intraspecific chromosomal number was described in *P. falcipes*, ranging from $2n=16$ to $2n=20$. In the present work, Brazilian *Pseudopaludicola* species were submitted to cytogenetic analysis aiming at their further characterization and attempting to better understanding the karyotypical evolution of this genus. The analyzed species were *Pseudopaludicola falcipes* (Porto Alegre, RS), *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) and *P. mystacalis* (Chapada dos Guimarães, MT), *P. mystacalis* and *P. ternetzi* (Uberlândia, MG), *P. aff. falcipes* I, II, III and IV (respectively from Santa Fé do Sul, Vitória Brasil, Palestina and Icém, SP), *P. aff. mystacalis* I, II, III and IV (Icém, SP, Barreirinhas, MA, and Urbano Santos, MA), and *Pseudopaludicola* sp. 1 and sp. 2 (Poconé, MT) and sp. 3 (Santa Terezinha, MT). Metaphases were obtained from suspensions of intestinal epithelium and testicular cells, and stained with Giemsa or submitted to silver staining technique in order to detect the nucleolus organizing regions (Ag-NOR), and C-banding, for heterochromatin localization. The results revealed interspecific chromosomal number variation. In the *Pseudopaludicola* sp. 1 and 2 specimens (Poconé MT), two distinct karyotypes were identified, respectively with $2n=22$ and $2n=16$ chromosomes. Within the *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* from Icém, SP, the analyzed specimens had $2n=20$ and $2n=16$ chromosomes, being nominated I and II, respectively. These data clearly indicated two cryptic species of *Pseudopaludicola* within each of those two localities. The *P. falcipes* and *Pseudopaludicola* sp.1 (Poconé, MT) had $2n=22$ and the NOR was located at the pericentromeric region in the long arm of the pair 8. The species differed in the NOR morphology, which was heteromorphic in *P. falcipes* and homomorphic in *Pseudopaludicola* sp.1, as well as in the localization of some C-bands. *Pseudopaludicola ameghini* (*sensu* Cope, 1887), *P. ternetzi* and *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I (Icém, SP) had

2n=20 chromosomes and the NOR was located on the telomeric region in the long arm of the pair 9. The karyotypes of *P. ternetzi* and *P. ameghini* differed in the pair 7 morphology and in the heterochromatin distribution pattern. All analyzed specimens of *P. mystacalis*, *P. aff. falcipes* I, II, III and IV, *P. aff. mystacalis* II, III and IV, and *Pseudopaludicola* sp. 2 and 3, showed 2n=16 chromosomes, which were all metacentric and submetacentric, with the NOR located in the pericentromeric region of the short arm of the pair 4. In several of those specimens, the size heteromorphism of the pair 4 altered, from submetacentric to metacentric, the classification of one of the homologous of that pair. Strong pericentromeric C-bands were detected on the short arm of the pair 1 and on the long arm of the pair 2 in *P. mystacalis*, *P. aff. falcipes* I, II, III and IV, *P. aff. mystacalis* II, III and IV, and *Pseudopaludicola* sp. 2 and 3. As based on the cytogenetic data, *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887), with 2n = 20, and *P. mystacalis*, with 2n = 16, are distinct taxonomic units, and the specimens formerly identified as *P. aff. falcipes* and as *Pseudopaludicola* sp. were indeed cytogenetically closely related to *P. mystacalis* and not to *P. falcipes*, which has 2n = 22 chromosomes. Hence, our data suggest that *P. ameghini* is not a *P. mystacalis* synonymy and emphasize the importance of a taxonomic review of the genus *Pseudopaludicola*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A CLASSE AMPHIBIA E A ORDEM ANURA: ASPECTOS GERAIS

Os anfíbios, além de serem os primeiros cordados a viverem fora da água, são também os primeiros tetrápodes (gr. *tetra*, quatro + *podos*, pé) vertebrados terrestres, com tegumento úmido e sem escamas (Pough, 2002). Sua denominação (gr. *amphi*, dual + *bios*, vida) indica corretamente que a maioria das espécies pertencentes a essa classe vive parcialmente em água doce e parcialmente em terra. Para isso, carregam consigo estruturas adaptativas importantes, tais como pele úmida e glandular, extremidades para nadar e andar (exceto para Ordem Gymnophiona), respiração por pulmões, pele, mucosa bucal e brânquias, presente em algum estágio da vida, e membros adaptados para o salto para alguns representantes (Romer & Parson, 1985; Pough, 2002).

A classe Amphibia é constituída por 6347 espécies, dividida em três ordens: Anura, Urodela (=Caudata) e Gymnophiona. A ordem Anura (*anura*: sem cauda), com 48 famílias e 5602 espécies, representadas por sapos, rãs e pererecas, possuem membros pélvicos bem alongados e corpo curto e flexível; Urodela ou Caudata, (571 espécies), representada por salamandras, com membros peitorais e pélvicos de igual tamanho movendo-se por ondulações laterais, e Gymnophiona (174 espécies), representada por anfíbios vermiformes cavadores (Romer & Passons, 1985; Duellman & Trueb, 1986; Duellman & Rodrigues, 1994; Pough, 2002; Frost, 2008).

Anura é considerada a ordem de anfíbios mais bem sucedida e com maior expansão territorial, vivendo principalmente na água ou em lugares úmidos, exceto na Antártida e no mar (Pough, 2002; Frost, 2008). No Brasil, o número de espécies de anuros é bastante elevado, tendo sido relatada a ocorrência de representantes de 20 das 48 famílias (Frost, 2008).

1.2. A FAMÍLIA LEIUPERIDAE E A PROBLEMÁTICA DE INTERESSE

Até 2006, o gênero *Pseudopaludicola* pertencia à Família Leptodactylidae que abrigava 49 gêneros e cerca de 1100 espécies, compreendidas em cinco subfamílias, Ceratophryinae,

Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae (Laurent, 1986, *apud* Nuin 2002; Frost, 2004). Recentemente, Frost *et al.*, (2006) com base em dados moleculares indicaram o polifiletismo da subfamília Leptodactylinae, uma vez que seus representantes formaram dois agrupamentos distintos, Leptodactylinae I (*Pleurodema*, *Edalorhyna*, *Physalaemus* e *Pseudopaludicola*) e Leptodactylinae II (*Adenomera*, *Lithodytes*, *Leptodactylus* e *Vanzolinius*), que mostraram ser parafiléticos com relação à Cycloramphinae I (*Paratelamobius* e *Scythrophrys*). De acordo com esses autores, estes agrupamentos somados ao gênero *Somuncuria* passaram então a ser reconhecidos como Leptodactylidae. Porém, Grant *et al.* (2006) ampliaram os estudos e propuseram uma nova estruturação para a família Leptodactylidae que passou a ser composta por quatro gêneros, *Hidrolaetere*, *Leptodactylus*, *Paratelamobius* e *Scythrophrys*. Os gêneros *Pseudopaludicola*, *Physalaemus* (incluindo *Engystomops* e *Eupemphix sensu* Nascimento *et al.*, 2005), *Edalorhyna*, *Pleurodema* e *Somuncuria* foram alocados na família Leiuperidae, a qual atualmente possui 77 espécies (Frost, 2008).

O gênero *Pseudopaludicola* apresenta-se amplamente distribuído na região oriental da América do Sul, da Colômbia até a Argentina, nas Guianas e Suriname, nas regiões amazônicas da Colômbia e do Brasil, no cerrado e mata Atlântica, no Uruguai e Argentina (Lobo, 1992). Nesse gênero encontram-se algumas das espécies com menores tamanhos da família Leiuperidae, constituídos por animais que geralmente não ultrapassam os 20 mm de comprimento, morfologicamente muito semelhantes entre si e com coloração policromática (Haddad e Cardoso, 1987). Lobo (1992) menciona que as espécies de *Pseudopaludicola* da fauna da Argentina, quando muito grandes, alcançam 25 mm.

Estudos envolvendo espécies do gênero *Pseudopaludicola* são escassos e predominantemente de caráter taxonômico e ecológico (ver Lobo, 1993, para referências). Contudo, a ocorrência de espécies crípticas ou muito semelhantes, vivendo simpatricamente, dificulta a identificação com base em caracteres externos o que tem causado, historicamente, diversas mudanças taxonômicas no gênero.

Milstead (1963) considerou *Pseudopaludicola ameghini* (reconhecida por Parker, 1927, e conhecida somente em sua localidade-tipo, na Chapada dos Guimarães, MT), *P. mystacalis* e *P. saltica*, como sinônimos de *P. falcipes*. Porém, Bokermann (1966; *apud* Lynch, 1989) reconheceu essas quatro espécies no oeste e sudeste do Brasil e colocou *P. ternetzi* como

sinônimo de *P. ameghini*. Posteriormente, Lynch (1971) listou cinco espécies para o sul e sudeste da América do Sul, *P. falcipes*, *P. ameghini*, *P. mystacalis*, *P. saltica* e *P. ternetzi*. Segundo Lynch (1989), os trabalhos anteriores não forneceram evidências para suportar as propostas de sinonimização e revalidação de *P. ternetzi*. Neste trabalho, o autor incluiu *P. pusilla*, *P. boliviana*, *P. ceratophyes* e *P. llanera* no grupo “pusilla”, distribuídos pela região noroeste sul-americana, propondo o monofiletismo do grupo com base na sinapomorfia de falanges terminais em forma de T. Esse caráter, já observado por Miranda Ribeiro (1926) em seu breve diagnóstico do gênero, fez Lynch (1989) relacionar as espécies restantes ao grupo “falcipes”, distribuídos pelo centro-oeste e centro-sul da América do Sul, tido como parafilético em relação ao grupo “pusilla”.

Haddad & Cardoso (1987) analisando as formas encontradas na Chapada dos Guimarães, MT, com base em dados de bioacústica e morfometria, colocaram *P. ameghini* na sinonímia de *P. mystacalis* e consideraram *P. saltica* e *P. mystacalis* como espécies válidas. Posteriormente, Lobo (1996) corroborou a proposta de sinonimização de *P. ameghini* a *P. mystacalis* (Haddad & Cardoso, 1987) e revalidou também as espécies *P. mystacalis* e *P. ternetzi*.

A revisão mais recente de Frost (2008) menciona a existência de 12 espécies: *P. falcipes*, *P. mystacalis*, *P. saltica*, *P. pusilla*, *P. boliviana*, *P. ternetzi*, *P. ceratophryes*, *P. mineira*, *P. mirandae*, *P. riopiedadensis*, *P. llanera* e *P. canga*. No Brasil há relatos da ocorrência de oito dessas espécies, porém, *P. riopiedadensis* não tem sido encontrada nos últimos anos (D. C. Rossa-Feres - comunicação pessoal).

As relações de parentesco de *Pseudopaludicola* com outros leptodactílicos (*sensu* Lynch, 1971) foram analisadas por vários autores. Heyer (1975), utilizando 37 caracteres provenientes de osteologia, miologia, morfologia externa de larvas e adultos, cariótipos e biologia reprodutiva, indicou o gênero *Pseudopaludicola* como mais relacionado à *Physalaemus* e *Pleurodema*. Canatella & Duellman (1984) sugeriram a origem de *Pseudopaludicola* a partir de *Physalaemus*, com base em três características, (1) larvas com linhas interrompidas nas papilas do lábio inferior; (2) processos alares muito expandidos dos hióides; e (3) perda dos músculos omohióideo e petrohióideo, caracteres estes derivados e compartilhados por alguns *Physalaemus*.

Esta hipótese, no entanto, foi questionada por Lynch (1989), que fez uma revisão do

gênero *Pseudopaludicola*, confirmando o seu monofiletismo, com base na presença de um tubérculo hipertrofiado existente na face posterior do antebraço.

Lobo (1995) analisou as relações filogenéticas de nove espécies de *Pseudopaludicola* (não foram incluídas *P. mirandae*, *P. riopiedadensis* e *P. canga* descritas posteriormente), com base em caracteres osteológicos e de morfologia externa, utilizando como grupo externo oito espécies de *Physalaemus* e duas de *Leptodactylus*. O monofiletismo de *Pseudopaludicola* foi confirmado por este estudo, o qual corroborou também o monofiletismo do grupo *pusilla*, mas com um arranjo interno diferente para as relações entre as espécies. A análise de Lobo (1995) mostrou ainda *P. saltica* como irmã de *P. falcipes*, e possivelmente também de *P. ternetzi*. *Pseudopaludicola mineira* apresentou uma relação incerta com as demais e *P. pusilla* mostrou-se irmã das espécies pertencentes ao seu grupo. Em grau específico há também alguns problemas a serem esclarecidos. Um exemplo é a questão taxonômica envolvendo a espécie *P. falcipes*, encontrada no sudeste do Brasil e norte da Argentina, a qual é morfologicamente muito semelhante a *P. mystacalis* e a ocorrência simpátrica dessas espécies em algumas localidades, possibilita que as mesmas sejam bastante confundidas entre si. Além disso, a pesquisadora M.L.Del-Grande (comunicação pessoal) observou que o canto de *P. mystacalis* na localidade-tipo (Chapada dos Guimarães, MT) é diferente da que ocorre na região noroeste do Estado de São Paulo, em municípios próximos a São José do Rio Preto. Essa mesma pesquisadora observou ainda variações morfológicas em populações de *Pseudopaludicola* da Bahia que sugerem a possibilidade da existência de espécies novas naquela região.

Segundo Lynch (1989) e Lobo (1996), o gênero *Pseudopaludicola* necessita de mais estudos, já que persistem dúvidas importantes principalmente sobre as espécies do sudeste da América do Sul e de acordo com Haddad e Cardoso (1987), análises cromossômicas associadas a dados biológicos poderão auxiliar no esclarecimento de questões de ordem sistemática e evolutiva do gênero.

1.2.1. CITOGENÉTICA EM ANUROS, COM ÊNFASE NO GÊNERO *PSEUDOPALUDICOLA*

A citogenética teve início com as primeiras técnicas realizadas por colorações convencionais, especialmente Giemsa, onde a maior preocupação era a caracterização numérica e morfológica dos cromossomos, que permitisse detectar a ocorrência de variabilidade entre os

anuros. Nas décadas de 60 e 70 do século passado, alguns pesquisadores brasileiros se dedicaram a estudar os cariótipos de anuros. Beçak (1968) estudou o cariótipo de dezoito espécies de anuros brasileiros de quatro famílias (Bufonidae, Leptodactylidae, Hylidae e Pseudidae), Bogart (1968) descreveu seis espécies de sapos africanos da família Bufonidae com $2n=20$ cromossomos, número incomum para a família na época, e Rabello (1969, 1970) relatou variações em Hylidae com $2n=22, 24, 26, 30, 48$ e 52 cromossomos, sendo mais frequente o cariótipo com $2n=24$ cromossomos. A citogenética tem contribuído muito para a diferenciação entre anuros. Espécies crípticas ou muitos semelhantes entre si e que, à primeira vista, poderiam ser consideradas uma mesma espécie, podem em muitos casos ser diferenciadas por meio de análise citogenética. Isso ocorreu com espécies de *Physalaemus* (Lourenço *et al.*, 1998; Amaral *et al.*, 2000), de *Pseudis* (Busin *et al.*, 2001), de *Epipedobates* (Aguar-Jr *et al.*, 2002), de *Paratelmatobius* e *Scythrophrys* (Lourenço *et al.*, 2000; 2003a, b, c; 2008), de *Dendropsophus* (Medeiros *et al.*, 2003), de *Megaelosia* (Rosa *et al.* 2003), de *Colostethus* (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003a, b, 2006), do grupo de *Hypsiboas pulchella* (Ananias *et al.*, 2004), *Hypsiboas bischoffi* e *H. guentheri* (Raber *et al.*, 2004), *Crossodactylus* (Aguar-Jr *et al.*, 2004), entre outras.

Embora muitos mecanismos de evolução cariotípica em Anura tenham sido propostos com base na análise comparativa dos cariótipos, uma melhor compreensão das relações de proximidade desses animais aconteceu após o uso de técnicas citogenéticas mais apuradas. Em estudos de anuros, as mais utilizadas são as técnicas de bandamento C, de Ag-NOR, bandamentos com fluorocromos e a hibridação *in situ* fluorescente. O uso dessas técnicas facilita o reconhecimento de homeologias dos cromossomos e possibilita uma melhor compreensão das relações entre gêneros e entre espécies.

Os trabalhos desenvolvidos em citogenética de anuros, embora relativamente poucos frente ao número de espécies descritas, permitem a detecção dos principais mecanismos de evolução cromossômica que atuaram ao longo de sua história. Mecanismos tais como fusão/fissão cêntrica, translocação, deleção, duplicação e poliploidização, são encontrados e discutidos em diversas famílias. Bogart (1991) encontrou evidências de que fusões cêntricas e fissões sejam os principais mecanismos envolvidos em variações nos números cromossômicos em *Eleutherodactylus* (*sensu* Lynch, 1971). Busin *et al.* (2001) sugerem que fissão seja o mecanismo envolvido na origem do cariótipo de 28 cromossomos de *Pseudis cardosoi* e Gruber

et al. (2007) atribuíram à redução cromossômica de $2n=24$ para $2n=22$ em espécies de *Hypsiboas*, possivelmente, a mecanismos de translocação e fusão cêntrica.

Para as espécies de *Pseudopaludicola*, os dados cromossômicos são, além de conflitantes, escassos na literatura. Saez e Brum (1960) e Brum e Saez (1968) relataram a presença de $2n=22$ cromossomos para populações de *P. falcipes* do Uruguai e Beçak (1968) descreveu o cariótipo de populações provenientes de São José do Rio Preto, SP, atribuídas a *P. falcipes* com $2n=18$ e a *P. mystacalis* (= *P. ameghini*) com $2n=20$. Batistic *et al.* (1969) e Batistic (1970) também encontraram diferenças no número de cromossomos para *P. falcipes*. Populações dos estados de São Paulo e de Minas Gerais apresentaram $2n=16$, 18 e 20 cromossomos, a população do Mato Grosso $2n=16$, e a população da Bahia $2n=22$ cromossomos, enquanto em *P. ameghini* o número diplóide $2n=20$ se manteve. De acordo com Batistic (1970), o cariótipo de *P. ameghini* difere do de *P. falcipes* $2n=20$ apenas na morfologia de um par cromossômico e na localização da constrição secundária. Embora rearranjos cromossômicos tenham sido sugeridos para explicar a variação cromossômica e um processo de especiação em curso (Batistic, 1970), análises adicionais não foram realizadas.

De modo geral, a existência de poucas informações citogenéticas para o gênero *Pseudopaludicola* dificulta a inferência de possíveis mecanismos envolvidos no processo de diferenciação cariotípica das espécies do gênero e de suas relações intra-genéricas.

1.3. REGIÃO ORGANIZADORA NUCLEOLAR

A biogênese de ribossomos ocorre no nucléolo, uma complexa estrutura nuclear formada por mais de 50 proteínas diferentes, RNA e DNA ribossomal. O nucléolo encontra-se associado a sítios cromossômicos específicos, denominados regiões organizadoras do nucléolo (NOR), que contêm os genes codificadores dos RNA ribossomais (RNAr). Esta estrutura atua tanto na transcrição e no processamento pós-transcricional de RNAr precursor, como também na associação entre RNAr menores e com proteínas para montagem das subunidades ribossomais. Essas subunidades são individualmente exportadas para o citoplasma para tomar parte na síntese de proteínas (Alberts *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2007).

O DNA possui genes codificadores de RNAr que estão repetitivamente arranjados em “unidades de transcrição”, separadas por seqüências espaçadoras externas denominadas

espaçadores intergênicos (IGS), que Miller (1981) acreditava não serem transcritas. As unidades quando transcritas, ainda possuem seqüências internas que separam os diferentes tipos de RNA pré-ribossomais 18S, 5,8S e 28S, denominadas espaçadores transcritos internos (ITS), além de um espaçador transcrito externo (ETS) ladeando o RNAr 18S. A clivagem dessas seqüências do RNA pré-ribossomal origina as subunidades do ribossomo (Mello *et al.*, 2007). O RNA que participa na composição do nucléolo pode ser evidenciado bioquimicamente pelo método de basofilia, usando-se como corante o azul de toluidina a pH 4,0, ou por outros métodos citoquímicos que revelam a presença de proteínas não-histônicas no nucléolo, tais como colorações para proteínas totais com *fast green* a pH 2,7, após remoção de histonas, ou com eosina e, o método de impregnação pela prata (AgNOR), que tem afinidade por proteínas associadas aos sítios de DNAr transcritos (Mello *et al.*, 2007).

O tamanho das NORs (mesmo que sejam homólogas) pode variar bastante entre diferentes indivíduos da mesma espécie, devido ao diferente número de cópias dos genes ribossomais apresentado por cada NOR (Schmid, 1982). A maioria das NORs aparece como constrições secundárias e em alguns casos essa região é circundada por heterocromatina (King, 1980; Schmid, 1982; Schwarzacher & Wachtler, 1993).

O bandamento N (Matsui & Sasaki, 1973) foi o primeiro dos vários métodos proposto para identificar especificamente NORs em cromossomos metafásicos. Envolve parte da extração de ácidos nucléicos e histonas, seguida por coloração com Giemsa. A impregnação pelo íon prata é o método mais usado para a identificação de NORs, embora detecte apenas as NORs que estiveram ativas na última intérfase. Essa técnica foi proposta inicialmente por Howell *et al.*, (1975), método conhecido como As-sat (prata amoniacal satélite), que envolve várias etapas: fixação do cromossomo em formalina, tratamento com prata amoniacal e com hidróxido de sódio e então detecção com uma mistura de formalina e prata amoniacal. No mesmo ano, Goodpasture e Bloom (1975) publicaram método Ag-As, uma técnica que envolve a utilização de nitrato de prata a 50% colocado sobre a preparação cromossômica, coberto com lamínula e exposto a uma lâmpada. Em seguida, os cromossomos recebem uma mistura de prata amoniacal e formalina. Outras propostas foram oferecidas por outros pesquisadores. Orlet (1979) misturou uma solução de prata a 50% com ácido fórmico diluído e incubou a lâmina nesta solução. Este procedimento foi modificado por Howell e Black (1980), que obteve uma solução coloidal misturando ácido fórmico à solução de gelatina diluída e posteriormente este

revelador coloidal foi misturado com uma solução de nitrato de prata imediatamente antes do uso, sendo então as lâminas incubadas em estufa. O método de impregnação por prata baseia-se na afinidade de proteínas ácidas, associadas às NORs ativas na intérfase, pelo íon prata. Essas proteínas argirófilas, também conhecidas como “proteínas Ag-NOR”, permanecem associadas às NORs mesmo durante a mitose e até o paquíteno da meiose (Howell, 1977; Schwarzacher *et al.*, 1978; Roussel *et al.*, 1996).

Schmid (1982) analisou cromossomos de 260 espécimes de anuros entre 23 diferentes gêneros, e pôde confirmar um alto grau de fixação de heteromorfismo de tamanho de NOR entre os espécimes, e também observar que a maioria dos anuros, tanto de famílias tidas como basais como derivadas, apresenta um par de NORs por genoma diplóide (Schmid, 1982; King *et al.*, (1990); Schmid *et al.*, 1990), sugerindo que possivelmente esta seja uma condição plesiomórfica em Anura. De acordo com King *et al.* (1990), as NORs em Anura tendem a coincidir com bandas C positivas indicando a presença de heterocromatina nesses sítios.

As análises de parâmetros e características relacionadas aos nucléolos são importantes ferramentas utilizadas por citologistas, citopatologistas e citogeneticistas. Os citogeneticistas de anuros, em especial, utilizam as regiões organizadoras de nucléolo como importantes marcadores, permitindo inferir possíveis mecanismos de evolução cromossômica-

A análise cuidadosa do número, da localização cromossômica e das características moleculares das NORs em diferentes indivíduos pode permitir a identificação de homeologias entre diferentes populações e espécies. A identificação de homeologias possibilita, em alguns casos, o reconhecimento de alguns rearranjos cromossômicos que possivelmente diferenciaram cariotipicamente espécies ou grupos. Busin *et al.* (2006), por exemplo, utilizando técnicas de impregnação pela prata e de bandamento C, puderam mostrar diferenças cromossômicas entre espécies de *Lysapsus*, *L. limellus limellus*, *L. l. bolivianus* e *L. caraya*.

Segundo Schmid (1978a, b), o número e a localização das NORs costumam ser características de espécies e populações, que em geral apresentam apenas um par cromossômico portador dessas regiões. No entanto, NORs múltiplas puderam ser identificadas em algumas espécies, como em *Hyla chrysoscelis* e *H. versicolor* (Wiley *et al.*, 1989), em *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991), em *Rana japonica* (Miura, 1994), em *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995), em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998) e *P. cuvieri* (Silva *et al.*, 1999) e em *Leptodactylus mystacinus* (Silva *et al.*, 2006). A origem da variação intra-específica no número

e na localização das NORs, tem sido explicada pela ocorrência de translocações e inversões, transposição de segmentos de DNA por meio de elementos genéticos móveis, ampliações de genes de DNAr fita simples formando NORs identificáveis e funcionais, além de erros de reinserções durante a amplificação do DNAr no curso da oogênese (Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1995).

Portanto, a análise da NOR e suas características, como número, tamanho e posição no genoma, tem se mostrado importante para o entendimento da evolução cromossômica do grupo em estudo, podendo ser um caráter informativo para a distinção de espécies e populações.

1.4. HETEROCROMATINA

O primeiro pesquisador a observar a cromatina no nível citológico, e vê-la apresentar-se condensada ou descondensada na intérfase, foi Flemming em 1882 (Schulz-Schaeffer, 1980). O termo heterocromatina foi introduzido por Heitz, em 1928, após um cuidadoso estudo em que acompanhou os cromossomos durante todo o ciclo celular e demonstrou que as estruturas que se apresentavam condensadas na intérfase nada mais eram do que regiões cromossômicas específicas que não descondensavam na telófase da mitose (John, 1988). Outra característica muito marcante é a chamada replicação tardia do DNA, isto é, a heterocromatina inicia sua replicação depois da eucromatina, caracteristicamente no final da fase S. Portanto, o termo heterocromatina é usado para descrever a região do cromossomo que permanece condensada durante todo o ciclo celular e que é transcricionalmente inativa durante a intérfase (Alberts *et al.*, 2002).

A técnica mais utilizada para evidenciar heterocromatina é o bandamento C, que foi proposta por Pardue e Gall (1970), ao observarem coloração intensa nos centrômeros e nas regiões pericentroméricas de cromossomos submetidos à técnica de hibridação *in situ*. Esses autores sugeriram que as regiões evidenciadas pelo método de hibridação *in situ* eram constituídas quase exclusivamente de DNA altamente repetitivo (DNA satélite). A partir disso, Arrighi e Hsu (1971) descreveram um protocolo para a obtenção de um padrão de bandamento, que marcava a região pericentromérica de cromossomos humanos, com incubação do material primeiro em solução ácida (HCl), depois em solução alcalina (NaOH) e em seguida em solução salina (2xSSC). Posteriormente, Sumner (1972) descreveu um melhoramento dessa técnica,

substituindo o hidróxido de sódio (NaOH) por hidróxido de bário (BaOH)₂, uma solução mais suave que permite um controle adequado da morfologia dos cromossomos.

A causa do bandamento C foi demonstrada por Comings *et al.* (1973), mostrando que a obtenção de bandas C se deve à extração das regiões eucromáticas e sua retenção nas porções heterocromáticas, porém não deixando claro por que razão existe a retirada de DNA somente de regiões eucromáticas e não de heterocromáticas.

Devido à relação de heterocromatina com setores não gênicos, alguns pesquisadores consideravam a heterocromatina como “DNA lixo”. Porém, Pardue e Henning (1990) discutiram que a heterocromatina não devia ser considerada um “lixo” e sim que exercia funções que, na época, ainda não haviam sido definidas, fazendo uma analogia de heterocromatina com “artigo de colecionadores”, cuja importância é reconhecida apenas por quem entende.

Hoje em dia já se conhecem muitas funções adicionais para a heterocromatina. Segundo a recente revisão realizada por Grewal e Jia (2007), a heterocromatina, dentre outras funções que exerce, se porta como uma “plataforma dinâmica” no recrutamento e extensão de proteínas regulatórias ao longo dos seus domínios, facilitando diversos processos, tais como, transcrição, segregação cromossomal e interações cromatínicas. A heterocromatina, embora presente em muitos locais nos cromossomos esta concentrada em regiões específicas, incluindo os centrômeros e telômeros. Normalmente, a maior parte do DNA que é compactado em heterocromatina não contém genes, porém os genes que se tornam compactados em heterocromatina são, em geral, resistentes à expressão ou silenciados. Isso não significa que a heterocromatina tenha que ser desprezada, muito pelo contrário, pois ela é responsável, dentre outros fatores, pelo funcionamento apropriado dos telômeros e centrômeros, auxiliando na proteção do genoma (Alberts *et al.*, 2002).

Estudos de genes funcionais em regiões heterocromáticas têm sido realizados em *Drosophila melanogaster*, embora, a densidade do gene seja muito menor do que na eucromatina (Hilliker *et al.*, 1980). Sumner (1990) sugere que estes genes possam estar contidos em pequenos segmentos de eucromatina, dentro de regiões heterocromáticas, já King (1991) vai além, dizendo que a heterocromatina desempenha um importante papel, protegendo os sítios eucromáticos adjacentes de modificações estruturais por recombinação, uma vez que diminui a formação de quiasmas.

Segundo Grewal e Jia (2007), é comum a associação de heterocromatina à cromatina condensada e a reorganização de domínios nucleares, que reduzem a acessibilidade à maquinaria de transcrição no locus heterocromáticos. No entanto, seu estudo demonstrou que a heterocromatina possui funções muito mais complexas, tornando seu dinamismo intimamente ligado à resposta celular e aos sinais do meio, sendo que este recrutamento de proteínas regulatórias pela heterocromatina oferece um importante mecanismo de regulação coordenada, envolvendo tanto a inativação, quanto a ativação gênica.

Estudos citogenéticos desmonstram que a heterocromatina pode diferir entre genomas de espécies consideradas próximas, não somente em função da sua quantidade, mas também pelo número de bandas apresentadas, sua localização e propriedades de composição, sendo que para isso, utilizado a coloração com diferentes fluorocromos. Pode-se também realizar uma análise mais detalhada buscando-se diferenças indicativas de rearranjos estruturais por técnicas de bandamento G, Q e R. A reação de Feulgen também pode evidenciar regiões com maior ou menor condensação cromatínica (Sumner, 1990).

Embora a correlação entre banda C positiva e DNA altamente repetitivo freqüentemente ocorra, há casos em que não foi detectado esse tipo de DNA em regiões evidenciadas pelo bandamento C (Sumner, 1990). A análise da localização e do tamanho das bandas C permite em alguns casos a identificação de cromossomos. As bandas C podem ser centroméricas, intersticiais ou teloméricas. Em alguns organismos, como algumas espécies de insetos, verificam-se braços ou mesmo cromossomos inteiros heterocromáticos.

Freqüentemente, o padrão de banda C varia entre as diferentes espécies, podendo ser um importante caráter sistemático, que permite a sugestão de rearranjos genéticos ocorridos durante a evolução do grupo em estudo (Sumner, 1990). Além de variações interespecíficas, variações intra-específicas no padrão de banda C, embora pouco freqüentes, já foram reportadas em anuros, mostrando principalmente polimorfismo de tamanho dessas regiões. Diferenças nos padrões heterocromáticos entre espécies são encontradas tanto nos anuros tidos como basais quanto nos mais derivados (King, 1991). Porém, em alguns anuros de sete famílias pertencentes aos Archaeobatrachia foram detectadas pequenas quantidades de heterocromatina utilizando técnicas de bandamento. Já os Neobatrachia, anuros considerados derivados, apresentam uma grande diversidade na distribuição e quantidade de heterocromatina (King, 1991). O padrão de distribuição e quantidade de heterocromatina, detectado pela técnica de bandamento C, assim

como a caracterização da composição das bandas heterocromáticas, obtidas a partir do uso de fluorocromos, têm sido ferramentas importantes na busca de uma melhor compreensão das questões sistemáticas, bem como da evolução cariotípica nesta Ordem (Schmid, 1978 a, b; Schmid, 1980; King, 1980; Miura *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 1999; Busin *et al.*, 2001; Odierna *et al.*, 2001; Kasahara *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

Caracterizar citogeneticamente as espécies *Pseudopaludicola falcipes* da região de Porto Alegre (RS), *P. mystacalis* e *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887), da Chapada dos Guimarães (MT) e *P. ternetzi* de Uberlândia (MG), além de populações tidas como *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* e *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* e *Pseudopaludicola* sp., visando contribuir para uma melhor compreensão da sistemática intra- e intergenérica de *Pseudopaludicola*, bem como para o entendimento dos processos envolvidos na evolução cromossômica do próprio gênero.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Jr, O., Lima, O. P., Giaretta, A.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2002). Cytogenetic analysis of four dart-poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura, Dendrobatidae). *Herpetologica*, 58: 293-303.
- Aguiar-Jr, O., Carvalho, K.A., Giaretta, A.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2004). Cytogenetics of *Hylodes* and *Crossodactylus* (Anura, Hylodinae) with comments on Hylodinae/Dendrobatidae relationships. *Genetica*, 121: 43-53.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, (4th ed.), Garland Science, New York. 1616p.
- Amaral, M.J.V., Cardoso, A.J. & Recco-Pimentel, S.M. (2000). Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). *Caryologia*, 53: 283-288.
- Ananias, F., Garcia, P. C. A. & Recco-Pimentel, S. M. (2004). Conserved karyotypes in the *Hyla puchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas*, 140: 42-48.
- Arrighi, F.E. & Hsu, T.C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10: 81-86.
- Batistic, R.F., Beçak, M.L. & Vizotto, L.D. (1969). Variação cromossômica no gênero *Pseudopaludicola* (Anura). *Ciênc. Cult.*, 21: 260.
- Batistic, R.F. (1970). Estudo cromossômico e mecanismos de especiação em *Pseudopaludicola* (Leptodactylidae, Anura). Memória de Mestrado em Biologia, Instituto de Biociências da USP, Mestrado em Biologia, São Paulo, 57p.

- Batistic, R.F., Beçak, M.L., Beçak, W. & Vizotto, L.D. (1970). Especiação e variação cariotípica em *Pseudopaludicola* (Amphibia, Anura). Res. XXII Reunião Anual da SBPC, E-72, 117.
- Beçak, M.L. (1968). Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, 21: 191-208.
- Bogart, J.P. (1968). Chromosome number difference in the amphibian genus *Bufo*: the *Bufo regularis* species group. *Evolution*, 22: 42-45.
- Bogart, J.P. (1991). The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In: *Amphibians Cytogenetics and Evolution*, edited by Green, D.M & Sessions, S.K. Academic Press, San Diego pp. 233-258.
- Bokermann, W.C.A. (1966). Lista anotada das localidades tipo de anfíbios brasileiros, Impresso pelo Serviço de Documentação, RUSP, São Paulo, Brasil. p. 79-80, 87-88.
- Brum-Zorrilla, N. & Saez, F.A. (1968). Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibian, Anura). *Experientia*, 24: 969.
- Busin, C.S., Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S.M. (2001). Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica*, 110: 131-141.
- Busin, C.S., Lima A.P., Prado C.P.A., Strüssmann C., Siqueira-Jr & S. Recco-Pimentel, S.M. (2006). Chromosomal differentiation of population of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). *Micron*, 37: 355-362
- Cannatella, D.C. & Duellman, W.E. (1984). Leptodactylid frogs of the genus *Physalaemus postulosus* group. *Copeia*, 4: 902-921.

- Comings, D.E., Avelino, E., Okada, T.A. & Wyandt, H.E. (1973). The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 77: 469-493.
- Duelman, W.E. & Trueb, L. (1986). Cytogenetics, molecular and genomic evolution. In: *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Duelman, W.E. & Rodríguez, L.O. (1994). Guide to the frogs of Iquitos region, Amazonian Peru. University of Kansas Printing Service, Lawrence, Kansas.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M. & Wheeler, W.C. (2006). The Amphibian tree of life. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 297: 1-370.
- Frost, D.R. Amphibian species of the world: an online reference. V5.2 (15 July, 2008). Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Foote, D.L., Wiley, J.E., Little, M.L. & Meybe, J. (1991). Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. *Cytogen. Cell Genet.*, 57: 196-199.
- Goodpasture, C. & Bloom S.E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53: 37-50.
- Grant, T., Frost, D.R., Caldwell, J.P., Gagliardo, R., Haddad, C.F.B., Kok, P.J.R., Means, D.B., Noonan, B.P., Schargel, W.E. & Wheeler, W.C. (2006). Phylogenetic systematics of dart poison frogs and their relatives (Amphibia, Athesphatanura, Dendrobatidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 299: 1-262.

- Green, M.D. & Sessions, S.K. (1991). Nomenclature for chromosomes. In: Green, M.D. & Session, S.K. (eds.), *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic, San Diego, USA. pp. 431-432.
- Grewal, S.I.S & Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.*, 8:35-46.
- Gruber, S.L., Haddad C.F.B. & Kasahara, S. (2007). Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n=24$ to $2n=22$ in the genus. *Genetica*, 130: 281-291.
- Haddad, C.F.B. & Cardoso, A.J. (1987). Taxonomia de três espécies de *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae). *Papéis Avulsos Zoologia*, São Paulo, 36: 287-300.
- Heyer, W.R. (1975). A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog Family Leptodactylidae. *Smithsonian Contr. Zool.*, 199: 1-55.
- Hilliker, A.J., Appell, R & Scharlet, A. (1980). The genetic analysis of *D. melanogaster* heterochromatin. *Cell*, 21: 607-619.
- Howell, W.M., Denton, T.E. & Diamond, J.R. (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosome. *Experientia*, 31: 260-266.
- Howell, W.M. (1977). Visualization of ribosomal gene activity. Silver staining proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62: 361-367.
- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- John, B. (1988). The biology of heterochromatin. In: *Heterochromatin: molecular and structural aspects*. 1st ed. Vol. 1 (ed. Verma, RS) Cambridge University Press, New York, 147 p.

- Kasahara, S., Zampieri, A. P., Bruber, S. L. & Haddad, C. F. B. (2003). Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. *Cytogenetic and Genome Res.*, 103: 155-162.
- King, M. (1980). C-banding studies in Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma*, 80: 191-207.
- King, M., Contreras, S.N., & Honeycutt, R.L. (1990). Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. *Genetica*, 80: 17-29.
- King, M. (1991). The evolution of the heterocromatin in amphibian genome. In: Green, D.M. & Sessions, S.K. (eds.), *Anphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego. pp. 359-391.
- Lobo, F. (1992). Distribución y lista de localidades de *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae) en la República Argentina. *Cuad. Herp.*, 7: 30-37.
- Lobo, F. (1993). Lista Bibliografica comentada de *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae) hasta junio de 1991. *Acta Zool. Lilloana* XLII, 2.
- Lobo, F. (1994). Descripción de una nueva especie de *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae), redescipción de *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) y *Pseudopaludicola saltica* (Coope, 1887) y osteologia de las tres especies. *Cuad. Herp.*, 8: 231-232.
- Lobo, F. (1995). Analisis filogenéticos del género *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae). *Cuad. Herp.*, 9: 21-43.

- Lobo, F. (1996). Evaluación del status taxonómico de *Pseudopaludicola ternetzi* (Mirando Ribeiro, 1937) y *Pseudopaludicola mystacalis* (Cope, 1887). Osteologia y distribución de las dos especies. *Acta Zool. Lilloana*, 43: 327-346.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1998). Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chrom. Res.*, 6: 621-628.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1999). Two karyotypes and heteromorphic sex chromosome in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). *Can. J. Zool.*, 77: 624-631.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C.A. & Recco-Pimentel, S. M. (2000). Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic comment. *Hereditas*, 133: 201-210.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2003a). Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* and new insight into the relationship with *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae). *Ital. J. Zool.*, 70: 183-190.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003b). Cytogenetics of a new species of the *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura, Leptodactylidae) with the description of an apparent case of pericentric inversion. *Amphibia-Reptilia*, 24(1): 47-55.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003c). Restriction fragment analysis of the ribosomal DNA of *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* species (Anura, Leptodactylidae). *Genet. Mol. Biol.*, 26(2): 139-143.
- Lourenço, L.B., Bacci-Júnior, M., Martins, V.G., Recco-Pimentel, S.M. & Haddad, C.F.B. (2008). Molecular phylogeny and karyotypic differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132: 255-266.

- Lynch, J.D. (1971). Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactyloid frogs. *Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas Misc. Publ.*, 69: 1-238.
- Lynch, J.D. (1989). A review of the leptodactylid frogs of the genus *Pseudopaludicola* in northern South America. *Copeia*, 3: 577-588.
- Matsui, S.I. & Sasaki, M. (1973). Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. *Nature*, 246: 148-150.
- Medeiros, L.R., Rossa-Feres, D.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2006). B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). *Genet. Mol. Biol.*, 29: 257-262.
- Mello, M.L.S. (2007) Nucléolo. In: Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. A célula. Ed. Manole, São Paulo, pp. 144-153.
- Miller, O.L. (1981). The nucleolus, chromosome and visualization of genetic activity. *J. Cell. Biol.*, 91: 15-17.
- Milstead, W.W. (1963). Notes on Brazilian frogs of the genera *Physalaemus* and *Pseudopaludicola*. *Copeia*, 3: 565-566.
- Miranda-Ribeiro, A. (1926). Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) brasileiros. *Arch. Mus. Nac. Rio de Janeiro.*, Tomo I., 27: 1-227.
- Miura, I. (1994). Sex chromosome differentiations 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. Sci.*, 11: 807-815.

- Miura, I.; Nishioka, M.; Borkin, L.J. & Wu, Z. (1995) The origin of the brown frogs with $2n = 24$ chromosomes. *Experientia* 51: 179-188.
- Odierna, G., Vences, M., Aprea, G. (2001). Chromosome data for Malagasy poison frogs (Amphibia, Ranidae, *Mantella*) and their bearing on taxonomy and phylogeny, *Zool. Sci.*, 18: 505-514.
- Olert, J. (1979). Interphase studies with simplified methods of silver staining of nucleoli. *Experientia*, 35: 283-385.
- Pardue, M.L. & Gall, J.G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168: 1353-1358.
- Pardue, M.L. & Henning, W. (1990). Heterochromatin: junk or collector's item? *Chromosoma*, 100: 3-7.
- Parker, H.W. (1927). A revision of the frogs of the genera *Pseudopaludicola*, *Physalaemus*, and *Pleurodema*. *An. Magazine Nat. Hist.*, 9: 450-478.
- Pough, F.H., Janis C.M e Heiser J.B. (2002). *Vertebrate Life*,. Prentice Hall Upper Saddle River, Sixth Ed.
- Rabello, M.N. (1969). Chromosomal studies in Brazilian anurans. *Caryologia*, 23, 1: 45-59.
- Rabello, M.N. & Beçak, M.L. (1970). Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. *Arq. Mus. Nac.*, 285-286.
- Raber, S.C., Carvalho, K.A., Garcia, P.C., Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S.M. (2004). Chromosomal characterization of *H. bischoffi bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). *Phyllomedusa*, 3: 43-49.

- Romer, A.S. & Parson, T.S. (1985). Quem é quem entre os vertebrados. In: Anatomia Comparada dos Vertebrados, Atheneu Ed., São Paulo, pp. 29-80.
- Rosa, C., Aguiar-Jr, O., Giaretta, A.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2003) Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B chromosome in a leptodactylid frog. *Copeia*, 1: 166-174.
- Roussel, P., André, C., Comai, L. & Hernandez-Verdun, D. (1996). The rDNA transcription machinery is assembled during mitose in active NORs and absent in inactive NORs. *J. Cell. Biol.*, 133: 235-246.
- Saez, F.A. & Brum, N. (1960). Chromosomes of South American amphibians. *Nature*, 185: 945.
- Schulz-Schaeffer, J. (1980). Cytogenetics, plants, animals, humans, 1st ed., Vol. 1, Springer-Verlag, New York, 444 p.
- Schmid, M. (1978a). Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388.
- Schmid, M. (1978b). Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma*, 68: 131-148.
- Schmid, M. (1982). Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, 87: 327-344.
- Schmid, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Chromosoma*, 80: 69-96.

- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F. & Leon, P. (1995). Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 69: 18-26.
- Schwarzacher, H.G., Mikelsaer, A. V., Schnedl, W. (1978). The nature of Ag-staining of nucleolus organizer region. Electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis e meiosis. *Cytogenet, Cell Genet.* 20: 24-39.
- Schwarzacher, H.G. & Wachtler, F. (1993). The nucleolus. *Anat. Embryol.*, 188: 515-536.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B. & Kasahara, S. (1999). Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence oh a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas*, 131: 135-141.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Galassi, G.G. & Kasahara, S. (2006). Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica*, 127: 35-44.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 83: 438-442.
- Sumner, A.T. (1990). C-banding and related methods. In: Chromosome banding. Unwin Hyman E., London, pp. 39-69.
- Veiga-Menoncello, A.C.P., Lima, A.P. & Recco-Pimentel, S.M. (2003a). Cytogenetic analysis of four Central Amazonian species of *Colostethus* (Anura, Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas*, 139: 189-198.

- Veiga-Menoncello, A.C.P., Lima, A.P. & Recco-Pimentel, S.M. (2003b). Cytogenetics of two central Amazonian species of *Colostethus* (Anura, Dendrobatidae) with nidicolous tadpoles. *Caryologia*, 56(3): 253-260.
- Veiga-Menoncello, A.C.P., Strüssmann, C., Lima, A.P. & Recco-Pimentel, S.M. (2006). Chromosomal study of *Colostethus brunneus* from the type locality and two related species (Anura, Dendrobatidae). *Genetica*, 126: 179-187.
- Wiley, J.E., Little, M.L., Romano, M.A., Blount, D.A. & Cline, G. R., (1989). Polymorphism in the locations of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. *Chromosoma*, 97: 481-487.

4. ARTIGO I

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES
DE *Pseudopaludicola* (ANURA – LEIUPERIDAE), COM COMENTÁRIOS
TAXONÔMICOS**

Eduardo R. Fávero¹, Ana C. P. Veiga-Menoncello¹, Christine Strüssmann², Ariovaldo A. Giaretta³, Denise C. Rossa-Feres⁴, Gilda V. de Andrade⁵, Patrick Colombo⁶, Shirlei M. Recco-Pimentel^{1*}

^{1*}Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil

²Departamento de Ciências Básicas e Produção Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 78060-900 Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

³Departamento de Biociências, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 38400-902 Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

⁴Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

⁵Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Biologia, 65085-580 São Luis, Maranhão, Brasil

⁶Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 90690-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Palavras-Chave: *Pseudopaludicola*, Cariótipo, Ag-NOR, Banda C

Título Resumido: Caracterização cromossômica de *Pseudopaludicola*

* - Autor para correspondência, e-mail: shirlei@unicamp.br

RESUMO

Com o intuito de caracterizar citogeneticamente espécies do gênero *Pseudopaludicola* e contribuir com a sistemática do grupo, foram estudados topotipos de *Pseudopaludicola falcipes*, *P. ameghini* (*sensu* Cope – 1887) e *P. mystacalis*, além de exemplares de *P. ternetzi* e de populações denominadas *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*, *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* e *Pseudopaludicola* sp. As preparações cromossômicas foram submetidas à coloração com Giemsa, bandamento C e impregnação pela prata (AgNOR), o que permitiu revelar uma variação interespecífica quanto ao número de cromossomos, localização da NOR e padrão de distribuição de heterocromatina. *Pseudopaludicola falcipes* apresentou um cariótipo com $2n=22$ cromossomos, enquanto *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) e *P. ternetzi* apresentaram $2n=20$ e *P. mystacalis* $2n=16$ cromossomos. Os espécimes das populações de *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*, *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* e *Pseudopaludicola* sp., compartilharam o mesmo número de cromossomos de *P. mystacalis* ($2n=16$). Porém, apesar da grande similaridade morfológica entre as espécies, foi encontrado também nas populações de *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* de Icém (SP) e *Pseudopaludicola* sp. de Poconé (MT), indivíduos com $2n=20$ e $2n=22$ cromossomos respectivamente, indicando ocorrência em simpatria de diferentes táxons. A presença de $2n=20$ em *P. ameghini* e de $2n=16$ em *P. mystacalis*, indica claramente a existência de duas unidades taxonômicas distintas. Adicionalmente, os espécimes tidos como *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* e como *Pseudopaludicola* sp., mostraram-se citogeneticamente relacionados à *P. mystacalis* e não à *P. falcipes* que possui cariótipo com $2n=22$ cromossomos. Desta forma, os nossos dados sugerem a retirada de *P. ameghini* da sinonímia de *P. mystacalis*, define *P. falcipes* com cariótipo $2n=22$ e reforçam a necessidade de uma revisão taxonômica no gênero *Pseudopaludicola*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Pseudopaludicola* Miranda Ribeiro (1926), pertencente à família Leiuperidae, é composto por animais que geralmente não ultrapassam 20 mm de comprimento, muito semelhantes entre si e com coloração policromática (Haddad & Cardoso, 1987). Os seus representantes encontram-se amplamente distribuídos pela América do Sul, da Colômbia à Argentina, passando pelas Guianas e Suriname (Lobo 1992). De acordo com Frost (2008), o gênero *Pseudopaludicola* é constituído por 12 espécies: *P. boliviana*, *P. canga*, *P. ceratophryes*, *P. falcipes*, *P. llanera*, *P. mineira*, *P. mirandae*, *P. mystacalis*, *P. pusilla*, *P. riopiedadensis*, *P. saltica* e *P. ternetzi*, com relatos de ocorrência de oito delas no Brasil.

Alguns estudos baseados em dados morfológicos sugerem uma proximidade de *Pseudopaludicola* com os gêneros *Physalaemus*, *Pleurodema* ou *Edalorhina* (Lynch, 1971; Heyer, 1974, 1975; Cannatella & Duellman, 1984). Por outro lado, os recentes estudos filogenéticos moleculares (Frost *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006) mostram-se contraditórios, quanto à identificação do grupo-irmão de *Pseudopaludicola*, o que demonstra a necessidade de mais estudos envolvendo representantes desse gênero.

A estrutura taxonômica desse gênero tem historicamente sofrido diversas mudanças. Milstead (1963) considerou *Pseudopaludicola ameghini*, reconhecida por Parker, 1927, e conhecida somente em sua localidade-tipo (Chapada dos Guimarães, estado do Mato Grosso - Brasil), *P. mystacalis* e *P. saltica*, como sinônimos de *P. falcipes*. Porém, Bokermann (1966; *apud* Lynch, 1989), reconheceu essas quatro espécies no oeste e sudeste do Brasil e sinonimizou *P. ternetzi* a *P. ameghini*. Lynch (1971), no entanto, considerou como válidas as cinco espécies, *P. ameghini*, *P. falcipes*, *P. mystacalis*, *P. saltica* e *P. ternetzi*, sem fornecer evidências para a retirada de *P. ternetzi* da sinonímia de *P. ameghini*. Posteriormente, Haddad e Cardoso (1987), realizaram análises bioacústica e morfométrica das formas encontradas na Chapada dos Guimarães e colocaram *P. ameghini* na sinonímia de *P. mystacalis* e consideraram para aquela localidade somente *P. saltica* e *P. mystacalis* como espécies válidas. Lobo (1996) corroborou a proposta de sinonimização de *P. ameghini* a *P. mystacalis* (Haddad e Cardoso, 1987) validando as espécies *P. mystacalis* e *P. ternetzi*. Recentemente, Strüssmann (2003), com base também em análise morfológica e bioacústica, contestou os argumentos utilizados por Haddad e Cardoso (1987) e Lobo (1996) e sugeriu a revalidação de *P. ameghini* (*sensu* Cope,

1887), uma vez que três unidades taxonômicas distintas são reportadas para a Chapada dos Guimarães. De acordo com C. Strüssmann (informação pessoal), a revalidação de *P. ameghini* poderá resultar na sinonimização de *P. ternetzi* a *P. ameghini* em concordância com a proposta Bokermann (1966).

De modo geral, existem poucas informações citogenéticas para o gênero *Pseudopaludicola* e, em sua maioria, se restringem à determinação do número e análise do cariótipo por método de coloração convencional. Porém, os dados presentes na literatura são conflitantes. Beçak (1968) analisando populações provenientes do município de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil, descreveu o cariótipo de *P. falcipes* com $2n=18$ e de *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) com $2n=20$ cromossomos. Porém, Batistic *et al.* (1969, 1970) e Batistic (1970) encontraram configurações cariotípicas distintas para *P. falcipes*, com variações de $2n=16$ até 20 cromossomos nas populações dos estados de São Paulo e Minas Gerais, de $2n=16$ e 20 em populações do estado do Mato Grosso e de $n=11$ para uma população do estado da Bahia, onde somente células em meiose foram analisadas. Por outro lado, os estudos realizados com populações de *P. falcipes* do extremo sul da América do Sul (Saez & Brum, 1960; Brum-Zoriilla & Saez, 1968) revelaram somente a presença de 22 cromossomos.

Uma vez que os dados citogenéticos têm se mostrado úteis na distinção de espécies morfologicamente semelhantes (por exemplo, Medeiros *et al.*, 2003; Veiga-Menoncello *et al.*, 2006) neste trabalho, caracterizamos citogeneticamente as espécies *P. falcipes*, *P. ameghini* (*sensu* Cope 1887) e *P. mystacalis*, provenientes de suas localidades-tipo, além de *P. ternetzi* e de oito diferentes populações morfologicamente semelhantes a *P. falcipes* e a *P. mystacalis* e duas *Pseudopaludicola* sp., objetivando esclarecer possíveis equívocos de identificação, além de contribuir para um melhor entendimento da sistemática de *Pseudopaludicola*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes:

Todos os espécimes estudados, bem como as localidades de coleta e os números de registro dos testemunhos depositados em museus, estão listados na Tabela 1. O mapa da figura 1 indica a localização geográfica dos espécimes analisados.

Todas as coletas foram realizadas com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Proc. nº 02001.002003/2005-16).

Preparações cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas de suspensões celulares de epitélio intestinal e de testículo de animais previamente tratados com colchicina a 2% por no mínimo 5 horas, segundo a técnica de King e Rofe (1976) e Schmid (1978 a).

As metáfases foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato pH 6,8 por 10 minutos ou submetidas às técnicas de impregnação pela prata (Ag-NOR) segundo Howell e Black (1980) e bandamento C de acordo com Sumner (1972), com pequenas modificações no pré-tratamento, onde o material foi previamente tratado com ácido acético 50% por 30 minutos (seguindo Siqueira *et al.* in prep.), lavado repetidamente em água destilada e em seguida, tratado com ácido clorídrico, sendo que nos intervalos dos tratamentos deixado secar à temperatura ambiente. A etapa de incubação em hidróxido de bário foi realizada à temperatura de 60°C por 13 segundos e em SSC à temperatura de 60°C por 15 minutos.

Tabela 1: Espécies, locais de coleta dos espécimes, número de indivíduos analisados e número de registro do ZUEC = Museu de Zoologia “Prof. Adão José Cardoso”, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil e do DZSJRP = Coleção de Vertebrados do Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

*- Entre os indivíduos de Icém, SP e Poconé, MT, havia dois cariótipos distintos.

Espécie	Localidades	Números de indivíduos	Número de registro de Museu
<i>P. falcipes</i>	Porto Alegre (RS) (-30°00'59"S/51°06'07"O)	4♂ / 2♀	ZUEC: 14.008 14.009, 14.022 14.023, 14.162, 14.163
<i>P. ameghini</i> (sensu Cope 1887)	Chapada dos Guimarães (MT) (15°27'38"/55°44'59")	2♂ / 1♀	ZUEC: 14.138, 14.139, 14.140
	Vila Bela da Santíssima Trindade (MT) (-15°00'29"S/59°57'02"O)	5♂	ZUEC: 13.923, 13.924, 13.925, 13.926, 14.146
<i>P. mystacalis</i>	Cuiabá (MT) (-15°35'46"S/56°05'48"O)	5♂ / 1♀	ZUEC: 14.149, 14.150, 14.141, 14.142, 14.153, 14.157
	Uberlândia (MG) (-18°55'07"S/48°16'38"O)	6♂ / 2♀	ZUEC: 230.1, 13.876, 13.878, 13.879, 13.880, 13.881 13.882, 13.883
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> I	Santa Fé do Sul (SP) (-20°12'40"S/50°55'33"O)	5♂	DZSJRP: 8694, 8695, 8696, 8705, 8710
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> II	Vitória Brasil (SP) (-20°11'48"S/50°29'04"O)	4♂ / 6♀	ZUEC: 13.894, 13.895, 13.896, 13.898, 13.900, 13.904, 13.905, 13.906, 13.907, 13.908
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> III	Icém (SP) (-20°20'30"S/49°11'42"O)	4♂ / 1♀	DZSJRP: 6438, 6441, 6448, 6452, 8720
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> IV	Palestina (SP) (-20°23'24"S/49°25'59"O)	1♂	ZUEC: 13.912
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>mystacalis</i> I	*Icém (SP) (-20°20'30"S/49°11'42"O)	2♂	DZSJRP: 6456, 6457
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>mystacalis</i> II	*Icém (SP) (-20°20'30"S/49°11'42"O)	2♂	DZSJRP: 8723, 8724
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>mystacalis</i> III	Barreirinhas (MA) (02°38'11"S/42°41'26"O)	4♂ / 2♀	ZUEC: 13.842, 13.843, 13.844, 13.845, 13.846, 13.849
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>mystacalis</i> IV	Urbano Santos (MA) (03°12'28"S/43°09'12"O)	4♂ / 2♀	ZUEC: 13.868, 13.869, 13.870, 13.871, 13.916, 13.915
<i>P. ternetzi</i>	Uberlândia (MG) (-18°55'07"S/48°16'38"O)	2♂ / 1♀	ZUEC: 14.170, 14.171, 14.172
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 1	*Poconé (MT) (-16°15'24"S/56°37'22"O)	2♀ / 4♂	ZUEC: 13.929, 13.930, 13.931, 13.932, 13.933, 13.934
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 2	*Poconé (MT) (-16°15'24"S/56°37'22"O)	1♀ / 2♂	ZUEC: 13.935, 13.936, 13.937
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 3	Santa Terezinha (MT) (-10°28'11"S/50°30'11"O)	1♂	ZUEC: 13.805

RESULTADOS

Os dados obtidos encontram-se resumidos na tabela 2. Para descrição dos cariótipos, as espécies foram agrupadas de acordo com o número de cromossomos.

***Pseudopaludicola falcipes* (Porto Alegre, RS) e *Pseudopaludicola* sp. 1 (Poconé, MT):**

Os cariótipos apresentaram $2n=22$ cromossomos, muito semelhantes, sendo os pares 1-3, 5, 6, 9-11 metacêntricos, 4 e 7 submetacêntricos e o par 8 subtelocêntrico (Figs. 2A e 3A). A NOR em *P. falcipes* foi localizada na região pericentromérica do braço longo do par 8 (Fig. 4A) e em *Pseudopaludicola* sp. 1, na região intestinal no braço longo do mesmo par (Fig. 5A). Em todos os indivíduos de *P. falcipes* foi observado um grande heteromorfismo de tamanho da NOR entre os homólogos desse par. Este fato não foi observado em *Pseudopaludicola* sp. 1, que apresentou o par e a NOR homomórfica. Ambas as espécies apresentaram blocos de heterocromatina em todos os centrômeros. Em *P. falcipes* foram observadas regiões ricas em heterocromatina nas porções pericentroméricas do par 3, fortemente marcada no braço curto e mais fraca no braço longo e também marcações heterocromáticas na região pericentromérica do braço longo do par 8 coincidente com a NOR. Já em *Pseudopaludicola* sp. 1, regiões ricas em heterocromatina foram detectadas nas regiões pericentroméricas do braço curto do par 1, 7 e 9 e no braço longo do par 2. Já no par 8, banda C na região intestinal, adjacente a NOR (Figs. 6A e 7A).

***Pseudopaludicola ameghini* (sensu Cope 1887) (Chapada dos Guimarães e Vila Bela da S. Trindade, MT), *P. ternetzi* (Uberlândia, MG), *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I (Icém, SP):**

Essas espécies apresentaram $2n=20$ cromossomos. Os cariótipos de *Pseudopaludicola ameghini* das duas localidades foram constituídos por cromossomos metacêntricos (pares 1, 2, 6 e 8), submetacêntricos (pares 3-5, 9 e 10) e subtelocêntrico (par 7), enquanto *P. ternetzi* diferiu apenas na morfologia do par 7, classificado como submetacêntrico (Fig. 2B-D). *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I de Icém apresentou cariótipo semelhante à *P. ameghini* e a *P. ternetzi*, porém o par 7 foi classificado como metacêntrico (Fig. 3B). A NOR foi localizada na região telomérica do braço longo do cromossomo 9 em *P. ameghini* e em *P. ternetzi* (Fig.

4B-D). Bandas centroméricas foram detectadas em todos os cromossomos. Em *P. ameghini*, bandas pericentroméricas foram detectadas nos braços curtos dos pares 1 e 2 e nos braços longos dos pares 3, 4 e 5, enquanto *P. ternetzi* apresentou marcação pericentromérica nos braços curtos dos pares 1 e 2 e nos braços longos dos pares 1, 2 e 3, além de uma porção heterocromática na região telomérica do par 4 (Fig. 6B-D). As técnicas de bandamento C e impregnação pela prata não foram ainda realizadas para *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I.

***Pseudopaludicola mystacalis* (Cuiabá, MT e Uberlândia, MG), *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* II, III e IV (Icém, SP; Barreirinhas, MA; Urbano Santos, MA), *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* (Santa Fé do Sul, Palestina, Icém e Vitória Brasil, SP), *Pseudopaludicola* sp. 2 e sp. 3 (Poconé, MT; Santa Terezinha, MT):**

Pseudopaludicola mystacalis e todas as populações apresentaram cariótipos com $2n=16$ cromossomos, formado por pares metacêntricos (1-3 e 6) e submetacêntricos (4, 5, 7 e 8) (Figs. 2E-F e 3C-K). No entanto, alguns indivíduos das populações da região noroeste do estado de São Paulo, do Maranhão, do Mato Grosso e inclusive de *P. mystacalis*, apresentaram o par 4 heteromórfico, sendo o morfo menor classificado como submetacêntrico e o maior como metacêntrico (Fig. 2 E-F e 3 C-E G, I e K), entretanto, esta característica não está relacionada ao sexo. A NOR foi localizada na região pericentromérica do braço curto do par 4 em todos os exemplares (Figs. 4E-F e 5B-F). Além de marcações centroméricas em todos os cromossomos, bandas C pericentroméricas foram detectadas no braço curto do par 1 e no braço longo do par 2 em todas as populações estudadas (Figs 6E-F e 7B-F). Essa técnica não foi ainda realizada para a população de *P. aff. mystacalis* II de Icém. Os indivíduos das populações de Vitória Brasil (SP) e Santa Terezinha (MT) que apresentaram o par 4 heteromórfico, exibiram também bandas heteromórficas intersticiais no braço curto do par 4 (Fig. 7B e 7F). As técnicas de impregnação pela prata e bandamento C não foram realizadas na população de *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* II por falta de material.

Tabela 2. Análise morfométrica dos cromossomos e classificação centromérica de acordo com valores propostos por Green & Sessions (1991). Os asteriscos indicam, o par e o braço cromossômico, portador da NOR. Em TR: tamanho relativo; RB: razão de braço; CC: classificação cromossômica; M: metacêntrico; SM: submetacêntrico; ST: subtelocêntrico; p: braço curto; q: braço longo.

CROMOSSOMOS													
	1	2	3	4	4'	5	6	7	8	8'	9	10	11
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	Porto Alegre (RS)												
RB	1,204	1,170	1,476	2,100		1,13	1,069	2,111	3,674	3,612	1,050	1,099	1,205
CC	M	M	M	SM		M	M	SM	*ST(q)	*ST(q)	M	M	M
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 1	Poconé (MT)												
RB	1,080	1,136	1,558	1,978		1,197	1,110	1,675	3,732		1,273	1,310	1,477
CC	M	M	M	SM		M	M	SM	*ST(q)		M	M	M
<i>Pseudopaludicola ameghini</i> (sensu, Cope 1887)	Chapada dos Guimarães (MT)												
RB	1,032	1,097	2,106	2,142		2,243	1,144	3,869	1,155		2,209	2,178	
CC	M	M	SM	SM		SM	M	ST	M		*SM(q)	SM	
<i>Pseudopaludicola ameghini</i> (sensu, Cope 1887)	Vila Bela da Santíssima Trindade (MT)												
RB	1,184	1,219	2,771	2,361		2,161	1,115	4,178	1,102		2,356	2,439	
CC	M	M	SM	SM		SM	M	ST	M		*SM(q)	SM	
<i>Pseudopaludicola ternetzi</i>	Uberlândia (MG)												
RB	1,152	1,163	2,333	2,230		2,244	1,027	2,044	1,033		1,967	2,000	-
CC	M	M	SM	SM		SM	M	SM	M		*SM(q)	SM	-
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>mystacalis</i> I	Icém (SP)												
RB	1,1591	1,2105	2,272	2,150		1,818	1,214	1,071	1,083		2,000	2,125	-
CC	M	M	SM	SM		SM	M	M	M		SM	SM	-
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Cuiabá (MT)												
RB	1,057	1,054	1,473	2,134	1,634	1,900	1,120	1,974	2,336				
CC	M	M	M	*SM(p)	*M(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i>	Uberlândia (MG)												
RB	1,061	1,065	1,522	2,333	1,646	2,023	1,065	2,115	2,037				
CC	M	M	M	*SM(p)	*M(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> I	Santa Fé do Sul (SP)												
RB	1,075	1,083	1,375	2,213	1,845	1,977	1,090	2,017	2,042				
CC	M	M	M	*SM(p)	*SM(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> II	Vitória Brasil (SP)												
RB	1,068	1,096	1,405	2,214	1,894	1,914	1,129	1,950	2,103				
CC	M	M	M	*SM(p)	*SM(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> III	Icém (SP)												
RB	1,104	1,090	1,405	2,041	1,586	1,946	1,242	1,843	2,069				
CC	M	M	M	*SM(p)	*M(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> IV	Palestina (SP)												
RB	1,375	1,227	1,382	2,000	1,857	2,150	1,076	2,125	2,166				
CC	M	M	M	*SM(p)	*SM(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>mystacalis</i> II	Icém (SP)												
RB	1,033	1,088	1,404	2,050	1,566	1,930	1,095	1,983	2,069				
CC	M	M	M	*SM(p)	*M(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>mystacalis</i> III	Barreirinhas (MA)												
RB	1,115	1,089	1,392	2,053	1,794	1,827	1,116	1,932	1,898				
CC	M	M	M	*SM(p)	*SM(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>mystacalis</i> IV	Urbano Santos (MA)												
RB	1,096	1,055	1,284	1,694	1,651	1,897	1,114	1,827	2,160				
CC	M	M	M	*SM(p)	*M(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 2	Poconé (MT)												
RB	1,070	1,065	1,370	2,00	1,682	2,036	1,075	1,920	2,171				
CC	M	M	M	*SM(p)	*SM(p)	SM	M	SM	SM				
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 3	Santa Terezinha (MT)												
RB	1,025	1,084	1,451	1,979	1,644	2,125	1,078	1,939	2,018				
CC	M	M	M	*SM(p)	*M(p)	SM	M	SM	SM				

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 – Mapa do Brasil mostrando as localidades de coleta dos espécimes das populações e espécies estudadas.

Figura 2 – Cariótipos submetidos à coloração com Giemsa. **A:** *Pseudopaludicola falcipes* de Porto Alegre (RS); **B:** *P. ameghini* da Chapada dos Guimarães (MT); **C:** *P. ameghini* de Vila Bela da Santíssima Trindade (MT); **D:** *P. ternetzi* de Uberlândia (MG); **E:** *P. mystacalis* de Cuiabá (MT); **F:** *P. mystacalis* de Uberlândia (MG). Em *Pseudopaludicola falcipes*, a seta aponta o par 8 heteromórfico, com uma evidente constrição secundária. Já no destaque em preto, *P. mystacalis* apresentando o par 4 heteromórfico (4 4'). Barra = 5µm.

Figura 3 – Cariótipos submetidos à coloração com Giemsa. **A:** *Pseudopaludicola* sp.1 de Poconé (MT); **B:** *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I de Icém (SP); **C:** *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* I Santa Fé do Sul (SP); **D:** *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* II Vitória Brasil (SP); **E:** *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* III Icém (SP); **F:** *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* IV Palestina (SP); **G:** *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* II de Icém (SP); **H:** *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* III de Barreirinhas (MA); **I:** *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* IV de Urbano Santos (MA); **J:** *Pseudopaludicola* sp.2 de Poconé (MT); **K:** *Pseudopaludicola* sp.3 de Sta. Terezinha (MT). Em *Pseudopaludicola* sp.1, a seta evidencia o par 8 homomórfico, com uma evidente constrição secundária. As espécies *P. aff. falcipes*, *P. aff. mystacalis* e *P. sp.* apresentam no detalhe, o par 4 heteromórfico (4 4'). Barra = 5µm.

Figura 4 – Cariótipos submetidos à impregnação pela prata. **A:** *Pseudopaludicola falcipes* de Porto Alegre (RS); **B:** *P. ameghini* da Chapada dos Guimarães (MT); **C:** *P. ameghini* de Vila Bela da Santíssima Trindade (MT); **D:** *P. ternetzi* de Uberlândia (MG); **E:** *P. mystacalis* de Cuiabá (MT); **F:** *P. mystacalis* de Uberlândia (MG). A seta evidencia os pares que carregam a NOR; repare em *P. falcipes* a NOR heteromórfica. Já no destaque, note o par 4 com heteromorfismo de tamanho em *P. mystacalis* (4 4'). Barra = 5µm.

Figura 5 – Cariótipos submetidos à impregnação pela prata. **A:** *Pseudopaludicola* sp.1 de Poconé (MT); **B:** *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* da região noroeste do estado de São Paulo; **C:** *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* III de Barreirinhas (MA) *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* IV de Urbano Santos (MA); **D:** *Pseudopaludicola* sp.2 de Poconé (MT); **E:** *Pseudopaludicola* sp.3 de Sta. Terezinha (MT). A seta indica os pares portadores da NOR; repare em *Pseudopaludicola* sp.1 a NOR homomórfica. No destaque, note o par 4 com heteromorfismo de tamanho (4 4'). Barra = 5µm.

Figura 6 – Cariótipos submetidos à técnica de bandamento C. **A:** *Pseudopaludicola falcipes* de Porto Alegre (RS); **B:** *P. ameghini* da Chapada dos Guimarães (MT); **C:** *P. ameghini* de Vila Bela da Santíssima Trindade (MT); **D:** *P. ternetzi* de Uberlândia (MG); **E:** *P. mystacalis* de Cuiabá (MT); **F:** *P. mystacalis* de Uberlândia (MG). Em *Pseudopaludicola falcipes*, a seta evidencia o par 8 com uma região heterocromática heteromórfica na região pericentromérica. Barra = 5µm.

Figura 7 – Cariótipos submetidos à técnica de bandamento C. **A:** *Pseudopaludicola* sp.1 de Poconé (MT); **B:** *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* da região noroeste do estado de São Paulo (Santa Fé do Sul, Vitória Brasil, Icém e Palestina); **C:** *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* III de Barreirinhas (MA); **D:** *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* IV de Urbano Santos (MA); **E:** *Pseudopaludicola* sp.2 de Poconé (MT); **F:** *Pseudopaludicola* sp.3 de Sta. Terezinha (MT). Em *Pseudopaludicola* sp.1, a seta evidencia o par 8 com regiões heterocromáticas homomórficas. Note no destaque em preto em *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* de Vitória Brasil e em *Pseudopaludicola* sp.3, de Poconé, a porção heterocromática fortemente marcada na região intersticial no braço curto cromossomo 4' e fracamente marcada na mesma região do par 4. Barra = 5µm.

Figura 1

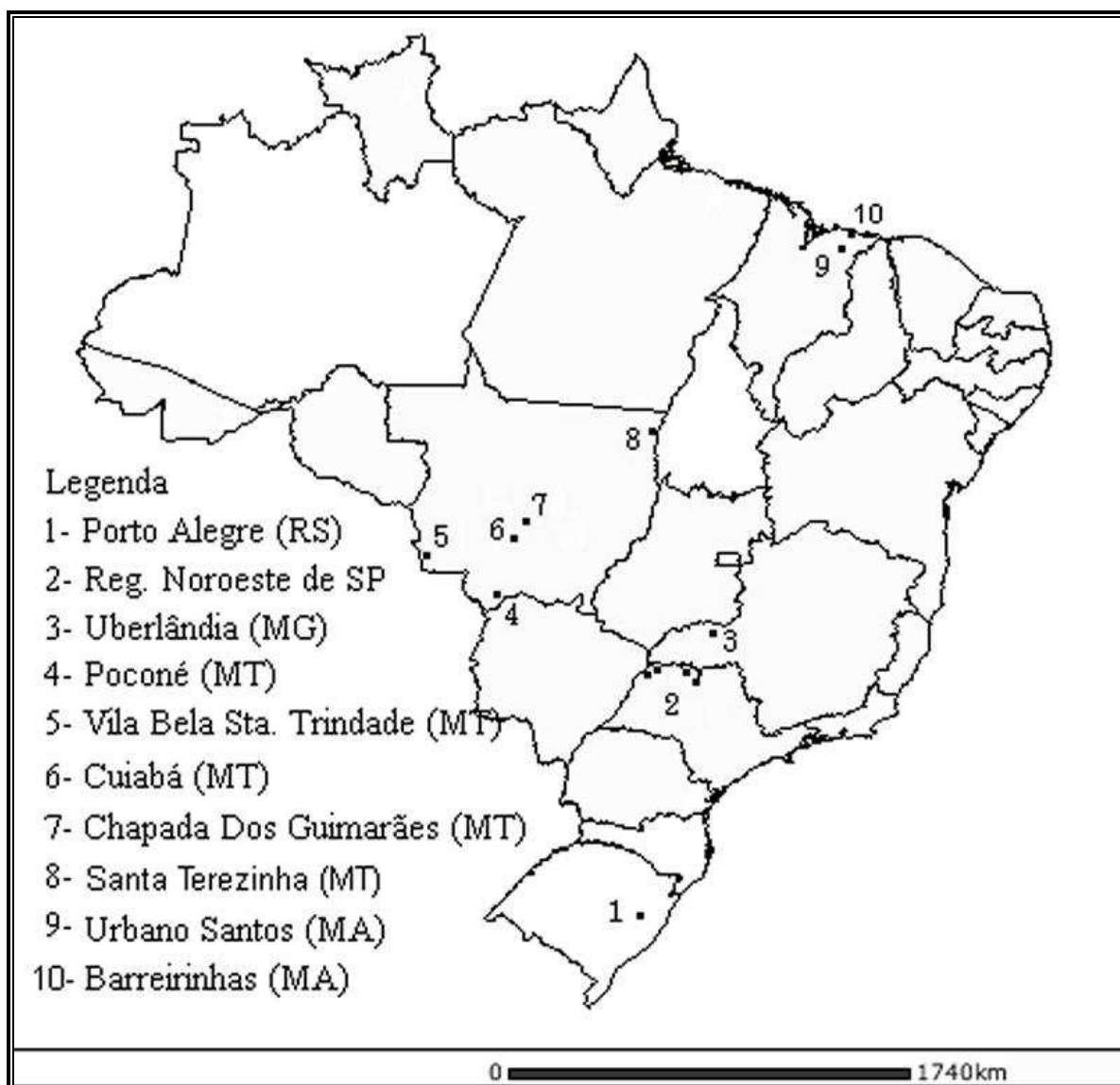


Figura 2

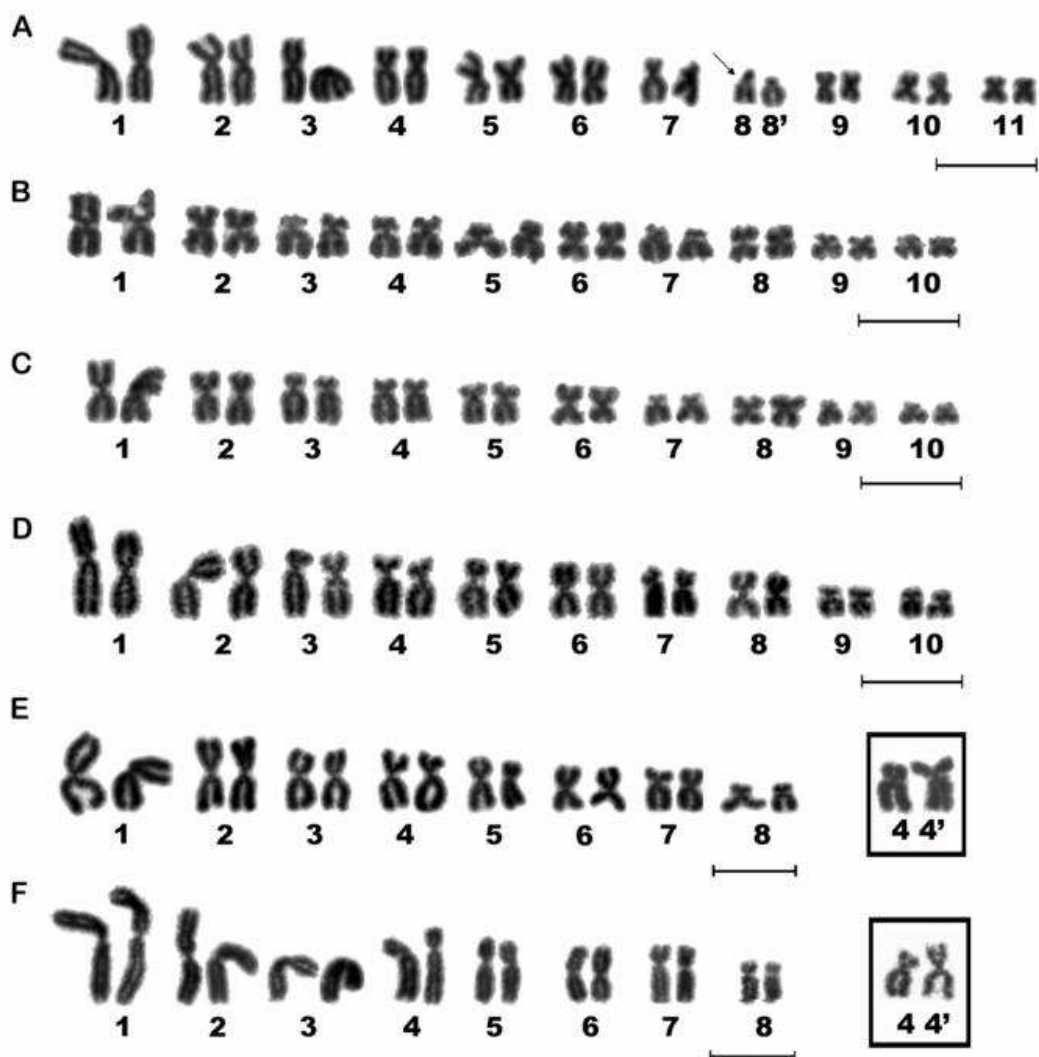


Figura 3

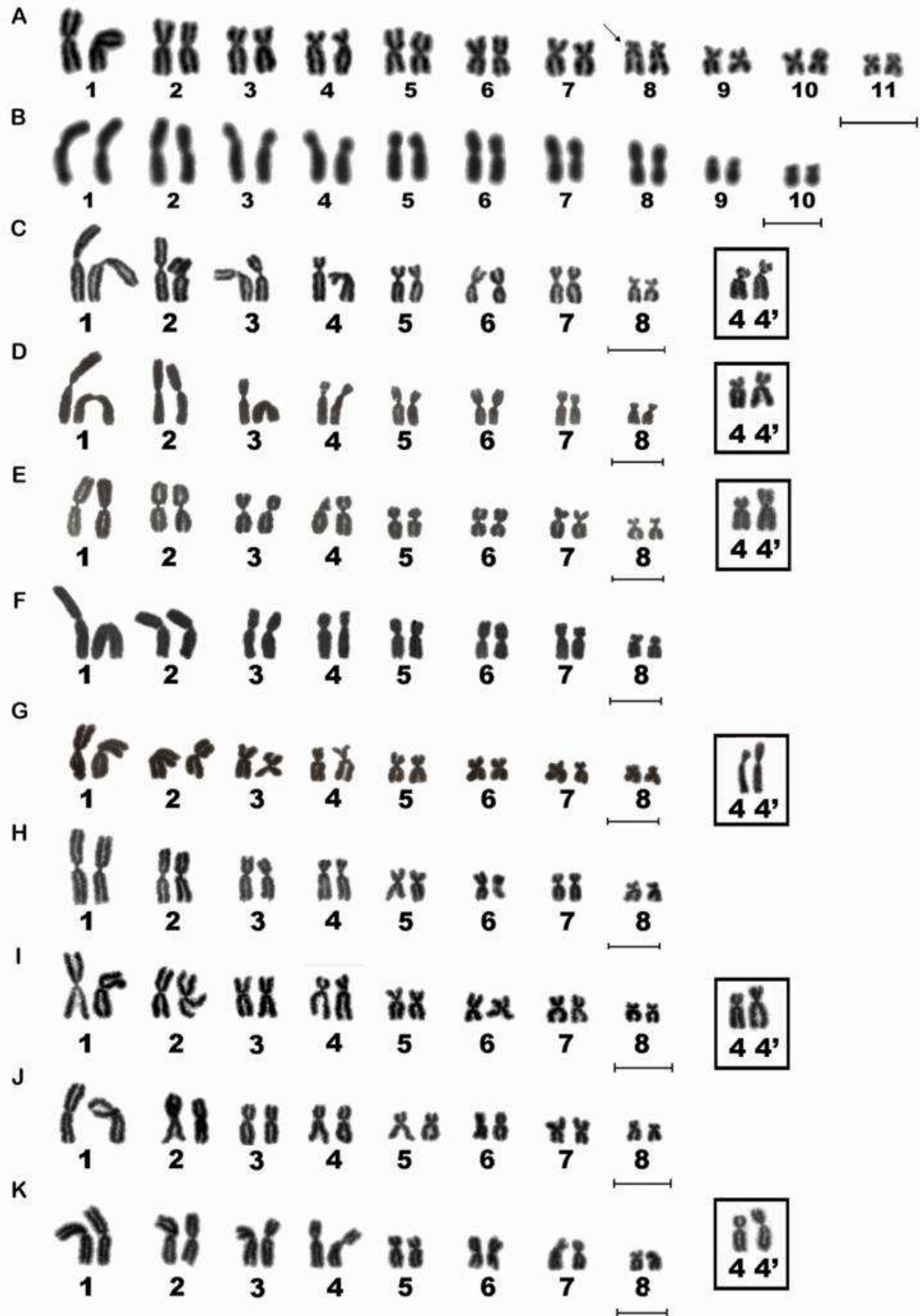


Figura 4

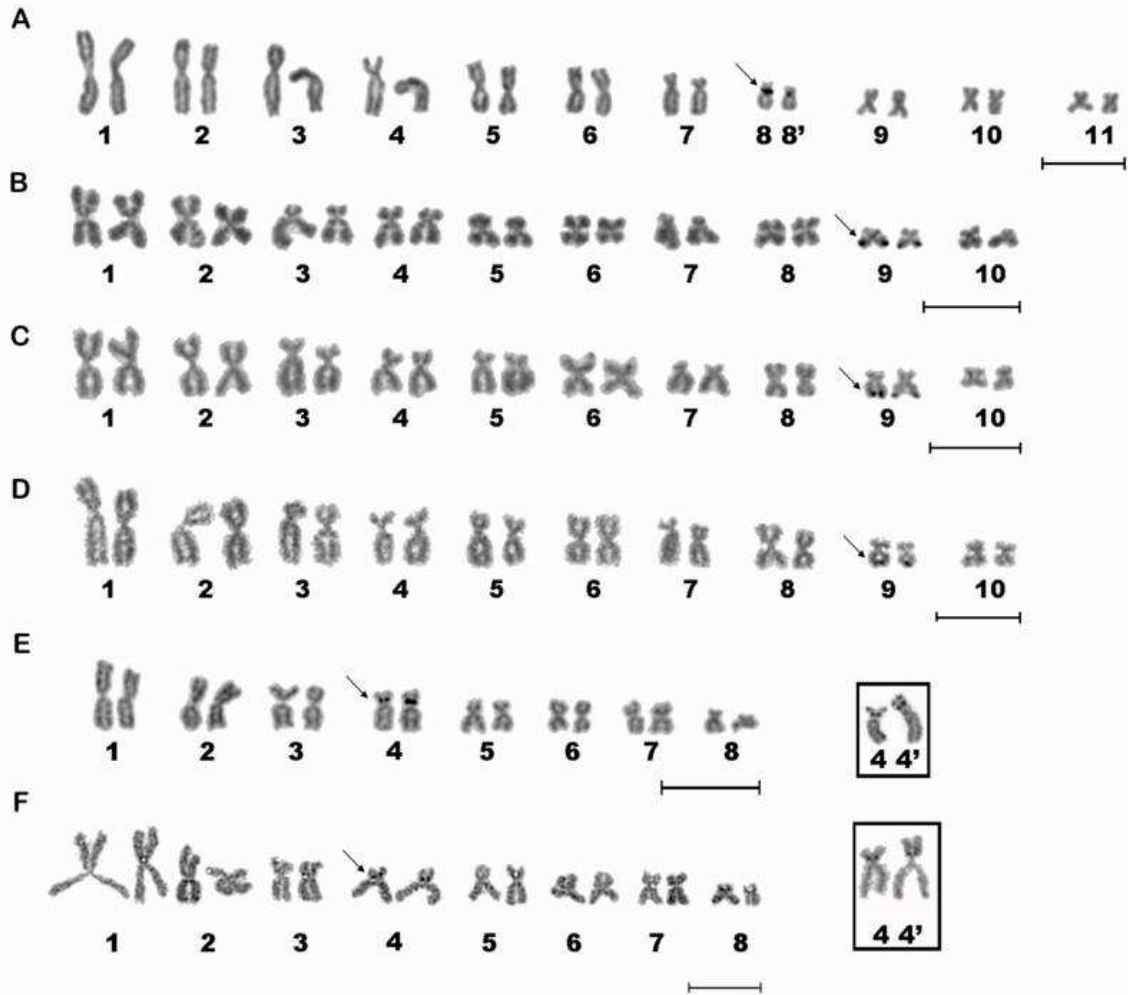


Figura 5

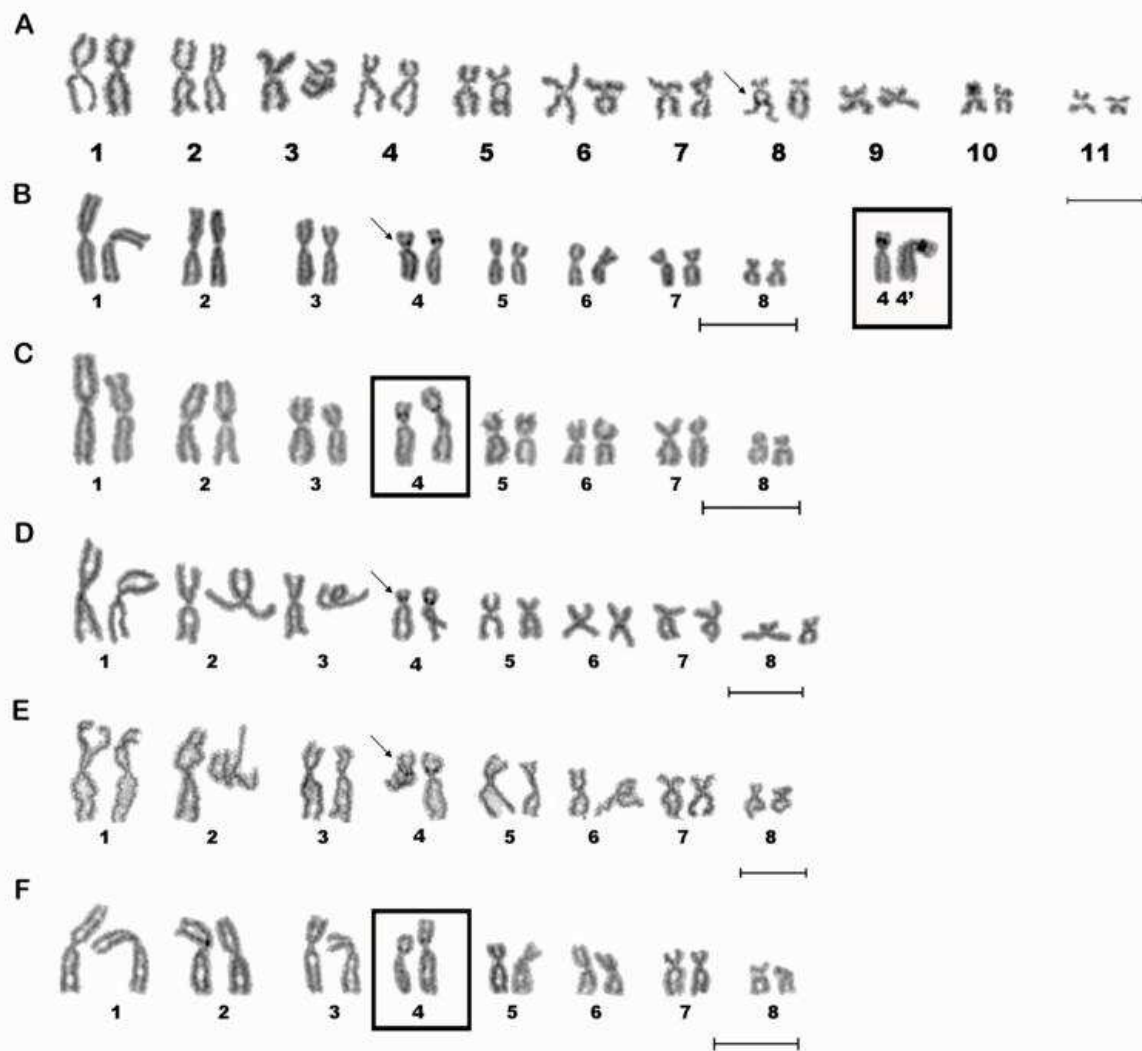


Figura 6

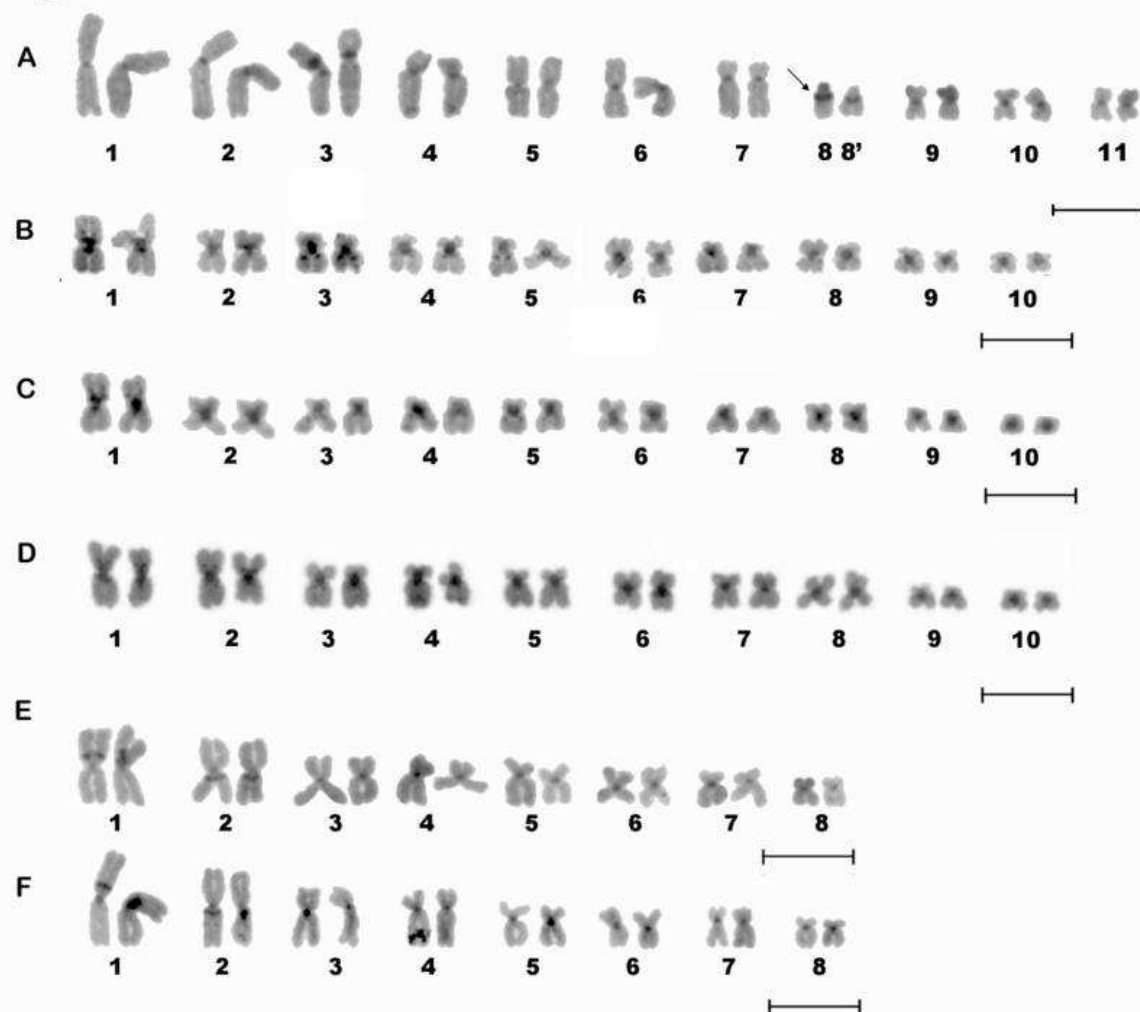
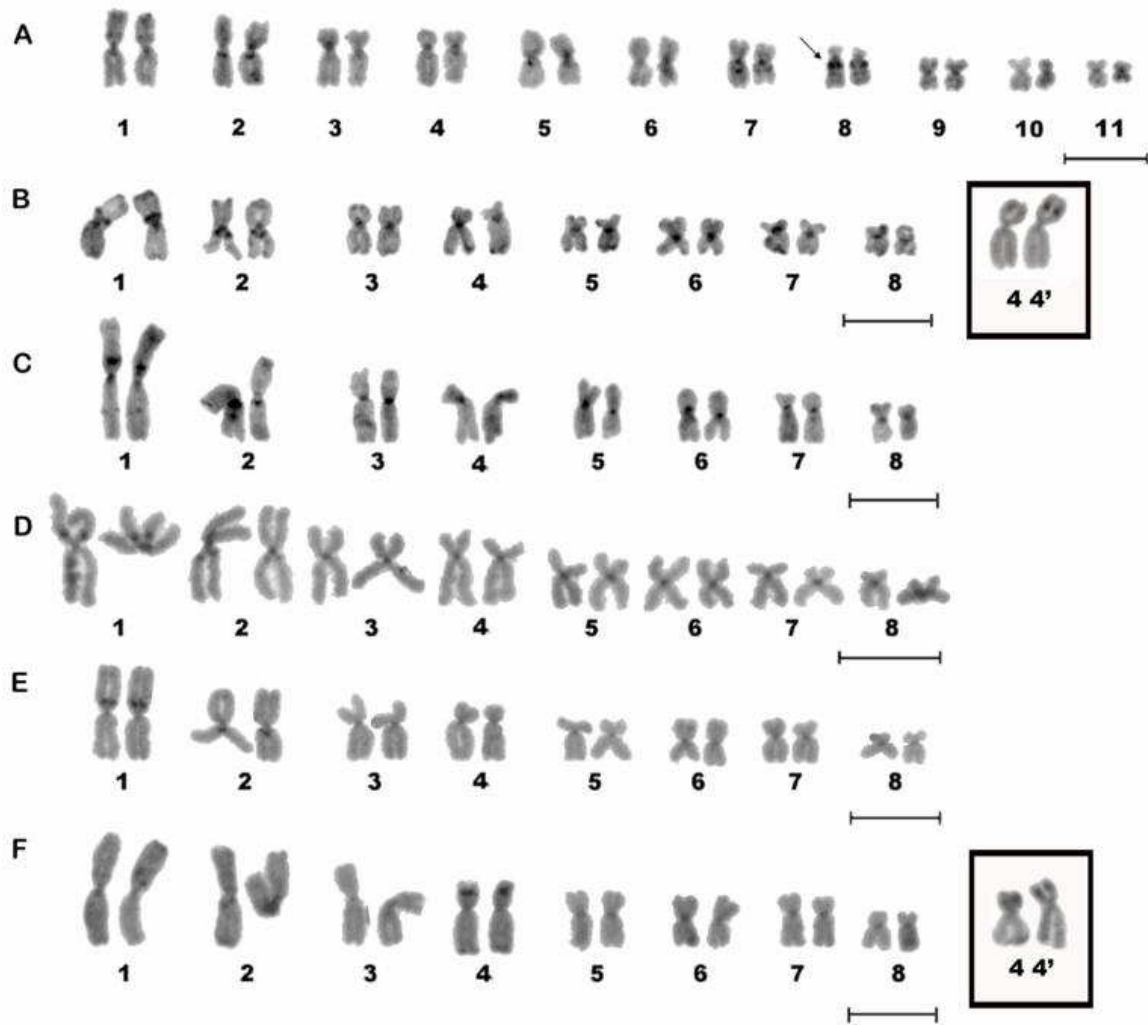


Figura 7



DISCUSSÃO

Dados cromossômicos para espécies do gênero *Pseudopaludicola* presentes na literatura são conflitantes e escassos. Das 12 espécies atualmente válidas para o gênero (Frost, 2008), apenas algumas populações de *Pseudopaludicola falcipes* e *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) foram analisadas citogeneticamente (Saez & Brum, 1960; Brum-Zorilla & Saez, 1968; Beçak, 1968; Batistic *et al.* 1969, 1970; Batistic, 1970).

A presença de $2n=22$ cromossomos para *P. falcipes* (localidade-tipo), diferiu não apenas dos dados previamente relatados por Beçak (1968), que descreveu um complemento diplóide com 18 cromossomos, mas também dos achados reportados por Batistic *et al.* (1969, 1970) e Batistic (1970). Estes autores revelaram a ocorrência de uma variação inter-populacional atribuída a *P. falcipes* com cariótipos formados por $2n=16$, 18 e 20 cromossomos, em exemplares coletados nas proximidades do município de São José do Rio Preto, região noroeste do estado de São Paulo e também em localidades dos estados de Mato Grosso e Minas Gerais. No entanto Batistic (1970) observou, em machos provenientes de Feira de Santana (BA), também atribuídos a *P. falcipes*, a presença de 11 bivalentes ($2n=22$) na meiose.

Os nossos resultados concordaram parcialmente com os descritos para populações de *P. falcipes* do Uruguai (Saez & Brum, 1960; Brum-Zorrilla & Saez 1968). Apesar de *P. falcipes* da localidade-tipo ter apresentado o mesmo número cromossômico das populações descritas por estes autores, diferenças quanto à morfologia dos cromossomos foram notadas, uma vez que Saez & Brum (1960) descreveram somente a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, enquanto os nossos resultados revelaram a existência de pares metacêntricos, submetacêntricos e um par subtelocêntrico. As diferenças na morfologia dos cariótipos podem sugerir a ocorrência de equívocos de identificação na população de *P. falcipes* do Uruguai, uma vez que as espécies deste gênero são morfologicamente semelhantes. Porém, a presença de $2n = 22$ em diferentes populações pode indicar a existência de mais de uma espécie no gênero *Pseudopaludicola*, que compartilha este número de cromossomos. Não foi possível realizar comparações cariotípicas com a população atribuída a *P. falcipes* ($n = 11$) do estado da Bahia (Batistic, 1970), uma vez que naquele estudo somente células em meiose foram analisadas. Os exemplares denominados de *Pseudopaludicola* sp.1, de Poconé (MT), analisados no presente trabalho, também apresentaram número diplóide de 22 cromossomos e cariótipo muito

semelhante ao de *P. falcipes* da localidade-tipo, o que sugere uma proximidade entre esses táxons. No entanto, não descartamos a possibilidade de *Pseudopaludicola* sp. 1 tratar-se de uma população de *P. falcipes*. Porém, análises comparativas de morfologia externa e do padrão de vocalização de ambas as populações faz-se necessárias para suportar a hipótese de uma ampla distribuição geográfica para *P. falcipes*.

Os dados citogenéticos obtidos no presente trabalho permitiram também diferenciar claramente *P. falcipes* da localidade-tipo ($2n=22$), de *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) e de *P. ternetzi* (ambas $2n=20$), como também de *P. mystacalis* ($2n=16$) e das demais populações tidas como *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* I, II, III e IV ($2n=16$), assim como de *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I ($2n=20$) e *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* II, III e IV ($2n=16$), devido à diferença marcante no número cromossômico, e também da localização da NOR. Portanto, os resultados corroboram a proposta de retirada de *P. ameghini* da sinonímia de *P. mystacalis* (Strüssmann, 2003), uma vez que *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) apresentou $2n=20$ cromossomos, diferindo de *Pseudopaludicola mystacalis*, não somente pelo número e morfologia dos cromossomos, mas também pela distribuição de heterocromatina e pela posição da região organizadora do nucléolo.

No entanto, com base nestes critérios não distinguimos *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* I, II, III e IV de *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* II, III e IV e de *Pseudopaludicola* sp. 2 e 3. As pequenas diferenças de morfologia externa observadas entre as populações que ocorrem simpatricamente em Icém (D. C. Rossa-Feres, comunicação pessoal) podem ser devidas a polimorfismos interpopulacionais, podendo tratar-se da mesma espécie. Aventamos a hipótese de que essas populações da região noroeste do estado de São Paulo, denominadas de “aff. *falcipes*” e “aff. *mystacalis* II” sejam a espécie *P. mystacalis*. Além de terem o mesmo número de cromossomos, os resultados obtidos utilizando as técnicas de bandamento C e impregnação pela prata, não permitiram diferencia-las de *P. mystacalis* e, portanto, corroboram a hipótese de que sejam a mesma espécie e de que a aparente afinidade a *P. falcipes* se deva à semelhança morfológica entre elas, dificultando sua identificação. Desta forma, os exemplares estudados por Batistic *et al.* (1969; 1970) e Batistic (1970) certamente não representavam diferentes populações de *P. falcipes*, uma vez que cariótipos com $2n=22$ (tipo “*falcipes*”) não foram encontrados na região noroeste do estado de São Paulo. Portanto, os nossos resultados apontam uma distribuição geográfica para populações aparentadas à *P. falcipes*, que não inclui a região noroeste do estado de São Paulo.

Provavelmente, *Pseudopaludicola* sp. 2 e 3 sejam também a mesma espécie ou muito proximamente relacionadas à *P. mystacalis*. Outra possibilidade, oposta, é que sejam todas de fato, espécies distintas, que no processo de especiação não sofreram mudanças significativas detectáveis no nível da estrutura dos cromossomos mantendo, portanto, alta similaridade cariotípica. Porém, a análise de outras características será necessária para definir o *status* dessas populações.

Por outro lado, *P. ternetzi* diferiu citogeneticamente de *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) pela morfologia do par 7 e também pela diferença no padrão de distribuição de bandas heterocromáticas. Portanto, de acordo com os dados citogenéticos *P. ternetzi* e *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) são unidades taxonômicas distintas, o que contradiz a proposta de sinonimização de *P. ternetzi* a *P. ameghini* defendida por Bokermann (1966) e aceita por alguns autores, mas desconsiderada por Lynch (1971), devido à ausência de argumentos para tal decisão.

Além dos resultados descritos, foi encontrado em alguns espécimes denominados *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I de Icém (SP), um cariótipo com $2n=20$ cromossomos, semelhante ao de *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) e ao de *P. ternetzi*. No entanto, a pequena diferença quanto a morfologia do par 7 entre os cariótipos dessas espécies, associada ao baixo número de exemplares analisados de *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I e à ausência de informações referentes ao padrão de bandamento C e localização da NOR, não permitem uma inequívoca distinção dessa população com as demais estudadas que compartilham o mesmo número de cromossomos.

De acordo com Duarte *et al.*, (em preparação) alguns indivíduos denominados de *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* II também de Icém (SP), apresentaram um cariótipo com $2n=18$ cromossomos, semelhante ao de *P. canga*. Portanto, na região noroeste de São Paulo, encontram-se, em simpatria, espécies com $2n=16$, $2n=18$ e $2n=20$ cromossomos, morfologicamente muito semelhantes entre si e a *P. falcipes*, o que indica claramente, a necessidade de uma revisão taxonômica, a qual certamente resultará na inclusão de novos representantes para esse gênero.

As relações de parentesco entre *Pseudopaludicola* e os demais gêneros da família Leptodactylidae (*sensu* Laurent, 1986), inferidas a partir de dados morfológicos (Lynch, 1971; Heyer, 1974, 1975; Cannatella & Duellman, 1984; Lobo, 1996) bem como baseadas em caracteres moleculares (veja Frost *et al.*, 2006 e Grant *et al.*, 2006), não foram conclusivas, uma

vez que nenhum gênero em especial foi seguramente apontado como mais próximo a *Pseudopaludicola*.

Dados citogenéticos para *Pseudopaludicola* indicam uma considerável variabilidade intragenérica no número de cromossomos (Saez & Brum, 1960; Brum-Zorrilla & Saez, 1968; Beçak, 1968; Batistic *et al.* 1969, 1970; Batistic, 1970; Duarte – em preparação e presente trabalho), que necessita ser melhor compreendida, uma vez que até o momento é prematuro sugerir qualquer homeologia cromossômica que possa corroborar a proximidade de *Pseudopaludicola* com os demais gêneros das famílias Leiuperidae em especial *Physalaemus* ($2n=22$), *Pleurodema* ($2n=22$) ou *Edalohina* ($2n=22$) (Lourenço *et al.*, 1998; 1999, 2000a, b; 2006) ou Leptodactylidae, como *Paratelmatobios* ($2n=24$) e *Scythrophrys* ($2n=24$) (Lourenço *et al.*, 2003a, b, c; 2008), como sugerido por Frost *et al.*, 2006 e Grant *et al.*, 2006.

Por outro lado, recentemente, os “eleutherodactylines” (*sensu* Frost *et al.*, 2006), grupo que apresentava grande variação no número cromossômico e que sofreu várias re-estruturações os últimos anos com base em estudos morfológicos e moleculares (Frost *et al.*, 2006; Heinicke *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008), foram colocados em um grande táxon, Terrarana (*sensu* Hedges *et al.*, 2008), o qual contém quatro famílias. A re-alocação dos “eleutherodactylines” em determinados gêneros, incluindo alguns novos, necessita, ainda, de um melhor entendimento, uma vez no estudo de Hedges *et al.*, (2008) alguns clados são fracamente suportados. Porém, outros como, por exemplo, o do grupo Antillensis, gênero *Eletherodactylus*, é bem consistente e demonstram uma correlação com a presença de $2n=26$ cromossomos em seus constituintes (veja Kuramoto, 1990). Esse fato parece indicar que o número cromossômico nesse gênero, assim como em *Pseudopaludicola*, pode ter um significado filogenético. A presença de $2n=18$ cromossomos apenas em *P. canga* (Duarte *et al.*, em preparação) e em espécies proximamente relacionadas corroborara o monofiletismo do grupo “pusilla” (Veiga-Menoncello, 2007), previamente proposto com base em dados morfológicos (Lynch, 1989). Estudos filogenéticos adicionais (Veiga-Menoncello *et al.*, em preparação) poderão complementar os dados citogenéticos e esclarecer tanto as relações inter- e intragenéricas como também a variabilidade no número de cromossomos presente em *Pseudopaludicola*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, bolsa de estudo concedida a ERF, Proc. 05/03645-6 e auxílio 06/60055-0, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Ministério do meio Ambiente (MMA-PROBIO) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e ao Sérgio Siqueira Junior pela coleta dos exemplares de Santa Terezinha, MT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batistic, R.F. (1970). Estudo cromossômico e mecanismos de especiação em *Pseudopaludicola* (Leptodactylidae, Anura). Memória de Mestrado em Biologia, Instituto de Biociências da USP, Mestrado em Biologia, São Paulo, 57 p.
- Batistic, R.F., Beçak, M.L., Beçak, W. & Vizotto, L.D. (1970). Especiação e variação cariotípica em *Pseudopaludicola* (Amphibia, Anura). Res. XXII Reunião Anual da SBPC, E-72, 117.
- Batistic, R.F., Beçak, M.L. & Vizotto, L.D. (1969). Variação cromossômica no gênero *Pseudopaludicola* (Anura). *Ciênc. Cult.*, 21: 260.
- Beçak, M.L. (1968). Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, 21: 191-208.
- Bokermann, W.C.A. (1966). Lista anotada das localidades tipo de anfíbios brasileiros, Impresso pelo Serviço de Documentação, RUSP, São Paulo, Brasil.
- Brum-Zorrilla, N. & Saez, F.A. (1968). Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibian, Anura). *Experientia*, 24: 969.
- Cannatella, D.C., & Duellman, W.E., (1984). Leptodactylid frogs of the genus *Physalaemus* *postulosus* group. *Copeia*, 4: 902 – 921.
- Frost, D.R. Amphibian species of the world: an online reference. V5.2 (15 July, 2008). Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> American Museum of natural History, New York, USA.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C. J., Campbell, J. A., Blotto, B.

- L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M. & Wheeler, W.C. (2006). The amphibian tree of life. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 297: 1-370.
- Grant, T., Frost, D.R., Caldwell, J.P., Gagliardo, R., Haddad, C.F.B., Kok, P.J.R., Means, D.B., Noonan, B.P., Schargel, W.E. & Wheeler, W.C., (2006). Phylogenetic systematics of dart poison frogs and their relatives (Amphibia, Athesphatanura, Dendrobatidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, 299: 1-262.
- Green, M.D. & Sessions, S.K. (1991). Nomenclature for chromosomes. In: Green, M.D. & Session, S.K. (eds.), *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic, San Diego, USA. pp. 431-432.
- Haddad, C.F.B. & Cardoso, A.J. (1987). Taxonomia de três espécies de *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae). *Papéis Avulsos Zool.*, 36: 287-300.
- Hedges SB, Duellman WE and Heinicke MP (2008) New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737: 1–182.
- Heinicke MP, Duellman WE and Hedges SB (2007) Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104: 10092-10097.
- Heyer, W.R. (1974). Relationships of the *Marmotus* species group (Amphibia, Leptodactylidae) within the subfamily Leptodactylinae. *Contrib. Sci.*, 253: 1-46.
- Heyer, W.R. (1975). A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog Family Leptodactylidae. *Smithsonian Contr. Zool.*, 199: 1-55.
- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Kuramoto, M. (1990). A list of chromosome numbers of anuran amphibians. *Bull. Fukuoka Univ. Educ.* 39 (III): 83-127.
- King, M. & Rofe, R. (1976). Karyotypic variation in the Australian gecko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma*, 54: 75-87.
- Lobo, F. (1992). Distribución y lista de localidades de *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae) en la República Argentina. *Cuad. Herp.*, 7: 30-37.
- Lobo, F. (1996). Evaluación del status taxonómico de *Pseudopaludicola ternetzi* Miranda Ribeiro, 1937 y *Pseudopaludicola mystacalis* (Cope, 1887). Osteología y distribución de las dos especies. *Acta Zool. Lilloana*, 43: 327-346.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1998). Polymorphism of the nucleolar organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)

- detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Res.*, 6: 621-628.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1999). Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Leptodactylidae, Anura). *Can. J. Zool.*, 77: 624-631.
- Lourenço, L.B., Cardoso, A.J. & Recco-Pimentel, S.M. (2000a) Cytogenetics of *Edalohrina perezii* (Anura, Leptodactylidae). *Cytologia*, 65: 359-363.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2000b). Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae) with phylogenetic comments. *Hereditas*, 113: 201-209.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003a). Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae) and new insights on the relationship with the leptodactylid *Paratelmatobius*. *Ital. J. Zool.*, 70: 183-190.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003b). Cytogenetics of a new species of the *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae) with the description of an apparent case of pericentric inversion. *Amphibia-Reptilia*, 24: 47-55.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S. M. (2003c). Restriction fragment analysis of the ribosomal DNA of *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* species (Anura: Leptodactylidae). *Genet. Mol. Biol.*, 26: 139-143.
- Lourenço, L.B., Andrade, J.A., Andrade, G.V., Rossa-Feres, D.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2006). Chromosomal analysis of the leptodactylids *Pleurodema diplolistris* and *Physalaemus nattereri* (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia*, 27: 481-489.
- Lourenço, L.B., Bacci-Júnior, M., Martins, V.G., Recco-Pimentel, S.M., Haddad, C.F.B. (2008). Molecular phylogeny and karyotypic differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132: 255-266.
- Lynch, J.D. (1989). A review of the leptodactylid frogs of the genus *Pseudopaludicola* in Northern South America. *Copeia*, 3: 577-588.
- Lynch, J.D. (1971). Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. *Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas Misc. Publ.*, 69: 1-238.
- Medeiros, L.R; Rossa-Feres, D.C & Recco-Pimentel, S.M. (2003). Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H-nana*. *J. Hered.*, 94: 149-154.
- Milstead, W.W. (1963). Notes on Brazilian frogs of the genera *Physalaemus* and *Pseudopaludicola*. *Copeia*, 1963: 565-566.

- Miranda Ribeiro, A. (1926). Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) brasileiros. *Arch. Mus. Nac. Rio de Janeiro.*, Tomo I. 27: 1 – 227.
- Parker, H.W. (1927). A revision of the frogs of the genera *Pseudopaludicola*, *Physalaemus*, and *Pleurodema*. *An. Mag. Nat. Hist.*, Ser.9: 450-478.
- Saez, F.A. & Brum, N. (1960). Chromosomes of South American amphibians. *Nature*, 185: 945.
- Schmid, M. (1978a). Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388.
- Schmid, M. (1978b). Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma*, 68: 131-148.
- Strüssmann, C. (2003). Herpetofauna da área sob influência do reservatório de Manso (Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil): composição taxonômica, padrões de abundância e de distribuição em diferentes unidades de paisagem. Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 122 pp.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 83: 438-442.
- Veiga-Menoncello, A.C.P., Strüssmann, C., Lima, A.P. & Recco-Pimentel, S.M. (2006). Chromosomal study of *Colostethus brunneus* from the type locality and two related species (Anura, Dendrobatidae). *Genetica*, 126: 179-187.
- Veiga-Menoncello, A.C.P., Fávero, E.R; Duarte, T.C., Lourenço, L.B., Strüssmann, C., Rossa-Feres, D.C., Lima, J.R.F. & Recco-Pimentel, S.M. (2007). A progressive deduction of chromosome number in *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae), inferred from the molecular phylogenetic analysis. *Chromosome Research*, 15: 45.

5. CONCLUSÕES GERAIS

1. As espécies do gênero *Pseudopaludicola* estudadas no presente trabalho apresentaram variações no número cromossomos, na localização da região organizadora do nucléolo (NOR) e no padrão de heterocromatina.
2. A variação no número de cromossomos permitiu distinguir inequivocamente as três espécies provenientes de suas localidades-tipo: *P. falcipes* da região de Porto Alegre (RS), com $2n=22$ cromossomos, *P. ameghini* (*sensu* Cope 1887) da Chapada dos Guimarães (MT), com $2n=20$ cromossomos e *P. mystacalis* da Chapada dos Guimarães (MT), com $2n=16$ cromossomos.
3. *Pseudopaludicola falcipes* e *Pseudopaludicola* sp.1 ($2n=22$) apresentaram os cariótipos muito semelhantes e a NOR localizada na região pericentromérica do braço longo do par 8, o que sugere uma proximidade entre esses táxons, porém apresentaram pequena diferença no padrão de bandas heterocromáticas. Há ainda a possibilidade de *Pseudopaludicola* sp. 1 tratar-se de uma população de *P. falcipes* sendo necessários porém estudos mais aprofundados para esclarecer o relacionamento dessas populações.
4. *Pseudopaludicola ameghini* (*sensu* Cope, 1887) possui cariótipo ($2n=20$) semelhante ao de *P. ternetzi*, porém, podem ser distinguidas desta pela morfologia do par 7 e pelo padrão de distribuição de bandas heterocromáticas, indicando que sejam, de acordo com os dados citogenéticos, unidades taxonômicas distintas.
5. *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I apresentou cariótipo com $2n=20$ cromossomos, semelhante ao de *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) e ao de *P. ternetzi*, diferindo apenas pela morfologia do par 7. O pequeno número de exemplares analisados e a ausência de informações referentes ao padrão de bandamento C e localização da NOR para *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* I de Icém (SP), não permitiram uma distinção citogenética dessa população em relação às demais estudadas que compartilham o mesmo número de cromossomos.

6. As populações da região noroeste do estado de São Paulo, usualmente denominadas de “aff. *falcipes* I, II, III e IV, e “aff. *mystacalis* II” e as de Barreirinhas e de Urbano Santos (MA), denominadas “aff. *mystacalis* III e IV”, são, ou estão, relacionadas à espécie *P. mystacalis*, pois possuem o mesmo número de cromossomos ($2n=16$), apresentam a mesma localização da NOR e o mesmo padrão de bandamento C. Portanto, a aparente afinidade de *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* I, II, III e IV à *P. falcipes*, pode ser devida à grande semelhança morfológica entre elas, tornado difícil a correta identificação.

7. Considerando que *P. falcipes* apresenta $2n=22$ cromossomos e que cariótipos com esse número (tipo “falcipes”) não foram encontrados na região noroeste do estado de São Paulo, pode-se concluir que os exemplares estudados por Batistic *et al.* (1969; 1970) e Batistic (1970), certamente não representavam diferentes populações de *P. falcipes*. Os resultados do presente trabalho apontam uma distribuição geográfica para populações aparentadas à *P. falcipes*, que não inclui a região noroeste do estado de São Paulo.

8. *Pseudopaludicola* sp. 2 de Poconé e *Pseudopaludicola* sp. 3 de Santa Terezinha, MT, são, provavelmente, a mesma espécie ou muito proximamente relacionadas à *P. mystacalis* ($2n=16$). Outra possibilidade, é que sejam todas de fato, espécies distintas, que no processo de especiação não sofreram mudanças significativas detectáveis no nível da estrutura dos cromossomos, mantendo, portanto, alta similaridade cariotípica. Outros métodos de análise serão necessários para confirmar essa hipótese.

9. Alguns dos indivíduos denominados de *Pseudopaludicola* aff. *mystacalis* II de Icém, apresentaram um cariótipo com $2n=18$ cromossomos, semelhante ao de *P. canga* e estão sendo descritos por Duarte *et al.* (em preparação). Portanto, na região noroeste de São Paulo, encontram-se, em simpatria, espécies com $2n=16$, $2n=18$ e $2n=20$ cromossomos, morfológicamente muito semelhantes entre si e algumas vezes confundidas com *P. falcipes*, o que indica claramente, a necessidade de uma revisão taxonômica, a qual poderá resultar na inclusão de novos representantes para esse gênero.