



Universidade Estadual de Campinas

SIMONE CARLA RABER

CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE *Hyla bischoffi bischoffi* E *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Simone Carla Raber e aprovada pela Comissão Julgadora.

Shirlei Maria Recco Pimentel

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, área de Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel



UNIDADE	B. C.
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	R112c
V.	Ex.
TOMBO BC/	40860
PROG.	278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	311,00
DATA	04/04/00
N.º CPD	

CM-00137660-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Raber, Simone Carla

R112c Caracterização cromossômica de *Hyla bischoffi bischoffi* e *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae)/Simone Carla Raber. -- Campinas, SP: [s.n.], 2000.

f: 39 ilus.

Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

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

Data da Defesa: 21 / 02 / 00

Banca Examinadora

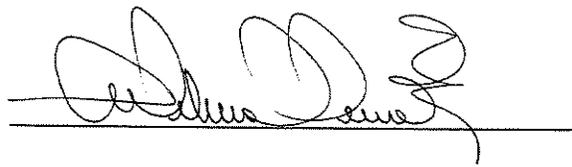
Titulares

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel



(Assinatura)

Profa. Dra. Selma Candelária Genari



(Assinatura)

Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi



(Assinatura)

Suplente

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

(Assinatura)

*Dedico ao Luiz, pelos momentos que
deveriam ser seus, sem nunca faltar
com o apoio e carinho*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel pela orientação, amizade e incentivo, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Às Dras. Mary Anne Heidi Dolder, Patrícia Pasquali Parise Maltempi, Selma Candelária Genari, pelas sugestões na análise prévia da tese.

Aos zoólogos Giovanni Vinciprova e Paulo Cristiano de Anchieta Garcia pelas sugestões, discussões, coletas e identificação dos animais.

À Klelia A. Carvalho pela atenção, auxílio técnico de laboratório e por todos os ensinamentos e ajuda concedidos.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP pela atenção e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos professores do curso de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, que muito contribuíram nesta etapa da minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP pelo auxílio prestado.

À Universidade de Passo Fundo, em especial ao Instituto de Ciências Biológicas, pela permissão da utilização dos laboratórios.

À Dra. Thais Leiroz Codenotti por toda atenção e auxílio constantes.

Ao Laboratório Unidos, de Passo Fundo, RS, por permitir o afastamento em alguns períodos, durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de Mestrado Carmen, Marta, Adil, Cleber e Vera pela amizade, ajuda e troca de idéias.

Aos colegas de pós-graduação do Mestrado Interinstitucional pela amizade.

Ao Luiz por todo amor, carinho, apoio e compreensão sempre oferecidos.

À minha família, em especial meu pai e minha mãe pelo incentivo e carinho sempre dispensados.

À amiga Rosa Mayr Prestes da Costa por toda ajuda e incentivo.

Aos meus amigos, que de uma forma ou outra sempre incentivaram minha luta.

À Deus, por toda força concedida ao longo deste caminho.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
I. INTRODUÇÃO	1
1. A classe Amphibia	1
2. A ordem Anura	1
3. A família Hylidae	2
4. O gênero <i>Hyla</i>	2
5. O grupo <i>polytaenia</i> de <i>Hyla</i>	3
6. O grupo <i>pulchella</i> de <i>Hyla</i>	3
7. As espécies em estudo	3
8. Citogenética em Hylidae	4
8.1. Aspectos gerais	4
8.2. A região organizadora nucleolar (NOR)	5
8.3. Heterocromatina	6
8.4. Citogenética dos grupos <i>polytaenia</i> e <i>pulchella</i> de <i>Hyla</i>	8
9. Objetivos	9
10. Referências Bibliográficas	10
II. ARTIGO – Caracterização cromossômica de <i>Hyla bischoffi bischoffi</i> e <i>Hyla guentheri</i> (Anura, Hylidae)	14
III. CONCLUSÕES GERAIS	31

RESUMO

Hyla bischoffi e *H. guentheri* apresentam algumas características morfológicas e de canto (apenas *H. guentheri*) semelhantes tanto à espécie do grupo *polytaenia* quanto *pulchella*. A inclusão dessas espécies em um ou outro grupo tem sido motivo de controvérsia na literatura. Neste trabalho, essas duas espécies foram comparadas citogeneticamente entre si e com outras espécies do grupo *pulchella* já estudadas, buscando evidências que possam auxiliar na taxonomia desses grupos. Foram analisados o cariótipo, o padrão de heterocromatina e de NOR de espécimes de *H. b. bischoffi* provenientes de São Francisco de Paula, RS, e de *H. guentheri* de Terra de Areia, RS. As duas espécies apresentam $2n = 24$ cromossomos, sendo os pares 1, 2, 8, 11 e 12 metacêntricos; os pares 3, 5, 7, 9 e 10 submetacêntricos e os pares 4 e 6 subtelo-cêntricos. O par 10 apresenta uma constrição secundária telomérica, que em *H. b. bischoffi* nem sempre está presente, tornando o cromossomo metacêntrico nesses indivíduos. Nas duas espécies foi evidenciada heterocromatina centromérica em todos os cromossomos e um bloco ocupando quase todo braço longo do par 10. Além disso, em *H. b. bischoffi* foi detectada uma banda telomérica fracamente corada no par 1 e uma banda pericentromérica intersticial estendida pelo braço curto do par 6, e em *H. guentheri* uma banda telomérica no braço longo do par 1 fortemente corada. A NOR localiza-se no braço longo do par 10 nas duas espécies, coincidente com a constrição secundária.

As duas espécies apresentam o mesmo número e morfologia cromossômica e a mesma localização de NOR. Porém, podem ser distinguidas pelo padrão de heterocromatina. Comparando os cariótipos estudados com os de algumas espécies do grupo *pulchella* é notável a semelhança. Apresentam cariótipos semelhantes e o mesmo marcador, um bloco de heterocromatina bastante evidente no braço longo do par 10. Os dados citogenéticos obtidos para *H. b. bischoffi* e *H. guentheri* não permitem excluir essas duas espécies do grupo *pulchella*.

ABSTRACT

Hyla bischoffi and *H. guentheri* share some morphological and call characteristics with the *pulchella* group and others with *polytaenia* group. The inclusion of these two species in these groups is still controversial. A cytogenetic study showed that both species have $2n = 24$ chromosomes; five metacentric, five submetacentric and two subtelocentric chromosome pairs. The nucleolus organizer region (NOR) was located on the long arm of chromosome 10, which also contained a block of heterochromatin in both species. The centromeric region of all the chromosomes contained C-banded heterochromatin. There were no marked differences in the karyotypes of these two species, except for an additional heterochromatic band on the short arms of chromosome 6 in *H. bischoffi*. These findings indicated that the karyotypes of these two species were very similar to those of the *H. pulchella* group of *Hyla* and that neither of them can be excluded from the *pulchella* group.

I. INTRODUÇÃO

1. A classe **Amphibia**

Na classe Amphibia incluem-se sapos, rãs e pererecas (Ordem Anura), salamandras (Ordem Caudata), cobras-cegas (Ordem Gymnophiona) e várias formas fósseis do Devoniano em diante. A classe Amphibia foi, mais recentemente, dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e LissAmphibia (Duellman & Trueb, 1985).

Pough *et al.* (1993) afirma que as subclasses Labyrinthodontia e Lepospondyli foram as primeiras sobre a face da Terra há cerca de 350 milhões de anos, extinguindo-se após 200 milhões de anos. A subclasse LissAmphibia apareceu no período Jurássico da era Mesozóica, há pelo menos 200 milhões de anos.

A subclasse LissAmphibia possui aproximadamente 4.000 espécies distribuídas em três ordens: Urodela (ou Caudata), com mais ou menos 350 espécies; Gymnophiona, com aproximadamente 170 espécies, e Anura, com cerca de 3.500 espécies (Duellman & Trueb, 1985; Hildebrand, 1995).

O parentesco entre os anfíbios modernos constitui, há muito tempo, um enigma, porque não existem fósseis que demonstrem a transição entre algum grupo do Paleozóico e quaisquer das três ordens modernas. Os fósseis mais antigos que podem representar anfíbios modernos consistem em vértebras isoladas do período Permiano. O mais antigo fóssil relativamente completo de anfíbio pode ser *Triadobatrachus*, um possível anuro do Triássico inferior (Pough *et al.*, 1993).

2. A ordem **Anura**

Os anuros são cosmopolitas, exceto para altas latitudes no Ártico, Antártida, algumas ilhas oceânicas e alguns locais extremamente desertos. A grande diversidade dos anuros está nos trópicos. Segundo Frost (1985), a ordem Anura é dividida em 26 famílias, sendo que nove delas ocorrem na América do Sul.

O canto dos anuros é diversificado, varia com as espécies e a maioria delas possui dois ou três tipos diferentes de canto, utilizados em diferentes situações. Os cantos mais

familiares são aqueles usualmente referidos como cantos nupciais. As características do canto identificam a espécie e o sexo do indivíduo que o emite (Pough *et al.*, 1993).

A fêmea é quem escolhe o macho para o amplexo, sendo esta forma de acasalamento diferente da cópula por não ter órgão introdutório (Storer *et al.*, 1984; Pough *et al.*, 1993). Na maioria dos anuros a fecundação é externa (Pough *et al.*, 1993). A fêmea deposita os ovos em um local apropriado, por exemplo na água, sob folhagem de mata ou ficam armazenados em câmaras especiais do corpo (mársupio). Até 10.000 ovos podem ser depositados em uma única desova (Storer *et al.*, 1984; Pough *et al.*, 1993).

3. A família Hylidae

Esta família ocorre no norte da América, na América Central, na Índia Ocidental e na América do Sul tropical, e, ainda, pode ser encontrada em toda Austrália, Tasmânia, Nova Guiné e nas Ilhas Solimões (Duellman & Trueb, 1985).

A Família Hylidae apresenta 4 subfamílias, 37 gêneros, 630 espécies (Duellman & Trueb, 1985; Frost, 1985), sendo 2 extintas (Duellman & Trueb, 1985). Os hílideos são anfíbios extremamente variáveis no tamanho (17-140 mm). Muitos hílideos são arborícolas, mas alguns são aquáticos e outros são cavadores (Duellman & Trueb, 1985).

A subfamília Hyliinae é a mais diversificada, com 22 gêneros e aproximadamente 476 espécies (Frost, 1985).

4. O gênero *Hyla*

O gênero *Hyla*, rãs arborícolas verdadeiras, apresenta ampla distribuição geográfica, não sendo encontrado nas regiões da Indonésia, Malásia, Polinésia, Etiópia e Madagascar. O número de espécies de *Hyla* nas regiões neotropicais é muito grande, especialmente no Brasil (Duellman & Trueb, 1985). Neste gênero estão incluídas cerca de 250 espécies (Duellman & Trueb, 1985; Frost, 1985).

Possuem a falange em forma de garra terminal unida a uma cartilagem intercalar. Esta é uma importante característica, que juntamente com o desenvolvimento dos discos digitais, possibilita um meio de locomoção de subida por adesão ou fricção. Em espécies grandes o rudimento do dedo polegar é longo e estreito (agudo) (Lutz, 1973).

5. O grupo *polytaenia* de *Hyla*

O grupo *polytaenia* inclui atualmente as espécies *Hyla polytaenia* Cope, 1870, *H. cipoensis* B. Lutz, 1968, *H. goiana* B. Lutz, 1968 e *H. leptolineata* Braun & Braun, 1977 (Cruz & Caramaschi, 1998). Segundo esses autores, o grupo *polytaenia* envolve espécies de pequeno porte (25,6-37,6mm nos machos; 29,0-41,5mm nas fêmeas), corpo alongado e cabeça estreita, com padrão de colorido dorsal composto por linhas e faixas longitudinais mais ou menos definidas e ausência de barras transversais ou manchas nas faces anterior e posterior das coxas e na região inguinal.

A distribuição geográfica do grupo *polytaenia* no Brasil inclui localidades do centro-oeste, sul e sudeste (Cruz & Caramaschi, 1998).

6. O grupo *pulchella* de *Hyla*

Este grupo consiste de populações encontradas no Brasil, Uruguai, Bolívia e Argentina, e tem sido dividido em várias formas geograficamente definidas. Entre as espécies incluídas no grupo por Duellman *et al.* (1997), fazem parte algumas encontradas no Brasil como *Hyla pulchella*, *H. pulchella joaquina*, *H. semiguttata*, *H. marginata*, *H. prasina* e *H. caingua*.

As espécies deste grupo foram descritas por Duellman *et al.* (1997) como tendo tamanho médio, antebraços hiperatrofiados, prepólex com espinho ósseo e manchas arredondadas ou barras nas coxas.

7. As espécies em estudo

Hyla bischoffi Boulenger, 1887, tendo como localidade tipo o Rio Grande do Sul, era antigamente confundida com *Hyla pulchella* em coleções (Lutz, 1973). Cochran (1955) colocou *H. multilineata* (Lutz & B. Lutz, 1939) como sub-espécie de *H. bischoffi*, passando então a chamar *H. b. multilineata* (ver Lutz, 1973), incluindo-a no grupo *albopunctata*. Porém Lutz (1973) a incluiu no grupo *polytaenia*, reconhecendo as duas subespécies, *H. bischoffi bischoffi* e *H. bischoffi multilineata*. Heyer *et al.* (1990) consideraram *H. multilineata* como espécie plena, porém não avaliaram o “status” desta espécie em relação à *H. b. bischoffi*.

H. bischoffi compartilha algumas características morfológicas com espécies do grupo *polytaenia* (Langone, 1997) e outras com espécies do grupo *pulchella* (P. C. Garcia & G. Vinciprova – informação pessoal).

Hyla guentheri Boulenger, 1886, foi incluída por Lutz (1973) no grupo *polytaenia* por causa do padrão de coloração dorsal, no que concordaram também Braun e Braun (1977, 1980). Mas, Klappenbach e Langone (1992) e Langone (1997) consideraram que *H. guentheri*, tendo como localidade tipo o Rio Grande do Sul (Frost, 1985), possa fazer parte do grupo *pulchella*, por causa das características morfológicas. Ainda, segundo Garcia (informação pessoal) há também semelhança de canto. Langone (1997) concluiu que não se podia ainda afirmar em que grupo a espécie em questão deveria ficar, já que até aquele momento não existiam definições claras dos grupos *pulchella* e *polytaenia*.

Porém, Cruz e Caramaschi (1998) afirmam que as quatro espécies incluídas no grupo *polytaenia* podem ser distinguidas prontamente de *H. bischoffi* e *H. guentheri* pela ausência de barras ou manchas arredondadas nas partes ocultas das coxas e região inguinal.

Portanto, no momento, *H. bischoffi* e *H. guentheri* não estão incluídas em nenhum dos grupos citados na literatura (*polytaenia* e *pulchella*) com os quais essas espécies tem maior afinidade.

8. Citogenética em Hylidae

8.1. Aspectos gerais

A lista mais recente sobre número de cromossomos em anuros inclui em torno de 1.000 espécies (ver Kuramoto, 1990). A maioria das espécies de anuros estudadas possui número diplóide de $2n = 22$ a $2n = 26$ cromossomos. Bogart (1973) defende a hipótese de que um ancestral comum com $2n = 26$ teria originado todos os gêneros atuais. O gênero *Hyla* é o que apresenta maior variação no número de cromossomos.

Nas espécies com 24 cromossomos, a morfologia dos cromossomos é bastante conservada. Foi observado por Bogart (1973) que *H. crepitans* e *H. pardalis* do grupo *faber* possuem cariótipo muito próximo ao de *H. polytaenia* e *H. pulchella*, sendo também muito próximo de todas as *Hyla* com $2n = 24$ cromossomos.

A evolução de cromossomos em anuros parece ter sido muito mais lenta que em outros grupos de vertebrados (Bogart, 1991). O processo de evolução em anuros parece ter ocorrido através de uma redução do número de cromossomos acrocêntricos por processo de fusão. Segundo Morescalchi (1968), as espécies mais primitivas caracterizam-se, na maioria das vezes, por um alto número diplóide, onde o tipo acrocêntrico de cromossomo aparece com frequência, enquanto as espécies consideradas mais recentes apresentam um número menor de cromossomos, a maioria metacêntricos e submetacêntricos. O mecanismo dessa redução provavelmente envolve a fusão de dois cromossomos acrocêntricos, com a formação de um cromossomo metacêntrico ou submetacêntrico e perda subsequente do segmento heterocromático (Foresti, 1972).

8.2. A região organizadora nucleolar (NOR)

As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são regiões do cromossomo que contém genes de rRNA, e sua transcrição origina o nucléolo (Alberts *et al.*, 1997).

O número e a localização da NOR nos cromossomos de anfíbios são característicos de cada população ou espécie (Schmid, 1978a, b) e aparecem quase sempre na mesma posição onde ocorre a constrição secundária (Beçak & Beçak, 1973, Schmid *et al.*, 1983, 1986 e 1993). Goessens (1984) mostrou que nem todas as NORs aparecem como constrições secundárias e que em alguns casos elas contêm heterocromatina e Schmid (1978a) relata que as NORs estão acompanhadas por heterocromatina constitutiva que é banda fortemente C-positiva. Em anfíbios, mais especificamente em anuros, as NORs tendem a coincidir com as bandas C-positivas (King, 1980; King *et al.*, 1990).

NORs adicionais também podem aparecer em algumas espécies de hílideos (Anderson, 1991) e de leptodactílideos (Lourenço *et al.*, 1998). Schmid (1978a) analisando algumas espécies das famílias Bufonidae e Hylidae, encontrou duas NORs em seus cariótipos. Cariótipos com baixo número de NORs são considerados mais primitivos do que aqueles com vários (Hsu *et al.*, 1975), porque com a evolução aumentou o número de NORs nas espécies. A posição da NOR também difere consideravelmente entre espécies.

Diferença de tamanho das NORs em um dos dois cromossomos homólogos caracteriza o heteromorfismo. Schmid (1982) considera que o aparecimento de NOR

heteromórfica pode ser devido a deleção parcial do cístron ou duplicação e triplicação de um dos cístrons. Segundo King *et al.* (1990), o heteromorfismo envolve amplificação do rDNA em um cromossomo do par de homólogos, onde primeiro ocorre a amplificação de algumas seqüências de DNA ribossomal, e depois a amplificação da NOR.

A impregnação pelo íon prata é o método mais usado para a identificação de NORs, mas apenas detecta as NORs que estiveram ativas na intérfase anterior. A técnica desenvolvida por Howel e Black (1980) é a mais utilizada para a evidenciação de NORs e nucléolos. O método de impregnação por prata (método Ag-NOR) baseia-se na afinidade de proteínas ácidas associadas as NORs ativas pelo íon prata. Essas proteínas argirófilas, também conhecidas por proteínas Ag-NOR, permanecem associadas às NORs mesmo durante a mitose e até o paquíteno da meiose (Schmid *et al.*, 1986; Sumner, 1990, Lourenço, 1996). A detecção das NORs para a análise do número e da localização cromossômica dessas regiões também pode ser feita através de hibridização “in situ” ou através de técnicas citoquímicas, como coloração com mitramicina ou cromomicina e bandamento N (revisão em Lourenço, 1996).

8.3. Heterocromatina

A cromatina apresenta-se como heterocromatina e como eucromatina. A heterocromatina refere-se a cromatina ou segmentos cromossômicos que permanecem condensados após o término da mitose, durante a intérfase, sendo transcricionalmente inativa. Em geral, o genoma pode conter até 10% de heterocromatina, considerando-se os dois tipos: a facultativa, que varia em seu estado de condensação em diferentes tipos celulares e estágios de desenvolvimento; e a constitutiva, que está permanentemente inativa, localizada em posições idênticas nos cromossomos homólogos de todas as células. A eucromatina pode estar 10% na forma ativa, menos condensada, enquanto o restante é eucromatina inativa, que é mais condensada que a cromatina ativa, mas menos condensada do que a heterocromatina. A cromatina condensada é transcricionalmente inativa podendo estar em estado reprimido com seu DNA inativo temporária e reversivelmente ou podendo ser constituída de DNA não codificador e assim ser incapaz de transcrever (Alberts *et al.*, 1997).

A heterocromatina em anfíbios está quase sempre associada com o centrômero, o telômero, a região organizadora nucleolar, e/ou com algumas regiões intersticiais do cromossomo (Schmid, 1978a, b).

Em algumas famílias como Bufonidae, Hylidae, Leptodactylidae, Myobatrachidae, Microhylidae e Ranidae, o padrão de heterocromatina mostra uma diversidade muito grande (King, 1991). Todas as espécies de Hylidae têm heterocromatina pericentromérica e, em muitos casos, heterocromatina telomérica também. Nos gêneros *Litoria* e *Cyclorana*, maiores mudanças têm ocorrido, e estas tem afetado ambas, a distribuição e a quantidade da heterocromatina C-positiva dentro do genoma. O processo parece envolver a adição de blocos de heterocromatina e a transformação de eucromatina em heterocromatina. Em alguns gêneros estas mudanças parecem estar associadas com a NOR (King, 1991).

Técnicas de bandamento se tornaram essenciais para análise citogenética. Espécies muito próximas podem diferir não somente na quantidade de heterocromatina em seus genomas, mas também no número de bandas, na localização e nas propriedades de coloração da heterocromatina (Sumner, 1990).

A heterocromatina constitutiva é geralmente detectada citogeneticamente através da técnica de bandamento C (Sumner, 1972; Schmid, 1978a, 1980, 1982; King, 1980; Schmid *et al.*, 1983, 1986, 1990; Baldissera Jr. *et al.*, 1993; Schmid *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1996; Lourenço *et al.*, 1999).

O mecanismo bioquímico para explicar o bandamento C foi proposto por Holmquist (1979) e apresenta, basicamente, três etapas: um tratamento ácido, que promove a remoção de purinas das moléculas de DNA; um tratamento alcalino, que provoca β -eliminação envolvendo a ribose do nucleotídeo que sofreu depurinação e desnatura irreversivelmente o DNA; e um tratamento salino, que remove segmentos de DNA quebrados. A extração de DNA através desse método ocorre mais lentamente nas regiões de heterocromatina constitutiva.

Atualmente a técnica mais utilizada é a proposta por Sumner (1972), que substituiu o tratamento com NaOH, que era muito destrutivo para os cromossomos, por Ba(OH)₂. Esta técnica envolve o tratamento do material com HCl 0,2 N; solução saturada de Ba(OH)₂ a 50°C e 2 x SSC a 60°C, seguido por coloração com Giemsa.

A caracterização dos cromossomos ocorre por análise da localização e do tamanho das bandas C. O padrão de banda C apresentado por espécies de diferentes famílias, como Bufonidae, Hylidae, Leptodactylidae e Myobatrachidae, mostra grande diferença entre elas. Espécies com heterocromatina não-centromérica também foram encontradas em algumas famílias, como Hylidae e Ranidae (King, 1991). Espécies muito próximas podem diferir na quantidade de heterocromatina em seus genomas, e, também, no número de bandas, na localização e nas propriedades de coloração da heterocromatina (Sumner, 1990). Diferença na propriedade de coloração da heterocromatina, principalmente em relação ao bandamento C, foi encontrada em alguns hílideos dos gêneros *Litoria* (King, 1980) e *Hyla* (Anderson, 1991).

O aparecimento de novas bandas heterocromáticas pode estar relacionado com a (1) translocação ou inversão de bandas já existentes, (2) transformação da eucromatina e (3) amplificação de seqüências de DNA (Sumner, 1990).

Em casos em que o método de banda C não detecta heterocromatina, outros métodos, incluindo banda N e alguns métodos de fluorescência têm sido usados, conduzindo à conclusão que bandas heterocromáticas são de fato muito heterogêneas (Sumner, 1990).

8.4. Citogenética dos grupos *polytaenia* e *pulchella* de *Hyla*

No grupo *polytaenia*, apenas o cariótipo da espécie *H. polytaenia* foi determinado e apresenta $2n = 24$ cromossomos, metacêntricos e submetacêntricos (Rabello, 1970).

Do grupo *pulchella* foram analisadas as espécies *H. pulchella pulchella*, *H. pulchella joaquina*, *H. prasina* (quatro populações) e *H. caingua*. Todas as espécies estudadas possuem $2n = 24$ cromossomos, com cariótipo semelhante (Ananias, 1996). No entanto, pequenas diferenças nos padrões de banda C e de localização de NOR permitem distinguir as espécies entre si.

9. Objetivos

Considerando que:

- *H. bischoffi* e *H. guentheri* apresentam algumas características morfológicas e/ou de canto semelhantes tanto à espécie do grupo *polytaenia* quanto do grupo *pulchella*, gerando controvérsias na literatura quanto à inclusão em um ou outro grupo;
- já existem dados citogenéticos de espécies do grupo *pulchella* na literatura que permitem uma comparação;

Este trabalho teve por objetivo caracterizar os cromossomos dessas espécies e contribuir com evidências citogenéticas que possam auxiliar na taxonomia de *H. bischoffi* e *H. guentheri*, e desses grupos de *Hyla*.

10. Referências Bibliográficas

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D.; trad. Simonetti, A. B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Artes Médicas. Porto Alegre. pp. 352-354, 378-384, 1997.
- Ananias, F. Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Masters Thesis**. Campinas, 1996.
- Anderson, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. *In: Amphibia Cytogenetics and Evolution*. pp. 299-331, 1991.
- Baldissera Jr., F. A.; Oliveira, P. S. L. & Kasahara, S. Cytogenetics of four brazilian *Hyla* species (Amphibia - Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Brasil. Genet.** **16 (2)**: 335-345, 1993.
- Beçak, M. L. & Beçak, W. Chromosome secondary constriction in different stages of development. **Experientia** **29(3)**: 359-361, 1973.
- Bogart, J. P. Evolution of anuran karyotypes. *In: VIAL, J. L. Evolutionary biology of anurans*. Univ. Missouri Press. pp. 337-349, 1973.
- Bogart, J. P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. *In: Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, New York. pp.233-258, 1991.
- Braun, P. C. & Braun, C. A. S. Nova espécie de *Hyla* do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Anura, Hylidae). **Rev. Bras. Biol.** **37(4)**: 853-857, 1977.
- Braun, P. C. & Braun, C. A. S. Lista prévia dos anfíbios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.** **56**: 121-146, 1980.
- Cruz, C. A. G. & Caramaschi, U. Definição, composição e distribuição geográfica do grupo de *Hyla polytaenia* Cope, 1870 (Amphibia, Anura, Hylidae). **Boletim do Museu Nacional** **392**: 1-19, 1998.
- Cochran, D. M. **Frogs of southerastern Brazil**. Smithsonian Institution, Washington, D. C.: VII-XI, pp. 84-87, 1955.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. **Biolog of Amphibians**. Mc Graw - Hill Book Co., New York. pp. 445-459, 515-553, 1985.

- Duellman, W. E.; De La Riva, I. & Wild, E. R. Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. **Scient. Pap. Nat. Hist. Mus. Univ. of Kansas** 3: 1-41, 1997.
- Foresti, F. Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia - Anura). Masters Thesis, ESALQ-USP, Piracicaba, SP: 1972.
- Frost, D.R. **Amphibian species of the world**. Allen Press and the association of systematics collections. Lawrence, Kansas. pp. 120-176, 1985.
- Goessens, G. Nucleolar Structure. **Int. Ver. Cytol.** 87:107-155, 1984.
- Heyer, W. R.; Rand, A. S.; Cruz, C. A. G.; Peixoto, O. L. & Nelson, C. E. Frogs of Boracéia. **Arq. Zool.** 31(4): 231-410, 1990.
- Hildebrand, M. Tetrápodes. *In: Análise da estrutura dos vertebrados*. Atheneu Editora, São Paulo. 1995.
- Holmquist, G. The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination. **Chromosoma (Berl.)** 72: 203-224, 1979.
- Howell, W. M. & Black, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-strep method. **Experientia**, 36: 1014-5, 1980.
- Hsu, T. C.; Spiritos, S. E. & Pardue, M. L. Distribution of 18S + 28S ribosomal genes en mammalian genomes. **Chromosoma**, 53: 23-36, 1975.
- Kaiser, H.; Mais, C.; Bolanos, F.; Steinlein, C.; Feichtinger, W. & Schmid, M. Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica** 98: 95-102, 1996.
- King, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** 80: 191-217, 1980.
- King, M.; Contreras, N & Honeycutt, R. L. Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S + 28S *in situ* hybridization. **Genetica** 80: 17-29, 1990.
- King, M. The evolution of heterochromatin in the Amphibian genome. **Amphibia Cytogenetics and Evolution**. pp. 359-391, 1991.
- Klappenbach, M. A. & Langone, J. A. Lista sistemática y sinonímica de los anfibios del Uruguay. **Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo**, 2 (VIII), 163-222, 1992.

- Kuramoto, M. A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. Of Educ.**, **39**: 83-127, 1990.
- Langone, J. A. Caracterizacion de *Hyla guentheri* Boulenger 1886 (Amphibia, Anura, Hylidae) **Cuad. Herp.** **11** (1-2): 13-20, 1997.
- Lourenço, L. B. Estudo citogenético comparativo de *Edalohrina perezi* e *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Masters Thesis**. Campinas, SP. 1996, 100p.
- Lourenço, L. B., Recco-Pimentel, S. M. & Cardoso, A. J. Polymorphism of the nucleolar organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. **Chrom. Res.** **6**: 621-628, 1998.
- Lourenço, L. B., Recco-Pimentel, S. M. & Cardoso, A. J. Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). **Can. J. Zool.**, **77** (1): 624-631, 1999.
- Lutz, B. Brazilian species of *Hyla*. University of Texas Press, Austin & London. Texas. pp. 3-7; 112-123, 1973.
- Morescalchi, A. Hypotheses on the phylogeny of the Salientia, based on kariological data. **Experientia** **24**: 964-966, 1968.
- Pough, F. H.; Heiser, J. B. & McFarland, W. N. Salamandras, Anuros e Cecílias. *In: A vida dos Vertebrados*. Atheneu Editora, São Paulo. 1993.
- Rabello, M. N. Chromosomal studies in brazilian anurans. **Caryologia** **23** (1): 45-59, 1970.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** **66**: 361-388, 1978 a.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma** **68**: 131-148, 1978 b.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** **77**: 83-103, 1980.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, **87**: 327-44, 1982.
- Schmid, M.; Haaf, T.; Geile, B. & Sims, S. Chromosome banding in Amphibia VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae*. **Chromosoma**, **88**: 68-82, 1983.

- Schmid, M.; Sims, S. H.; Haaf, T. & MacGregor, H. C. Chromosome banding in Amphibia X. 18S and 28S ribosomal RNA genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrotheca riobambae*. **Chromosoma**, **94**: 139-145, 1986.
- Schmid, M.; Steinlein, C; Nanda, I. & Epplen, J. T. Chromosome banding in Amphibia. **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**: 21-45, 1990.
- Schmid, M., Ohta, S., Steinlein, C. & Guttenbach, M. Chromosome banding in Amphibia XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Burgeria buergeri* (Anura, Phacophoridae). **Cytogenet. Cell Genet.** **62**:238-246, 1993.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Weimer, R.; Mais, C.; Bolanos, F. & Leon, P. Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer region in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet Cell Genet** **69**: 18-26, 1995.
- Storer, T. I., Usinger, R. L., Stebbins, R. C. & Nybakken, J. W. **Zoologia Geral** 6 ed. pp. 618-641, 1984.
- Sumner, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell. Res.** **75**: 304-306, 1972.
- Sumner, A. T. C-banding and related methods. *In*: **Chromosome banding**. Unwin Hyman Ed. pp. 39-69, 1990.

II. ARTIGO

(a ser submetido à revista “Herpetologica”)

**Caracterização cromossômica de *Hyla bischoffi bischoffi*
e *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae)**

SIMONE CARLA RABER¹, GIOVANNI VINCIPROVA², PAULO C. GARCIA³ &
SHIRLEI M. RECCO-PIMENTEL¹.

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de
Campinas (Unicamp), 13083-970 Campinas, SP, Brasil;

²Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

³Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual
Paulista, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.

Correspondence to:
Shirlei M. Recco-Pimentel
Departamento de Biologia Celular, IB, Unicamp
13083 970 – Campinas, SP, Brasil
e- mail: shirlei@obelix.unicamp.br
fax: 55 – 19 – 788 7821

ABSTRACT: *Hyla bischoffi* and *H. guentheri* share some morphological and call characteristics with the *pulchella* group and others with the *polytaenia* group. The inclusion of these two species in these groups is still controversial. A cytogenetic study showed that both species have $2n = 24$ chromosomes; five metacentric, five submetacentric and two subtelocentric chromosome pairs. The nucleolus organizer region (NOR) was located on the long arm of chromosome 10, which also contained a block of heterochromatin in both species. The centromeric region of all the chromosomes contained C-banded heterochromatin. There were no marked differences in the karyotypes of these two species, except for an additional heterochromatic band on the short arms of chromosome 6 in *H. bischoffi*. These findings indicated that the karyotypes of these two species were very similar to those of the *H. pulchella* group of *Hyla* and that neither of them can be excluded from the *pulchella* group.

Key words: Amphibia, *Hyla bischoffi bischoffi*, *Hyla guentheri*, *pulchella*, karyotype, C-banding, Ag-NOR.

Hyla bischoffi Boulenger, 1887, tendo como localidade tipo o Rio Grande do Sul, era antigamente confundida com *H. pulchella* em coleções (Lutz, 1973). Cochran (1955) colocou *H. multilineata* (Lutz & Lutz) como subespécie de *H. bischoffi*, passando então a chamar *H. b. multilineata* (ver Lutz, 1973), incluindo-a no grupo *albopunctata*. Porém Lutz (1973) a incluiu no grupo *polytaenia*, reconhecendo as duas subespécies, *H. bischoffi bischoffi* e *H. bischoffi multilineata*. Heyer *et al.* (1990) consideraram *H. multilineata* como espécie plena, porém não avaliaram o “status” desta espécie em relação a *H. b. bischoffi*.

H. bischoffi compartilha algumas características morfológicas com espécies do grupo *polytaenia* (Langone, 1997) e outras com espécies do grupo *pulchella* (P. C. Garcia & G. Vinciprova – informação pessoal).

Hyla guentheri Boulenger, 1886, foi incluída por Lutz (1973) no grupo *polytaenia* por causa do padrão de coloração dorsal, no que concordaram também Braun e Braun (1977, 1980). Mas, Klappenbach e Langone (1992) e Langone (1997) consideraram que *H. guentheri*, tendo como localidade tipo o Rio Grande do Sul (Frost, 1985), possa fazer parte do grupo *pulchella*, por causa das características morfológicas. Ainda, segundo Garcia (informação pessoal) há também semelhança de canto. Langone (1997) concluiu que não se podia ainda decidir em que grupo a espécie em questão deveria ficar, já que até aquele momento não existiam definições claras dos grupos *pulchella* e *polytaenia*.

Porém, Cruz e Caramaschi (1998) definem o grupo *polytaenia* com quatro espécies (*H. polytaenia*, *H. goaina*, *H. cipoensis* e *H. leptolineata*) as quais podem ser distinguidas prontamente de *H. bischoffi* e *H. guentheri* pela ausência de barras ou manchas arredondadas nas partes ocultas das coxas e região inguinal.

Portanto, no momento, *H. bischoffi* e *H. guentheri* não estão incluídas em nenhum dos grupos citados na literatura (*polytaenia* e *pulchella*) com os quais essas espécies tem maior afinidade.

Há poucos dados de citogenética na literatura, tanto de espécies do grupo *pulchella* quanto *polytaenia*. Algumas espécies do grupo *pulchella* foram analisadas por Ananias (1996) que determinou o cariótipo, padrão de heterocromatina e região organizadora do nucléolo. No grupo *polytaenia*, apenas o cariótipo da espécie *H. polytaenia* (Rabello, 1970) foi estudado. Neste trabalho caracterizamos citogeneticamente *H. b. bischoffi* e *H.*

guentheri com o objetivo de contribuir com informações citogenéticas adicionais que possam auxiliar na taxonomia dessas espécies e desses grupos de *Hyla*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram analisados 6 espécimes (machos) de *H. b. bischoffi*, provenientes de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, e 9 espécimes (8 machos; 1 fêmea) de *H. guentheri*, coletados na localidade de Terra de Areia, RS.

Obtenção de metáfases:

As preparações cromossômicas foram obtidas por suspensão de células do epitélio intestinal e testículos de animais previamente colchicinizados.

Métodos citoquímicos:

- Coloração convencional: com solução de Giemsa a 10% em tampão fosfato pH 7. Para classificação dos cromossomos e confecção dos ideogramas foi feita a morfometria em 32 metáfases de *H. b. bischoffi* e em 44 de *H. guentheri*.
- Banda C: foi utilizada a técnica de Sumner (1972) e de Schmid (1982), com pequenas modificações no tempo de tratamento com as soluções de Ba(OH)₂ e de 2xSSC.
- Ag-NOR: foi utilizado o método de Howell & Black (1980).

RESULTADOS

Cariótipo

H. b. bischoffi e *H. guentheri* apresentam $2n = 24$ cromossomos e cariótipo bimodal com 6 pares de cromossomos grandes e 6 pares de cromossomos pequenos. Os pares 1, 2, 8, 11 e 12 são metacêntricos; os pares 3, 5, 7, 9 e 10 submetacêntricos e os pares 4 e 6 são subtelocêntricos (Figs. 1 A e B, 4 A e B; Tabela 1). Em todas as metáfases de *H. guentheri*

analisadas, o par número 10 apresenta uma evidente constrição secundária (Fig. 1B). Em *H. b. bischoffi*, esta constrição nem sempre era visível nas metáfases analisadas tornando o cromossomo 10, nestes casos, metacêntrico (Fig. 1A e 4A; Tabela 1).

Banda C

As duas espécies apresentaram heterocromatina centromérica em todos os cromossomos e uma forte marcação no braço longo do par 10, adjacente a uma constrição secundária. Além disso, *H. guentheri* apresentou uma banda telomérica bem evidente no braço longo do par 1. Em *H. b. bischoffi* essa banda se corou fracamente. *H. b. bischoffi* apresentou também um bloco heterocromático fortemente corado por quase todo braço curto do par 6 (Figs. 2 A e B, 4 A e B).

NOR

O par 10 das duas espécies apresenta a marcação da NOR na região próxima ao telômero do braço longo, coincidindo com a constrição secundária (Figs. 3 A e B, 4 A e B). A aplicação sequencial dos métodos de banda C e de Ag-NOR na mesma metáfase mostrou que a NOR não coincide com o bloco heterocromático adjacente àquela região. Nos núcleos interfásicos, o método AgNOR evidenciou 1 ou 2 nucléolos (Fig. 3C)

DISCUSSÃO

O número diplóide $2n = 24$ cromossomos encontrado em *H. b. bischoffi* e *H. guentheri* é o mesmo encontrado em *H. b. multilineata* (Beçak, 1968), *H. (bischoffi?) bischoffi* (Foresti, 1972), *H. polytaenia* (Rabello, 1970) e nas espécies do grupo *pulchella* (Ananias, 1996).

Todas essas espécies possuem número diplóide de $2n = 24$ cromossomos. Este número é comum dentro da ordem Anura, sendo encontrado em espécies das famílias Discoglossidae, Pelodytidae, Miobatrachidae, Leptodactylidae, Pseudidae, Hylidae, Microhylidae, Dendrobatidae, Ranidae e Hyperoliidae (Kumaroto, 1990). A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Hyla*, possui $2n = 24$ ou $2n = 30$ cromossomos (Beçak, 1968; Rabello, 1970; Bogart, 1973; Kumaroto, 1990; Skuk e Langone, 1990; Anderson, 1991; Baldissera Jr. *et al*, 1993), indicando uma dicotomia dentro do gênero *Hyla*, embora existam também outros números diplóides com $2n = 18, 20, 26, 32$ e 34 (Kumaroto, 1990; Baldissera Jr. *et al*, 1993). Segundo Miura (1995), o surgimento de espécies de *Hyla* com $2n=24$ cromossomos pode estar relacionado a um ancestral comum com $2n=26$ e Bogart (1973) sugere que espécies com cariótipos morfologicamente semelhantes podem ter um ancestral comum.

Comparando a morfologia cromossômica de *H. b. bischoffi* e *H. guentheri* entre si e com os cariótipos de espécies de grupos relacionados (*polytaenia* e *pulchella*) nota-se grande semelhança entre eles.

Beçak (1968) analisou os cromossomos de *H. multilineata* (*H. b. multilineata*) cujos indivíduos foram coletados em Itapecerica da Serra, São Paulo, tendo classificado os pares 1, 9, 10, 11 e 12 metacêntricos e o restante submetacêntricos, diferindo quanto aos cromossomos 2, 4, 6, 8, 9 e 10 com relação aos resultados encontrados neste trabalho. Comparando-se os dados referentes à *H. b. bischoffi* deste trabalho aos obtidos por Foresti (1972) para *H. bischoffi*, população de Rio dos Cedros, Santa Catarina, verifica-se que o número diplóide de cromossomos é o mesmo ($2n=24$), diferindo apenas na classificação de alguns cromossomos, os pares 2, 4, 6, 9 e 10.

Essas diferenças se devem, provavelmente, à utilização de tabelas de classificação diferentes, pois comparando-se todos esses cariótipos entre si verifica-se que os cromossomos apresentam a mesma morfologia.

A comparação da morfologia dos cromossomos corroboram a hipótese de que as populações de *H. bischoffi* (Foresti, 1972) e *H. multilineata* (Beçak, 1968) que ocorrem em São Paulo devem pertencer ao mesmo táxon que as encontradas no Rio Grande do Sul.

Comparando-se os cariótipos de *H. b. bischoffi* e de *H. guentheri* ao de *H. polytaenia* (Rabello, 1970), também verifica-se grande semelhança quanto ao número e morfologia dos cromossomos. Porém, também neste caso, não há dados de localização de NOR e de padrão de heterocromatina de *H. polytaenia* para uma comparação mais completa. Por outro lado, pode-se verificar que o cariótipo de *H. b. bischoffi* assemelha-se muito às espécies *H. pulchella*, *H. p. joaquina*, *H. caingua* e *H. prasina* do grupo *pulchella* (Ananias, 1996), não só quanto ao número e morfologia dos cromossomos, mas também pela presença de um mesmo marcador, um bloco de heterocromatina bastante evidente no braço longo do par 10. Essa banda, que ocorre também em *H. marginata*, *H. semiguttata* e *H. sp. n* (F. Ananias – informação pessoal) e nas espécies do grupo *pulchella* analisadas por Ananias (1996), é, portanto, um marcador importante desse grupo de espécies relacionadas.

A NOR foi localizada no braço longo do par 10, na região correspondente à constrição secundária nas duas espécies analisadas. NOR no par 10 foi detectada nas espécies *H. marginata* e *H. sp. n* (F. Ananias – informação pessoal). Nas espécies do grupo *pulchella*, a NOR ocorre no par 1 em *H. p. joaquina*, no par 7 em *H. caingua* e no par 12 em *H. prasina* e *H. pulchella* (Ananias, 1996). Para espécies do grupo *polytaenia*, não há dados na literatura. Considerando que os cariótipos destas espécies são aparentemente muito conservados e que as espécies citadas acima são reconhecidas como tendo grande proximidade entre si, a variação na localização da NOR permite sugerir que rearranjos cromossômicos, como translocações, podem ter tido um papel importante na evolução e diferenciação dessas espécies. Segundo Schmid (1978; 1982), comparações interespecíficas mostram que nos cariótipos de espécies pertencentes ao mesmo grupo ou a grupos de espécies relacionados, a NOR quase sempre se localiza na mesma região cromossômica. Segundo Schmid (1978), exceções a esta regra dão indicações de que rearranjos

cromossômicos ocorreram envolvendo os segmentos cromossômicos da NOR na evolução dos anuros.

O bandamento C das espécies *H. b. bischoffi* e *H. guentheri* mostrou pequena quantidade de heterocromatina, localizada principalmente na região centromérica. Embora os padrões de heterocromatina tenham sido muito semelhantes, a banda detectada no cromossomo 6 apenas em *H. b. bischoffi* é espécie-específica, já que não ocorre em *H. guentheri*. Essa banda não foi detectada também nas espécies do grupo *pulchella* analisadas por Ananias (1996) e pode, portanto, ser considerada um marcador para *H. b. bischoffi*.

Por outro lado, a espécie *H. p. joaquini*, população de Urubici, SC, (Ananias, 1996) possui padrão heterocromático muito semelhante ao das espécies estudadas neste trabalho, principalmente ao de *H. guentheri*. Apresenta pequena quantidade de heterocromatina, localizada principalmente nos centrômeros, e apenas uma banda intersticial, a do cromossomo 10.

Portanto, considerando os dados dessas duas espécies em conjunto e comparando com os que se dispõe na literatura para espécies relacionadas a elas, verifica-se características citogenéticas comuns marcantes, como o mesmo número e a mesma morfologia cromossômica, a presença de uma banda heterocromática no par 10 presente em todos os cariótipos, pequena quantidade de heterocromatina e poucas bandas heterocromáticas intersticiais. Assim, pode-se concluir que os dados citogenéticos obtidos no presente trabalho não permitem excluir essas espécies do grupo *pulchella*. A análise das espécies do grupo *polytaenia*, definido recentemente por Cruz e Caramaschi (1998), poderá auxiliar na elucidação da relação das espécies estudadas neste trabalho com um ou outro grupo.

Além disso, as relações filogenéticas dos grupos *polytaenia* e *pulchella* não estão ainda esclarecidas e dependem de um estudo mais completo envolvendo várias metodologias, o que vem sendo feito por alguns pesquisadores.

Agradecimentos – Os autores agradecem à Klélia Aparecida de Carvalho pelo auxílio técnico de laboratório e à CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS CITADAS

- ANANIAS, F. 1996. Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae). Masters Thesis. Campinas, SP.
- ANDERSON, K. 1991. Chromosome evolution in Holartic *Hyla* treefrogs. *Amphibia Cytogenetics and Evolution*. 299-331.
- BALDISSERA Jr., F. A., P. S. L. OLIVEIRA, and S. KASAHARA. 1993. Cytogenetics of four brazilian *Hyla* species (Amphibia - Anura) and description of a caso with a supernumerary chromosome. *Rev. Brasil. Genet.* 16 (2):335-345.
- BEÇAK, M. L. 1968. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia* 21(3):191-208.
- BOGART, J. P. 1973. Evolution of anuran karyotypes. In VIAL, J. L. *Evolutionary biology of anurans*. Univ. Missouri Press:337-349.
- BRAUN, P. C., and C. A. S. BRAUN. 1977. Nova espécie de *Hyla* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Anura, Hylidae). *Rev. Bras. Biol.* 37(4):853-857.
- BRAUN, P. C., and C. A. S. BRAUN. 1980. Lista prévia dos anfíbios do Estado do Rio Grande do sul, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.* 56:121-146.
- CRUZ, C. A. G., and CARAMASCHI, U. 1998. Definição, composição e distribuição geográfica do grupo de *Hyla polytaenia* Cope, 1870 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu Nacional* 392:1-19.
- COCHRAN, D. M. 1955. *Frogs of southeastern Brazil*. Smithsonian Institution, Washington, D. C.: VII-XI, 84-87.
- FORESTI, F. 1972. Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia - Anura). Masters Thesis, ESALQ-USP, Piracicaba, SP.

- FROST, D. R. 1985. Amphibian species of the world. Allen Press and the Association of systematics collections. Lawrence, Kansas:120-176.
- GREEN, D. M., and S. K. SESSIONS. 1991. The Phylogeny of Amphibians. *Amphibian Cytogenetics and Evolution*: 18-31, 431-432.
- HEYER, W. R., A. S. RAND, C. A. G. CRUZ, O. L. PEIXOTO, and C. E. NELSON. 1990. Frogs of Boracéia. *Arq. Zool.* 31(4):231-240.
- HOWELL, W. M., and D. A. BLACK. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.
- KLAPPENBACH, M. A., and J. A. LANGONE. 1992. Lista sistemática y sinonímica de los anfibios del Uruguay. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo*, 2 (VIII), 163-222.
- KURAMOTO, M. 1990. A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. *Bull. Fukuoka Univ. Of Educ.* 39:83-127.
- LANGONE, J. A. 1997. Caracterización de *Hyla guentheri* Boulenger 1886. (Amphibia, Anura, Hylidae). *Cuad. Herp.* 11 (1-2):13-20.
- LUTZ, B. 1973. Brazilian species of *Hyla*. University of Texas Press, Austin & London. Texas: 3-7; 112-123.
- MIURA, I. 1995. Two differentiated groups of the Japanese toad, *Bufo japonicus japonicus*, demonstrated by C-banding analysis of chromosomes. *Caryologia* 48 (2): 123-136.
- RABELLO, M. N. 1970. Chromosomal studies in Brazilian anurans. *Caryologia* 23 (1):45-59.
- SCHMID, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361-388.

———. 1982. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-44.

SKUK, G., and J. A. LANGONE. 1990. Los cromosomas de cuatro especies del género *Hyla* (Anura: Hylidae) con número diploide de $2n=30$. *Acta zool. Lilloana* 41: 165-171.

SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl Cell Res* 75:304-306.

TABELA 1. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *H. b. bischoffi* e *H. guentheri*. Classificação segundo Green & Sessions (1991).

<i>H. b. bischoffi</i>													
	Cromossomos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10a	10b	11	12
TR %	17,48	13,48	10,98	10,79	9,84	7,97	6,27	5,54	5,20	4,90	4,68	4,25	3,39
RB	1,10	1,50	2,01	3,60	2,17	3,49	2,12	1,11	1,86	1,83	1,18	1,02	1,00
IC	0,47	0,40	0,33	0,22	0,32	0,23	0,32	0,47	0,35	0,35	0,46	0,49	0,50
PC	M	M	SM	ST	SM	ST	SM	M	SM	SM	M	M	M

<i>H. guentheri</i>													
	Cromossomos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
TR %	17,48	13,55	10,69	10,68	9,59	8,06	6,44	5,58	5,53	4,99	4,35	3,29	
RB	1,02	1,28	1,88	3,36	1,74	3,07	2,11	1,07	2,11	2,05	1,00	1,00	
IC	0,49	0,43	0,35	0,23	0,36	0,24	0,32	0,48	0,32	0,33	0,50	0,50	
PC	M	M	SM	ST	SM	ST	SM	M	SM	SM	M	M	

TR = Tamanho Relativo (%); RB = Razão de Braço; IC = Índice Centromérico; PC = Posição do Centrômero; M = Metacêntrico; SM = Submetacêntrico; ST = Subtelocêntrico.

Legendas:

FIG. 1. - Cariótipos de *H. b. bischoffi* (macho, adulto) (A) e de *H. guentheri* (macho, adulto) (B). Metáfases mitóticas de epitélio intestinal, coradas com Giemsa. Cromossomo 10a evidenciando a constrição secundária e o cromossomo 10b sem a constrição secundária. Barra = 5µm.

FIG. 2. - Cariótipos de *H. b. bischoffi* (A) e *H. guentheri* (B). Cromossomos mitóticos do epitélio intestinal submetidos ao método de bandamento C. Barra = 5µm.

FIG. 3. - Cromossomos mitóticos *H. b. bischoffi* (A) e *H. guentheri* (B). O par 10 submetido ao método de Ag-NOR. Núcleos de epitélio de intestino de *H. guentheri* evidenciando 1 e 2 nucléolos (C). Barra = 5µm.

FIG. 4. - Ideogramas de *H. b. bischoffi* (A) e *H. guentheri* (B). Os círculos hachurrados representam NORs; os blocos pretos correspondem a segmentos de heterocromatina fortemente corados e os blocos pontilhados à regiões fracamente evidenciadas pelo bandamento C.

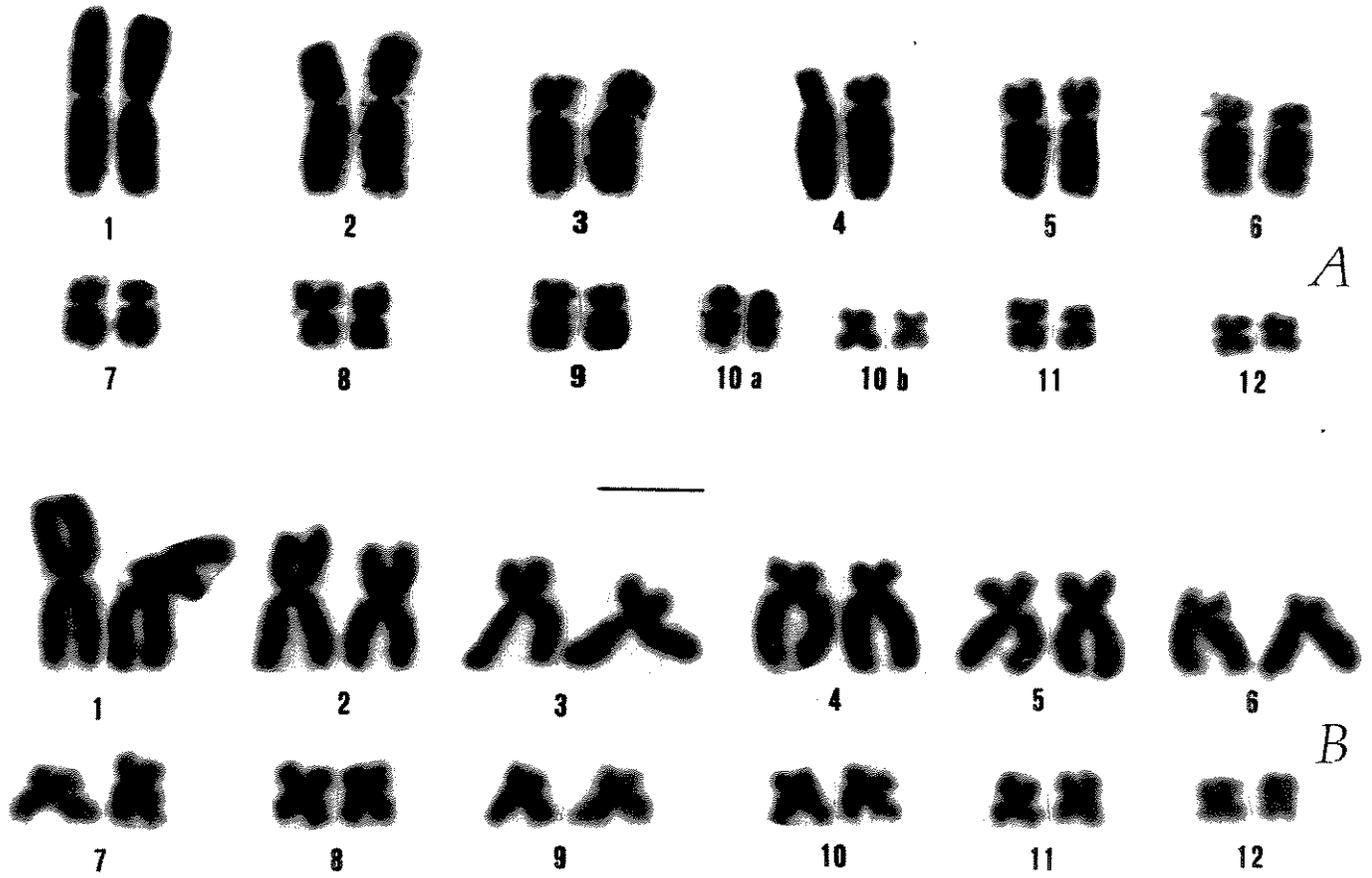


FIGURA 1

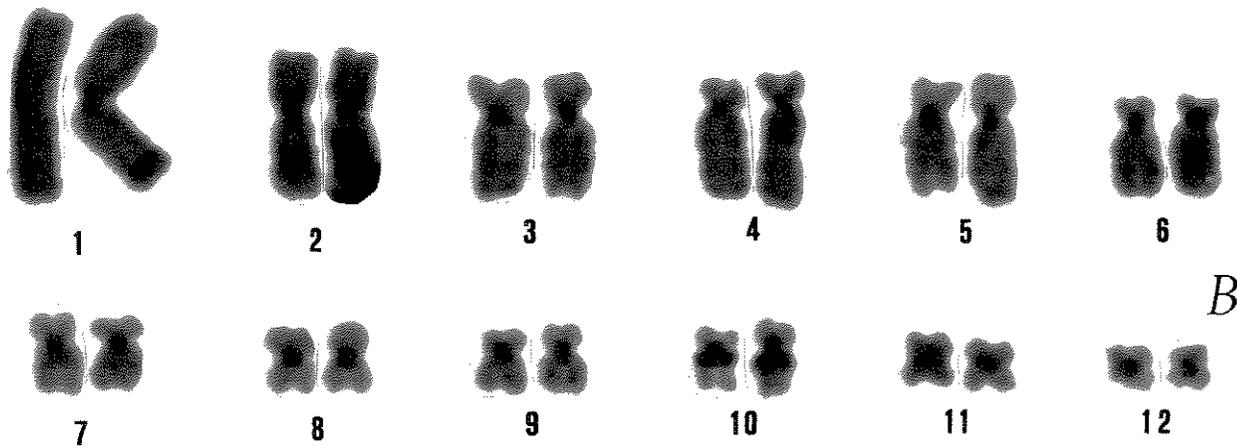
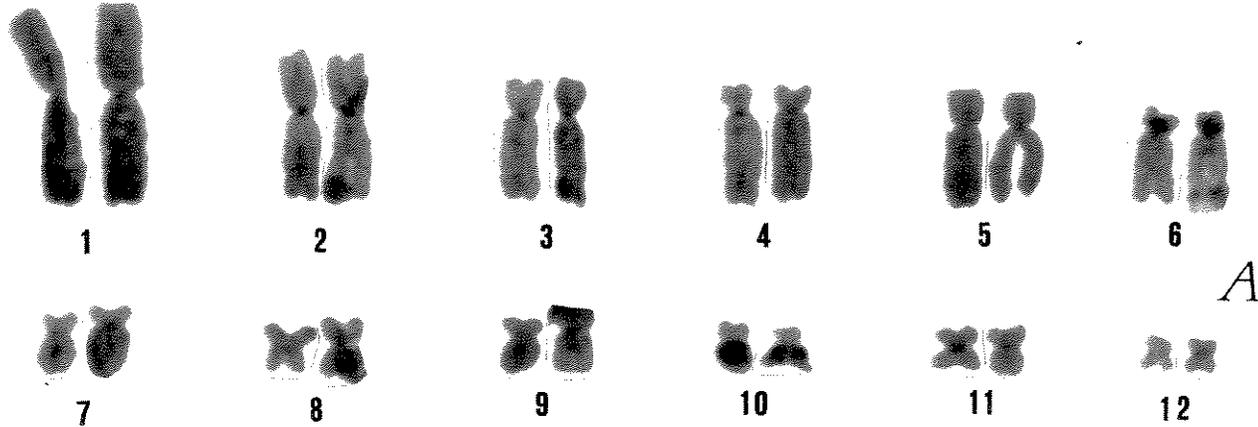


FIGURA 2

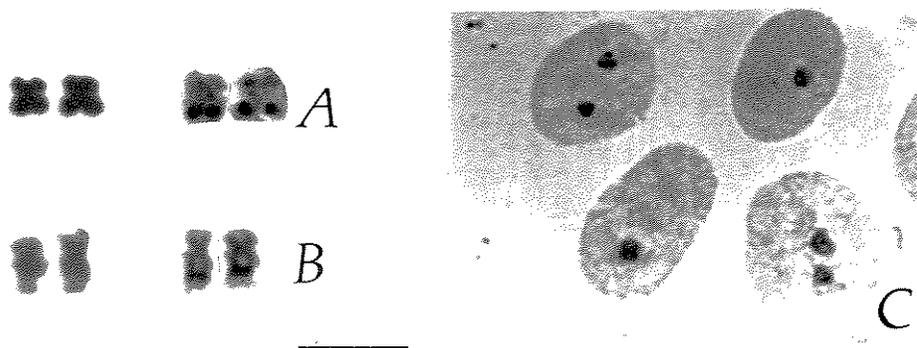
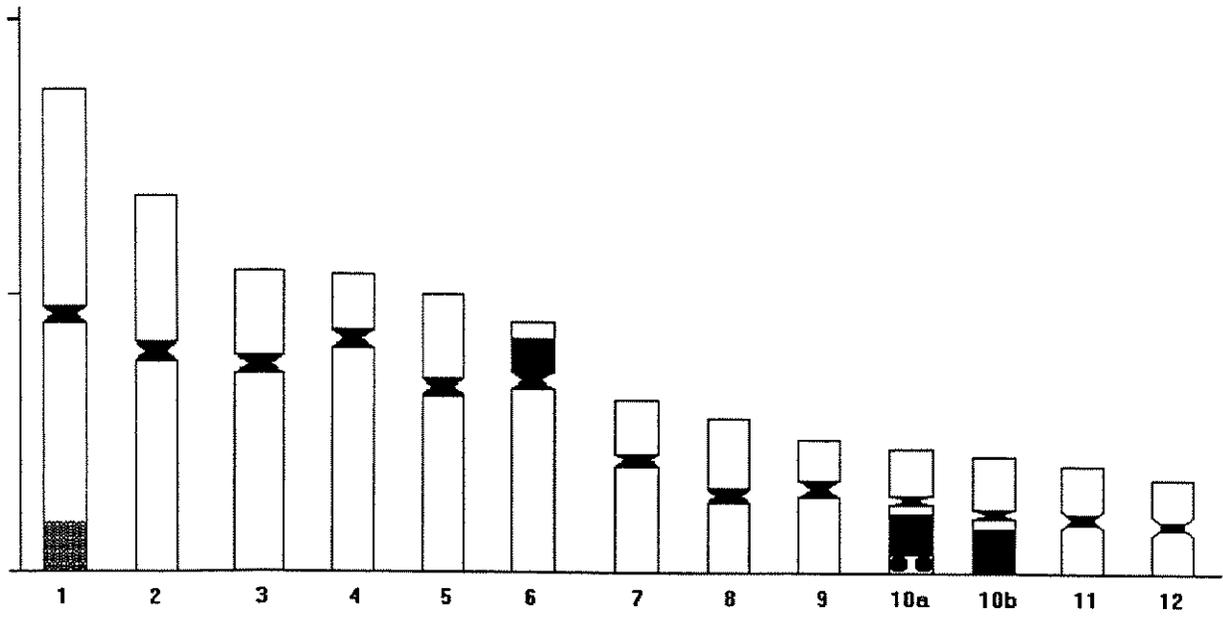
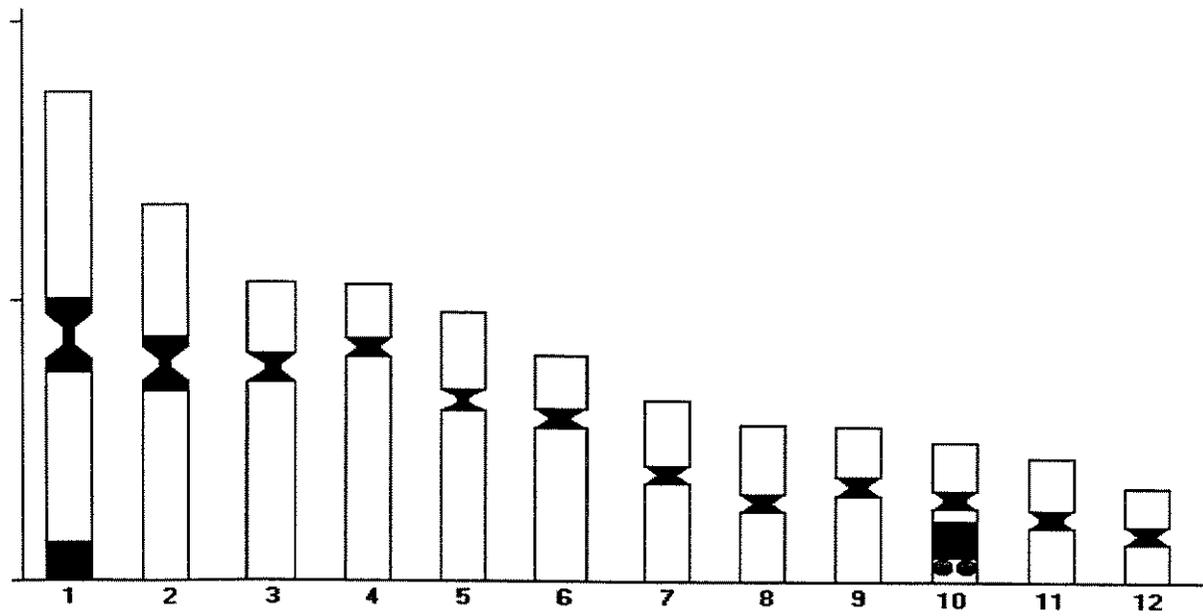


FIGURA 3



A



B

FIGURA 4

III. CONCLUSÕES GERAIS

1. As duas espécies apresentam o mesmo número e morfologia cromossômica e a mesma localização de NOR. Porém, podem ser distinguidas entre si pela presença de um bloco de heterocromatina que ocorre no cromossomo 6 apenas em *H. b. bischoffi*.
2. *H. b. bischoffi* apresenta o mesmo cariótipo de *H. (b.) multilineata*, o que reforça a hipótese de que pertençam ao mesmo táxon, embora não se tenha dados de bandamento e localização de NOR de *H. b. multilineata* para uma comparação mais completa.
3. *H. b. bischoffi* e *H. guentheri* assemelham-se muito às espécies *H. pulchella*, *H. p. joaquina*, *H. caingua* e *H. prasina* do grupo *pulchella* não só quanto ao número e morfologia dos cromossomos, mas também pela presença de um mesmo marcador, um bloco de heterocromatina evidente no braço longo do par 10.
4. Os dados citogenéticos obtidos para *H. b. bischoffi* e *H. guentheri* não permitem excluir essas duas espécies do grupo *pulchella*.