

Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello

ESTUDO CITOGENÉTICO COMPARATIVO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Colostethus* (ANURA – DENDROBATIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Ana Cristina Prado
Veiga-Menoncello
e aprovada por(a) orientador(a) em _____

26/10/2000
Shirlei Maria Recco-Pimentel

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Orientador: Prof. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

UNIDADE	B.C.
N.º CHAMADA:	J/UNICAMP
	V533e
V.	Ex.
TOMBO BC/	43749
PROC.	18-392/01
C	☐
D	☒
PRECº	R\$ 11,00
DATA	13/02/01
N.º CPD	

CM-00153243-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

V533e **Veiga-Menoncello, Ana Cristina Prado**
Estudo citogenético comparativo de espécies do gênero colostethus
(Anura-Dendrobatidae/Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello. - -
Campinas, SP.
[s.n.], 2000.
75f: illus.

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

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

Data da Defesa: 26.10.2000

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel



Assinatura

Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad



Assinatura

Profa. Dra. Sanae Kasahara



Assinatura

Profa. Dra. Patricia Pasquali Parise Maltempi



Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dedico este trabalho aos
meus pais, Nelson e Rosali
e ao meu marido, Roger.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pela orientação, apoio e oportunidade, indispensáveis à realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Albertina Pimentel Lima do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela coleta dos espécimes analisados.

Aos Profs. Drs. Célio Fernando Baptista Haddad, Sanae Kasahara e Patricia Pasquali Parise Maltempi, pela análise prévia deste trabalho e pelas valiosas sugestões.

À Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pela revisão do texto em inglês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

À técnica do laboratório de Citogenética do Depto. de Biologia Celular da UNICAMP, Klélia Ap. Carvalho, pelo apoio técnico e pela amizade.

Em especial aos amigos Fernando Ananias, pelo acompanhamento inicial de minhas atividades no laboratório, Luciana Bolsoni Lourenço, pelas valiosas discussões e sugestões aplicadas a este trabalho e Odair Aguiar Júnior, pelas contribuições, discussões e apoio sempre presentes.

Aos colegas do laboratório de Citogenética do Depto. de Biologia Celular da UNICAMP, Luciana, Lilian, Cristina, Marta, Klélia, Odair, Fernando, Maurício, Alexandre e Sérgio, pelo agradável convívio, amizade e boas risadas.

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

À amiga de graduação e pós-graduação, Glaucia Monteiro de Castro.

Aos colegas de pós graduação do Depto. de Biologia Celular da UNICAMP.

Aos funcionários do Depto. de Biologia Celular da UNICAMP, em especial à secretária Lilian, pela eficiência e auxílio prestado durante e na finalização deste trabalho.

Ao meu marido Roger, meus pais Nelson e Rosali e ao meu irmão José Augusto, que sempre me apoiaram e incentivaram nesta etapa da minha vida.

À minha amiga Inês Cristina Castelan, pela amizade e incentivo.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

SUMÁRIO

ABSTRACT	9
RESUMO	11
I – INTRODUÇÃO	13
1.1. A Classe Amphibia e a Ordem Anura: aspectos gerais.....	13
1.2. A Família Dendrobatidae.....	14
1.2.1. Citogenética da Família Dendrobatidae.....	17
1.3. Região Organizadora do Nucléolo.....	18
1.4. Heterocromatina.....	19
II – OBJETIVOS	22
III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
IV – ARTIGO I	29
Resumo.....	31
Introdução.....	31
Materiais e Métodos.....	33
Resultados.....	34
Discussão.....	35
Referências Bibliográficas.....	38
Legendas das Figuras.....	42
Figuras.....	43
V – ARTIGO II	45

Resumo.....	47
Introdução.....	47
Materiais e Métodos.....	49
Resultados.....	50
Discussão.....	52
Referências Bibliográficas.....	58
Legendas das Figuras.....	64
Figuras.....	66
 VI – CONCLUSÕES GERAIS.....	 73

ABSTRACT

The genus *Colostethus* is composed of a great number of species, which are characterized by a brownish color and the fact that they are not poisonous. When compared to the other genera of the Dendrobaidae family, *Colostethus* is not highly specialized and has the largest chromosome number known for the family ($2n = 24$). Karyotypical data of the family indicate a tendency to reduce the chromosome number, however the intrageneric relationships and the family origin are still disputed.

The few cytogenetic studies of dendrobatids have been restricted to the number and chromosome morphology. In this work, a karyotypical analysis of 4 Brazilian Amazonian *Colostethus* species was made, 3 species being of the *marchesianus* group, in which we described for the first time, the heterochromatic patterns and nucleolus organizer regions (NOR) of this genus.

Colostethus stepheni shows $2n = 24$ chromosomes, like all the other species of this genus that are described in the literature. The *Colostethus stepheni* karyotype differs from the other species of this genus in the morphology of some chromosome pairs and in the localization of the secondary constriction. The bimodal structure of the karyotype and the presence of a large first metacentric pair are common characteristics of the dendrobatids. These species have only one NOR pair, localized in the pericentromeric region of the chromosome, coincident with the secondary constriction and with a constitutive heterochromatin block. Heteromorphism of the NOR size was detected in some specimens and the constitutive heterochromatin were located in centromeric regions of all the chromosomes.

The three species of *marchesianus* group, *Colostethus caeruleodactylus*, *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*) and *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*) differ from *Colostethus stepheni* and from the other *Colostethus* species karyotyped, because they show $2n = 22$ chromosomes, revealing a new chromosome number for the genus. In the Dendrobatidae family, intrageneric variability of the chromosome number was described only in *Dendrobates*, in which species with $2n = 18$ or 20 chromosomes were found.

The karyotypes of the three species are similar, with small differences in the morphology of some chromosome pairs. However, these species can easily be differentiated from each other, by NOR localization and by the constitutive heterochromatin distribution pattern. The NOR is localized on the long arm of pair 4 in *C. caeruleodactylus*, on the short arm of pair 8 in *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*) and on the short arm of pair 7 in *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*). Heteromorphisms in the sizes of the NORs were observed in these last species. In *C. caeruleodactylus*, an additional NOR site on the interstitial region of the long arm of one homologue of pair 1, was detected. Exclusively in *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*), the secondary constriction did not indicate the nucleolus organizer region, being characterized by the presence of a constitutive highly stained heterochromatin, located adjacent to the NOR. In situ hybridization with rDNA probe has confirmed the localization of all the NORs detected by silver impregnation. However, an additional marking on the long arm of pair 5 in one specimen of *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*), undetected by AgNOR, was also observed, indicating the presence of homologous sequences in rDNA on this region.

Despite the differences found in the distribution pattern of the constitutive heterochromatin, a small band was detected on the long arm of pair 7 in the three species. This heterochromatin can be considered as indicative of the *Colostethus* of *marchesianus* group.

Colostethus caeruleodactylus, *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*) and *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*) show the same chromosome number and karyotypical similarity, but differ in both their NOR and C-band patterns. It is possible that chromosome rearrangements, such as translocations and addition of heterochromatic blocks, transformation of euchromatic segments to heterochromatic ones and concerted evolutions of multiple heterochromatic sites may be involved in the differentiation of these species.

The chromosome number reduction from 24 to 22, seems to be a characteristic of the *marchesianus* group *Colostethus*, and may have involved more than one type of chromosome rearrangement, because there are no direct evidences that fusion and fission are, themselves, responsible for the karyotype presently found in this group.

RESUMO

O gênero *Colostethus* é composto por um grande número de espécies, que se caracterizam por exibir uma coloração parda e não apresentar toxinas na pele. Quando comparado aos outros gêneros da Família Dendrobatidae, *Colostethus* possui características menos especializadas e o maior número cromossômico conhecido para a família ($2n = 24$). Dados cariotípicos obtidos para os gêneros desta família indicam uma tendência à diminuição do número cromossômico, porém as relações intergenéricas e a origem desta família ainda é controversa.

Os poucos estudos citogenéticos existentes para dendrobatídeos restringem-se apenas à determinação do número e morfologia cromossômica. Neste trabalho, foi realizada a análise cariotípica de 4 espécies de *Colostethus* da Amazônia brasileira, sendo três delas do grupo *marchesianus*, e descrevemos pela primeira vez os padrões de heterocromatina e região organizadora do nucléolos (NOR) para o gênero.

Colostethus stepheni apresenta número diplóide $2n = 24$ cromossomos, à semelhança de todos os outros *Colostethus* descritos na literatura. O cariótipo de *Colostethus stepheni* difere do de outras espécies do gênero, tanto na morfologia de alguns pares cromossômicos, quanto na localização da constrição secundária. A estrutura bimodal do cariótipo e a presença do par 1 metacêntrico grande são características comuns aos dendrobatídeos em geral. Esta espécie possui apenas um par de NOR localizado na região pericentromérica dos cromossomos 1, coincidente como uma constrição secundária e com um bloco de heterocromatina constitutiva. Heteromorfismo de tamanho de NOR foi detectado em alguns indivíduos e a heterocromatina constitutiva foi localizada nas regiões centroméricas de todos os cromossomos.

As três espécies do grupo *marchesianus*, *Colostethus caeruleodactylus*, *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*) e *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*), diferem de *C. stepheni* e das demais espécies de *Colostethus* cariotipadas por apresentarem $2n = 22$ cromossomos, revelando, assim, um novo número cromossômico para o gênero. Na Família Dendrobatidae, variabilidade intragenérica no número de cromossomos foi descrita apenas em *Dendrobates*, sendo encontradas espécies com $2n = 18$ ou 20 cromossomos.

Os cariótipos das três espécies são semelhantes, com pequenas diferenças na morfologia de alguns pares cromossômicos. Porém, essas espécies podem ser facilmente distinguidas entre si, também pela localização da NOR e pelo padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva. A NOR está localizada no braço longo de par 4 em *C. caeruleodactylus* e no braço curto do par 8 em *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*) e do par 7 em *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*). Heteromorfismos de tamanho de NOR foram observados nessas duas últimas espécies. Em *C. caeruleodactylus*, foi detectada uma NOR adicional na região intersticial do braço longo de um dos homólogos do par 1. Somente em *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*), a constrição secundária não foi indicadora da região organizadora do nucléolo, sendo caracterizada pela presença de uma heterocromatina constitutiva fortemente corada, localizada adjacente à NOR. A hibridação *in situ* (FISH) com sonda de rDNA confirmou a localização de todas as NORs, detectadas pela impregnação por prata, porém uma marcação adicional no braço longo do par 5 em um indivíduo de *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*), não detectada por AgNOR, também foi observada, indicando a presença de seqüências homólogas ao rDNA nesta região.

Apesar das diferenças encontradas no padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva, uma pequena banda no braço longo do par 7 foi detectada nas três espécies, podendo esta heterocromatina ser considerada marcadora para os *Colostethus* do grupo *marchesianus*.

Considerando-se que *Colostethus caeruleodactylus*, *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*) e *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*) apresentam o mesmo número cromossômico e similaridade cariotípica, mas diferenças no padrão de NOR e de banda C, é possível que rearranjos cromossômicos, como translocações e eventos como adição de blocos heterocromáticos, transformação de segmentos eucromáticos em heterocromáticos e a evolução em conjunto de múltiplos sítios heterocromáticos, possam estar envolvidos na diferenciação destas espécies.

A redução do número cromossômico de 24 para 22 parece ser uma característica do grupo de *Colostethus marchesianus* e deve ter envolvido mais de um tipo de rearranjo cromossômico, já que não há evidências diretas de que fenômenos de fissão e fusão, por si só, sejam responsáveis pelo cariótipo atualmente encontrado nesse grupo.

I – INTRODUÇÃO

1.1. A Classe Amphibia e a Ordem Anura: aspectos gerais

O grupo basal dos vertebrados terrestres é a classe Amphibia, cuja denominação (*Amphi*, dual + *bios*, vida) indica, corretamente, que a maioria das espécies pertencentes a esta classe vive parcialmente na água e parcialmente na terra (Storer *et al.*, 1989; Romer & Parsons, 1985).

A Classe Amphibia está dividida em três Subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (Duellman & Trueb, 1986).

Com relação à Subclasse Lissamphibia, acredita-se que tenha surgido no período Jurássico da era Mesozóica, há cerca de 200 milhões de anos. Esta Subclasse expandiu-se rapidamente e, atualmente, apresenta cerca de 4000 espécies distribuídas em três ordens viventes: Anura, representada pelos sapos, rãs e pererecas; Urodela, representada pelas salamandras, e Gymnophiona, representada por anfíbios vermiformes cavadores (Duellman & Rodríguez, 1994; Duellman & Trueb, 1986; Storer *et al.*, 1989; Romer & Parsons, 1985).

Os Anura são os anfíbios mais bem sucedidos, estando divididos em 29 famílias (Frost, 1999), com mais de 4200 espécies que habitam todos os continentes, com exceção dos pólos, algumas ilhas oceânicas e regiões desérticas. Cerca de 1600 dessas espécies vivem na América do Sul e, principalmente, na Amazônia e nas florestas tropicais úmidas, sendo que em nenhuma outra parte do mundo há uma fauna tão diversificada. Os Anura diferem dos outros anfíbios por serem especializados para saltar. Esta especialização inclui um encurtamento do corpo, ausência de cauda e presença de poderosos membros posteriores (Duellman & Rodríguez, 1994; Zug, 1993).

Diferente de muitos animais terrestres como salamandras, cobras e mamíferos, os anuros não são conhecidos por deixar rastro de odor para marcar território e identificar possíveis companheiros. Portanto, os Anura, assim como os pássaros, anunciam sua presença através do som. De maneira geral, o encontro entre machos e fêmeas é feito por orientação sonora. Algumas espécies de anfíbios anuros produzem sons variados, sendo o mais comum o

canto de anúncio, para atrair fêmeas, cantos territoriais que são reconhecidos por outros machos e cantos de combate que são produzidos durante interações entre machos (Duellman & Rodríguez, 1994). O canto é bastante diversificado entre as espécies, sendo que suas características auxiliam na identificação da espécie, bem como na determinação do sexo do animal (Lutz, 1973).

Os Anura apresentam uma diversidade de modos reprodutivos, sendo a fertilização externa a mais freqüente, exceto em *Ascaphus*, *Mertensophryne micranotis* e em algumas espécies de *Nectophrynoides* e *Eleutherodactylus*. Modos mais primitivos envolvem ovos e larvas aquáticas, porém modos mais especializados incluem deposição de ovos fora da água, mas com larvas aquáticas, ovos terrestres, ovoviviparidade e viviparidade (Duellman & Rodríguez, 1994; Duellman & Trueb, 1986).

Muitas espécies de anuros exibem um cuidado parental, seja vigiando ninhos ou transportando ovos e girinos para água, sendo que este tipo de comportamento pode ser realizado de maneira maternal, paternal ou biparental (Beck, 1998).

1.2. A Família Dendrobatidae

A Família Dendrobatidae é composta por seis gêneros, sendo: *Aromobates*, *Dendrobates*, *Epipedobates*, *Minyobates*, *Phyllobates* e *Colostethus*, os quais possuem um total de mais de 150 espécies (Ford, 1993) distribuídas nas regiões tropical e subtropical úmidas da Nicarágua, até a Bolívia e o sudeste do Brasil (Duellman & Trueb, 1986).

Vários dendrobatídeos são conhecidos por suas brilhantes cores de advertência (aposemática) e pela presença de alcalóides tóxicos na pele de alguns de seus membros (Ford, 1993). Estes alcalóides têm atraído a atenção de pesquisas biomédicas, devido aos seus diversos efeitos nos tecidos muscular e nervoso (Myers & Daly, 1983). Algumas tribos indígenas da América do Sul utilizam as toxinas liberadas pelas glândulas da pele destes animais, com a finalidade de preparar suas flechas e zarabatanas para a caça.

Os dendrobatídeos possuem uma complexa história de vida. Os ovos são colocados em ninhos terrestres e as larvas da maioria das espécies, são transportadas no dorso de um dos

parentais até um ambiente aquático, onde o desenvolvimento é completado (Savage, 1968; Praderio & Robinson, 1990). Em muitas espécies, o comportamento é conhecido e inclui cuidado parental, territorialidade e até mesmo combate (Bogart, 1991).

Aromobates nocturnus (Myers *et al.*, 1991), difere das espécies dos demais gêneros por apresentar atividade noturna e aquática, um tamanho grande e não possuir alcalóides tóxicos.

Dentro da Família *Dendrobatidae*, há uma aparente progressão de espécies menos especializadas para mais especializadas, especialização esta correlacionada com cuidado parental e tamanho da desova (Savage, 1968; Bogart, 1991).

Segundo Ford (1993), *Colostethus* é o maior gênero contendo 98 espécies descritas, mas certamente muitas ainda aguardam descrição. Sua distribuição dá-se principalmente na baixa América Central e nordeste da América do Sul, Amazônia e Mata Atlântica, com algumas representações no leste dos Andes (Duellman & Trueb, 1986; Myers *et al.*, 1991;).

O gênero *Colostethus* possui características menos especializadas quando comparado a outros gêneros, pois apresenta um maior número de ovos, menor territorialidade e menor cuidado com a prole (Ver Bogart, 1991, para referências).

As espécies do gênero *Colostethus* são de coloração parda e não apresentam toxinas na pele (Duellman & Simmons, 1988), com exceção de *Colostethus inguinalis*, uma espécie do Panamá, na qual Daly *et al.* (1994) detectaram a presença de uma toxina chamada tetrodotoxina. Membros deste gênero parecem não produzir nem sequestrar nenhum dos alcalóides lipofílicos, característica esta que define as linhagens dos gêneros *Epipedobates*, *Dendrobates*, *Minyobates* e *Phyllobates*.

A ausência de uma defesa química tem sido considerada uma característica primitiva em *Colostethus*, mas a descoberta de um dendrobatídeo primitivo (*Aromobates*), que possui uma secreção volátil defensiva, tem levantado a possibilidade de que a perda de alguma defesa química primitiva pode ser uma característica derivada de *Colostethus* (Myers *et al.*, 1991).

O grupo ancestral que teria originado os *Dendrobatidae* permanece ainda indefinido. Alguns autores consideram a família mais próxima aos *Leptodactylidae* da América do Sul, relacionada ao gênero *Hylodes* (Noble, 1931; Lynch, 1971 e Ardila-Robayo, 1979), e outros aos *Ranidae* africanos (Griffiths, 1959, 1963).

A filiação dos dendrobatídeos com os ranídeos ou leptodactilídeos depende das características analisadas, uma vez que Ford (1993), através de análises baseadas em caracteres osteológicos, afirma que os dendrobatídeos são uma unidade monofilética e que estão estritamente relacionados como os ranídeos. No entanto, Morescalchi (1973) descreveu os cromossomos dos dendrobatídeos como sendo do tipo dos leptodactilídeos e, também, levantou a hipótese de que todos os neobatrâquios, incluindo os ranídeos, são derivados de um “estoque” leptodactilídeo. Hay *et al.* (1995), através de estudos moleculares com DNA mitocondrial, mostraram que os dendrobatídeos estão associados em 92% com os leptodactilídeos e excluídos do grupo dos ranídeos em 99%.

Na Amazônia, o gênero *Colostethus* é constituído por um complexo de espécies morfologicamente semelhantes. Muitas destas espécies ainda não foram descritas, sendo, portanto, agrupadas e consideradas como pertencentes a um grupo de espécies denominado *marchesianus*. Nesse grupo, há muitas espécies em descrição e outras que apresentam dificuldades de identificação (M. Martins, com. pessoal).

Uma das espécies em estudo é: *Colostethus stepheni*, que apresenta um tamanho pequeno, sendo de 15,2 a 16,5 mm para os machos e de 17,0 a 18,0 mm para as fêmeas. Quanto a sua coloração, o exemplar vivo possui dorso castanho claro, com pequenas manchas irregulares mais escuras e pouco distintas, faixa dorsolateral creme, desde os olhos até a região inguinal, sobre outra faixa castanho escura (Martins, 1989).

Colostethus stepheni vive no chão da floresta, onde vocaliza e se reproduz. O período de reprodução corresponde à estação chuvosa, que normalmente é iniciada em novembro e se estende até maio (Juncá, 1996).

De acordo com as observações de Juncá *et al.* (1994), *C. stepheni* possui um modo reprodutivo diferente dos demais dendrobatídeos, pois mostrou completo desenvolvimento terrestre, dependente apenas da umidade do folheto, portanto não havendo necessidade dos girinos serem transportados por um dos parentais para ambientes aquáticos, para completarem seu desenvolvimento. Enquanto o cuidado parental em outras espécies desta família termina após a deposição dos girinos na água, em *C. stepheni* este é contínuo e proporcionado pelo macho até o final da metamorfose.

As outras três espécies do gênero *Colostethus* analisadas no presente trabalho, pertencentes ao grupo *marchesianus*, são morfologicamente semelhantes, porém diferem entre si no tamanho, coloração e canto. Indivíduos adultos de *Colostethus caeruleodactylus* caracterizam-se por apresentarem tamanho pequeno (15,0 – 16,3 mm) e os dedos das mãos e discos das mãos e pés, azuis. *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) apresenta um tamanho intermediário (18 mm) e o dorso castanho claro, enquanto *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) possui o dorso castanho escuro e um tamanho maior (19,5 mm), quando comparado às outras duas espécies (Lima & Caldwell, 2000).

1.2.1. Citogenética da Família Dendrobatidae

Os poucos estudos citogenéticos realizados nesta família, presentes na literatura, restringem-se apenas à determinação do número e à análise da morfologia cromossômica. Estudos sobre a distribuição e tipos de heterocromatina, assim como da posição da região organizadora do nucléolo (NOR), são escassos.

Duellman (1967) descreveu pela primeira vez o número cromossômico de duas espécies da família Dendrobatidae (*Dendrobates pumilio*, $2n = 20$ e *Colostethus inguinalis*, $2n = 24$). Outras espécies de *Colostethus*, *Epipedobates*, *Minyobates*, *Dendrobates* e *Phylllobates*, tiveram seus cariótipos analisados por Rada de Martínez (1976), Rasotto *et al.* (1987) e Bogart (1991).

Dados cariotípicos desta família indicam uma tendência à diminuição do número cromossômico de $2n=24$ para $2n=18$. Bogart (1991) sugere que o número cromossômico $2n=24$ seja o ancestral nos dendrobatídeos e que a variação cromossômica esteja relacionada à história de estratégia de vida, uma vez que o gênero *Colostethus*, além de apresentar $2n=24$, é considerado, também, o menos especializado quando comparado à *Dendrobates*, que apresenta $2n= 20$ ou 18 , e é o gênero mais especializado da Família Dendrobatidae.

1.3. Região Organizadora do Nucléolo – NOR

Os organizadores nucleolares são sítios cromossômicos de genes para RNA ribossomal (rRNA), que são sintetizados e processados formando pré-ribossomos no nucléolo, e que, posteriormente, tornam-se parte de ribossomos maduros no citoplasma. Estes sítios são segmentos cromossômicos, de cuja atividade se origina o nucléolo (Sumner, 1990).

Os métodos de coloração para a NOR têm evoluído da complexidade para a simplicidade. A técnica original de Howell *et al.* (1975) envolve diversos estágios como: fixação dos cromossomos com formalina, tratamento com uma solução pré-corante de prata amoniacal, um tratamento com hidróxido de sódio diluído, e finalmente, a coloração com uma mistura de formalina e prata amoniacal. Goodpasture & Bloom (1975) publicaram, no mesmo ano, uma técnica que envolve a utilização de nitrato de prata a 50%, colocado sobre a preparação cromossômica, coberto com laminula e exposto a uma lâmpada. Em seguida, os cromossomos recebem uma mistura de prata amoniacal e formalina. Variações desta técnica foram publicadas posteriormente por outros pesquisadores. Uma alternativa proposta para a coloração de prata foi dada por Olert (1979), que misturou uma solução de prata a 50% com ácido fórmico diluído e incubou as lâminas nesta solução. Este procedimento foi modificado por Howell & Black (1980), que fizeram uma solução coloidal reveladora ao adicionar ácido fórmico a uma solução de gelatina diluída. Este revelador coloidal foi misturado com uma solução de nitrato de prata imediatamente antes do uso, sendo, então, as lâminas incubadas em uma estufa.

A especificidade pela prata dá-se em razão da reação desta com as proteínas acídicas, associadas ao rRNA recém-transcrito (Howell, 1977; Schwarzacher *et al.*, 1978). Portanto, apenas as NORs que estiverem ativas no ciclo celular anterior serão evidenciadas pelo método.

Freqüentemente, as NORs aparecem na mesma posição onde se encontra a constrição secundária (Schwarzacher & Wachtler, 1993).

A localização e o número da NOR podem variar entre famílias, gêneros e até mesmo espécies (Schmid, 1978; Batistic, 1989), sendo, portanto, uma característica a ser considerada em estudos citogenéticos comparativos.

Segundo King (1991), aproximadamente 837 anuros foram analisados cariotipicamente, sendo 252 caracterizados por algum tipo de bandamento. Entretanto, apenas 92 espécies foram analisadas pelo método Ag-NOR ou por hibridação *in situ*, com sondas de rDNA 18S + 28S. Atualmente, muitas outras espécies de anuros encontram-se citogeneticamente estudadas, o que pode contribuir para o entendimento das relações filogenéticas e taxonômicas.

1.4. Heterocromatina

O termo heterocromatina foi criado por Heitz em 1928, para denominar e descrever segmentos cromossômicos, ou, em alguns casos, cromossomos inteiros que se mantinham em estado condensado durante toda a intérfase. A definição proposta por Heitz foi inteiramente baseada em análises morfológicas (John, 1988).

Ris & Korenberg (1979) mostraram, através de estudos autoradiográficos, que a síntese de RNA é possível apenas na cromatina difusa, sendo então a cromatina condensada transcricionalmente inativa.

A cromatina condensada pode ser classificada em diferentes formas, dependendo do tipo de condensação envolvido: eucromatina condensada, heterocromatina facultativa e heterocromatina constitutiva. A eucromatina condensada envolve a inativação de uma fração cromossômica em uma determinada geração celular, porém esta inativação é reversível. A eucromatina condensada pode ser diferenciada da heterocromatina em microscopia de luz, entretanto em microscopia eletrônica elas apresentam a mesma densidade. Heterocromatina facultativa refere-se à eucromatina que sofreu inativação e condensação no início do desenvolvimento do organismo, e permanece inativada por muitas gerações celulares em todos os tecidos somáticos. A heterocromatina constitutiva é aquela que ocorre em posições idênticas de cromossomos homólogos. Essa heterocromatina corresponde àquelas regiões condensadas observadas por Heitz (ver revisão de John, 1988).

A heterocromatina constitutiva é predominantemente constituída por uma sequência de DNA altamente repetitivo e não codificador (John, 1988; Sumner, 1994). Pardue & Henning

(1990) referem-se à heterocromatina como “artigo de colecionadores”, tendo valor apenas para quem entende e conhece suas funções, uma vez que muitos pesquisadores a consideravam como “DNA lixo”, devido à inexistência de genes. Entretanto, muitos genes têm sido descritos na heterocromatina de *Drosophila melanogaster*, embora a densidade destes genes seja muito menor do que na eucromatina (Hilliker *et al.*, 1980). Porém, Sumner (1990) sugere que estes genes possam estar contidos em pequenos segmentos de eucromatina, dentro de regiões heterocromáticas.

Segundo King (1991), a heterocromatina desempenha um importante papel, protegendo os sítios eucromáticos adjacentes de modificações estruturais por recombinação, uma vez que diminui a formação de quiasmas. Porém, John (1988) afirma que algumas categorias de heterocromatina permitem recombinação, enquanto outras não. Hawley *et al* (1993) defendem o pareamento meiótico de seqüências heterocromáticas homólogas localizadas em cromossomos homólogos ou não. Outros papéis já foram propostos para a heterocromatina, como a inativação de genes localizados muito próximos (Reuter & Spierer, 1992).

Em estudos citogenéticos, a heterocromatina constitutiva tem sido comumente evidenciada através da técnica de bandamento C. Além disso, técnicas de citogenética molecular como, bandamento por enzimas de restrição, fluorocromos e hibridação *in situ* também podem ser utilizadas.

O bandamento C foi descoberto acidentalmente por Pardue & Gall em 1970. Eles sugeriram que as regiões de banda C eram quase que exclusivamente sítios de DNA altamente repetitivo (DNA satélite). Seqüências de DNA altamente repetitivo têm sido localizadas nas regiões de banda C em uma grande variedade de espécies. Embora exista uma associação entre DNA altamente repetitivo e banda C, há situações em que este tipo de DNA não é encontrado em regiões evidenciadas pela técnica de bandamento C (Sumner, 1990).

O processo químico que explica o bandamento C foi inicialmente descrito por Holmquist (1979), o qual envolve três passos: um tratamento preliminar com ácido hidrocloreídrico, que causa uma despurinação do DNA; um tratamento alcalino que causa quebra dos sítios apurínicos, assim como a desnaturação irreversível do DNA; e um tratamento salino que promove a remoção do DNA despurinado. Acredita-se que a extração do

DNA das regiões de heterocromatina constitutiva ocorra de forma mais lenta, porém não se conhece a razão pela qual as regiões não banda C são preferencialmente extraídas.

O bandamento C é importante para a identificação de cromossomos de plantas e insetos, assim como de anfíbios, uma vez que os bandamentos G, R e Q são empregados satisfatoriamente apenas em vertebrados superiores. As características do bandamento C, que auxiliam na identificação dos cromossomos, são o tamanho e a localização das bandas, sendo que estas são normalmente encontradas nas regiões centroméricas, podendo também serem localizadas nas regiões teloméricas, adjacentes às regiões organizadoras do nucléolo e intersticiais dos cromossomos (Sumner, 1990; 1994).

Sumner (1990) relata, ainda, que cromossomos que não apresentam bandas C são raros e, provavelmente, não ocorram em cariótipos normais.

Várias espécies de diferentes famílias de Archaeobatrachia foram submetidas ao bandamento C e verificou-se uma quantidade relativamente pequena de heterocromatina constitutiva neste grupo de anuros. Por outro lado, espécies pertencentes a algumas famílias de Neobatrachia, quando analisadas através da técnica de bandamento C, revelaram uma enorme diversidade interespecífica, tanto em quantidade, quanto em distribuição de heterocromatina constitutiva, sendo, portanto, muito diferente do padrão encontrado para os Archaeobatrachia (King, 1991).

Três processos gerais são sugeridos por King (1991), para indicar a evolução da heterocromatina no genoma de anfíbios, sendo eles: a adição de heterocromatina a sítios cromossômicos específicos, a transformação de regiões cromossômicas eucromáticas em regiões heterocromáticas e a evolução combinada de sítios heterocromáticos múltiplos.

A utilização da técnica de bandamento C em estudos citogenéticos é de grande importância, uma vez que detecta a presença de heterocromatina constitutiva, e este caracter pode fornecer informações úteis para o entendimento das relações filogenéticas do grupo em estudo.

II - OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo comparar citogeneticamente diferentes espécies do gênero *Colostethus*, a fim de contribuir com dados para a taxonomia, entendimento das relações filogenéticas e origem desta família.

III - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDILA-ROBAYO, M. C. Status sistematico del genero *Geobatrachus* (Ruthven 1915) (Amphibia , Anura), **Caldasia** **12**: 383-495, 1979.
- BATISTIC, R. F. Aspectos Citogenéticos da Evolução de *Phyllomedusa* (Anura, Amphibia). Tese de Doutorado. F. M. USP – Ribeirão Preto – SP, 1989.
- BECK, C. W. Mode of fertilization and parental care in anurans. **Anim. Behav.** **55**: 439-449, 1998.
- BOGART, J. P. The Influence of Life History on Karyotypic Evolution in Frogs. In: Green, D. M. & Sessions, S. K., eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego, pp. 233-258, 1991.
- DALY, J. W.; GUSOVSKY, F.; MYERS, C. W.; YOTSU-YAMASHITA, M.; YASUMOTO, T. First occurrence of tetrodotoxin in a dendrobatid frog (*Colostethus inguinalis*), with further reports for the bufonid genus *Atelopus*. **Toxicon** **32**: 279-285, 1994.
- DUELLMAN, W. E. Additional studies of chromosomes of Anuran Amphibians. **Syst. Zool.** **16**: 38-43, 1967.
- DUELLMAN, W. E.; RODRÍGUEZ, L. O. In: **Guide to the Frogs of the Iquitos Region, Amazonian Peru**. University of Kansas Printing Service Lawrence, Kansas. 1994.
- DUELLMAN, W. E.; SIMMONS, J. E. Two news species of dendrobatid frogs, genus *Colostethus* from the Cordillera del Cóndor, Ecuador. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia** **140**: 115-124, 1988.

- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. In: **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill. New York, 1986.
- FORD, L. The phylogenetic position of the dart-poison frogs (Dendrobatidae) among anurans: An examination of the competing hypothesis and their characters. **Ethol. Ecol. Evol.** **5**: 219-231, 1993.
- FROST, D. R. Amphibian species of the world (on line). Ver. 2.1. November, 1999. American Museum of Natural History, New York, New York, U.S.A. 1999. <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>
- GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in Mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** **53**: 37-50, 1975.
- GRIFFITHS, I. The phylogeny of Salientia. **Biol. Rev.** **38**: 241-292, 1963.
- GRIFFITHS, I. The phylogeny of *Sminthillus limbatus* and the status of the Brachycephalidae (Amphibia). **Proc. Zool. Soc. London.** **132**: 457-489, 1959.
- HAWLEY, R. S.; IRICK, H.; ZITRON, A. E.; HADDOX, D. A.; LOHE, A.; NEW, C.; WHITLEY, M. D.; ARBEL, T.; JANG, J.; McKIM, K.; CHILDS, G. There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila*, one of which requires heterochromatic homology. **Dev. Genet.** **13**: 440-467, 1993.
- HAY, J. M.; RUVINSKY, I.; HEDGES, B.; MAXSON, L. R. Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12 S and 16 S ribosomal RNA genes. **Mol. Biol. Evol.** **12**: 928-937, 1995.
- HEITZ, E. Das heterochromatin der moose. **I. Jabet. Wiss. Bot.** **69**: 762-818, 1928.

- HILLIKER, A. J.; APPELS, R.; SCHALET, A. The genetic analysis of *D. melanogaster* heterochromatin. **Cell** **21**:607-619, 1980.
- HOLMQUIST, G. The mechanism of C-banding: Depurination and β -elimination. **Chromosoma** **72**: 203-224, 1979.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Experientia** **36**: 1014-1015, 1980.
- HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver staining proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma** **62**: 361-367, 1977.
- HOWELL, W. M.; DENTON, T. E.; DIAMOND, J. R. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. **Experientia** **31**: 260-262, 1975.
- JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: R. S. Verma, ed., **Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects** pp. 1-128, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1988.
- JUNCÁ, F.A. Parental care and egg mortality in *Colostethus stephni*. **J. Herpetol.** **30**: 292-294, 1996.
- JUNCÁ, F. A.; ALTIG, R.; GASCON, C. Breeding biology of *Colostethus stephni*, a dendrobatid frog with a nontransported nidicolous tadpole. **Copeia** **3**: 747-750, 1994.
- KING, M. The evolution of the heterochromatin in amphibian genome. In: Green, M. G. & Sessions, S. K., eds., **Amphibian Cytogenetics and Evolution** pp. 359-391, Academic Press, San Diego, 1991.

- LIMA, A. P.; CALDWELL, J. P. A New Amazonian species of *Colostethus* with Sky Blue Digits. **Herpetologica** 2000 (no prelo).
- LUTZ, B. In: **Brazilian species of *Hyla***. University of Texas Press. Austin & London, 1973.
- LYNCH, J. D. Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. **Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ.**, **53**: 1-238, 1971.
- MARTINS, M. Nova espécie de *Colostethus* da Amazônia Central (Amphibia: Dendrobatidae). **Rev. Brasil. Biol.** **49**: 1009-1012, 1989.
- MORESCALCHI, A. Amphibia. In: Chiarelli, A.; Capanna, E., eds. **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution**. Academic Press, New York. pp. 233-248, 1973.
- MYERS, C. W. ; DALY, J. W. Dart -poison frogs. **Sci. Amer.** **248**: 120-133, 1983.
- MYERS, C. W.; PAOLILLO, A.; DALY, J. W. Discovery of a defensively malodorous and nocturnal frog in the family Dendrobatidae: Phylogenetic significance of a new genus and species from the Venezuelan Andes. **Amer. Mus. Novitates** **3002**: 2-33, 1991.
- NOBLE, G. W. In: **The Biology of the Amphibia**. McGraw-Hill, New York, 1931.
- OLERT, J. Interphase studies with a simplified method of silver staining of nucleoli. **Experientia** **35**: 283-285, 1979.
- PARDUE, M. L., GALL, J. G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science** **168**:1356-1358, 1970.
- PARDUE, M. L., HENNING, W. Heterochromatin: junk or collector's item? **Chromosoma** **100**: 3-7, 1990.

- PRADERIO, M. J.; ROBINSON, M. D. Reproduction in the toad *Colostethus trinitatus* (Anura: Dendrobatidae) in a Northern Venezuela seasonal environment. **J. Trop. Ecol.** 6: 333-341, 1990.
- RADA de MARTÍNEZ, D. Cariotipo de *Colostethus trinitatis* (Amphibia: Dendrobatidae). **Acta Biol. Venez.** 9: 213-220, 1976.
- RASOTTO, M B.; CARDELLINI, P.; SALA, M. Karyotypes of five species of Dendrobatidae (Anura: Amphibia). **Herpetologica** 43: 177-182, 1987.
- REUTER, G.; SPIERER, P. Position effect variegation and chromatin proteins. **Biossays** 14: 605-612, 1992.
- RIS, H.; KORENBERG, J. Chromosome Structure and Levels of Chromosome Organization. In: D. M. Prescott & L. Goldstein, eds., **Cell Biology: A Comprehensive Treatise** New York, 1979.
- ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. Quem é Quem Entre os Vertebrados. In: **Anatomia Comparada dos Vertebrados**. Atheneu Ed. São Paulo. 1985, pp. 29-80.
- SAVAGE, J. M. The Dendrobatid frogs of Central America. **Copeia** (4): 745-776, 1968.
- SCHMID, M. Chromosome Banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** 66: 361-368, 1978.
- SCHWARZHAHER, H. G.; MIKELSAER, A. V.; SCHNEDL, W. The nature of Ag-staining of nucleolus organizer region. Electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis. **Cytogenet. Cell Genet.** 20: 24-39, 1978.

SCHWARZAHER, H. G.; WACHTLER, F. The nucleolus . **Anat. Embryol.** **188**: 515-536, 1993.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. Classe Amphibia – Anfíbios. In: **Zoologia Geral**. Companhia Ed. Nacional. 1989, pp. 618-41.

SUMNER, A. T. C-banding and related methods. In: **Chromosome banding**. Unwin Hyman Ed. London, 1990, pp. 39-69.

SUMNER, A. T. Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem.** **38**: 91-109, 1994.

ZUG, G. R. Amphibians. In: **Herpetology – An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, Inc. Washington, DC, 1993.

IV - ARTIGO I

Caracterização Citogenética de *Colostethus stepheni* (Anura – Dendrobatidae) da Amazônia Brasileira

Ana Cristina P. Veiga¹, Albertina P. Lima² & Shirlei M. Recco-Pimentel¹

¹Departamento de Biologia Celular – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (Unicamp) 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil

²Coordenadoria de Pesquisas em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) 69011-970, Manaus, Amazonas, Brasil

Palavras – chave: cariótipo, citogenética, *Colostethus*, Dendrobatidae

Título curto: Citogenética de *Colostethus stepheni*

RESUMO:

Espécimes de *Colostethus stepheni*, provenientes da Amazônia brasileira, foram estudados citogeneticamente. O número diplóide $2n=24$, o cariótipo bimodal, com seis pares grandes e seis pares pequenos de cromossomos, e o par 1 metacêntrico grande, são características comuns de outros *Colostethus* previamente descritos e dos dendrobatídeos em geral. Porém, *C. stepheni* difere de outras espécies do gênero quanto à morfologia de alguns cromossomos e à localização de constrições secundárias. *C. stepheni* apresenta apenas um par de NOR, localizado na região pericentromérica dos cromossomos 1, coincidente com uma constrição secundária e com um bloco de heterocromatina banda C positivo. Em alguns indivíduos, foi detectado heteromorfismo de tamanho de NOR. Heterocromatina foi localizada nas regiões centroméricas de todos os cromossomos. Dados de heterocromatina e de NOR são descritos pela primeira vez para o gênero *Colostethus*.

INTRODUÇÃO:

Os anuros correspondem a grande maioria das espécies de anfíbios viventes. Eles são encontrados no mundo todo e ocupam uma grande variedade de habitats, com exceção dos pólos, algumas ilhas oceânicas e regiões desérticas (Duellman & Trueb, 1986; Hillis, 1991). Entretanto, apesar do grande número de espécies e da diversidade de habitats, os anuros são morfologicamente conservados, sendo, então, necessária a utilização de outras metodologias, como a análise citogenética, a fim de contribuir para a solução de problemas sistemáticos e o entendimento das relações filogenéticas deste grupo.

Poucos estudos citogenéticos foram realizados na Família Dendrobatidae (Duellman, 1967; Rada de Martínez, 1976; Rasotto *et al.*, 1987; Bogart, 1991) e estes restringem-se apenas à determinação do número e da morfologia dos cromossomos.

Colostethus stepheni Martins, 1989 é um dendrobatídeo de tamanho pequeno, com cerca de 15,2 a 18 mm, que ocorre no chão da mata. Esta espécie possui um comportamento reprodutivo diferente dos demais dendrobatídeos, pois seus girinos desenvolvem-se totalmente

em ninhos terrestres, não havendo necessidade de transportá-los a um ambiente aquático para completar seu desenvolvimento. Este comportamento é considerado derivado para a família Dendrobatidae (Juncá, 1998; Juncá *et al.*, 1994).

Neste trabalho, caracterizamos citogeneticamente a espécie *C. stepheni* e apresentamos pela primeira vez dados de bandamento C e NOR para o gênero *Colostethus*.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram analisados quatorze espécimes de *Colostethus stepheni*, sendo 5 machos e 9 fêmeas, coletados na Reserva Florestal Adolfo Ducke (RFAD), localizada a 25 km ao nordeste da cidade de Manaus, AM, Brasil, sob licença do IBAMA (02005.001367/99-58-AM).

Os espécimes testemunhos foram depositados na coleção do Museu “Professor Adão José Cardoso” da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, (ZUEC) e na coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus, Amazônia, Brasil. Os espécimes foram catalogados com os números ZUEC 11.450, 11.609, 11.612, 11.613, 11.614, 11.616, 11.619 e 11.621 e INPA 72.00, 72.01, 72.02, 72.03, 72.04 e 72.07.

As preparações cromossômicas foram obtidas através da suspensão de células do intestino e testículo de animais previamente tratados com colchicina, por no mínimo 6 horas, segundo a técnica de King & Rofe (1976) e Schmid (1978a).

As técnicas utilizadas neste estudo foram: coloração convencional com Giemsa em tampão fosfato pH 6,8; impregnação por prata (AgNOR) segundo Howell & Black (1980) e bandamento C de acordo com Sumner (1972), com algumas modificações na temperatura do $Ba(OH)_2$. Os cromossomos foram classificados segundo valores propostos por Green & Sessions (1991).

RESULTADOS:

Todos os espécimes de *Colostethus stepheni* apresentaram o mesmo número diplóide de $2n = 24$ cromossomos, sendo este confirmado pela presença de 12 bivalentes na metáfase I da meiose de gônada masculina. Nesta espécie não foram encontrados cromossomos heteromórficos.

O cariótipo de *C. stepheni* é constituído por pares metacêntricos, submetacêntricos, um par subtelocêntrico e um telocêntrico, os quais podem ser agrupados em seis pares grandes e seis pequenos, sendo, portanto, considerado um cariótipo bimodal (Figs. 1A e 2; Tabela 1).

A impregnação por prata revelou apenas um par de NOR, localizado na região pericentromérica dos cromossomos 1, coincidente com a constrição secundária, que nem sempre foi observada em metáfases coradas com Giemsa. Na população estudada, foi encontrado, ainda, um heteromorfismo de tamanho de NOR (Fig. 1C). Este heteromorfismo foi detectado também em núcleos interfásicos.

A região centromérica de todos os cromossomos apresentam grandes blocos de heterocromatina constitutiva. Na região pericentromérica do par 1, uma banda C positiva foi detectada, coincidindo com a NOR ativa evidenciada pelo método AgNOR (Fig. 1C), e outras bandas intersticiais fracamente coradas foram observadas nos braços curtos dos cromossomos 3 e 5 (Figs. 1B e 2).

DISCUSSÃO:

O número cromossômico encontrado em *Colostethus stepheni* ($2n = 24$) está de acordo com o das outras espécies deste gênero, já analisadas citogeneticamente por Bogart (1991) e Rada de Martínez (1976).

O cariótipo de *C. stepheni* é considerado bimodal, devido à presença de seis pares grandes e seis pares pequenos, assim como a maioria das espécies de *Colostethus* já descritas por Bogart (1991), com exceção de *Colostethus talamancae*, onde não ocorre uma diminuição tão abrupta dos cromossomos a partir do par sete, como indica o ideograma proposto por esse autor.

A presença do par 1 metacêntrico grande foi observada em outras espécies, pertencentes não apenas a *Colostethus*, mas também a outros gêneros da família (Bogart 1991), podendo ser considerada uma característica dos dendrobatídeos.

Quando comparamos o cariótipo de *C. stepheni* com os das demais espécies do gênero, notamos que ele difere, tanto na morfologia de alguns cromossomos, quanto na localização da constrição secundária. Por exemplo, o cariótipo de *Colostethus* sp A descrito por Bogart (1991) mostra a presença de duas constrições secundárias localizadas em pares cromossômicos diferentes, sendo uma na região pericentromérica do braço longo do par 1, como em *C. stepheni*, e a outra na região pericentromérica do braço longo do par 3.

Porém, como Bogart (1991) não utilizou nenhuma técnica de bandamento nas espécies de *Colostethus*, não podemos afirmar que na constrição encontrada na mesma região que em *Colostethus stepheni*, encontre-se a região organizadora de nucléolo (NOR), já que em algumas regiões onde a heterocromatina constitutiva está acumulada, eventualmente adquire uma aparência de constrição secundária (Schmid, 1978 a, b), mas nunca exhibe marcações pela prata, o que caracterizaria a NOR.

Segundo Schmid *et al.*, (1990) e Schmid (1982), as comparações interespecíficas demonstram que em cariótipos de espécies pertencentes ao mesmo grupo ou a grupos relacionados, as NORs detectadas pela impregnação por prata estão frequentemente localizadas nas mesmas regiões cromossômicas. Exceção a esta regra dá indício de que ocorreram rearranjos nos segmentos cromossômicos, que carregam a NOR durante a evolução

dos anuros. Além disso, diferenças no tamanho das NORs marcadas pela prata é bastante comum.

Heteromorfismos entre NORs homólogas foram determinados em um grande número de espécimes analisados por Schmid (1982). A maioria dos heteromorfismos detectados foram provenientes de duplicações ou triplicações *in tandem* das NORs. Contudo, observou-se também, mas em uma menor proporção, heteromorfismo devido a uma simples diferença entre o tamanho dos blocos corados pela prata.

Apesar da alta frequência de duplicações ou triplicações de NORs em anuros, *C. stepheni* não apresentou resultados que pudessem indicar uma clara duplicação de NOR. Sendo assim, acreditamos que o heteromorfismo encontrado nesta população deve-se apenas a uma distinção entre o tamanho dos blocos impregnados pela prata, causada por diferenças na quantidade de rDNA.

Outras causas usualmente consideradas para o desenvolvimento de NORs heteromórficas, segundo Schmid (1982), inclui deleções, além de *crossing-over* desiguais e trocas entre cromátides irmãs.

Segundo Schmid (1980b; 1982), homomorfismos ou heteromorfismos de NORs, evidenciados pela prata em cromossomos metafásicos, são expressos também em núcleos interfásicos, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

De acordo com Schmid (1980a) e Schmid *et al.* (1990), os cariótipos dos anfíbios são caracterizados por muitas regiões de heterocromatina constitutiva, sendo que nos anuros, as regiões preferencialmente heterocromáticas são as centroméricas, pericentroméricas e teloméricas, podendo ser encontradas em regiões intersticiais também.

A região organizadora do nucléolo (NOR) em *C. stepheni* é coincidente com uma banda C pericentromérica, localizada no braço longo do par 1. Esta associação de NOR e heterocromatina constitutiva já foi observada em outras espécies de anuros (Silva *et al.*, 1999; Schmid, 1982; 1978 b), porém esta associação não é obrigatória, uma vez que em outras espécies já estudadas (Schmid, 1982; Schmid, 1978 a) a região organizadora do nucléolo é adjacente a regiões de heterocromatina constitutiva. O mesmo foi observado em outras espécies do gênero *Colostethus* analisadas (Veiga *et al.*, em preparação).

Segundo King (1991), as espécies de Neobatrachia, analisadas através do método de bandamento C, mostraram uma enorme diversidade interespecífica, tanto na distribuição como na quantidade de heterocromatina dentro dos seus genomas. Em termos de variação interespecífica, é muito difícil encontrar duas espécies iguais em relação à distribuição de heterocromatina.

Os resultados de bandamento C em *C. stepheni*, aqui descritos, revelam apenas grandes blocos de heterocromatina constitutiva em todos os centrômeros e algumas bandas intersticiais, diferindo do padrão obtido para outras espécies deste gênero (Veiga *et al.*, em preparação).

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Bogart, J. P.** (1991). The influence of life history on karayotypic evolution in frogs. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution* (Green, D. M. & Sessions, S. K., eds.). Academic Press, San Diego, pp. 233-258.
- Duellman, W. E.** (1967). Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Syst. Zool.* 16: 38-43.
- Duellman, W. E. and Trueb, L.** In: *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. New York, 1986.
- Green, M. G. and Sessions, S. K.** (1991). In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, pp. 431-432.
- Hillis, D. M.** (1991). The phylogeny of amphibians: current knowledge and the role cytogenetics. In: *Amphian Cytogenetics and Evolution* (Green, D. M. & Sessions, S. K., eds.). Academic Press, San Diego, pp. 7-31.
- Howell, W. M. and Black, D. A.** (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Juncá, F. A.** (1998). Reproductive Biology of *Colostethus stepheni* and *Colostethus marchesianus* (Dendrobatidae), with the description of a new anuran mating behavior. *Herpetologica* 54: 377-387.
- Juncá, F. A., Altig, R. and Gascon, C.** (1994). Breeding biology of *Colostethus stepheni*, a Dendrobatid frog with a nontransported nidicolous tadpole. *Copeia* 3: 747-750.

- King, M.** (1991) Evolution of heterochromatin in the Amphibia genome. (Green, M. G. & Sessions, S. K., eds.) In: *Amphian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego. pp. 359-391.
- King, M., and Rofe, R.** (1976). Karyotypic variation in the Australian Gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma* 54: 75-87.
- Martins, M.** (1989). Nova espécie de *Colostethus* da Amazônia central (Amphibia: Dendrobatidae). *Rev. Brasil. Biol.* 49: 1009-1012.
- Rada de Martínez, D.** (1976). Cariotipo de *Colostethus trinitatis* (Amphibia: Dendrobatidae). *Acta Biol. Venez.* 9: 213-220.
- Rasotto, M. B., Cardellini, P. and Sala, M.** (1987). Karyotypes of five species of Dendrobatidae (Anura: Amphibia). *Herpetologica* 43: 177-182.
- Schmid, M. , Steinley, C. Nanda, I and Epplen, J. T.** (1990). Chromosome banding in Amphibia. In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. (Olmo, E., ed.) Birkhäuser Verlag Basel, Berlin, pp. 21-45.
- Schmid, M.** (1982). Chromosome banding in amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-344.
- Schmid, M.** (1980a). Chromosome banding in amphibia IV. Differentiation of CG- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103.
- Schmid, M.** (1980b). Chromosome banding in amphibia V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Chromosoma* 80: 69-96.

- Schmid, M.** (1978a). Chromosome banding in amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-368.
- Schmid, M.** (1978b). Chromosome banding in amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma* 68: 131-148.
- Silva, A. P. Z., Haddad, C. F. B. and Kasahara, S.** (1999) Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas* 131: 135-141.
- Sumner, A. T.** (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

Tabela 1 – Dados morfométricos de cromossomos mitóticos de *Colostethus stepheni*.
(Classificação segundo Green & Sessions, 1991).

Nº de cromossomos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TR %	17,888	13,752	12,645	11,979	10,740	9,894	5,297	4,582	4,077	3,717	3,375	2,088
IC	0,437	0,396	0,238	0,333	0,367	0,369	0,464	0,458	0,474	0,467	0,455	-
PC	M	M	ST	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	T

TR = tamanho relativo; **IC** = índice centromérico; **PC** = posição do centrômero, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico e T = telocêntrico.

LEGENDA DAS FIGURAS

Fig. 1. Cariótipo de *C. stepheni*. **A-** corado com Giemsa; **B-** submetido ao bandamento C; as setas indicam bandas intersticiais fracamente coradas; **C-** Pares cromossômicos nº 01, submetidos seqüencialmente ao bandamento C e à impregnação por prata; a ponta de seta indica banda C positiva na porção pericentromérica. As setas indicam a NOR coincidente com a banda C e a NOR levemente heteromórfica. Barra = 10µm.

Fig. 2 Ideograma representativo do cariótipo de *C. stepheni*. Os setores escuros representam blocos de heterocromatina constitutiva fortemente corados; setores cinza, blocos de heterocromatina constitutiva fracamente corados e os círculos cinza indicam a NOR. O parêntese indica marcação heteromórfica.

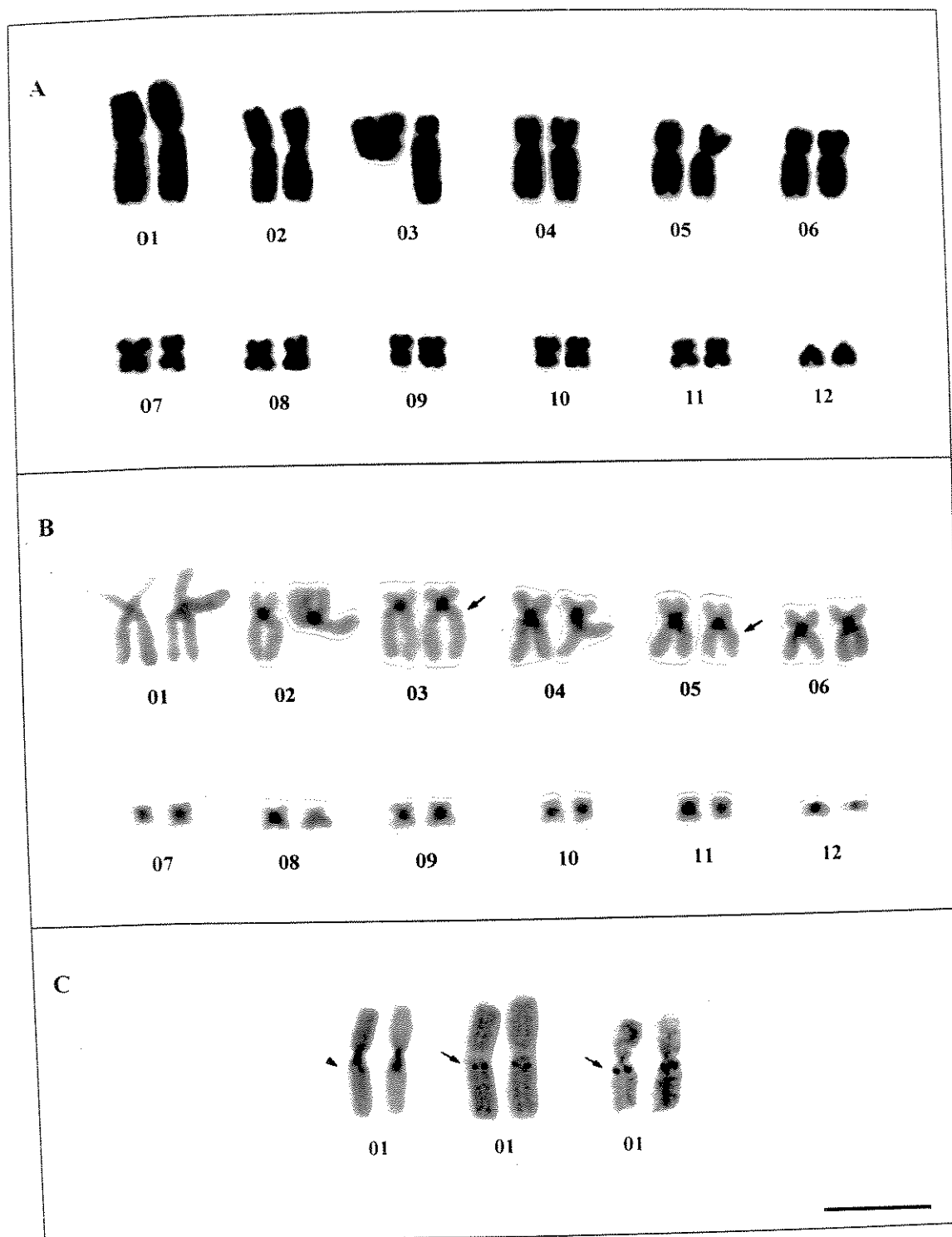


Fig. 1

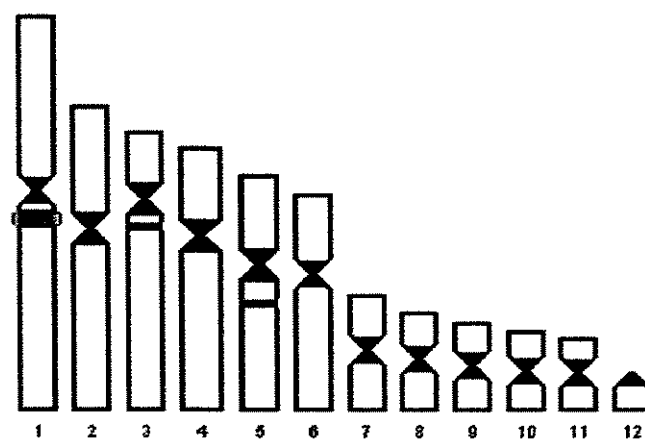


Fig. 2

V - ARTIGO II

Citogenética de três espécies de *Colostethus* do grupo *marchesianus* (Anura, Dendrobatidae), com descrição de um novo número cromossômico.

Ana Cristina P. Veiga¹, Albertina P. Lima² & Shirlei M. Recco-Pimentel¹

¹Departamento de Biologia Celular – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, (Unicamp) 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil

²Coordenadoria de Pesquisas em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) 69011-970 Manaus, Amazonas, Brasil

Palavras – chave: cariótipo, citogenética, *Colostethus*, Dendrobatidae

Título curto: Citogenética de *Colostethus*

RESUMO

A análise citogenética de três espécies do grupo de *Colostethus marchesianus* da Amazônia brasileira, revelou um novo número cromossômico para o gênero. *Colostethus caeruleodactylus*, *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) apresentam um complemento diplóide de $2n = 22$ cromossomos, diferindo de todos os *Colostethus* já analisados que apresentam $2n=24$ cromossomos. As três espécies são morfologicamente semelhantes e apresentam cariótipos bastante conservados, mas podem ser distinguidas entre si por diferenças na morfologia de alguns cromossomos, pela localização de regiões organizadoras de nucléolo (NOR) e pela distribuição de heterocromatina. NORs adicionais, heteromorfismos de NOR e de heterocromatina e seqüências adicionais homólogas de DNAr foram detectados nos cariótipos dessas espécies. Os dados sugerem que rearranjos cromossômicos, como inversões e translocações, podem ter contribuído para a diferenciação desses cariótipos.

INTRODUÇÃO

Atualmente, seis gêneros são considerados pertencentes à família Dendrobatidae (Ford, 1993), sendo que *Colostethus* é o maior deles, com 99 espécies descritas (Frost, 1999), mas, certamente, muitas espécies ainda aguardam descrição. Sua distribuição dá-se, principalmente, na baixa América Central, nordeste da América do Sul, Amazônia e Mata Atlântica, com algumas representações no leste dos Andes (Duellman & Trueb, 1986; Myers *et al.*, 1991).

De acordo com Hillis (1991), os anuros apresentam características morfológicas muito conservadas, tornando extremamente difícil a utilização destes caracteres na investigação filogenética, o que sugere, então, que outras metodologias devam ser empregadas.

A citogenética em anuros tem fornecido dados de grande importância, tanto para a sistemática, como para a filogenia, não apenas através da identificação do número e da morfologia cromossômica, mas também, com a utilização das diferentes técnicas de bandamento (Schmid, 1978a, b; King, 1980; Schmid, 1982; Foote *et al.*, 1991; Miura, 1995; Schmid *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1996; Lourenço *et al.*, 1998; 1999).

Dados cariotípicos da família Dendrobatidae indicam uma tendência à diminuição do número cromossômico de $2n = 24$ para $2n = 18$. Bogart (1991) sugere, ainda, que o número cromossômico $2n = 24$ seja o ancestral nos dendrobatídeos e que a variação cromossômica esteja relacionada com a história de estratégia de vida, uma vez que o gênero *Colostethus*, além de apresentar $2n = 24$, é considerado, também, o menos especializado dentre outros gêneros, como *Dendrobates*, que apresenta $2n = 20$ ou 18 e é o mais especializado.

As espécies do gênero *Colostethus* são crípticamente coloridas e muito semelhantes na aparência, dificultando assim, a identificação (Duellman & Simmons, 1988).

Coloma (1995), em sua revisão do gênero *Colostethus* do Equador, relata que populações atualmente atribuídas à espécie *Colostethus marchesianus* não exibem grandes diferenças morfológicas, entretanto, diferenças no canto podem ser notadas, sugerindo que mais de uma espécie esteja inserida neste táxon. O mesmo foi observado por Lima (com. pessoal) na Amazônia brasileira.

Com o objetivo de contribuir com dados citogenéticos para a família Dendrobatidae e caracterizar espécies do grupo de *Colostethus marchesianus*, neste trabalho analisamos *Colostethus caeruleodactylus* (Lima & Caldwell, 2000), *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e *Colostethus* sp 2 (aff. *marchesianus*) por coloração convencional dos cromossomos com Giemsa, banda C para detecção de heterocromatina, impregnação por prata e hibridização *in situ*, para localização de regiões organizadoras do nucléolo. Neste trabalho, descrevemos também um novo número cromossômico para o gênero *Colostethus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos espécimes:

Neste trabalho, foram analisados 5 espécimes de *Colostethus caeruleodactylus* (3 machos e 2 fêmeas); 10 de *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) (9 machos e 1 fêmea) e 6 de *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) (4 machos e 2 fêmeas). As coletas foram realizadas de fevereiro a agosto de 1998, fevereiro de 1999 e fevereiro de 2000, no município de Careiro, ao longo da estrada de Autazes, Amazonas, Brasil. Os espécimes foram coletados e identificados por Albertina Pimentel Lima, com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) licença nº (02005.001367/99-58-AM).

Os testemunhos foram depositados na coleção do Museu “Professor Adão José Cardoso” da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), São Paulo, Brasil, e na coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Amazonas, Brasil, com os números ZUEC 11.633, 11.634, 11.636, 11.637 e 11.640 para *Colostethus caeruleodactylus*; INPA 7264-66, ZUEC 11.707-09, 11.711, 11.712, 11.716 e 11.719 para *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e ZUEC 11.694, 11.699-702 e 11.704 para *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*).

Preparações cromossômicas:

As preparações cromossômicas foram obtidas através da suspensão de células do intestino e testículo de animais previamente tratados com colchicina, por no mínimo 6 horas, segundo técnica de King & Rofo (1976) e Schmid (1978a).

As técnicas utilizadas neste estudo foram: coloração convencional com Giemsa em tampão fosfato pH 6,8, impregnação por prata (AgNOR) segundo Howell & Black (1980), bandamento C de acordo com Sumner (1972), com algumas modificações, e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Viegas-Péquignot, 1992), utilizando-se um plasmídeo recombinante (HM 123), contendo fragmentos de rDNA de *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival *et al.*, 1979) para localização de genes ribossomais. A sonda foi marcada com biotina por “nick-translation”, de acordo com o protocolo da GIBCO BRL. As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX 60 ou Microscópio Confocal BioRad MRC 1024 UV.

RESULTADOS

Em todos os espécimes analisados, o número diplóide encontrado foi $2n = 22$ cromossomos (Fig. 1A-C), sendo este confirmado pela presença de 11 bivalentes na metáfase I da meiose de gônada masculina (Fig. 2A, B e C). Nenhuma das três espécies apresentou cromossomos heteromórficos relacionados à determinação do sexo.

O cariótipo de *Colostethus caeruleodactylus* é constituído por oito pares de cromossomos metacêntricos (pares 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, e 11), dois pares submetacêntricos (pares 3 e 4) e um par subtelocêntrico (par 7). Já o cariótipo de *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*), difere apenas no par 3, que nesta espécie foi caracterizado como sendo metacêntrico. *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) apresenta um cariótipo constituído por oito pares metacêntricos (pares 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10 e 11) e três pares submetacêntricos (pares 3, 4 e 7) (Figs. 1 e 7; Tabela 1).

Em *Colostethus caeruleodactylus*, a NOR pôde ser detectada por impregnação por prata, na porção intersticial do braço longo dos cromossomos 4. Entretanto, em dois indivíduos analisados, uma NOR adicional foi encontrada em um dos homólogos do par 1, na região intersticial do braço longo (Fig. 3A).

A maioria dos núcleos interfásicos dos indivíduos portadores de NOR adicional apresentaram três nucléolos corados pela prata, diferindo dos indivíduos com apenas um par de NOR, onde em seus núcleos foram corados somente dois nucléolos (Fig. 4A e B).

Essa NOR adicional pode ser confirmada através da técnica de hibridação *in situ* (FISH) (Fig. 5A).

Colostethus sp. 1 (aff. *marchesianus*) e *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) apresentaram a NOR no braço curto dos cromossomos 8 e 7, respectivamente (Figs. 3B e C). Nestas espécies foram encontrados heteromorfismos de tamanho de NORs entre os homólogos, e, também, em nucléolos de núcleos interfásicos corados pela prata (Figs. 3B e C; 4C-F).

As áreas marcadas pela prata foram sempre detectadas pela técnica de FISH (Fig. 5). Entretanto, um indivíduo de *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) apresentou uma marcação

na região pericentromérica do braço longo dos cromossomos 5, não evidenciada pelo método AgNOR (Fig. 5B).

O bandamento C revelou variações interespecíficas entre os cariótipos analisados. A região centromérica de todos os cromossomos das três espécies carrega grandes blocos de heterocromatina constitutiva. Bandas pericentroméricas, intersticiais e terminais também foram encontradas, sendo algumas fracamente coradas e de difícil observação (Figs. 6 e 7).

Nas três espécies analisadas, um pequeno bloco de heterocromatina constitutiva foi localizado na região intersticial do braço longo do par 7 (Figs. 6 e 7).

Um indivíduo macho de *Colostethus* sp. 1 aff. *marchesianus* apresentou aumento na quantidade de heterocromatina constitutiva, localizada na região intersticial do braço longo do par 9 em apenas um dos homólogos. O heteromorfismo de tamanho observado nesta banda, pôde ser detectado na forma de constrição secundária em metáfases submetidas à técnica de impregnação por prata, e também pela mudança na morfologia deste homólogo (Figs. 6B e 7).

Em nenhuma das três espécies analisadas, regiões de heterocromatina constitutiva foram coincidentes com a região organizadora do nucléolo (Fig. 7).

Em *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) uma banda intersticial fortemente corada foi localizada no braço curto do par 7 (Fig. 6C). Esta banda, adjacente à NOR, coincide com uma constrição secundária, observada tanto em metáfases coradas com Giemsa, como em metáfases submetidas à impregnação por prata (Fig. 3C). Quando detectado o heteromorfismo de NOR, esta banda heterocromática também se apresentou heteromórfica com relação ao seu tamanho (Fig. 6C).

DISCUSSÃO

No gênero *Colostethus* existem 99 espécies conhecidas (Frost, 1999), mas apenas 10 tiveram o cariótipo descrito (Veiga *et al.*, em preparação; Bogart, 1991; Rada de Martínez, 1976) e todas apresentam $2n = 24$ cromossomos. Porém, as espécies pertencentes ao grupo *marchesianus* analisadas neste trabalho possuem $2n = 22$ cromossomos, revelando, assim, um novo número cromossômico e, portanto, uma variabilidade presente neste gênero. A análise de um número maior de espécies poderá confirmar se esse número de cromossomos caracteriza citogeneticamente o grupo de *Colostethus marchesianus*.

Na Família Dendrobatidae, apenas em *Dendrobates* foi encontrada variação intragenérica de número de cromossomos, sendo encontradas espécies com $2n = 18$ ou 20 cromossomos (Bogart, 1991; Rasotto *et al.*, 1987; Leon, 1970; Duellman, 1967), indicando que o número de cromossomos não é conservado nos gêneros *Dendrobates* e *Colostethus*.

Apesar dos poucos dados cariotípicos existentes na literatura, algumas espécies dos diferentes gêneros da Família Dendrobatidae apresentam cromossomos telocêntricos (Bogart 1991; Rasotto *et al.*, 1987), o que levou Bogart (1991) a sugerir que fusões ou fissões cêntricas são possíveis mecanismos evolutivos envolvidos na variação do número de cromossomos. Porém, algumas das espécies de *Colostethus* já analisadas e as descritas neste trabalho, não apresentam cromossomos do tipo telocêntrico, indicando que outros mecanismos, como translocações e inversões, provavelmente também estejam envolvidos na evolução cariotípica do grupo.

De acordo com Bogart (1991), a variação cariotípica em alguns grupos de anuros pode estar relacionada com estratégias de vida, como tamanho da desova, investimento parental, desenvolvimento terrestre e direto. Sendo assim, os dados citogenéticos e de ecologia devem ser confrontados para um possível entendimento das relações filogenéticas, uma vez que até então não se conhecia outro número cromossômico para *Colostethus*, que não fosse $2n = 24$. Além disso, Bogart (1991) sugeria, também, que devido ao fato deste gênero tender a produzir mais ovos, apresentar menos cuidado com a prole e menor territorialidade, teria, também, uma menor variabilidade cromossômica que as outras espécies incluídas em outros gêneros. Os dados deste trabalho parecem não corroborar essa hipótese.

Os cariótipos das três espécies descritos neste trabalho apresentam algumas características comuns aos demais dendrobatídeos já analisados citogeneticamente, uma vez que o par 1 mantém-se metacêntrico e é respeitada a estrutura bimodal dos cromossomos, ou seja, os cariótipos das espécies são formados por seis grandes pares de cromossomos e cinco pares menores, com exceção de *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*), o qual apresenta uma diminuição do tamanho dos cromossomos, a partir do par 7. Esta característica não foi detectada em nenhum outro *Colostethus*, porém, uma única espécie do gênero *Minyobates*, estudada por Bogart (1991), apresenta não somente sete pares grandes como *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*), mas também 22 cromossomos. Uma análise mais detalhada de *Minyobates* poderia ajudar a entender a relação entre esses dois gêneros.

Rearranjos cromossômicos podem ter alterado o grupo dos pequenos pares em *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*). Contudo, as metodologias empregadas não permitem observar homologias, que pudessem esclarecer se estes rearranjos envolveram quebra em algum cromossomo grande, ou fusão de algum cromossomo pequeno.

O cariótipo de *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) difere de *Colostethus caeruleodactylus* apenas por apresentar o par 3 metacêntrico. Porém, os valores de razão de braços e índice centromérico, obtidos para este cromossomo, estão muito próximos dos necessários para classificá-lo como submetacêntrico, o que tornaria estas espécies iguais em relação à morfologia dos cromossomos. Portanto, pela simples análise cariotípica, esta diferença observada não é suficiente para claramente separar essas 2 espécies.

Apesar da grande similaridade entre os cariótipos, tanto a localização da NOR, quanto a quantidade e distribuição de heterocromatina constitutiva, foram características para cada espécie.

De acordo com Schmid (1982) e Schmid *et al.* (1990), comparações interespecíficas demonstraram que no cariótipo de espécies pertencentes ao mesmo grupo ou a grupos relacionados, as NORs são sempre localizadas nas mesmas regiões cromossômicas. Embora as espécies aqui estudadas apresentem grande similaridade cariotípica, as NORs foram detectadas em regiões distintas para cada espécie, o que, segundo esse autor, são indícios de que rearranjos cromossômicos nos segmentos portadores da NOR ocorreram durante a evolução.

Em *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*), a NOR foi localizada no braço curto do par 7, alterando a morfologia destes cromossomos, bem como o padrão cariotípico para sete pares grandes e quatro pequenos. Como uma pequena banda C positiva foi detectada na mesma região do braço longo deste par nas três espécies analisadas, podemos sugerir que a alteração na morfologia do par 7 em *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*), deu-se por rearranjos de segmentos comossômicos que carregam a NOR e pela adição de heterocromatina constitutiva.

Nas espécies *Colostethus caeruleodactylus* e *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*), todas as regiões organizadoras do nucléolo (NORs), evidenciadas pelo método de impregnação por prata (AgNOR), foram coincidentes com as constrições secundárias observadas nos cromossomos corados por Giemsa. Em *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) a NOR foi localizada adjacente à uma constrição secundária. Quando submetida ao bandamento C, esta constrição apresenta-se fortemente corada, indicando a presença de heterocromatina constitutiva. Segundo Schmid (1978a, b), nem toda constrição secundária é constrição nucleolar, uma vez que segmentos heterocromáticos, ocasionalmente também adquirem a aparência de constrição secundária.

King (1980) caracterizou cinco diferentes classes de constrição secundária, através das técnicas de bandamento C e impregnação por prata, em 12 espécies do gênero *Litoria* (Hylidae). De acordo com a classificação proposta por esse autor, a constrição secundária observada em *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) pode ser classificada como sendo do tipo III, pois como mencionado anteriormente, esta constrição é banda C positiva e não exibe marcação pela prata. Este tipo de constrição é considerado comum e varia na sua expressão entre cromossomos, células e indivíduos.

Apesar de Schmid (1978a) ter identificado este tipo de constrição em coloração convencional, não é mencionado se estas constrições continuam sendo observadas após a impregnação por prata, como em *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*).

Heteromorfismos entre NORs homólogas foram encontrados em um grande número de espécies analisadas por Schmid (1982), sendo, portanto, um evento bastante comum em anuros. Nas duas espécies analisadas neste trabalho que apresentaram heteromorfismos de tamanho de NORs, estes parecem ter envolvido a amplificação de algumas sequências ribossomais em um dos homólogos do par, pois nossos resultados não indicaram uma

duplicação *in tandem* das NORs, como o observado para a maioria das espécies analisadas por Schmid (1982). *Crossing-over* desiguais ou trocas entre cromátides irmãs são as causas usualmente consideradas para o desenvolvimento de NORs heteromórficas, além da possibilidade de duplicações acidentais na quantidade de rDNA (King, 1990; Schmid, 1982).

Os núcleos interfásicos dos indivíduos de *C. sp. 1* e *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*) que apresentaram diferenças no tamanho das NORs, também exibiram nucléolos desiguais, concordando com os resultados obtidos por Schmid (1980; 1982). Segundo este autor, homomorfismos ou heteromorfismos de NORs, evidenciados pela prata em cromossomos metafásicos, são expressos também em núcleos interfásicos.

Em *Colostethus caeruleodactylus*, além da NOR detectada no braço longo do par 4, uma NOR adicional foi observada em apenas um dos homólogos do par 1, revelando assim, uma variabilidade de números de NORs nesta espécie.

Polimorfismo intraespecífico no número e localização de NORs foi descrito para poucas espécies de anuros até o momento: *Hyla versicolor*, *Hyla chrysoscelis* (Hylidae) por Wiley *et al.* (1989), *Bufo terrestris* (Bufonidae) por Foote *et al.* (1991), *Agalychnis callidryas* (Hylidae) por Schmid *et al.* (1995), *Physalaemus petersi* (Leptodactylidae) por Lourenço *et al.* (1998) e *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) por Silva *et al.* (1999). Em *Colostethus caeruleodactylus*, assim como em *A. callidryas* e *B. terrestris*, a NOR adicional ocorreu em apenas um dos homólogos do par, sendo que esta parece ter sido precisamente extraída ou inserida dentro dos cromossomos sem alterar sua morfologia.

Segundo os autores Wiley *et al.* (1989), Foote *et al.* (1991), Schmid *et al.* (1995) e Kaiser *et al.* (1996), os prováveis mecanismos envolvidos na origem deste polimorfismo são translocações e inversões nos braços dos cromossomos que contém a NOR, transposição de NORs por elementos de mobilidade genética, cópias de genes ribossomais órfãos e reinserção de seqüências ribossomais amplificadas durante a ovogênese.

Quando foi utilizada a técnica de hibridação *in situ*, para confirmar o heteromorfismo de tamanho de NOR observado no par 8 com impregnação por prata, uma pequena marcação adicional no braço longo do par 5 foi detectada no indivíduo ZUEC 11.712. Wiley *et al.* (1989) também observaram alguns sítios marcados por hibridação *in situ* em *Hyla versicolor* e *Hyla chrysoscelis*, que nunca se coraram pela prata. Segundo Schmid (1978b), NORs muito

Schmid *et al.* (1986, 1993, 1995); King *et al.* (1990); Foote *et al.* (1991) e Lourenço *et al.* (1998), todas as NORs evidenciadas pelo método AgNOR são, também, detectadas por hibridação *in situ*. Portanto, consideramos que a marcação adicional obtida nesta região do par 5 provavelmente se deve à presença de seqüências homólogas ao rDNA. Em todos os indivíduos de *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*), esta região apresenta também uma banda C positiva, mas como em nenhum outro indivíduo foi detectado marcação por FISH, podemos também sugerir a ocorrência de transposição de seqüências de rDNA para esta região heterocromática.

Os resultados de banda C obtidos neste trabalho estão de acordo com a observação de King (1991), de que as espécies de Neobatrachia, já analisadas por este método, apresentam uma enorme variabilidade interespecífica, tanto na distribuição, quanto na quantidade de heterocromatina constitutiva presentes nos seus genomas. Por outro lado, Kasahara *et al.* (1996) mostraram que os padrões de banda C podem ser constantes e caracterizar um grupo de espécies. Da mesma forma, as três espécies de *Colostethus* analisadas podem ser caracterizadas pela presença de uma banda C fracamente corada, localizada no braço longo do par 7.

Adição de blocos heterocromáticos, transformação de segmentos eucromáticos em heterocromáticos e a evolução em conjunto de múltiplos sítios heterocromáticos, são processos implicados na evolução da heterocromatina no genoma dos anfíbios (King, 1991). Considerando-se que as três espécies analisadas apresentam o mesmo número cromossômico, similaridade cariotípica, mas com diferenças no padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva, é possível que os eventos citados acima possam estar envolvidos na separação destas espécies de *Colostethus*.

Apesar da dificuldade encontrada na obtenção de padrões de banda C, devido ao pequeno tamanho dos espécimes e, portanto, pequena quantidade de material para análise, observamos que algumas bandas, principalmente as localizadas nas regiões intersticiais, apresentaram-se fracamente coradas. Esta variação na intensidade de coloração, de acordo com Hsu e Arrighi (1971), é relacionada com porções variáveis nas seqüências repetitivas, ou seja, seqüências altamente repetitivas se reassociam melhor após a desnaturação alcalina e,

portanto, coram-se mais fortemente do que as seqüências com níveis variáveis de homogeneidade.

Com relação ao heteromorfismo de tamanho de banda C, observado em um dos homólogos do par 9 em apenas um indivíduo de *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) (ZUEC 11.719), é possível que tenha sido originado através de uma amplificação de seqüências de DNA repetitivo, resultando em uma mudança na morfologia deste cromossomo. Mudanças na morfologia cromossômica, causadas por adição de segmentos heterocromáticos, já foram relatados por King (1980) em *Litoria* (*Hylidae*).

Portanto, embora as espécies de *Colostethus* analisadas no presente trabalho apresentem similaridades na morfologia da maioria dos cromossomos, elas podem ser facilmente separadas citogeneticamente entre si, pela localização da NOR e padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva. Além disso, distinguem-se das demais espécies do gênero analisadas cariotipicamente, por apresentarem $2n = 22$ cromossomos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro. À Luciana B. Lourenço, pelo auxílio na técnica de hibridação *in situ* e pelas valiosas sugestões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOGART, J. P. The Influence of Life History on Karyotypic Evolution in Frogs. In: Green, D. M. & Sessions, S. K., eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego, pp. 233-258, 1991.
- COLOMA, L. Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae). **Uni. Kansas Nat. Hist. Mus., Miscell. Publ.** 87: 1-72, 1995.
- DUELLMAN, W. E. Additional studies of chromosomes of Anuran amphibians. **Syst. Zool.** 16: 38-43, 1967.
- DUELLMAN, W. E.; SIMMONS, J. E. Two new species of Dendrobatid frogs, genus *Colostethus* from the Cordillera del Cóndor, Ecuador. **Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia** 140 (2): 115-124, 1988.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. In: **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill. New York, 1986.
- FOOTE, D. L.; WILLEY, J. E.; LITTLE, M. L.; MEYNE, J. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenet. Cell Genet.** 57: 196-199, 1991.
- FORD, L. The Phylogenetic position of the dart-poison frogs (Dendrobatidae) among anurans: An examination of the competing hypothesis and their characters. **Ethol. Ecol. Evol.** 5: 219-231, 1993.
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World (on line). Ver. 2.1. November, 1999. American Museum of Natural History, New York, New York, U.S.A. 1999. <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>

- GREEN, M. G.; SESSIONS, S. K. In: **Amphian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. 1991, pp. 431-432
- HILLIS, D. M. The Phylogeny of Amphibians: Current Knowledge and the Role Cytogenetics. In: Green, D. M. & Sessions, S. K., eds., **Amphian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego, pp. 7-31, 1991.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1 step method. **Experientia** **36**: 1014-1015, 1980.
- HSU, T. C.; ARRIGHI, F. E. Distribution of constitutive heterochromatin in Mammalian chromosomes. **Chromosoma** **34**: 243-253, 1971.
- KAISER, H.; MAIS, C.; BOLAÑOS, F.; STEINLEIN, C. 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.
- KASAHARA, S.; SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B. Chromosome banding in Three species of Brazilian toads (Amphibia – Bufonidae) **Braz. J. Genet.** **19**: 237-242, 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. In: John, B.; Gwent C., eds., **Animal Cytogenetics 4, Chordata 2, Amphibia**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1990.

- KING, M. Evolution of Heterochromatin in the Amphibia Genome. In: Green, M. G. & Sessions, S. K., eds., **Amphian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. 1991, pp. 359-391.
- KING, M.; CONTRERAS, N.; HONEYCUTT, R. T. Variation within and between nucleolar regions in Australian hyloid frogs (Anura) show by 18S and 28S "in-situ" hybridization. **Genetica** 80: 17-29, 1990.
- KING, M.; ROFE, R. (1976). Karyotypic variation in the Australian Gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). **Chromosoma** 54: 75-87, 1976.
- LÉON, P. E. Report of the chromosome numbers of some Costa Rican Anurans. **Rev. Biol. Trop.** 17: 119-124, 1970.
- LIMA, A. P.; CALDWELL, J. P. A New Amazonian species of *Colostethus* with sky blue digts. **Herpetologica** 2000 (no prelo).
- LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. Polymorphism of nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosome Research** 6: 621-628, 1998.
- LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. Two karyotypes, heteromorphic sex chromosomes and C-band variability in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). **Can. J. Zool.** 36: 301-306, 1999.
- MEUNIER-ROTIVAL, M.; CORTADAS, J.; MACAYA, G.; BERNARDI G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucleic Acids res.** 6:2109-2123, 1979.

- MIURA, I. Two differentiated groups of the Japanese toad, *Bufo japonicus japonicus*, demonstrated by C-banding analysis of chromosome. **Caryologia** **48**:123-136, 1995.
- MYERS, C. W.; PAOLILLO, A.; DALY, J. W. Discovery of a defensively malodorous and nocturnal frog in the family Dendrobatidae: Phylogenetic significance of a new genus and species from the Venezuelan Andes. **Amer. Mus. Novitates** (3002): 2-33, 1991.
- RADA de MARTÍNEZ, D. Cariotipo de *Colostethus trinitatis* (Amphibia: Dendrobatidae). **Acta Biol. Venez.** **9**: 213-220, 1976.
- RASOTTO, M B.; CARDELLINI, P.; SALA, M. Karyotypes of five species of Dendrobatidae (Anura: Amphibia). **Herpetologica** **43**: 177-182, 1987.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** **66**: 361-368, 1978a.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma** **68**: 131-148, 1978b.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). **Chromosoma** **80**: 69-96, 1980.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** **87**: 327-344, 1982.
- SCHMID, M.; FEICHTINGER, W.; WEIMER, R.; MAIS, C.; BOLAÑOS, F.; LEÓN, P. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus

- organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** **69**: 18-26, 1995.
- SCHMID, M.; OHTA, S.; STEINLEIN, C.; GUTTENBACH, C. Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosome in *Buergeria buergeria* (Anura, Rhacophoridae) **Cytogenet. Cell Genet** **62**:238-246, 1993.
- SCHMID, M.; SIMS, S. H.; HAAF, T.; MACGREGOR, H. C. Chromosome banding in Amphibia. X. 18S and 28S ribosomal RNA genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrotheca riobambae*. **Chromosoma** **94**: 139-145, 1986.
- SCHMID, M.; STEINLEY, C.; NANDA, I.; EPPLEN, J. T. Chromosome banding in Amphibia. In: Olmo, E., ed., **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles** Birkhäuser Verlag Basel, Berlin, pp. 21-45, 1990.
- SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. **Hereditas** **131**: 135-141, 1999.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** **75**: 304-306, 1972.
- VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. *In situ* Hybridization to Chromosomes With Biotinylated Probes. In: Willernson D., ed., ***In situ* hybridization: a Practical Approach**. Oxford University Press, IRL Press, pp 137-158, 1992.
- WILEY, J. E.; LITTLE, M. L.; ROMANO, M. A.; BLOUNT, D. A.; CLINE, G. R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. **Chromosome** **97**: 481-487, 1989.

Tabela 1 – Dados morfométricos de cromossomos mitóticos de *Colostethus caeruleodactylus*, *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*). Classificação segundo Green & Sessions, 1991.

Nº de cromossomos											
<i>Colostethus caeruleodactylus</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TR %	16,708	14,063	12,466	12,113	10,882	9,587	6,034	5,491	4,800	4,162	3,697
IC	0,414	0,382	0,354	0,260	0,410	0,411	0,132	0,462	0,450	0,460	0,458
PC	M	M	SM	SM	M	M	ST	M	M	M	M
<i>Colostethus</i> sp. 1 (aff. <i>marchesianus</i>)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TR %	15,316	13,212	11,707	11,484	10,713	10,132	6,277	6,218	5,722 6,893*	4,892	4,327
IC	0,436	0,429	0,419	0,324	0,435	0,442	0,162	0,461	0,456 0,357*	0,424	0,438
PC	M	M	M	SM	M	M	ST	M	M SM*	M	M
<i>Colostethus</i> sp. 2 (aff. <i>marchesianus</i>)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
TR %	16,470	13,636	11,847	11,199	10,636	9,827	7,833 8,446*	5,404	4,974	4,343	3,829
IC	0,443	0,422	0,354	0,286	0,383	0,405	0,354 0,440*	0,488	0,466	0,452	0,452
PC	M	M	SM	SM	M	M	SM M*	M	M	M	M

TR = tamanho relativo, IC = índice centromérico, PC = posição do centrômero, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico e ST = subtelocêntrico. * = Valores obtidos para um dos homólogos dos respectivos pares que apresentaram heteromorfismo de tamanho de NOR e ou banda C.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1. Cariótipos submetidos à coloração com Giemsa. **A-** *Colostethus caeruleodactylus*; **B-** *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e **C-** *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*). Barra =10 μ m.

Fig. 2. Metáfases I da meiose de testículo coradas com Giemsa, mostrando 11 bivalentes. **A-** *Colostethus caeruleodactylus*; **B-** *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e **C-** *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*). Barra =10 μ m.

Fig. 3. Pares cromossômicos marcados pelo método Ag-NOR. **A-** *Colostethus caeruleodactylus*; a seta indica NOR adicional em um dos homólogos do par 01, além da marcação obtida no par 04; **B-** *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*); par 05 não marcado pela prata, par 8 com NOR homomórfica e heteromórfica; **C-** *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*); par 07 com NOR homomórfica e heteromórfica; a seta indica constrição secundária não corada pela prata. Barra =10 μ m.

Fig. 4. Núcleos interfásicos submetidos à impregnação por prata. **A-** *Colostethus caeruleodactylus*, com dois nucléolos, **B-** *C. caeruleodactylus*, com três nucléolos; **C-** *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*), com nucléolos de mesmo tamanho, **D-** *C. sp. 1* (aff. *marchesianus*), com nucléolos de tamanhos diferentes; **E-** *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) com nucléolos de mesmo tamanho e **F-** *C. sp. 2* (aff. *marchesianus*), com nucléolos de tamanhos diferentes. Barra =10 μ m.

Fig. 5. Metáfases mitóticas submetidas à técnica de hibridação *in situ*. **A-** *Colostethus caeruleodactylus*; as setas indicam o par 04 marcado e ponta de seta indica marcação adicional em um homólogo do par 01; **B-** *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*); as setas indicam marcações heteromórficas no par 08 e as pontas de seta indicam a marcação adicional no par 05; **C-** *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*); as setas indicam marcações heteromórficas no par 07. Barra =10 μ m.

Fig. 6. Cariótipos submetidos à técnica de bandamento C. **A-** *Colostethus caeruleodactylus*; **B-** *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*); em destaque o par 09, mostrando o aumento de heterocromatina constitutiva em um dos homólogos e **C-** *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*); em destaque o par 07 mostrando o heteromorfismo de tamanho de banda C, na região intersticial do braço curto. As setas indicam uma banda intersticial fracamente corada presente no par 7 das três espécies. Barra =10 μ m.

Fig. 7. Ideograma representativo dos cariótipos. **A-** *Colostethus caeruleodactylus*; **B-** *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e **C-** *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*). Setores escuros indicam blocos de heterocromatina constitutiva fortemente corados; setores cinza, heterocromatina constitutiva fracamente corada; círculos cinza indicam a NOR; e os parênteses indicam marcações heteromórficas.

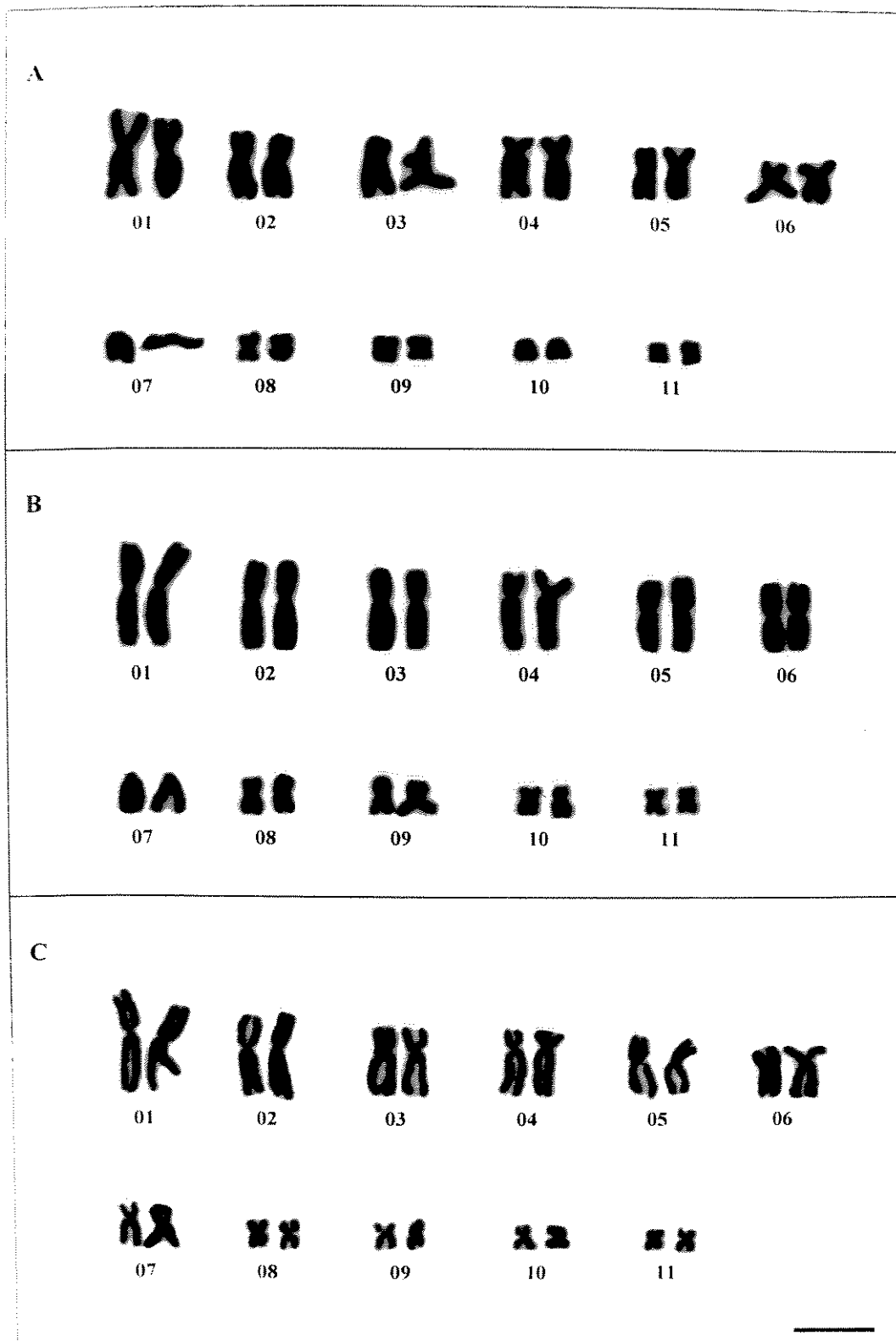


Fig. 1

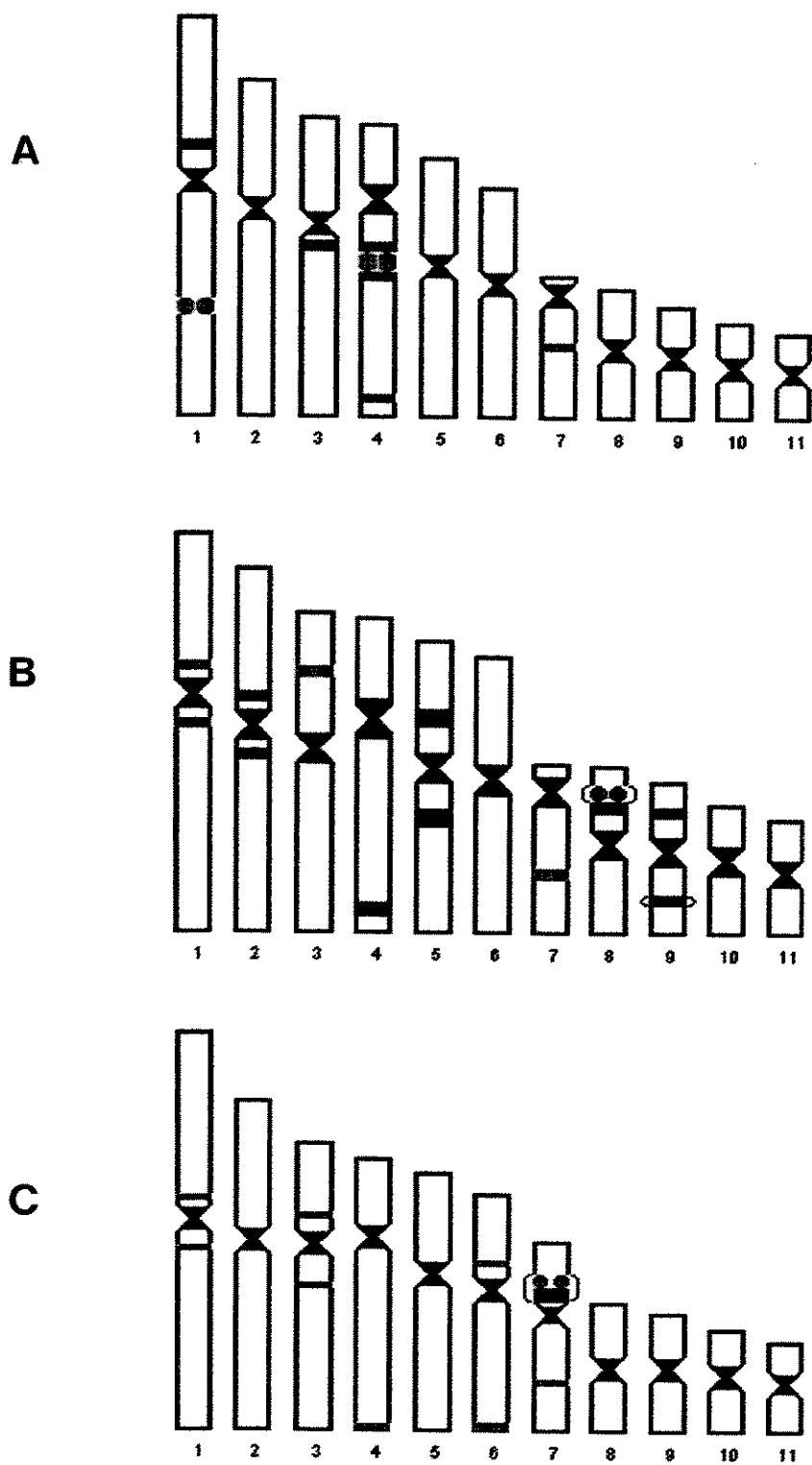


Fig. 7

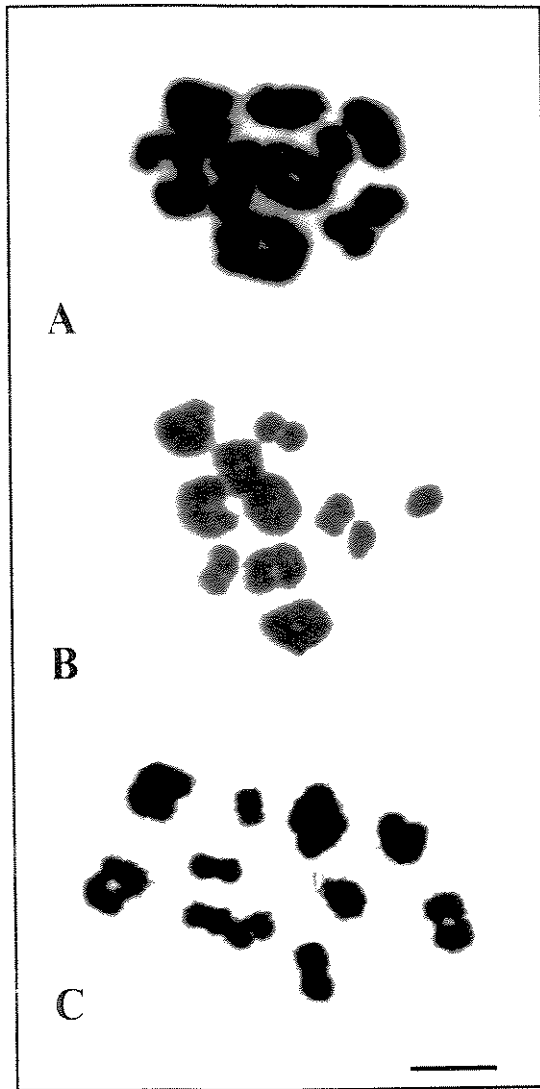


Fig. 2

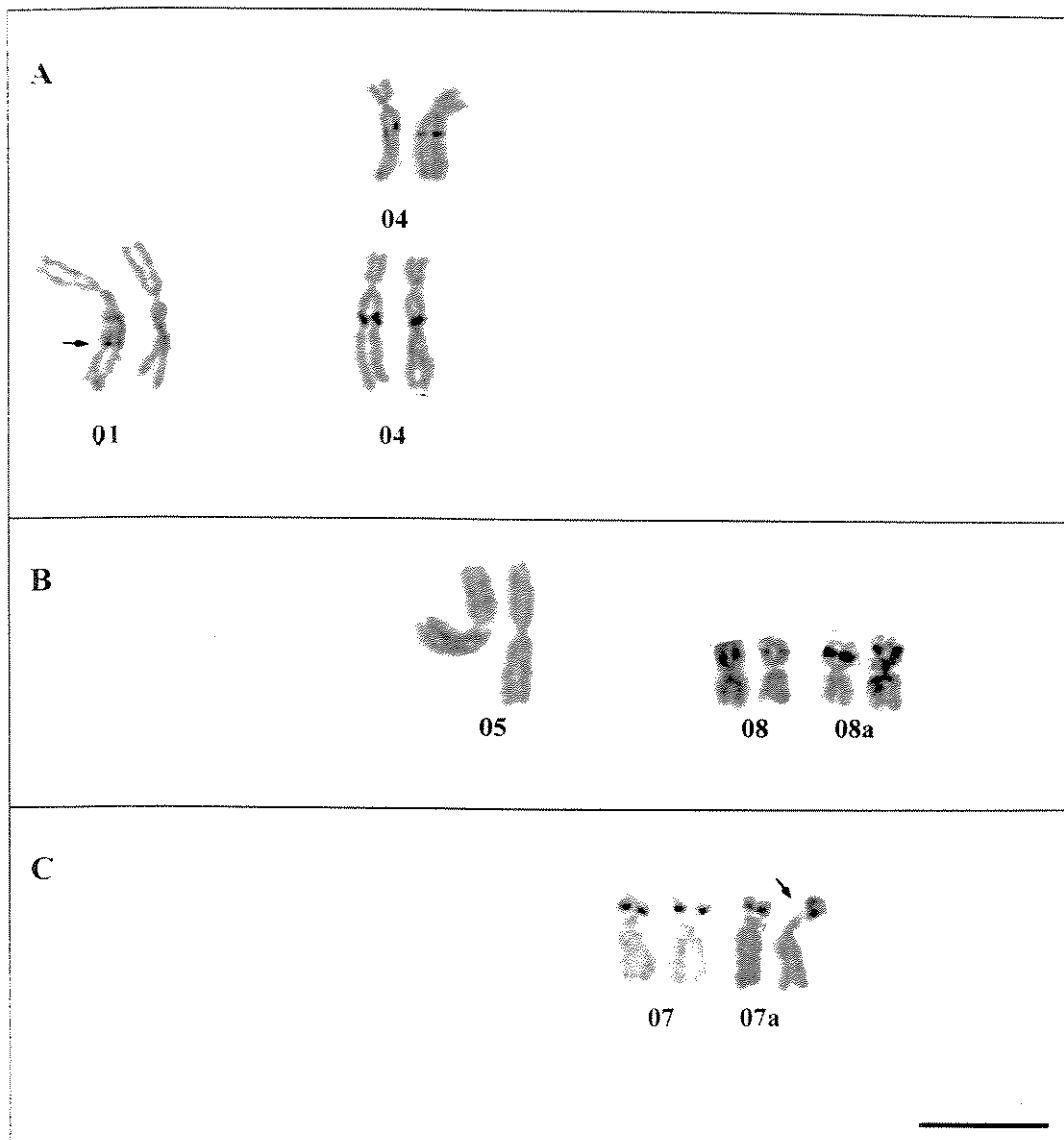


Fig. 3

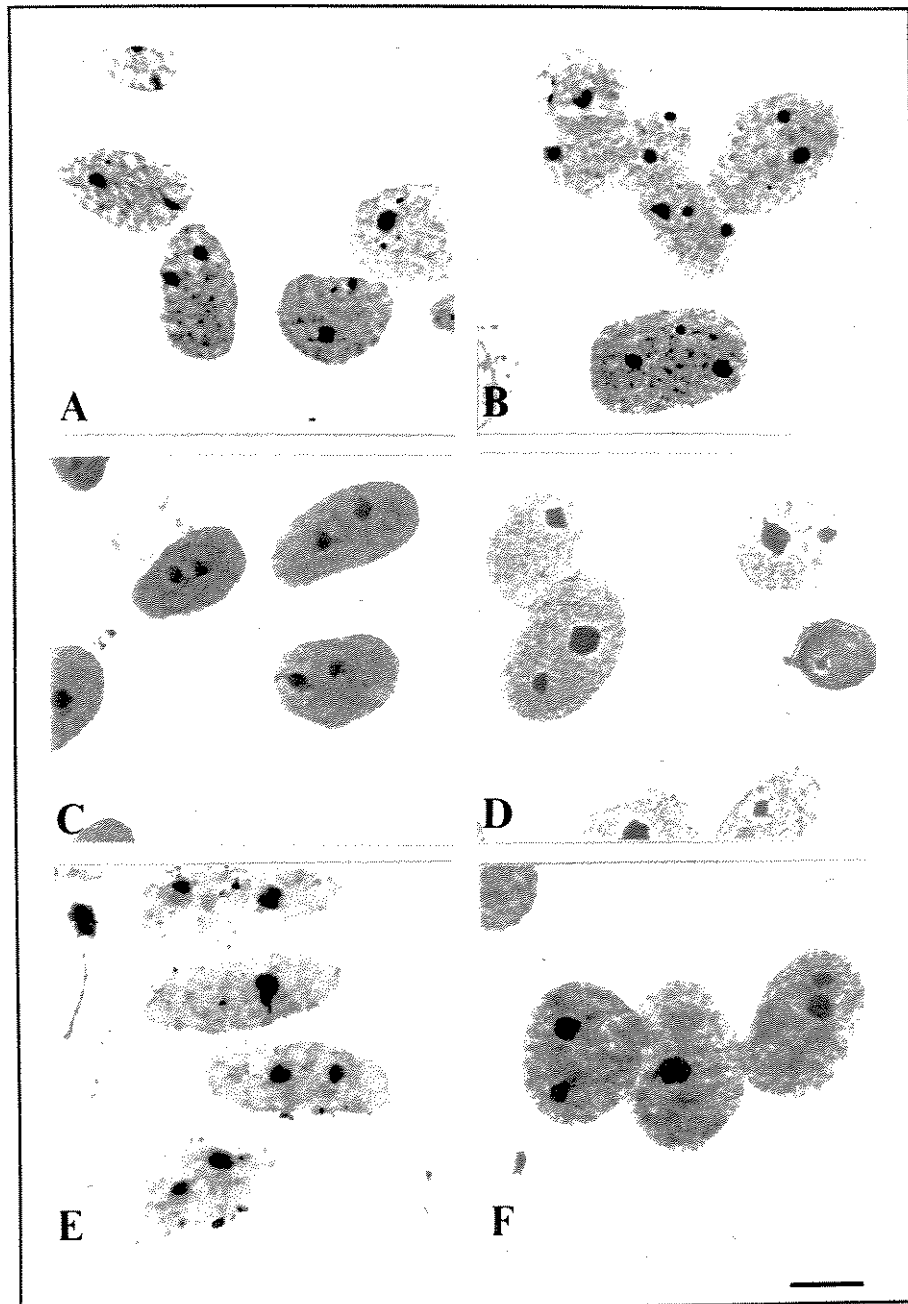


Fig. 4

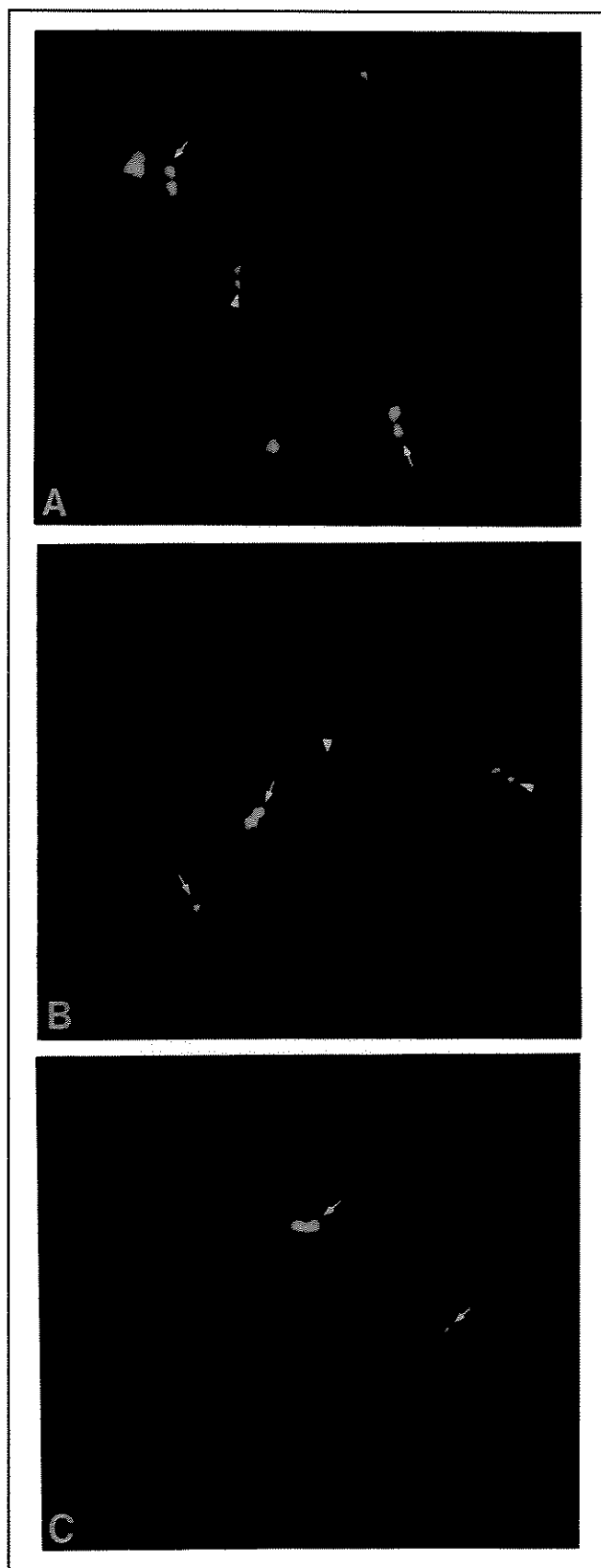


Fig. 5

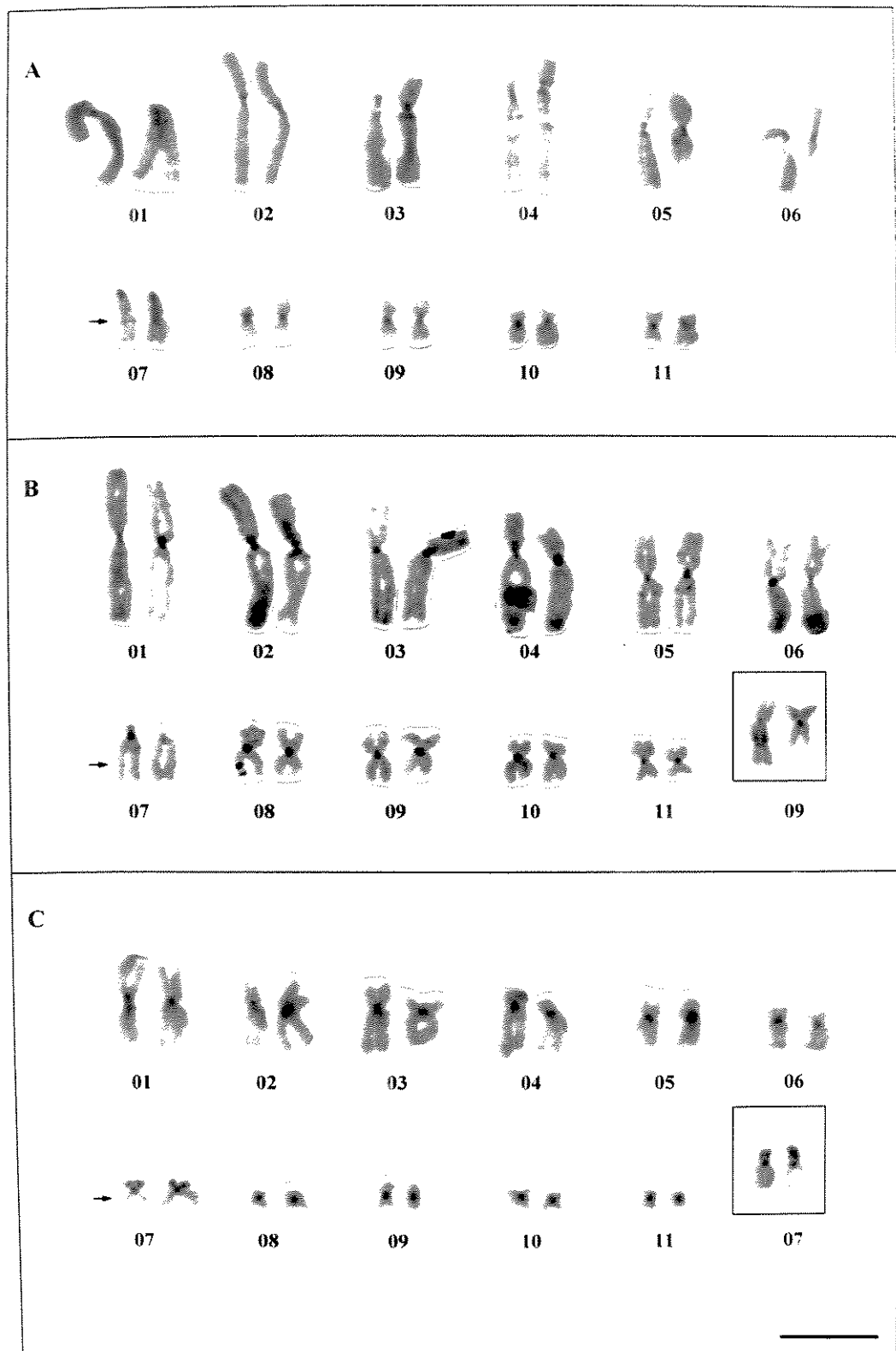


Fig. 6

VI CONCLUSÕES GERAIS

1. A espécie *Colostethus stepheni* apresenta $2n = 24$ cromossomos, sendo seu cariótipo constituído por sete pares metacêntricos, três submetacêntricos, um subtelocêntrico e um telocêntrico. O número cromossômico, o cariótipo bimodal e a presença do par 1 metacêntrico grande são características comuns às outras espécies do gênero descritas citogeneticamente.
2. *Colostethus stepheni* difere de outras espécies do gênero já analisadas, quanto à morfologia de alguns cromossomos e à localização da constrição secundária.
3. *Colostethus stepheni* apresenta apenas 1 par de NOR (região organizadora do nucléolo) localizado na porção pericentromérica do braço longo do par 1, coincidente com uma banda C positiva, à semelhança da maioria dos anfíbios estudados. Um pequeno heteromorfismo de tamanho de NOR foi observado neste par, provavelmente devido à amplificação de cístrons ribossomais.
4. Blocos de heterocromatina constitutiva foram detectados na região centromérica de todos os cromossomos de *Colostethus stepheni*. Apenas na região intersticial do braço longo dos pares 3 e 5 foram evidenciadas bandas intersticiais fracamente coradas.
5. As três espécies de *Colostethus* do grupo *marchesianus* estudadas apresentaram $2n = 22$ cromossomos, revelando, assim, um novo número cromossômico e, portanto, uma variabilidade cariotípica ainda não descrita para este gênero.
6. O cariótipo de *Colostethus* sp.1 (aff. *marchesianus*) é semelhante ao de *Colostethus caeruleodactylus*, diferindo apenas por apresentar o par cromossômico 3 metacêntrico. Porém, como os valores obtidos para índice centromérico estão próximos de classificá-lo como submetacêntrico, esta diferença cromossômica não é suficiente para distinguir estas duas espécies. No entanto, a espécie *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*), pode ser claramente separada das outras duas analisadas, pela morfologia do par cromossômico 7 submetacêntrico.

7. As três espécies do grupo *marchesianus* diferem quanto à localização da NOR, sendo que em *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) está no par 8, em *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) está no par 7, adjacente a uma constrição secundária banda C positiva e em *Colostethus caeruleodactylus* no para 4, além de uma adicional em um dos homólogos do par 1.

8. A alteração na morfologia cromossômica do par 7 de *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*), quando comparado às outras espécies em estudo, deu-se, provavelmente, devido à translocação de um segmento cromossômico portador da NOR e à adição de heterocromatina constitutiva.

9. Nas espécies *C.* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e *C.* sp. 2 (aff. *marchesianus*), foram detectados heteromorfismos de tamanho de NOR, provavelmente devido à amplificação de seqüências ribossomais em um dos homólogos.

10. Todas as NORs observadas através da impregnação por prata, foram confirmadas pelo método de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr. Porém, nas metáfases de um indivíduo de *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) (ZUEC 11.712), uma marcação adicional no par 5 foi detectada apenas com FISH, coincidente com uma região banda C positiva. Esta marcação deve-se provavelmente a homologia deste sítio com alguma porção da sonda utilizada.

11. Foi encontrada grande variabilidade nos padrões de heterocromatina. Porém, uma pequena banda fracamente corada presente no braço longo do par 7 nas três espécies, pôde ser considerada um marcador para as espécies de *Colostethus* do grupo *marchesianus*.

12. O heteromorfismo de tamanho de banda C, observado nos cromossomos do par 9 em apenas um indivíduo de *C.* sp. 1 (aff. *marchesianus*), provavelmente tenha se originado através de uma amplificação de seqüências de DNA repetitivo, uma vez que resultou em uma mudança na morfologia deste cromossomo.

13. Embora as três espécies do grupo *marchesianus* analisadas apresentem similaridades na morfologia da maioria dos cromossomos, elas podem ser separadas entre si pelas diferenças na localização das NORs e distribuição de heterocromatina constitutiva.

14. *Colostethus caeruleodactylus*, *Colostethus* sp. 1 (aff. *marchesianus*) e *Colostethus* sp. 2 (aff. *marchesianus*) apresentam um par de cromossomos a menos ($2n=22$ cromossomos) que *C. stepheni* e de todas as outras espécies do gênero, descritas na literatura, o que sugere ser esta uma característica das espécies do grupo de *Colostethus marchesianus*.