

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/43388

IB/ 81608

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

M467e

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LILIAN RICCO MEDEIROS

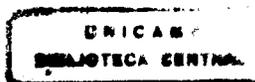
ESTUDO CITOGÊNÉTICO DAS ESPÉCIES
Hyla nana E *Hyla sanborni* (ANURA, HYLIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Lilian Ricco Medeiros e aprovada pela Comissão Julgadora.

Shirlei Maria Recco Pimentel

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

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco - Pimentel



UNIDADE	IB/81608
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M.467e
V.	Ex.
TOMBO BC/	43388
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$11,00
DATA	06/10/10
N.º CPD	

CM-00154309-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Medeiros, Lilian Ricco

M467e

Estudo citogenético das espécies *Hyla nana* E *Hyla sanborni*
(Anura, Hylidae/Lilian Ricco Medeiros. - - Campinas-SP. [s.n.], 2000.
77f: ilus.

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

1. Polimorfismo. 2. Cromossomo. 3. Supernumerário. I. Recco-
Pimentel, Shirlei Maria. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título

DATA DA DEFESA: 29/09/2000

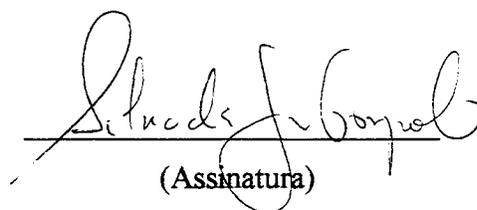
Banca Examinadora

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (orientadora)



(Assinatura)

Profa. Dra. Silvia das Graças Pompolo



(Assinatura)

Prof. Dr. Jorge Jim



(Assinatura)

Profa. Dra. Selma Candelária Genari



(Assinatura)

*Dedico este trabalho aos meus pais
Lauro e Rosemary e irmãos Renato e
Leonardo pelo imenso amor e pela
compreensão das minhas ausências.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer imensamente a todos que de várias formas contribuíram para a realização deste trabalho e, especialmente:

-À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel pela orientação, dedicação e incentivo indispensáveis á realização deste trabalho, pelo exemplo de seriedade e competência e, principalmente pela oportunidade e confiança.

-À Prof. Dra. Denise de Cerqueira Rossa-Feres pela identificação dos espécimes estudados, pela amizade e valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

-Aos Profs. Drs. Jorge Jim, Silvia das Graças Pompolo e Selma Candelária Genari por aceitarem serem membros examinadores, pela análise prévia deste trabalho e importantes sugestões.

-À Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela revisão do resumo em inglês.

-Ao CNPq pelo apoio financeiro imprescindível para a realização deste trabalho.

-Aos Profs. do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular da UNICAMP pela dedicação e capacidade demonstrada.

-À Luciana Bolsoni Lourenço pela amizade, paciência e pelas discussões e sugestões importantes para o meu trabalho e para minha formação.

-À técnica do laboratório de Citogenética da UNICAMP, Klélia A. Carvalho pelo auxílio na realização deste trabalho e principalmente pela amizade e atenção.

-Ao amigo Marcelo Menin pela coleta dos espécimes analisados, valiosas discussões e pelo carinho e amizade de tantos anos.

-Ao Prof. Elias Freitas por ter cedido as fotos das espécies estudadas.

-Aos colegas de laboratório: Ana Cristina, Cristina, Odair, Mauricio, Marta, Fernando, Sérgio e Alexandre pela amizade e incentivo.

-Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, Lílíam e Sidnei pelo eficiente auxílio.

-As amigas de Pós Graduação, Érika e Cláudia pela força e amizade.

-Aos Profs. e colegas de graduação do Ibilce, UNESP, São José do Rio Preto pela amizade carinho e incentivo a carreira científica.

-À minha querida amiga “irmã” Selma Anita Tamashiro, pelo apoio, incentivo, carinho e principalmente paciência para ouvir horas de desabafo ao telefone.

-Aos amigos Felipe, Juliana, Larinha, Rubão, Thiago, Adriana, Glauce, Flávia e Jou, pelo companherismo e amizade fortalecida durante esses anos.

-Ao meu grande amigo e namorado Gustavo Quevedo Romero pela paciência, carinho, pelas discussões sobre ecologia e principalmente por estar sempre ao meu lado com tanta dedicação, compreensão e amor compartilhado a cada dia.

-Aos pais e irmãos do Gustavo, D. Neusa e Sr. Antônio, Francisco e Fernando pela amizade, respeito e carinho com que sempre me trataram.

-Aos meus pais e irmãos pelo incentivo ao conhecimento, amor, compreensão e por tudo que na vida me ensinaram.

-Á minha cunhada Lirian Soraya pelo carinho, incentivo e amizade.

Sumário

Abstract.....	9
Resumo.....	11
I.Introdução.....	13
1. A ordem Anura.....	13
2. A família Hylidae: características gerais.....	14
3. As espécies em estudo.....	14
4. Aspectos gerais da citogenética.....	16
5. Cromossomos supernumerários.....	17
6. A região organizadora nucleolar (NOR).....	20
7. Heterocromatina.....	22
8. Objetivos.....	25
9. Referências Bibliográficas.....	26
II. Artigo 1.....	33
Resumo.....	35
Introdução.....	35
Materiais e Métodos.....	36
Resultados.....	37
Discussão.....	39
Legenda das figuras.....	44
Figuras.....	46
Referências Bibliográficas.....	55
III. Artigo 2.....	60
Resumo.....	62
Introdução.....	62
Materiais e Métodos.....	63
Resultados.....	63
Discussão.....	64
Legenda das figuras.....	67

Figuras.....	68
Referências Bibliográficas.....	73
IV. Conclusões gerais.....	77

Abstract

Hyla nana and *H. sanborni* are morphologically very similar. *H. sanborni* was considered a sub-species of *H. nana*, but later it was revalidated as a good species, based on the finding of both forms in sympatry in some localities, the external and internal morphological differences and the structure of their mating-call. In this work, we analyzed cytogenetically *H. nana* and *H. sanborni* specimens from a population of Nova Aliança municipality, São Paulo, southeastern of Brazil. The chromosomal preparations were obtained from suspensions of intestinal and testis cells. The slides were stained conventionally with Giemsa solution or submitted to C-banding, Ag-NOR and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) techniques. Both species had the same diploid chromosome number, $2n=30$. The karyotypes of *H. nana* and *H. sanborni* differed from each other in the morphology of the chromosomes. *H. nana* had six metacentric pairs of chromosomes (3, 8, 9, 10, 11 and 13), five submetacentric pairs (1, 2, 4, 5 and 7) and four telocentric pairs (6, 12, 14 and 15). *H. sanborni* karyotype consisted of six metacentric pairs (2, 8, 9, 10, 11 and 14), four submetacentric pairs (1, 3, 4 and 6) and five telocentric (5, 7, 13 and 15) pairs. In four specimens of *H. nana*, a karyotype with $2n=31$ chromosomes was found, differing from that with $2n=30$ chromosomes only because of the presence of an extra small telocentric chromosome. This small supernumerary chromosome was found in 9.3% of the 43 specimens analyzed, it appears as an univalent in meiosis I and has no nucleolus organizing regions and heterochromatin. C-banded heterochromatin was detected in all of the centromeric regions of the karyotypes of both species. Besides the differences in chromosome morphology, specially in relation to the number of telocentric pairs – four in *H. nana* and five in *H. sanborni* – these two species also differed in the NOR-bearing chromosome, the metacentric pair 13 in *H. nana* and the telocentric pair 12, in *H. sanborni*. Additional active NORs were detected in one of the homologous chromosomes of the pairs 1, 5, 12 e 14 in some specimens of *H. nana*. It was detected by Ag-NOR technique and confirmed by FISH. In one specimen, an additional marker on the pair 6 was detected only by FISH. Therefore, six different patterns of NOR were identified and this intraspecific variability in *H. nana* was considered a polymorphism. These results suggests

a high rate of chromosomal evolution in *H. nana*. The cytogenetic data obtained in the present work, allow us to clearly separate the *H. nana* e de *H. sanborni* individuals from the Nova Aliança population. Also, the chromosomal morphology of both species analyzed differs from that found in the literature for populations from other geographic regions, suggesting that a systematic reevaluation of this group of species may be necessary.

Resumo

Hyla nana e *H. sanborni* são espécies que apresentam fortes semelhanças morfológicas. *H. sanborni* chegou a ser considerada subespécie de *H. nana*, mas posteriormente foi estabelecida como espécie plena, baseado nas observações osteológicas e do canto de anúncio, além da verificação de ambas ocorrendo em simpatria em vários locais. Neste trabalho, foi realizada a análise citogenética de espécimes de *H. nana* e de *H. sanborni* provenientes de uma população do município de Nova Aliança, São Paulo, sudeste do Brasil. As preparações cromossômicas, obtidas por suspensão de células de epitélio intestinal e de testículos, foram submetidas à coloração com Giemsa, bandamento C, Ag-NOR e hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH). As duas espécies analisadas apresentaram $2n=30$ cromossomos, sendo que *H. nana* apresentou seis pares metacêntricos, cinco pares submetacêntricos e quatro pares telocêntricos e *H. sanborni* apresentou seis pares metacêntricos, quatro submetacêntricos e cinco telocêntricos. Em quatro espécimes de *H. nana* foi encontrado um cariótipo com $2n=31$ cromossomos, igual àquele com $2n=30$ cromossomos, exceto pela presença de um pequeno cromossomo telocêntrico. Este pequeno cromossomo supernumerário ocorre em 9,3% dos espécimes analisados, apresenta-se como um univalente em meiose I, não contém regiões organizadoras do nucléolo (NOR) e não apresenta heterocromatina. Blocos heterocromáticos foram localizados somente na região centromérica em todos os cromossomos das duas espécies estudadas. Além de diferirem na morfologia de alguns cromossomos, principalmente em relação ao número de cromossomos telocêntricos - quatro em *H. nana* e cinco em *H. sanborni* -, essas espécies diferem também quanto à localização da NOR, no par 13, metacêntrico, em *H. nana* e no par 12, telocêntrico, em *H. sanborni*. NORs adicionais ativas em um dos cromossomos dos pares 1, 5, 12 e 14 foram detectadas nos cariótipos de alguns indivíduos de *H. nana*, através do método Ag-NOR e confirmados por FISH. Em um espécime, uma marcação adicional no par 6 só foi detectada por FISH. Foram identificados seis padrões diferentes, considerados como polimorfismos de NOR. Esses resultados indicam uma elevada taxa de evolução cromossômica em *H. nana*. As características citogenéticas estudadas neste trabalho permitem separar claramente os

indivíduos de *H. nana* e de *H. sanborni* analisados nesse estudo. A morfologia cromossômica das populações presentemente estudadas difere das descritas na literatura para populações de outras regiões geográficas, indicando a necessidade de uma revisão sistemática desse grupo de espécies.

I. Introdução

1. A ordem Anura

A classe Amphibia está dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (Duellman e Trueb, 1986).

As subclasses Labyrinthodontia e Lepospondyli foram pioneiras sobre a face da terra há cerca de 350 milhões de anos, tendo se extinguido após 200 milhões de anos, e nesse mesmo período surgiu a subclasse Lissamphibia (Pough *et al.*, 1993).

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

Os anuros são considerados cosmopolitas; somente não habitam as regiões cujo clima é extremamente adverso às suas adaptações morfofisiológicas. A maior diversidade é encontrada nos trópicos, sendo que onze famílias ocorrem na América do Sul (Duellman e Trueb, 1986).

A ordem Anura está dividida em 26 famílias (Frost, 1985) e dentre estas, a família Hylidae está representada por uma grande variedade de espécies que possuem ampla distribuição geográfica.

Na ordem Anura, o encontro dos sexos dá-se geralmente por orientação sonora. O macho vocaliza com o intuito de atrair a fêmea e, às vezes, também para afastar os machos de sua própria espécie. O canto é diversificado, variando de acordo com a espécie e o sexo do animal que o emite (Pough *et al.*, 1993).

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

A fêmea é quem escolhe o macho para o amplexo. O acasalamento em Anura é diferente pois a maioria não possuem órgão copulador introdutório. As fêmeas depositam os ovos em local apropriado, como a água, sob folheto na mata ou ainda armazenando em

partes do corpo (marsúpio). Até 10.000 ovos podem ser postos em uma única desova (Pough *et al.*, 1993).

2. A família Hylidae: características gerais

A família Hylidae apresenta quatro subfamílias, 37 gêneros, 630 espécies, sendo duas extintas (Duellman e Trueb, 1986). Esta família compreende anuros arborícolas, que usualmente possuem cabeça e olhos grandes e, frequentemente, cintura delgada, patas longas e de tamanho extremamente variável (de 17-140 mm) (Duellman e Trueb, 1986). Muitas espécies da família Hylidae possuem discos digitais aumentados e são denominadas pererecas (Pough *et al.*, 1993). É um grupo recente que apareceu primeiramente no paleoceno e acredita-se ser derivado dos leptodactídeos (Chatell, 1964 *apud* Ananias, 1996).

A subfamília Hylinae é constituída por 25 gêneros e aproximadamente 476 espécies, todos possuindo uma distribuição geográfica bastante variável, habitando a América do Norte e do Sul, oeste da Índia, Região Australo-Papua, Eurásia, incluindo o extremo norte da África e o Arquipélago japonês (Frost, 1985).

3. As espécies em estudo

As duas espécies de anfíbios estudadas no presente trabalho, *Hyla nana* Boulenger, 1889 e *H. sanborni* Schmidt, 1944 pertencem à família Hylidae e apresentam fortes semelhanças morfológicas (Del-Grande, 1995; Langone e Basso, 1987; Langone, 1994). Barrio (1967) chegou a considerar *H. sanborni* como sendo subespécie de *H. nana*. Posteriormente, Cardoso (1981) considerou *H. sanborni* como espécie plena, sendo isso também aceito por Basso *et al.* (1985) baseado nas observações osteológicas e do canto de anúncio, além da verificação de ambas ocorrendo em simpatria em vários locais (Langone e Basso, 1987).

Segundo Langone e Basso (1987), devido a semelhanças destas duas espécies muitos dos trabalhos feitos com *H. nana* se tratam de exemplares de *H. sanborni* e vice-versa, ou

ainda de outras espécies que também são consideradas muito semelhantes a estas. Cei e Pierotti (1955) (*apud* Langone e Basso, 1987) citam *Hyla nana* para as Ilhas del Delta, Província de Buenos Aires, Argentina, baseando-se em material de *H. sanborni*. Bokermann (1963) (*apud* Langone e Basso, 1987) descreve e apresenta uma figura de um girino de *H. nana* com base no material proveniente de Paranapiacaba, São Paulo. Cei (1980) apresenta o mesmo material dizendo se tratar de *H. nana nana*, porém Langone e Basso (1987), após ter examinado o material, constatam que se tratam de exemplares de *Hyla sanborni*.

H. nana Boulenger, 1889 tem como localidade tipo Colônia Resistência, sul do Chaco da República Argentina e a localidade tipo de *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 é Hacienda Alvarez, 15 km do nordeste de San Carlos no Uruguai (Langone e Basso, 1987).

Segundo Langone e Basso (1987), *Hyla nana* apresenta-se distribuída nas províncias de Buenos Aires, Corrientes, Chaco, Entre Rios, Jujuy, Misiones, Salta e Santa Fé na Argentina; no sudeste da Bolívia; nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo no Brasil; Sul do Paraguai e norte do Uruguai. Já *Hyla sanborni* possui distribuição confirmada nas províncias argentinas de Buenos Aires, Corrientes, Entre Rios e Santa Fé, no Uruguai e nos estados brasileiros de: São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Existem também várias localidades em que *Hyla nana* e *Hyla sanborni* ocorrem em simpatria: Municípios de Jaguariúna, Mogi-guaçu, Nova Itapirema (Cardoso, 1981) e Botucatu (Langone e Basso, 1987) no estado de São Paulo, Brasil, Delta do Paraná, Punta Lara, Província de Buenos Aires (Basso *et al.*, 1985), Província de Corrientes (Colonia Carlos Pellegrini, Alvear, Manantiales e arredores de Ituzaijó) na Argentina (Langone e Basso, 1987) e sudeste do Paraguai.

Segundo Langone (1994) *H. nana* e *H. sanborni* pertencem ao grupo *microcephala* embora Barrio (1967) e Cei (1987) as considerem pertencentes ao grupo *minuta* e Frost (1985) no grupo *nana*, constituído apenas por *Hyla nana* e *H. sanborni*.

4. Aspectos gerais da citogenética

A sistemática de anfíbios anuros têm se baseado em caracteres morfológicos, geralmente dos adultos, suscitando muitas dúvidas pela imprecisão ou por falta de mais dados que pudessem caracterizar de forma precisa as entidades sistemáticas. Atualmente leva-se em consideração outros critérios que têm fornecido maior solidez à sistemática e aberto uma visão biológica mais ampla. A genética tem nos proporcionado não somente a compreensão dos mecanismos de evolução, mas também demonstrado claramente a natureza hereditária dos caracteres de todo período de desenvolvimento, que é regido por sistema genético passível de mudanças evolutivas (Jim, 1970). O uso correto de caracteres morfológicos juntamente com os de outras áreas, como da citogenética, vem ajudando a esclarecer os problemas filogenéticos e taxômicos. Espécies que são morfolologicamente muito parecidas, como *Hyla brunnea* e *Hyla setentrionalis*, consideradas inicialmente como uma única espécie, foram submetidas à análise cariotípica que neste caso foi muito elucidativa. Demonstrou-se que a primeira apresentava o número de cromossomos $2n=34$ e a segunda $2n=24$, além de outras diferenças na morfologia destes constituintes celulares (Cole, 1974).

Existem ainda casos em que entre os espécimes morfolologicamente idênticos de uma mesma população de *Physalaemus petersi* foi encontrado dois cariótipos distintos (Lourenço *et. al.*, 1999), caso semelhante ocorreu com *Pseudis minuta* de $2n=24$ cromossomos, que foi encontrada uma população morfolologicamente muito parecida em que os espécimes apresentavam $2n=28$ cromossomos (Busin, 2000).

Das 4041 espécies conhecidas de anfíbios, apenas cerca de 1000 espécies foram estudadas do ponto de vista citogenético (Kuramoto, 1990). A maior parte destes dados citogenéticos referem-se à ordem Anura, perfazendo um total de 830 espécies com cariótipos descritos.

Os estudos cromossômicos são bastante extensos dentro da família Hylidae. Além da análise do cariótipo por coloração convencional, a estrutura e a morfologia dos cromossomos têm sido estudadas através de bandamento C, Ag-NOR, corantes fluorescentes, bandamento de replicação tardia e bandamento por enzimas de restrição, que

ajudam a compreender as alterações cromossômicas que ocorreram ao longo da evolução e, em alguns casos, o processo de diferenciação e especiação em anuros.

5. Cromossomos supernumerários

Em algumas espécies, além dos cromossomos que compõem o cariótipo normal, ditos cromossomos A, aparecem cromossomos extras, geralmente pequenos e heterocromáticos, chamados cromossomos B, cromossomos acessórios ou cromossomos supernumerários. Nas espécies que possuem esses cromossomos, o número deles por indivíduo pode ser muito variável. No milho, onde foram inicialmente descobertos, o número cromossômico varia de $2n=20$ a $2n=54$ ($20A + 34B$). Os cromossomos supernumerários podem tanto se assemelhar aos cromossomos do complemento normal como serem claramente distintos (Guerra, 1988).

A variação numérica se deve, em parte, ao comportamento meiótico irregular, frequentemente com formação de univalentes, migração preferencial para um dos pólos, retardo anafásico ou, mais raramente, pareamento com um cromossomo A. Em algumas espécies, o número de supernumerários varia entre diferentes células de um mesmo indivíduo. Neste caso isso se deve a um retardo anafásico, com eliminação do supernumerário de algumas células ou tecidos, ou à não disjunção mitótica, quando ambas as cromátides migram para um mesmo pólo. Em plantas, existem vários casos em que os supernumerários são completamente eliminados das raízes e são mantidos em níveis variáveis em outros órgãos (Guerra, 1988).

A julgar por esta alta instabilidade, dever-se-ia esperar que os supernumerários fossem rapidamente eliminados das espécies onde surgem. Entretanto, isso não ocorre e vários dados sugerem que em algumas espécies, o número de supernumerários é controlado geneticamente.

A existência de mecanismos capazes de controlar o número de supernumerários em determinados órgãos ou de favorecer a sua transmissão gamética sugere que esses cromossomos tenham alguma importância para as espécies. Embora não tenham sido localizados genes nesses cromossomos que causem alteração fenotípica importante, sabe-se

que em alguns casos os supernumerários interferem em características críticas para a espécie, como o pareamento de homólogos A, frequência de quiasmas ou fertilização dos gametas.

Em alguns espécimes de *Akodon* sp ($2n=25$) foi encontrado atividade gênica em supernumerários. Nesses roedores foram observadas regiões organizadoras de nucléolos em ambos os telômeros de um supernumerário submetacêntrico. Isto mostra que supernumerários podem conter informações genéticas. Entretanto, os genes da região organizadora do nucléolo (NOR) constituem um tipo especial de informação genética, devido a sua repetitividade. Com relação aos genes das NOR de *Akodon* sp, observou-se que os presentes no cromossomo supernumerário não têm conseqüências importantes para seu portador (Kasahara e Yonenaga-Yassuda, 1982). Por outro lado, em determinado momento da história evolutiva de uma espécie pode haver necessidade de alterar a frequência de quiasmas ou aumentar o limite de transcrição de genes rRNA, e os supernumerários poderão conferir uma vantagem adaptativa para a espécie.

Em Anura, apenas oito espécies apresentam cromossomos supernumerários distribuída em 5 famílias (Green e Sessions, 1991).

Nur e Nevo (1969) encontraram em uma população do hilídeo *Acris crepitans*, um pequeno metacêntrico que variava em número de zero a cinco supernumerários por indivíduo. Dessauer e Nevo (1969) encontraram uma variação de transferina e esterase no loci desta população que não ocorria nas outras populações. Esses autores concluíram que nesta população os cromossomos supernumerários podem provocar efeitos deletérios.

Cromossomos supernumerários também foram descritos em espécimes de *Rana temporaria* de quatro populações da Bulgária. Estes cromossomos são metacêntricos e a heterocromatina ocupa a região distal de um dos braços. A preservação dos cromossomos supernumerários em espécimes das populações analisadas indica que eles garantem alguma vantagem podendo estar relacionada com atividade transcricional ou com um aumento de recombinação, assim aumentando a variabilidade genética da espécie (Schmid, 1978b).

Belcheva e Sophianidou (1990) também concordam que cromossomos supernumerários conferem alguma vantagem seletiva através do aumento da variabilidade genética.

Kuramoto (1989) descreveu um cromossomo supernumerário telocêntrico em um macho de *Rana everetti* das Filipinas. Wu e Zhao (1985) descreveram um cromossomo supernumerário metacêntrico pequeno em uma espécie de ranídeo chinês *Amolops liagshanensis* que foi observado somente em fêmeas. Os autores concluíram que este supernumerário talvez seja um indicativo de um sistema sexual 0W/00. Contudo foram analisados somente três fêmeas e um macho e mais estudos precisariam ter sido feitos para confirmar esta hipótese.

Schmid *et al.* (1987) encontraram cromossomo supernumerário telocêntrico pequeno em uma fêmea de *Discoglossus pictus*, que segundo estes autores é muito semelhante ao pequeno cromossomo que aparece no cariótipo de *Ascaphus truei*.

Um único e grande supernumerário tem sido encontrado entre populações do sapo *Scaphiopus hammondi*. Esse é telocêntrico e heterocromático, exceto em uma região pequena onde se encontra a NOR.

Morescalchi (1968) descreveu cromossomos supernumerários em *Leiopelma hochstetteri*. Até 1988, 20 populações haviam sido estudadas e foi possível verificar a existência de muitas variações interpopulacionais em relação ao número de supernumerários. Os cromossomos supernumerários de *L. hochstetteri* parecem não ter efeito algum. Essa falta de influência pode ocasionar um aumento no número de cromossomos supernumerários (Green *et al.*, 1987).

Baldissera *et al.* (1993) também descreveram em *Hyla* sp. (*aff. circumdata*) um cromossomo supernumerário. Esta espécie apresenta um número cromossômico de $2n=24$ e em dois espécimes (um macho e uma fêmea) foi encontrado um cariótipo com $2n=25$, que era similar ao de $2n=24$, exceto pela presença de um pequeno metacêntrico.

6. A região organizadora nucleolar (NOR)

A transcrição contínua de múltiplas cópias dos genes dos rRNA garante um suprimento adequado destas moléculas, que são imediatamente compactadas com proteínas ribossomais para formar os ribossomos. A compactação ocorre no núcleo, numa estrutura grande e distinta, chamado nucléolo. O nucléolo contém grandes alças de DNA que emanam de um ou mais pares de cromossomos, cada uma das quais contém um agrupamento de genes de rRNA. Cada um desses agrupamentos é conhecido como uma região organizadora nucleolar (Alberts *et al.*, 1994).

As regiões organizadoras de nucléolos são sítios cromossômicos formados por numerosas cópias de genes que codificam rRNA 18S, 5,8S e 28S, arranjados "in tandem" e separadas por sequências espaçadoras (Miller, 1981). Esses espaçadores, ao contrário do que Miller (1981) acreditava podem transcrever, embora o transcrito formado seja rapidamente desorganizado.

Células eucarióticas sintetizam grande quantidade de rRNA que corresponde a cerca de 80% do total de RNA celular. Acima de 100 cópias de genes rRNA são necessárias para sintetizar milhares de novos ribossomos por ciclo celular, utilizado para manter a capacidade sintéticas das células filhas (Webb e Mougey, 1991).

O tamanho das diferentes NORs (mesmo que sejam homólogas) também pode variar bastante entre diferentes indivíduos da mesma espécie, devido ao diferente número de cópias do gene ribossomal apresentado por cada NOR (Schmid, 1982). King *et al.* (1990) relataram variação desse tipo entre diferentes células de um mesmo indivíduo em espécies de *Litoria* e *Cyclorana novaehollandiae* (Hylidae, Anura). No entanto, o número e a localização das NORs tendem a ser característicos de cada população ou espécie (Schmid, 1978a, b) embora a ocorrência de múltiplas NORs já tenha sido relatada para algumas espécies, como, por exemplo, em *Agalychnis callidryas*, *Bufo terrestris*, *Heleioporus albopunctatus*, *Hyla eyrei*, *H. inornatus*, *H. psammophilus*, *H. chrysocelis*, *H. versicolor*, *Litoria raniformis*, *Pleurodema thaul* e *Physalaemus petersi* (Foote *et al.*, 1991; King *et al.*, 1990; Lourenço *et al.*, 1998; Mahony e Robinson, 1986; Schmid *et al.*, 1995; Veloso e Iturra, 1987; Willey *et al.*, 1989). O mecanismo de aparecimento de NORs múltiplas não

foi bem esclarecido, sendo que amplificação de cístrons ribossômicos, ativação de NORs latentes, eventos de rearranjos cromossômicos, como inversões e translocações e elementos móveis podem estar correlacionados com o surgimento de NORs múltiplas.

Algumas evidências mostram que nem todas as NORs aparecem como constrições secundárias, e que em alguns casos elas contêm heterocromatina. Em anfíbios, particularmente em anuros, as NORs tendem a coincidir com banda C-positivas (King *et al.*, 1990).

Schmid (1978 a, b) detectou várias NORs em espécies da família Ranidae e em algumas delas as NORs se destacavam pelo tamanho maior, sempre localizada em uma grande constrição secundária. Segundo esse autor, espécies que não apresentam outras NORs em seu genoma, detectável pela prata, pode ser devido ao pequeno tamanho ou condição inativa. Hsu *et al.* (1975) consideram que cariótipos com baixo número de NORs são mais primitivos do que aqueles com várias, sendo aquele um estado ancestral.

Conhecendo-se as características das NORs e dos nucléolos, a análise cuidadosa do número, da localização cromossômica e das características moleculares das NORs em diferentes indivíduos pode permitir a identificação de homologias entre diferentes populações e espécies, possibilitando, em alguns casos, o reconhecimento de alguns rearranjos cromossômicos que possivelmente diferenciaram cariotipicamente diversos grupos. Além disso, a análise das NORs e dos nucléolos permite o estudo da atividade da célula durante o seu desenvolvimento, como é o caso da gametogênese.

A análise molecular dos “cluster” de rDNA das NORs é feita através da investigação de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição. A detecção das NORs para a análise do número e da localização cromossômica dessas regiões pode ser feita através de hibridização “*in situ*” ou através de técnicas citoquímicas, como coloração com mitramicina ou cromomicina, bandamento N e impregnação pelo íon prata. Dentre esses métodos, a hibridação “*in situ*” é o mais específico e evidencia todas as NORs, inclusive as inativas. A mitramicina e cromomicina coram regiões ricas em GC podendo evidenciar, portanto, não apenas as NORs, mas também muitos outros segmentos, como regiões heterocromáticas. O bandamento N envolve a extração de ácidos nucléicos e histonas dos cromossomos, seguida pela coloração com Giemsa e evidencia NORs. A

impregnação pelo íon prata é o método mais usado para a identificação de NORs, embora detecte apenas as NORs que estiveram ativas na intérfase.

O método de impregnação por prata baseia-se na afinidade de proteínas ácidas associadas as NORs ativas na intérfase pelo íon prata. Essas proteínas permanecem associadas as NORs mesmo durante a mitose e até o paquíteno da meiose.

Embora seja um método largamente utilizado, a impregnação pela prata metálica não é específico para NORs, pois outras estruturas como heterocromatina, cinetocoro e “cores” cromossômicos também podem ser marcadas. No entanto, essas estruturas quando marcadas são facilmente distinguíveis das NORs pelas suas formas e colorações, pois geralmente as NORs aparecem mais escuras e são puntiformes (Sumner, 1990).

O emprego do método Ag-NOR possibilitou observar que a maioria dos anuros, tanto de famílias primitivas como de derivadas, apresentam um par de NORs por genoma diplóide, o que levou King *et al.*, (1990) a sugerir que essa seja uma condição primitiva em Anura. Segundo Schmid (1982), estudos em Anura sugerem também que heteromorfismos de tamanho de NORs sejam bastante comuns nesse grupo e que NORs duplicadas ou triplicadas não ocorra em homozigose em populações selvagens, estando sempre associadas a NORs de tamanho “normal”.

7. Heterocromatina

O termo heterocromatina é usado genericamente para descrever a região do cromossomo que permanece condensada durante todo o ciclo celular e que é transcricionalmente inativa durante a intérfase (Alberts *et al.*, 1994). Outra característica muito marcante é a chamada replicação tardia do DNA, isto é, a heterocromatina inicia sua replicação depois da eucromatina, caracteristicamente no final da fase S.

A cromatina condensada é transcricionalmente inativa ou porque está em estado reprimido com seu DNA inativo temporária e reversivelmente ou por ser constituída de DNA não codificador e assim ser permanentemente incapaz de transcrever (John, 1988).

A heterocromatina constitutiva de diversos organismos já estudados é composta predominantemente por sequências de DNA curtas, altamente repetitivas e não

codificadoras, como confirmam as revisões de John (1988). A inexistência de genes na heterocromatina constitutiva e a observação de que essa cromatina pode ser eliminada ou não amplificada enquanto o restante do DNA sofre politenização em células somáticas levou alguns pesquisadores a considerarem a heterocromatina como um "lixo" do núcleo. No entanto, Sumner (1994) lembra que a ausência de genes não exclui a possibilidade dessa cromatina exercer outras funções.

Para King (1991) a heterocromatina exerce papel importante na proteção de sítios eucromáticos adjacentes de modificações estruturais acarretadas por recombinação, uma vez que reduz a formação de quiasmas.

Outras funções da heterocromatina podem estar relacionadas à sua posição, geralmente centromérica, e a sua composição, geralmente grandes quantidades de DNA repetido "*in tandem*" (Sumner, 1990).

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

A heterocromatina constitutiva é geralmente detectada citogeneticamente através da técnica de bandamento C. As heterocromatins com outras características são evidenciadas por outros métodos, como bandamento N, Q, H e mitramicina. A reação de Feulgen também é utilizada para evidenciar regiões com maior ou menor condensação (Sumner, 1990).

Dos bandamentos conhecidos, o C é o principal nos estudos de Anura, uma vez que os bandamentos G e R apresentam resultados satisfatórios apenas em vertebrados superiores. A análise da localização e do tamanho das bandas C, assim como as marcações de NORs permitem a identificação de cromossomos. Bandas C podem ser pericentroméricas, intersticiais ou teloméricas. Frequentemente o padrão de banda C varia entre as diferentes espécies, podendo ser um importante caráter sistemático, que permite a sugestão de rearranjos genéticos ocorridos durante a evolução do grupo em estudo (Sumner, 1990).

Diferenças nos padrões heterocromáticos entre espécies são encontradas tanto nos Anuros primitivos quanto nos mais derivados (King, 1991). Porém nos Anuros primitivos

de sete famílias pertencentes aos Archaeobatrachia foram detectadas pequenas quantidades de heterocromatina através das técnicas de bandamento. Já os Neobatrachia, anuros mais recentes, apresentam uma grande diversidade na distribuição e quantidade de heterocromatina. King *et al.* (1990) consideram que a evolução da heterocromatina no genoma dos anfíbios possa ocorrer ou por adição de heterocromatina ou por transformação da eucromatina em heterocromatina, ou ainda por uma evolução de múltiplos sítios de heterocromatina.

Schmid (1978a) detectou três classes de heterocromatina em bufonídeos e em hilídeos, diferenciadas pela resposta aos métodos de bandamento: banda C positiva fortemente fluorescente a quinacrina mostarda; banda C positiva fracamente fluorescente e heterocromatina telomérica com uma fraca banda C. Tais diferenças na coloração da heterocromatina, principalmente com relação à banda C, foram encontradas em alguns hilídeos dos gêneros *Litoria* (King, 1980) e *Hyla* (Anderson, 1991), nos leiopelmatídeos do gênero *Leiopelma* (Green, 1988), e nos ranídeos do gênero *Rana* (Schmid, 1978a).

Além destas diferenças, a heterocromatina pode se apresentar em estado heteromórfico. Schmid (1978a) encontrou diferenças no tamanho dos blocos heterocromáticos entre cromossomos homólogos em 7 espécies de bufonídeos e hilídeos. King (1980) detectou heteromorfismo em uma banda telomérica de *Litoria meireiana*.

Essas características da heterocromatina banda C positiva evidenciam que seu estudo pode fornecer importantes informações evolutivas, sendo, portanto um caráter citogenético a ser analisado.

8. Objetivos

Tendo em vista as fortes semelhanças morfológicas e ecológicas das espécies *Hyla nana* e *H. sanborni*, dificultando a identificação, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar e comparar citogeneticamente *H. nana* e *H. sanborni*, de uma população simpátrica, a fim de contribuir na solução dos problemas sistemáticos em nível de espécie.

9. Referências bibliográficas

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1994). **Biologia Molecular da Célula**, ed. Artes Médicas, Porto Alegre. pp.352-4, 378-80.
- Anderson, K. (1991). Chromosome evolution in holoactic *Hyla* treefrogs. In: GREEN, M.G. & SESSIONS, S.K. eds. **Amphibian Cytogenetics And Evolution**. Academic Press, San Diego, pp.299-331.
- Ananias, F. (1996). **Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 101p.
- Baldissera Jr., F.A.; Oliveira, P. S. L. & Kasahara, S. (1993). Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Bras. Genet.** 16 (2): 335-34.
- Barrio, A. (1967). Sobre la validez de *Hyla sanborni* y *H.uruguayana* (Anura, Hylidae). **Physis**, 26 (76): 521-524.
- Basso, N. J., Peri, S. I. & Di Tada, I. E. (1985). Revalidación de *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura: Hylidae). **Cuadernos herpetológicos**, Asociación Herpetológica Argentina, 1(3): 1-11.
- Belcheva, R. G. & Sofianidou, T. S. (1990). Karyological investigation of the brown frogs species (Anura, Ranidae) from Bulgaria and Greece. In: **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**, Birkhauser-Verlag, Basel, pp.141-146.

- Busin, C. S. (2000). **Estudo citogenético comparativo de *Pseudis minuta* e de *P. sp.* (aff. *minuta*) (ANURA, PSEUDIDAE)**. Dissertação de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. UNICAMP.
- Cardoso, A. J. (1981). **Organização espacial e temporal na reprodução e vida larvária de uma comunidade de hílideos no sudeste do Brasil (Amphibia, Anura)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. UNICAMP.
- Cei, J. M. & Pierotti, S. A. (1955). Notas batracológicas y biogeográficas argentinas V. Fauna bromelicola de la Isla del Delta (Paraná) en Provincia de Buenos Aires. **Anales del departamento de investigaciones Científicas**, Sección Biología, Universidad Nacional de Cuyo, 2 (2): 11-14.
- Cei, J. M. (1980). Amphibians of Argentina. **Monitore Zoologico Italiano**, (N.S.) Monografia (2):1-609.
- Cei, J. M. (1987). Additional notes to “Amphibians of Argentina”: an update, 1980-1986. **Monitore Zoologico Italiano**, (21): 209-272.
- Cole, C. J. (1974). Chromosome evolution in selected treefrogs including casqueheaded species (*Pternohyla*, *Tripriion*, *Hyla* and *Smilisca*). **Am. Mus. Novit.**, 2451: 1-10.
- Del-Grande, M. L. (1995). **Estudo comparado da biologia de *Hyla nana* e de *Hyla sanborni* (Amphibia, Anura, Hylidae), em Corumbataí, Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 70p.
- Dessauer, H. C. & Nevo, E. (1969). Geographic variation of blood and liver proteins in the cricket frogs. **Biochem. Genet.** (3): 171-188.

- Duellman, W. E. & Trueb, L. (1986). Cytogenetics, molecular and genomic evolution. In: **Biology of Amphibians**. McGraw - Hill Book Company, New York.
- Footo, D. L., Willey, J. E. & Little, M. L., Meyne, J. (1991). Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenet. Cell Genet.** (57): 196-199.
- Frost, D. R. (1985). **Amphibian Species of the World**. Allen Press and the Association of Systematics Collections, Lawrence, Kansas.
- Green, D.M. (1988). Heteromorphic sex chromosome in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zealand. **J. Heredity** (79): 165-9.
- Green, D. M. & Sessions, S. K. (1991). **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. 456pp.
- Green, D. M., Kezer, J. & Nussbaum, R. A. (1987). Supernumerary chromosome variation and heterochromatin distribution in the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. **Chromosoma** (95): 339-344.
- Guerra, M. S. (1988). **Introdução à Citogenética Geral**, ed. Guanabara, Rio de Janeiro, RJ. pp 97-98.
- Hsu, T. C., Spirito, S. E. & Pardue, M. L. (1975). Distribution of 18S+28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma** (53): 23-36.
- Jim, J. (1970). **Contribuição ao estudo de uma *Hyla* da região de Botucatu (AMPHIBIA, ANURA)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.

- John, B. (1988). The biology of heterochromatin. In: VERMA, R. S. (Ed). **Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects**. Cambridge University Press, Cambridge. pp 1-147.
- Kasahara, S. & Yonenaga-Yassuda, Y. (1982). Chromosomal variability in *Akodon* sp (Rodentia, Cricetidae). **Cytologia**, (47): 317-324.
- King, M. (1980). C-banding studies in Australian Hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** (80): 191-207.
- King, M., Contreras, S. N. & Honeycutt, R. L. (1990). Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. **Genetica** (80):17-29.
- King, M. (1991). Evolution of heterochromatin in the Amphibia genome. In: Green, M. G. & Sessions, S. K., eds. **Amphibian Cytogenetic and Evolution**. Academic Press, San Diego, pp. 359-91.
- Kuramoto, M. (1989). Karyological studies on some Philippine frogs. In **Current Herpetology in East Asia**. Ed. M. Matsui, T. Hikida, R.C. Goris, Herpetological Society of Japan, Kyoto, pp. 115-121.
- Kuramoto, M. (1990). A list of chromosome numbers of anuran amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. of Educ.** (39): 83-127.
- Langone, J. A. e Basso, N. G. (1987). Distribucion geografica y sinonima de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. **Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo**, 164 (11): 1-17.

- Langone, J. A. (1994). Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos). **Museo Damaso Antonio Larrañaga** (5): 9-45.
- Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M. e Cardoso, A. J. (1998). Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. **Chrom. Res.** (6): 621-628.
- Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M. e Cardoso, A. J. (1999). Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). **Can. J. Zool.** (77): 624-631.
- Mahony, M. J. & Robinson, E. S. (1986). Nucleolar organizer region (NOR) location in karyotypes of Australian ground frogs (Family Myobatrachidae). **Genetica** (68): 119-127.
- Miller, O. L. (1981). The nucleolus, chromosome and visualization of genetic activity. **J. Cell. Biol.** (91): 15-17.
- Morescalchi, A. (1968). The karyotype of two specimens of *Leiopelma hochstetteri* Fitz. (Amphibia, Salientia). **Caryologia** (21):37-46.
- Nur, U. & Nevo, E. (1969). Supernumerary chromosomes in the cricket frog, *Acris crepitans*. **Caryologia** (22): 97-102.
- Pough, F. H.; Heiser, J. B. & McFarland, W. N. (1993). Salamandras, Anuros e Cecílias. In: **A vida dos vertebrados**. Atheneu Editora, São Paulo.
- Schmid, M. (1978a). Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** (66): 361-388.

- Schmid, M. (1978b). Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma** (68): 131-48.
- Schmid, M. (1982). Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** (87): 327-44.
- Schmid, M., Vitelli, L. & Batistoni, R. (1987). Chromosome banding in Amphibia XI: Constitutive heterochromatin, nucleolus organizer regions 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma** (95): 271-284.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F. & Leon, P. (1995). Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell. Genet.** (69): 18-26.
- Sumner, A. T. (1990). C-banding and related methods. In: **Chromosome Banding**. Unwin Hyman Ed., London, pp. 39-69.
- Sumner, A. T. (1994). Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem** (38): 91-109.
- Veloso, A. & Iturra, P. (1987). Chromosome location of active ribosomal genes in *Pleurodema thaul* (Amphibia-Leptodactylidae). C-banding and polymorphism of the nucleolar organizer region. **Caryologia** (40): 359-368.
- Webb, B. S. & Mougey, E. B. (1991). News from the nucleolus: rRNA gene expression. **TIBS** (16): 58-62.

- Wiley, J. E., Little, M. L., Romano, M. A., Blount, D. A. & Cline, G. R. (1989). Polymorphism in the location of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Chromosoma** (97): 481-487.
- Wu, G. F., Zhao, E. (1985). Preliminary studies on karyotypes of the genus *Amolops* of the Hengduan mountains. **Acta Herpetol. Sinica** (4): 276-282.

II. Artigo 1

Citogenética de *Hyla nana* e de *H. sanborni* (Anura, Hylidae) e polimorfismo de NOR em *H. nana*

L. R. Medeiros¹, D. de C. Rossa-Feres² & S. M. Recco-Pimentel¹

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

² Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristovão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Palavras chaves: *Hyla*, Hylidae, cariótipo, polimorfismo.

Título resumido: Citogenética de *Hyla nana* e *H. sanborni*.

RESUMO

A análise citogenética de *Hyla nana* e de *H. sanborni*, provenientes de populações simpátricas na região noroeste do Estado de São Paulo, revelou um número diplóide de $2n=30$ cromossomos, com semelhança na morfologia de vários pares e no padrão de heterocromatina, detectada somente nas regiões centroméricas. Os cariótipos das duas espécies diferem entre si principalmente em relação ao número de cromossomos telocêntricos - quatro em *H. nana* e cinco em *H. sanborni* - e à localização da NOR, no par 13 metacêntrico em *H. nana* e no par 12 telocêntrico em *H. sanborni*. As características citogenéticas permitem separar claramente os indivíduos de *H. nana* e de *H. sanborni* analisados nesse estudo. A morfologia cromossômica das populações presentemente estudadas difere das descritas na literatura para populações de outras regiões geográficas, indicando a necessidade de uma revisão sistemática desse grupo de espécies. NORs adicionais ativas em um cromossomo dos pares 1, 5, 12 e 14, foram detectadas nos cariótipos de alguns indivíduos de *H. nana*, através do método Ag-NOR e confirmados por FISH. Em um espécime, a NOR adicional de um cromossomo do par 6, só foi detectada por FISH, o que sugere tratar-se de uma região de homologia com rDNA. Foram identificados seis padrões diferentes, considerados como polimorfismos de NOR. Esses resultados indicam uma elevada taxa de evolução cromossômica em *H. nana*.

INTRODUÇÃO

Hyla nana e *H. sanborni* são espécies morfologicamente (Langone & Basso, 1987; Langone, 1994) e ecologicamente (Del-Grande, 1995; Rossa-Feres, 1997) muito semelhantes. Barrio (1967) chegou a considerar *H. sanborni* como subespécie de *H. nana*. Posteriormente, Cardoso (1981) considerou *H. sanborni* como espécie plena, tratamento aceito por Basso *et al.* (1985) e Langone & Basso (1987), com base principalmente em observações osteológicas e do canto de anúncio. Além disso, as relações dessas espécies com outros grupos de espécies do gênero *Hyla* são controversas: Langone (1994)

considerou-as no grupo *microcephala*, Barrio (1967) e Cei (1987) no grupo *minuta* e Frost (1985) no grupo *nana*, constituído apenas por *Hyla nana* e *H. sanborni*.

A sistemática dos anfíbios anuros tem sido baseada principalmente em caracteres morfológicos, os quais, algumas vezes, não permitem caracterizar de forma precisa os táxons analisados. A associação com caracteres de outras áreas, como da citogenética, vem ajudando a esclarecer problemas filogenéticos e taxonômicos, especialmente entre os anfíbios anuros, que possuem várias espécies com pequena diferenciação morfológica (Bogart & Wasserman, 1972; Hillis, 1991).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e comparar citogeneticamente *Hyla nana* e *H. sanborni*, através de análise cariotípica, de localização e número de regiões organizadoras de nucléolo e do padrão de heterocromatina.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes

Foram analisados 43 espécimes de *Hyla nana* (40 machos e 3 fêmeas) e 27 de *H. sanborni* (todos machos), provenientes de um açude de água temporária, localizado em área de pastagem no distrito de Nova Itapirema, município de Nova Aliança (21°11'S – 49°42'W), Estado de São Paulo, Brasil. As coletas foram realizadas no período de fevereiro a maio de 1998 e de outubro de 1998 a maio de 1999.

Após a retirada do intestino e dos testículos, órgãos utilizados para a análise citogenética, os espécimes foram fixados em formalina a 10%, durante sete a dez dias, conservados em álcool 70°GL e depositados na coleção do Museu de História Natural "Prof. Adão José Cardoso", da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), e no Departamento de Zoologia de São José do Rio Preto, UNESP (DZSJRP), com os números ZUEC 11405 a 11412, 11416 a 11418, 11647 a 11677 (*H. nana*), ZUEC 11678 a 11692 (*H. sanborni*), DZSJRP 1111 (*H. nana*), DZSJRP 990 a 1001 (*H. sanborni*).

Obtenção das preparações cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de suspensão de células do epitélio intestinal e testículos, conforme os procedimentos descritos por Stephenson *et al.* (1972).

O material foi submetido às técnicas de coloração convencional com Giemsa, impregnação pelo íon prata (Howell & Black, 1980), bandamento C (King, 1980) e hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH) (Viégas-Péquignot, 1992), com sondas de rDNA. Nos experimentos de hibridação “*in situ*” foram utilizadas como sonda o plasmídeo HM 123 ou uma mistura dos plasmídeos HM 123 e HM 456, contendo fragmentos de rDNA de *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival *et al.*, 1979), os quais foram marcados com biotina por “nick translation”. Em um indivíduo que apresentou uma marcação adicional, não detectada pelo método Ag-NOR, foi utilizado um plasmídeo recombinante obtido a partir do HM 123 que contém a maior parte da região codificadora do RNA 28S (Lourenço *et al.*, em preparação). As preparações cromossômicas submetidas aos diversos métodos citoquímicos e ao FISH foram analisadas sob microscópio Olympus BX60. Os cromossomos foram classificados de acordo com os valores propostos por Green & Sessions (1991).

RESULTADOS

Descrição dos cariótipos e banda C

Hyla nana e *H. sanborni* apresentaram cariótipos com $2n=30$ cromossomos e número fundamental 52 e 50, respectivamente. Em *H. nana* os pares 3, 8, 9, 10, 11 e 13 são metacêntricos; os pares 1, 2, 4, 5 e 7 submetacêntricos e os pares 6, 12, 14 e 15 são telocêntricos (fig. 1A, 8 e tabela 1). Em algumas metáfases mitóticas coradas com Giemsa foi possível identificar uma constrição secundária no braço curto do par 1 e no braço longo dos cromossomos 5 e 13 (fig. 1A e B).

Os exemplares de *H. sanborni* apresentaram um cariótipo contendo os pares 2, 8, 9, 10, 11 e 14 metacêntricos; os pares 1, 3, 4 e 6 submetacêntricos; e 5, 7, 12, 13 e 15 telocêntricos (fig. 1C, 8 e tabela 1). Não foi encontrada nenhuma constrição secundária nas metáfases analisadas.

Hyla nana e *H. sanborni* apresentaram o mesmo padrão de banda C. Todos os cromossomos apresentaram somente blocos de heterocromatina na região centromérica (figs. 2A e B).

As células em meiose I apresentam 15 bivalentes em *H. nana* e *H. sanborni* (figs. 3A e B).

Regiões impregnadas por prata

O método Ag-NOR permitiu identificar marcação na região telomérica do braço longo do par 13 de todos os espécimes de *Hyla nana* estudados, e múltiplas NORs em sete dos 43 indivíduos analisados (fig. 4A-F). Foram observados cinco padrões de distribuição de NOR adicional. Impregnação característica de NOR ativa foi identificada em um dos cromossomos dos pares autossômicos 1, 5, 12 e 14 de *H. nana*, com diferentes combinações individuais. A NOR dos cromossomos 5, 12 e 14 localiza-se no braço longo; a do cromossomo 12 aparece na região próxima ao telômero; a do cromossomo 14 está localizada em uma posição intermediária entre o centrômero e o telômero e a do par 1 aparece no braço curto (figs. 4B-F). As NORs dos cromossomos 1, 5 e 13 coincidem com regiões visualizadas como constrições secundárias em metáfases coradas com Giemsa.

A hibridação “*in situ*” utilizando HM 123 e HM 123 em conjunto com HM 456 como sonda, em sete indivíduos de *H. nana* mostrou marcações nas mesmas regiões de NOR observadas pelo método de impregnação por prata (fig. 5A-E). Adicionalmente em um indivíduo de *H. nana* foi possível detectar por FISH uma marcação em um dos homólogos do par cromossômico 6 (fig. 5F). Esta marcação não foi encontrada utilizando-se o método Ag-NOR (fig. 4F).

Em *Hyla sanborni* o método de prata e FISH detectou NOR em apenas um par de cromossomos mitóticos, localizado no telômero do par telocêntrico 12 (fig. 6A e B).

Nas duas espécies, do presente trabalho, não foi observado heteromorfismo de tamanho de NORs, variabilidade relativamente comum em anuros.

Através do método de Ag-NOR foi possível detectar 1 ou 2 nucléolos em *H. sanborni* nos núcleos interfásicos das células do epitélio intestinal (fig. 7B), em *H. nana* foi possível se detectar 1, 2 ou 3 nucléolos (fig. 7A).

DISCUSSÃO

Os cariótipos

Entre os hílideos, há dois grupos cromossômicos principais, com cariótipo básico de $2n=24$ e $2n=30$ cromossomos. Porém, são encontrados também algumas espécies com cariótipos $2n=18$, 20, 22 e 26 (ver Kuramoto, 1990). Segundo Duellman & Trueb (1986) esses dois grupos teriam se originado de um ancestral com $2n=26$ cromossomos. As espécies presentemente estudadas pertencem ao grupo dos hílideos com $2n=30$ cromossomos. A maioria das espécies de *Hyla* com $2n=30$ cromossomos apresenta número variável de telocêntricos, sendo que algumas, como *Hyla minuta*, não possuem nenhum par e outras têm vários telocêntricos como, por exemplo, *H. labialis* com cinco pares (Duellman & Trueb, 1986; Bogart, 1973). *Hyla nana* e *H. sanborni* possuem 4 e 5 telocêntricos, respectivamente. A presença de cromossomos telocêntricos sugere um possível caminho evolutivo, seja ele por fusão ou fissão (Bogart, 1973). Porém, as diferenças cariotípicas encontradas entre as espécies não se restringem apenas ao número de telocêntricos e não poderiam ser explicadas apenas por esses mecanismos. Segundo Bogart (1973), outros mecanismos, como rearranjos cromossômicos do tipo inversões pericêntricas podem ter contribuído para os cariótipos atuais.

Os cariótipos de *Hyla nana* e de *H. sanborni* do presente estudo, além de diferirem entre si, diferem também dos descritos na literatura para populações de outras regiões. Assim, as medidas de tamanho de cromossomos de *H. nana* indicam que o par 12 é telocêntrico e o 13 é metacêntrico, ao contrário do descrito por Skuk & Langone (1992) que, estudando uma população da Província do Chaco na Argentina, classificaram o par 12 dessa espécie como metacêntrico e o 13 como telocêntrico. Provavelmente ocorreu uma inversão na posição desses dois pares, na montagem do cariótipo pelos autores, já que esses cromossomos apresentam tamanhos muito próximos. No entanto, Skuk & Langone (1992) relatam também que em uma das metáfases analisadas foi detectada uma constrição secundária próxima ao telômero do braço longo dos pares 6 e 11. Essa constrição não foi detectada no presente trabalho. Foram encontradas constrições secundárias no braço longo dos pares 5 e 13 e no braço curto do par 1.

Uma outra descrição do cariótipo de *Hyla nana* foi feita por Rabello (1970), que descreveu os pares 5 e 9 como acrocêntricos. Esses dados não concordam com os obtidos no presente estudo. No entanto, se no trabalho de Rabello (1970), for invertida a ordem do par 6 pelo par 5, e o par 9 pelo 12, o cariótipo ficaria idêntico ao do presente estudo. Rabello (1970) não informa em seu trabalho a procedência dos animais. Bogart (1973) descreve o cariótipo de *Hyla nana* com 5 telocêntricos, proveniente do norte da Argentina. Mas, surpreendentemente, invertendo-se a posição do par 13 com o 14, esse cariótipo fica idêntico ao de *H. sanborni* descrito no presente trabalho.

Já para *Hyla sanborni*, Skuk & Langone (1992) descreveram os pares 7 e 13 como metacêntricos e os pares 9 e 14 como acrocêntricos, em indivíduos provenientes de Ponta Grossa, Estado do Paraná. No presente estudo, os pares 7 e 13 são telocêntricos e os pares 9 e 14 são metacêntricos. Skuk & Langone (1992) encontraram uma constrição secundária no par 8, não observada em nenhuma metáfase no presente estudo. Além disso, a população de *H. sanborni* de Nova Aliança difere daquela do Paraná analisada por Skuk & Langone (1992), por apresentar cinco telocêntricos, ao invés de quatro.

Surpreendente também é a grande semelhança entre o cariótipo de *Hyla nana* de Nova Aliança (presente estudo) com o de *H. sanborni* do Paraná (Skuk & Langone, 1992). Neste último, colocando-se o telocêntrico maior (nº 9) de *H. sanborni* na posição 6, obtêm-se o mesmo cariótipo de *H. nana* de Nova Aliança. Considerando-se que Skuk & Langone (1992) mediram apenas duas metáfases de *H. sanborni*, e que esses cromossomos médios têm todos tamanhos muito próximos, a possibilidade de ter ocorrido um posicionamento invertido no cariótipo é muito grande. Comparações da morfologia cromossômica das populações de *H. nana* e de *H. sanborni* presentemente estudadas com as descritas na literatura mostram que, com apenas uma inversão na posição de dois pares de cromossomos, o cariótipo de *Hyla nana* do norte da Argentina (Bogart, 1973) e o de *H. sanborni* do Paraná (Skuk & Langone, 1992) ficam idênticos, respectivamente, ao de *H. sanborni* e de *H. nana* de Nova Aliança (presente estudo). É possível que a semelhança morfológica entre essas duas espécies esteja dificultando sua identificação. Uma outra possibilidade é que as diferenças detectadas estejam caracterizando as diferentes populações dessas espécies, que provavelmente sofreram pequenas modificações em seus

cariótipos, podendo-se especular se um processo de especiação incipiente estaria ocorrendo nessas populações.

Hyla nana e *H. sanborni* apresentaram o mesmo padrão de distribuição da heterocromatina, com quantidades relativamente pequenas somente na região do centrômero, não ocorrendo heteromorfismo no tamanho da banda C. Portanto, mecanismos como aumento de heterocromatina não parecem estar envolvidos na diferenciação dos cariótipos dessas espécies.

Outra característica que distingue os dois cariótipos é a localização da NOR no par 12, telocêntrico, em *Hyla sanborni* e no par 13, metacêntrico, em *H. nana*. Um par de NOR por genoma diplóide está de acordo com as observações referentes à maioria dos anuros, inclusive a famílias primitivas, como mostram Vitelli *et al.* (1982) e Schmid (1982). Porém, 14% dos espécimes de *H. nana* mostraram NORs adicionais ativas, detectadas pelo método Ag-NOR, geralmente em um dos homólogos de um par. Esse tipo de variação intrapopulacional foi descrito em poucas espécies de Anura, como *Hyla chrysosceles* e *H. versicolor* (Wiley *et al.*, 1989), *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991), *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995) e *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998). Como algumas vezes a impregnação por prata evidencia inespecificamente blocos de heterocromatina, a análise por hibridação “*in situ*” permitiu confirmar que as regiões adicionais marcadas por prata continham de fato seqüências de DNA ribossomal. Estudos de hibridação “*in situ*” fluorescente com sondas de rDNA em *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995) e em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998) mostraram, como para *H. nana*, marcação nos mesmos locais que aqueles obtidos com o método Ag-NOR. Portanto, os vários padrões observados se referem a uma variação de número e localização de NORs, e não a uma diferença intrapopulacional de expressão da NOR.

Os mecanismos envolvidos na dispersão da NOR no genoma foram discutidos por Foote *et al.* (1991), Schmid *et al.* (1995), Kaiser *et al.* (1996) e Lourenço *et al.* (1998), que destacaram algumas possibilidades: transposição de NOR que seriam carregadas por elementos móveis presentes próximos a essas regiões; amplificação de cístrons “orphon like” de rDNA; reinserção de rDNA durante a amplificação desses cístrons, que ocorre durante a ovogênese de anfíbios; uma outra possibilidade é a ocorrência de translocações e

inversões envolvendo segmentos cromossômicos contendo a NOR. O mecanismo de translocação é pouco provável no caso de *H. nana*, uma vez que não foi detectada diferença significativa no tamanho dos cromossomos e nas razões de braços dos cromossomos com e sem NOR adicional nos indivíduos analisados.

Utilizando a técnica de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH) foi possível detectar, em *Hyla nana*, uma marcação de NOR em um dos homólogos do par cromossômico 6, não visualizada por Ag-NOR. Casos semelhantes foram descritos por Wiley *et al.* (1989) para *Hyla chrysoscelis* e *H. versicolor*. NORs inativas não são detectadas pelo método de impregnação por prata que detecta NORs ativas na intérfase precedente (Miller *et al.*, 1976a, b; Engel *et al.*, 1977). Resultados que independem do estado de atividade da NOR podem ser esperados por estudos de hibridação “*in situ*” (Schmid, 1978). No entanto, nenhum caso de regulação da NOR foi encontrada em anfíbios (Kaiser *et al.*, 1996). Portanto a marcação encontrada no cromossomo do par 6 parece ser uma região de homologia com rDNA.

Duas ou mais espécies?

No presente estudo analisamos populações sintópicas diferenciadas pelas seguintes características: canto de anúncio – frequência dominante em torno de 4KHz em *Hyla nana* e de 6KHz em *H. sanborni*; comprimento rostro-cloacal – *H. nana* = $20,22 \pm 1,03$ mm, n= 211 e *H. sanborni*= $16,70 \pm 1,51$ mm, n= 109; coloração do saco vocal – amarelo em *H. nana* e transparente em *H. sanborni*; período de ocorrência sazonal – setembro/outubro a março para *H. nana* e dezembro/janeiro a março para *H. sanborni*; altura do sítio de vocalização – *H. nana* = $24,3 \pm 14$ cm, n= 600 e *H. sanborni* = $47,8 \pm 18$ cm, n= 109 (Rossa-Feres, 1997).

Através dos métodos citogenéticos utilizados, essas duas espécies puderam ser facilmente diferenciadas pela morfologia dos cromossomos, especialmente pelo número de cromossomos telocêntricos (um a mais em *H. sanborni*) e pela localização da NOR (no par 13 metacêntrico em *H. nana* e no par 12 telocêntrico em *H. sanborni*). Embora a morfologia de alguns cromossomos seja bastante semelhante entre essas espécies, as

medidas realizadas localizam alguns desses cromossomos em posições não coincidentes nos ideogramas.

A análise conjunta das diferenças citogenéticas entre as populações simpátricas presentemente estudadas, da variabilidade na distribuição das NORs em *H. nana*, e das diferenças cariotípicas detectadas com relação às populações de outras regiões (ver Rabello, 1970; Bogart, 1973; Skuk & Langone, 1992), sugerimos a possibilidade da existência de mais de duas espécies sob os nomes *H. nana* e *H. sanborni*.

A presença de múltiplas NORs é considerada um caráter derivado em Anura (King *et al.*, 1990). O polimorfismo de NOR em *H. nana* indica grande variabilidade nesse genoma, sugerindo alta taxa de evolução cromossômica. Assim, o estudo de populações de diferentes regiões e, especialmente, de indivíduos provenientes da localidade-tipo, utilizando métodos para a análise da estrutura cromossômica (morfometria, bandamento, fluorocromos, Ag-NOR e hibridação “*in situ*”), juntamente com estudos morfológicos, ecológicos e da estrutura do canto poderão auxiliar e compreender melhor os processos envolvidos na diferenciação dessas espécies e suas populações.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. À Klélia Aparecida de Carvalho pelo auxílio técnico de laboratório, ao Marcelo Menin pela coleta dos espécimes estudados, a Luciana Bolsoni Lourenço pelo auxílio técnico, análise e discussão dos resultados de FISH e ao Prof. Dr. Francisco Langeani pelas valiosas discussões sobre evolução e especiação.

Legendas das figuras

Fig. 1: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Hyla nana* e de *H. sanborni* corados com Giemsa. A: cariótipo *H. nana*; B: mostrando a constrição secundária dos pares 1 e 5 de *H. nana*; C: Cariótipo de *H. sanborni* (Barra= 5µm).

Fig. 2: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Hyla nana* e de *H. sanborni* submetidos a banda C. A: *H. nana*; B: *H. sanborni* (Barra= 5µm).

Fig. 3: Cromossomos meióticos de *H. nana* e de *H. sanborni* submetidos a coloração com Giemsa. A: mostrando 15 bivalentes em *H. nana*; B: 15 bivalentes em *H. sanborni* (Barra= 5µm).

Fig. 4: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Hyla nana* submetidos ao método de Ag-NOR. A: cariótipo mostrando a marcação do par 13; B: NOR dos pares 1 e 13. C: NOR dos pares 1, 13 e 14. D: NOR dos pares 1, 12 e 13 ; E: NOR dos pares 12 e 13; F: NOR dos pares 5 e 13, mostrando também o par 6 não marcado pela prata. As setas indicam as NORs (Barra = 5µm).

Fig. 5: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Hyla nana* submetidos ao método de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH). A: cariótipo mostrando a marcação do par 13; B: marcação dos pares 1 e 13. C: marcação dos pares 1, 13 e 14. D: marcação dos pares 1, 12 e 13; E: marcação dos pares 12 e 13; F: marcação dos pares 5 e 13. (Barra = 5µm).

Fig. 6: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Hyla sanborni*. A: cariótipo submetidos ao método de Ag-NOR mostrando a marcação do par 12; B: cromossomos do par 12 submetidos ao método de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH). (Barra = 5µm).

Fig. 7: Nucléolos em células submetidas ao método de Ag-NOR. A: 1, 2 ou 3 nucléolos marcados em *H. nana*; B: 1 ou 2 nucléolos marcados em *H. sanborni* (Barra = 5µm).

Fig. 8: Ideograma representativo dos cariótipos. As áreas pretas indicam regiões de heterocromatina, os círculos cinza indicam a NOR, regiões em aberto indicam a constrição secundária. A: *H. nana*, cabeças de setas indicam regiões polimórficas; B: *H. sanborni*.

TABELA 1: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *H. nana* e de *H. sanborni*. Classificação segundo Green & Sessions (1991).

cromossomo	<i>Hyla nana</i> (n=31)				<i>Hyla sanborni</i> (n=12)			
	T.R.(%)	R.B	I.C.	P.C.	T.R.(%)	R.B.	I.C.	P.C.
	X ± S	X ± S	X ± S		X ± S	X ± S		
1	11,57 ±0,37	2,99 ±0,33	0,25 ±0,03	SM	11,48 ±0,32	2,70 ±0,38	0,27 ±0,03	SM
2	10,10 ±0,28	2,24 ±0,34	0,30 ±0,04	SM	10,62 ±0,4	1,30 ±0,41	0,44 ±0,03	M
3	9,61 ±0,24	1,11 ±0,14	0,47 ±0,03	M	9,58 ±0,33	2,89 ±0,35	0,31 ±0,04	SM
4	8,19 ±0,43	2,88 ±0,36	0,25 ±0,02	SM	7,81 ±0,28	2,29 ±0,42	0,26 ±0,02	SM
5	7,26 ±0,39	2,79 ±0,28	0,26 ±0,03	SM	7,23 ±0,27	-	-	T
6	7,24 ±0,33	-	-	T	6,71 ±0,39	2,18 ±0,24	0,28 ±0,03	SM
7	6,75 ±0,22	2,64 ±0,43	0,28 ±0,02	SM	6,43 ±0,42	-	-	T
8	6,38 ±0,29	1,46 ±0,27	0,39 ±0,04	M	6,14 ±0,32	1,46 ±0,30	0,41 ±0,01	M
9	5,73 ±0,41	1,39 ±0,35	0,41 ±0,03	M	5,71 ±0,46	1,34 ±0,33	0,42 ±0,03	M
10	5,31 ±0,36	1,26 ±0,26	0,43 ±0,02	M	5,22 ±0,15	1,30 ±0,27	0,42 ±0,02	M
11	4,92 ±0,24	1,43 ±0,37	0,41 ±0,03	M	5,15 ±0,24	1,15 ±0,20	0,46 ±0,03	M
12	4,77 ±0,27	-	-	T	4,74 ±0,41	-	-	T
13	4,53 ±0,41	1,39 ±0,36	0,42 ±0,03	M	4,29 ±0,32	-	-	T
14	3,8 ±0,31	-	-	T	3,92 ±0,43	1,07 ±0,32	0,44 ±0,03	M
15	3,34 ±0,28	-	-	T	3,34 ±0,27	-	-	T

R.B.= Relação de braços; T.R.= Tamanho relativo; I.C.= Índice Centromérico; P.C.= Posição do centrômero; M.= Metacêntrico; S.M.= Submetacêntrico; T.= Telocêntrico; n= Número de metáfases medidas.

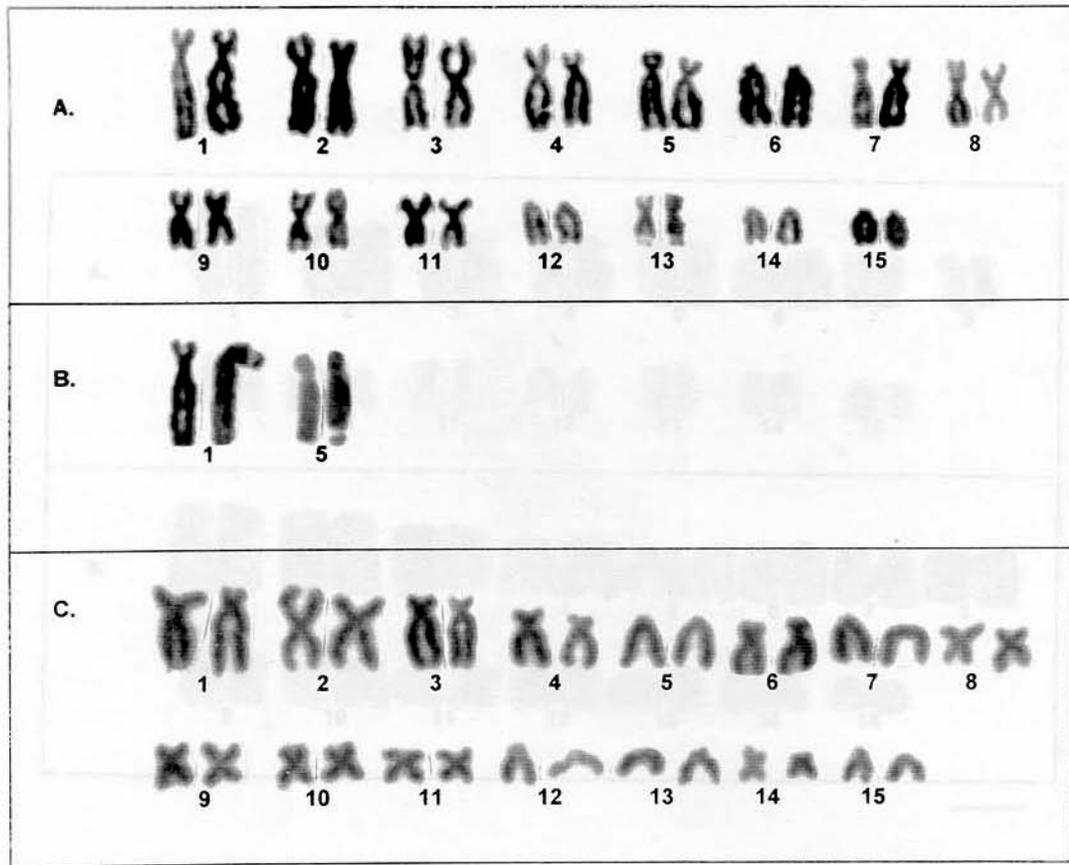


Fig. 1

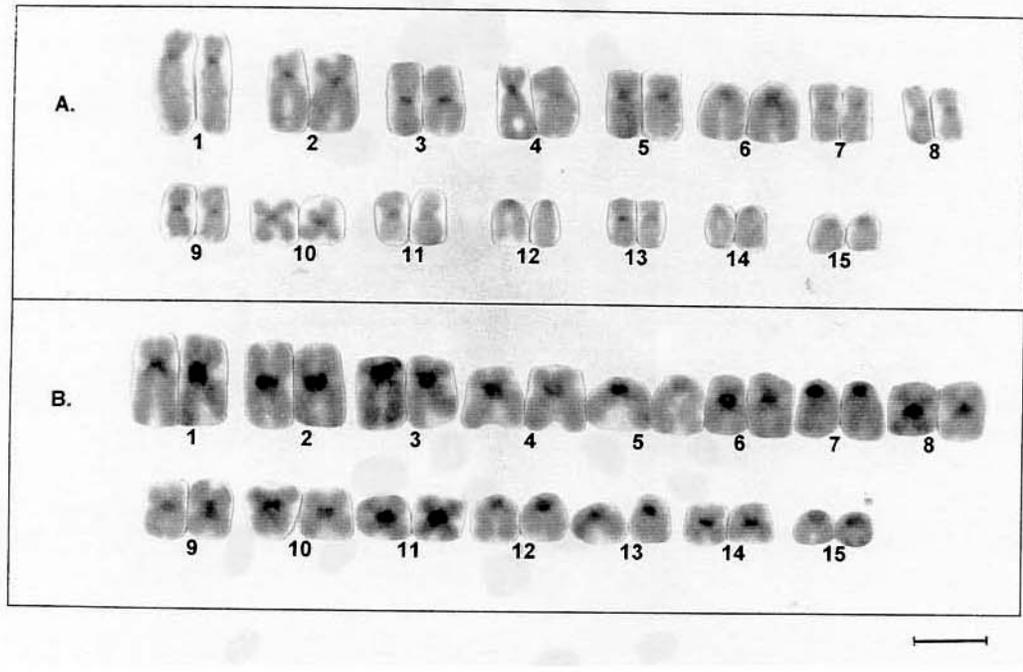


Fig. 2

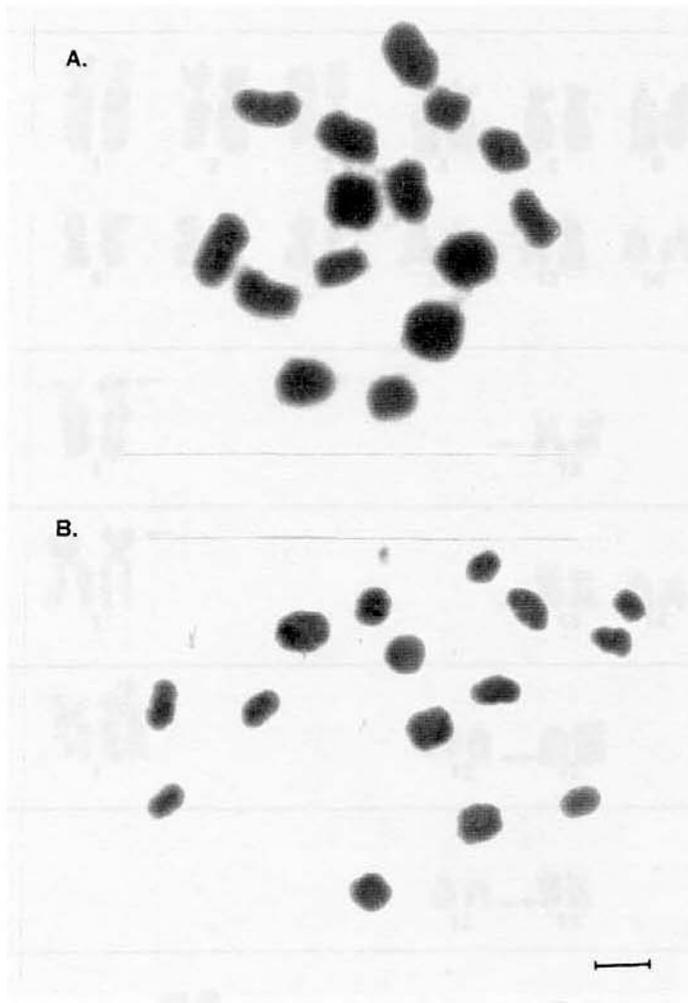


Fig. 3

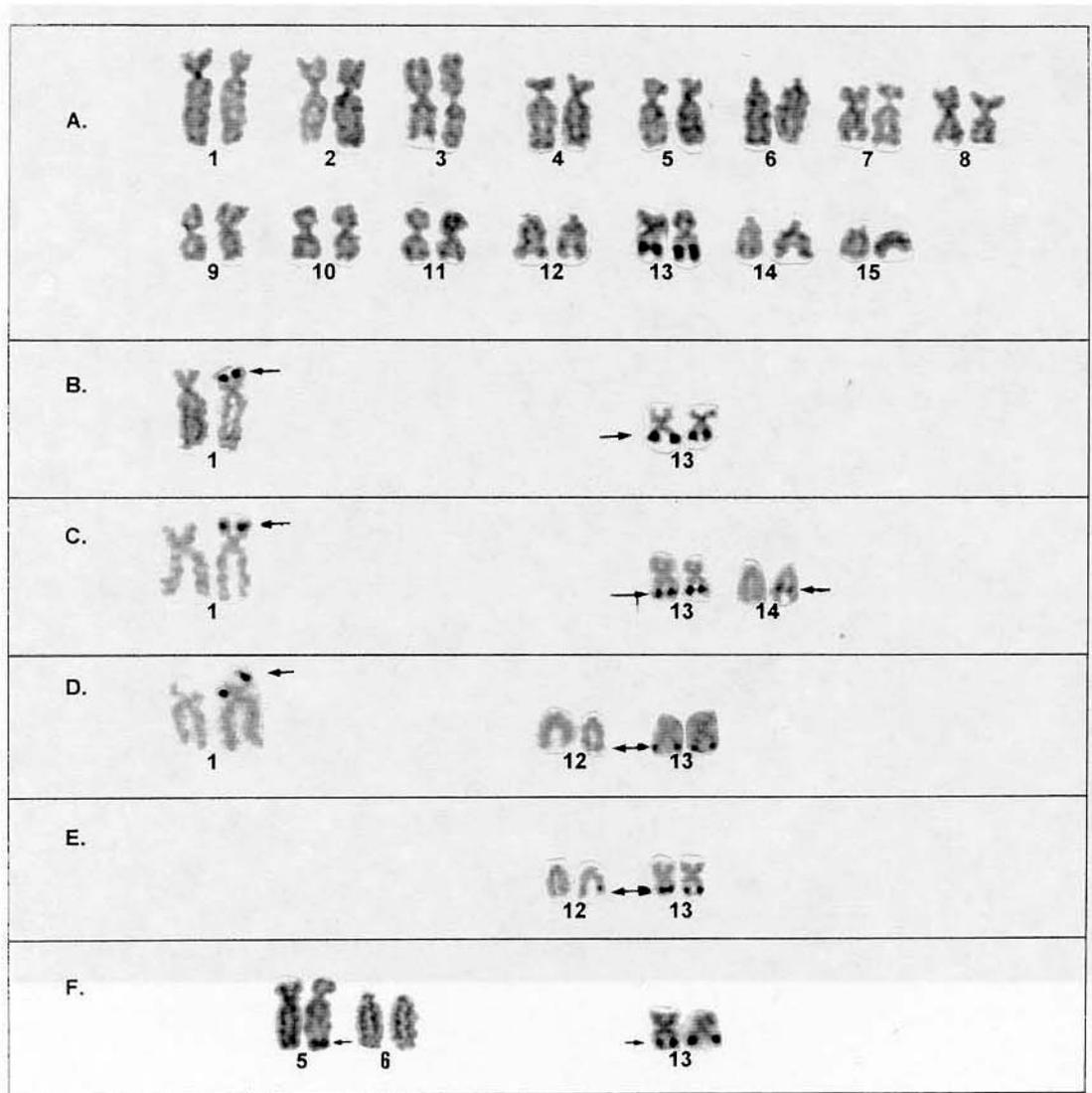


Fig. 4



Fig. 5

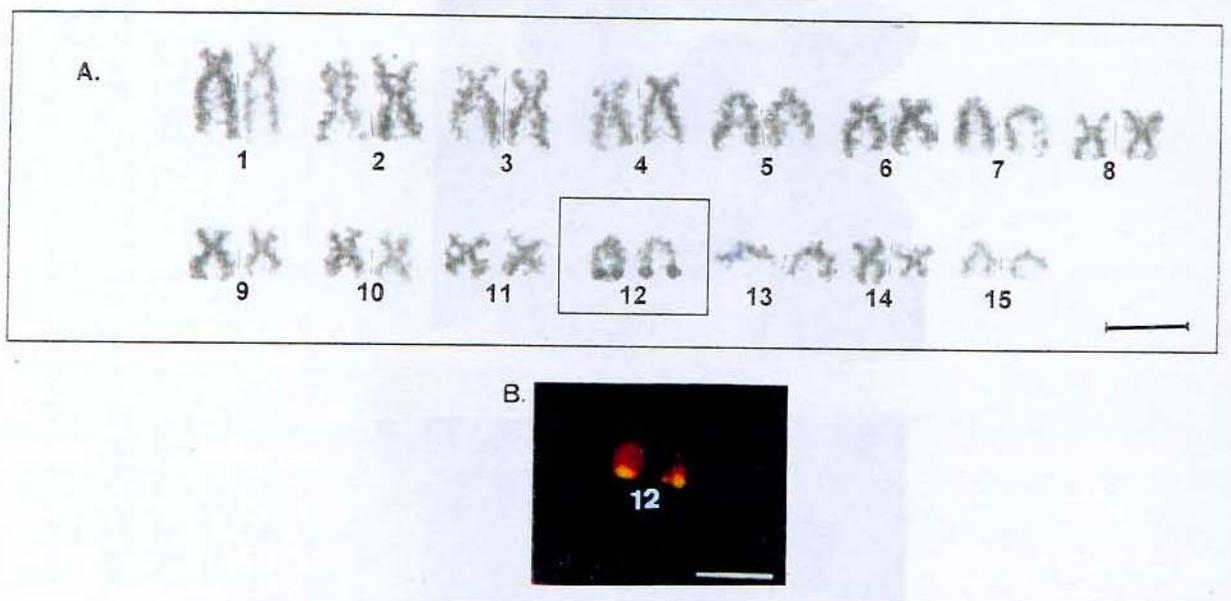


Fig. 6

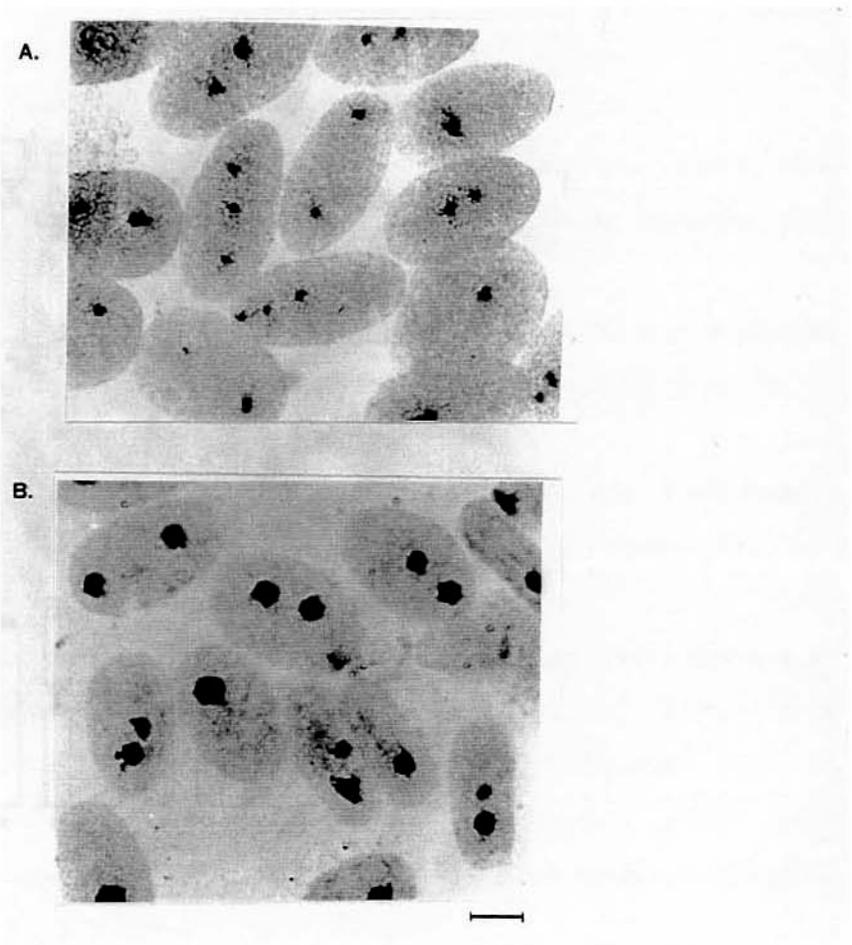
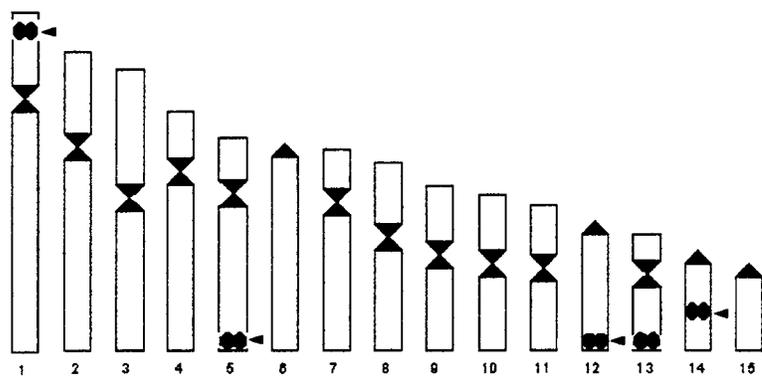


Fig. 7

A.



B.

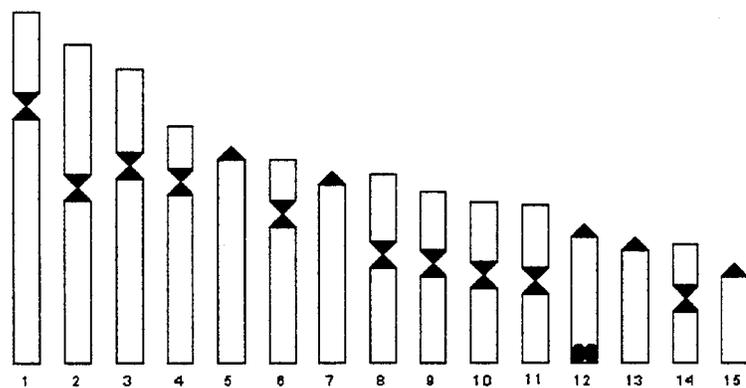


Fig. 8

Referências Bibliográficas

- Barrio, A. (1967). Sobre la validez de *Hyla sanborni* y *H. uruguayana* (Anura, Hylidae). **Physis**, 26 (76),: 521-524.
- Basso, N.J., Peri, S.I. & Di Tada, I.E. (1985). Revalidación de *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura: Hylidae). **Cuadernos herpetológicos**, Asociación Herpetológica Argentina, 1(3): 1-11.
- Bogart, J. P & Wasserman, A. O. (1972). Diploid-polyploid cryptic species pair: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. **Cytogenetics** (11): 7-24.
- Bogart, J.P. (1973). Evolution of anuran karyotypes. In: VIAL, J.L. eds. **Evolutionary biology of anurans**. Univ. Missouri Press, pp. 337-49.
- Cardoso, A.J. (1981). **Organização espacial e temporal na reprodução e vida larvária de uma comunidade de hílídeos no sudeste do Brasil (Amphibia, Anura)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.
- Cei, J.M. (1987). Additional notes to “Amphibians of Argentina”: an update, 1980-1986. **Monitore Zoologico Italiano** (21): 209-272.
- Del-Grande, M.L. (1995). **Estudo comparado da biologia de *Hyla nana* e de *Hyla sanborni* (Amphibia, Anura, Hylidae), em Corumbataí, Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, S.P. 70p.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1986). **Biology of Amphibians**. McGraw - Hill Book Company, New York.
- Engel, W., Zenzes, M. T. & Schmid, M. (1977). Activation of mouse ribosomal RNA genes at the 2-cell stage. **Hum. Genet.** (38): 57-63.

- Foote, D. L., Wiley, J. E., Little, M. L. & Meyne, J. (1991). Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenet. Cell Genet.** (57): 196-199.
- Frost, D. R. (ed.). (1985). **Amphibian Species of the World. A Taxonomic and Geographical Reference.** Allen-Press Inc. and The Association of Systematics Collections, Lawrence. 732 pp.
- Green, D. M. & Sessions, S. K. (1991). **Amphibian Cytogenetics and Evolution.** Academic Press, San Diego. 456pp.
- Hillis, D. M. (1991). The phylogeny of amphibians. *In: Amphibian cytogenetics and evolution. Edited by D. M. Green and S. K. Sessions.* Academic Press, San Diego. pp. 7-31.
- Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** (36): 1014-1015.
- Kaiser, H., Mais, C., Bolanos, F., Steinlein, C., Feichtinger, W. & Schmid, M. (1996). Chromosomal investigation of three Costa Rica frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica** (98): 95-102.
- King, M. (1980). C-banding studies in Australian Hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** (80): 191-207.
- King, M., Contreras, N. & Honeycutt, R.L. (1990). Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. **Genetica** (80):17-29.

- Kuramoto, M. (1990). A list of chromosome numbers of anuran amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. of Educ.** (39): 83-127.
- Langone, J. A. & Basso, N. G. (1987). Distribucion geografica y sinonima de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. **Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo**, 164 (11): 1-17.
- Langone, J. A. (1994). Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biologicos). **Museo Damaso Antonio Larrañaga** (5): 9-45.
- Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M. & Cardoso, A. J. (1998). Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. **Chrom. Res.** (6): 621-628.
- Meunier-Rotival, M., Cortadas, J. & Macaya, G. (1979). Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucleic Acids Res.** (6): 2109-2123.
- Miller, D. A., Dev, V. G., Tantravahi, R. & Miller, O. J. (1976a). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Exp. Cell Res.** (101): 235-243.
- Miller, O. J., Miller, D. A., Dev, V. G., Tantravahi, R. & Croce, C. M. (1976b). Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cells hybrid. **Acad. Sci. (Wash.)** (73): 4531-4535.
- Rabello, M. N. (1970). Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, 23 (1): 45-59.

- Rossa-Feres, D. de C. (1997). **Ecologia de uma comunidade de anfíbios da região noroeste do Estado de São Paulo: Microhabitat, Sazonalidade, Dieta e Nicho Multidimensional**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro.
- Schmid, M. (1978). Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** (66): 361-388.
- Schmid, M. (1982). Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** (87): 327-44.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F. e Leon, P. (1995). Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell. Genet.** (69): 18-26.
- Skuk, G. & Langone, J. A. (1992). Los cromosomas de cuatro especies del Género *Hyla* (Anura: Hylidae) com número diploide de $2n=30$. **Acta Zool. Lilloana** (41): 165-171.
- Stephenson, E. M., Robinson, E. S. & Stephenson, N. S. (1972). Karyotype variation within the genus *Leiopelma* (Amphibia, Anura). **Can. J. Genet. Cytol.** (14): 691-702.
- Viegas-Péquignot, E. (1992). *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. ed. ***In situ* hybridization: a practical approach**. Oxford. Oxford University press, IRL press, pp 137-158.
- Vitelli, L.; Batistoni, R.; Andronico, F.; Nardi, I. & Barsacchipiloni, G. (1982). Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary diverse anuran amphibians. **Chromosoma** (84): 475-491.

Wiley, J. E., Little, M. L., Romano, M. A., Blount, D. A. & Cline, G. R. (1989). Polymorphism in the location of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Chromosoma** (97): 481-487.

II. Artigo 2

Cromossomo supernumerário em uma população de *Hyla nana* (Anura, Hylidae); análise por banda C, Ag-NOR e hibridização “*in situ*”.

L. R. Medeiros¹, D. de C. Rossa-Feres² & S. M. Recco-Pimentel¹.

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

² Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristovão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Palavras chaves: Cromossomo supernumerário, *Hyla*, Anura.

Título curto: Cromossomo supernumerário em *Hyla nana*.

RESUMO

O presente trabalho relata a presença de um cromossomo extra em quatro espécimes de *Hyla nana* provenientes de um açude de água temporária, na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. O cariótipo com $2n=31$ é igual àquele com $2n=30$ cromossomos, exceto pela presença de um pequeno telocêntrico adicional. Este pequeno cromossomo ocorreu em aproximadamente 9,3% dos espécimes analisados, apresentando-se como um univalente em meiose I, sem regiões organizadoras do nucléolo (NOR) e sem heterocromatina. Esses dados indicam a presença de cromossomo supernumerário em *H. nana*.

INTRODUÇÃO

Cromossomos supernumerários são elementos extras encontrados no genoma de muitas espécies de animais e plantas e são, em geral, considerados dispensáveis para o desenvolvimento normal dos indivíduos (Jones & Rees, 1982). Segundo Beukeboom (1994) esses cromossomos ocorrem em aproximadamente 15% das espécies. Os cromossomos supernumerários não estão presentes em toda a população, não tem semelhança com nenhum dos autossomos, não possuem herança mendeliana, aparecem como univalentes na meiose e são elementos genômicos aparentemente desprovidos de função gênica específica (Jones & Rees, 1982; Green & Sessions, 1991).

Em algumas espécies, o número de supernumerários varia entre diferentes células de um mesmo indivíduo. Neste caso, isso se deve a um retardo anafásico, com eliminação do supernumerário de algumas células ou tecidos, ou à não disjunção mitótica, quando ambas as cromátides migram para um mesmo pólo (Guerra, 1988).

Em Anura, os cromossomos supernumerários foram descritos em apenas oito espécies, distribuídas em 5 famílias: Hylidae, Leiopelmatidae, Discoglossidae, Pelobatidae e Ranidae (Green & Sessions, 1991).

No presente trabalho descrevemos mais um caso de cromossomo supernumerário em Anura, observado em espécimes de *Hyla nana* Boulenger, 1889.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 43 espécimes de *Hyla nana* (40 machos e 3 fêmeas), coletados nos períodos de fevereiro a maio de 1998 e de outubro a maio de 1999, no distrito de Nova Itaipirema, município de Nova Aliança (21°11'S – 49°42'W), Estado de São Paulo, Brasil.

Após a retirada dos órgãos (intestino e testículos) que foram utilizados para análise citogenética, os espécimes foram fixados em formol a 10%, transferidos para álcool 70°GL e depositados no Museu de História Natural "Prof. Adão José Cardoso", da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC), e no Departamento de Zoologia de São José do Rio Preto, UNESP (DZSJRP), catalogados com os números ZUEC 11405 a 11412, 11416 a 11418, 11647 a 11677, DZSJRP 1111.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de suspensão de células do epitélio intestinal e dos testículos, conforme os procedimentos descritos por Stephenson *et al.* (1972). As lâminas foram submetidas às técnicas de coloração convencional com Giemsa, impregnação pelo íon prata (Howell & Black, 1980), bandamento C (King, 1980) e hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH) (Viégas-Péquignot, 1992) usando como sonda os plasmídeos recombinantes HM 123 e HM 456 que contém fragmentos de rDNA de *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival *et al.*, 1979), marcados com biotina segundo protocolo da GIBCO. As preparações cromossômicas submetidas aos diversos métodos citoquímicos e ao FISH foram analisadas ao microscópio Olympus BX60. Os cromossomos foram classificados de acordo com os valores propostos por Green & Sessions (1991).

RESULTADOS

Em 39 indivíduos analisados o cariótipo apresenta $2n=30$ cromossomos, conforme descrito anteriormente (Medeiros *et al.*, em preparação), e em quatro espécimes machos foi encontrado cariótipo com $2n=31$ (ZUEC 11673, 11651, 11652 e DZSJRP 1111). Este cariótipo é igual àqueles com $2n=30$, exceto pela presença de um pequeno telocêntrico adicional (fig. 1A, 4 e tabela 1).

A técnica de bandamento C evidenciou as regiões centroméricas de todos os cromossomos, exceto do cromossomo extra que não apresentou nenhuma marcação por este método (fig. 1B).

Nas metáfases analisadas dos 4 espécimes com $2n=31$, o pequeno cromossomo extra não apresentou nenhuma marcação pelo método Ag-NOR. Apenas o par cromossômico 13 apresentou a NOR (fig. 1C). A hibridação “*in situ*” utilizando sonda ribossômica de HM 123 confirmou o resultado obtido pelo método Ag-NOR (fig. 2).

Este pequeno cromossomo extra foi observado também em metáfases meióticas, que apresentavam 15 bivalentes e um pequeno univalente (fig. 3A), os indivíduos com $2n=30$ cromossomos apresentaram, em meiose I 15 bivalentes (fig.3B).

DISCUSSÃO

O cromossomo extra encontrado em quatro espécimes de *Hyla nana*, que apresentaram $2n=31$, pode ser interpretado como um cromossomo supernumerário, por possuir algumas das características básicas que são geralmente atribuídas a esta classe de cromossomos. Embora existam algumas descrições do cariótipo de *Hyla nana* (Rabello, 1970; Bogart, 1973; Skuk & Langone, 1992) na literatura, não há qualquer menção à presença de cromossomos supernumerários nesta espécie. Este pequeno complemento extra, com morfologia diferente dos autossomos, sempre se apresenta como um univalente nas células em metáfase I, à semelhança de muitos outros casos já descritos (Jones & Rees, 1982).

Na maioria dos cromossomos supernumerários não foi detectado genes com grandes efeitos. A influência que eles exercem é usualmente determinada por seu número acumulativo, embora esse tipo de efeito não tenha sido documentado para anfíbios (Green & Sessions, 1991). Em alguns casos, o efeito pode ser a diminuição da fertilidade (Hewitt *et al.*, 1987) e meiose anormal (Parker *et al.*, 1981). Entretanto, existem exceções e alguns supernumerários carregam genes funcionais (Green, 1990). Um caso interessante de cromossomos supernumerários em anfíbios ocorre em *Leiopelma hochstetteri* que chega a apresentar até 12 extras, nesta espécie, os cromossomos supernumerários em estado

plumoso apresentam pequenas alças laterais indicando atividade transcricional, embora em um nível inferior ao dos autossomos (Green *et al.*, 1987).

A NOR em supernumerários é rara, tendo sido detectada, entre os anuros, somente em *Scaphiopus hammondi*. Neste caso, a NOR contribui para o número de nucléolos na célula, demonstrando com isso que cromossomos supernumerários podem carregar genes funcionais de grande importância (Green & Sessions, 1991). Nos espécimes de *H. nana* não foi observado nenhum tipo de NOR ativa ou inativa, nem pelo método de coloração pela prata nem pelo uso de sondas de rDNA.

Belcheva & Sofianidou (1990) descrevem cromossomos supernumerários em espécimes de *Rana temporaria* e argumentam que a preservação de cromossomos supernumerários na população analisada indica que eles garantem alguma vantagem, relacionada à atividade transcricional ou ao aumento na variabilidade genética das espécies.

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a origem e conservação de cromossomos supernumerários. A origem mais tradicionalmente aceita é a de que cromossomos supernumerários sejam derivados dos autossomos (Jones & Rees, 1982). Considerando que não ocorre pareamento ou quiasmas entre os supernumerários e fragmentos de cromossomos A na meiose, a homologia inicial entre eles deve ser rapidamente perdida. Portanto, eles devem ter se modificado em estrutura e no comportamento de pareamento na meiose para prevenir associação com cromossomo A ancestral (Camacho *et al.*, 2000).

A heterocromatinização parece ser um processo comum que ocorre durante a diferenciação desses cromossomos, já que muitos se apresentam completamente heterocromáticos em muitas espécies (Venere *et al.*, 1999). Embora essa também não seja uma característica universal, foi sugerido que estes cromossomos possam ter se originado de fragmentos centroméricos, mas essa é uma hipótese pouca corroborada (Green *et al.*, 1987, Camacho *et al.* 2000). Esse processo de diferenciação de cromossomos supernumerários não se aplica a *Hyla nana* que não apresentou heterocromatina banda C positiva. Portanto, seu isolamento dos cromossomos A deve ter envolvido outros mecanismos.

Quando se considera a origem evolutiva dos cromossomos supernumerários, os autores são cuidadosos em considerar aspectos como a morfologia, a falta de homologia com sequências dos autossomos que impede um pareamento, a heterocromatinização e o tamanho geralmente pequeno, porque essas não são características universais como tem sido demonstrado inclusive em anfíbios (Green & Sessions, 1991). À semelhança do que foi proposto por Verene *et. al* (1999), para peixes, é possível que, também em anfíbios, os cromossomos supernumerários tenham surgido várias vezes com origem independente.

Uma outra possibilidade que deve ser considerada é a origem de cromossomos B a partir de cromossomos A de outra espécie próxima, por hibridação interespecífica. Evidências foram encontradas na espécie híbrida de peixe *Poecilia formosa* (Schartl. *et al*, 1995) e na vespa *Nasonia* (McAllister & Werren, 1997).

Hyla sanborni Schmidt, 1944 é uma espécie morfologicamente (Ceii, 1980; Langone, 1994) e ecologicamente muito semelhante à *H. nana* (Ceii, 1980; Rossa-Ferres, 1997), sendo ambas pertencentes ao mesmo grupo intragenérico (Frost, 1985). Considerando essa grande semelhança e sua ocorrência sintópica em várias localidades (Langone & Basso, 1987) bem como a existência de divergências nos cariótipos de espécimes de *H. nana* (Medeiros *et al.*, em preparação), não se pode descartar a hipótese de hibridação interespecífica estar envolvida na origem evolutiva desses cariótipos portadores de com cromossomos supernumerários.

Apesar das informações sobre ocorrência, distribuição, modelo de herança e estrutura molecular dos cromossomos supernumerários terem se multiplicado nas últimas décadas, sua origem e papel na evolução do genoma continua um assunto bastante especulativo.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. À Klélia Aparecida de Carvalho pelo auxílio técnico de laboratório, ao Marcelo Menin pelas coletas dos espécimes estudados e a Luciana Bolsoni Lourenço pelo auxílio técnico, análise e discussão dos resultados de FISH.

Legendas das figuras

Fig. 1: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Hyla nana*, evidenciando a presença do supernumerário. A: corados com Giemsa. B: submetidos a banda C; C: submetidos ao método de Ag-NOR mostrando a marcação do par 13 (Barra=5µm).

Fig. 2: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Hyla nana* submetidos ao método de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH), mostrando a marcação apenas no par 13 (cabeça de seta) e supernumerário não marcado (seta). (Barra=5µm).

Fig. 3: Cromossomos meióticos de *H. nana* submetidos à coloração com Giemsa. A: mostrando 15 bivalentes e um univalente (seta); B: mostrando 15 bivalentes (Barra=5µm).

Fig. 4: Ideograma representativo do cariótipo $2n = 31$ de *H. nana*. Áreas pretas indicam regiões de heterocromatina, os círculos em cinza indicam a NOR e regiões em aberto mostram as constrições secundárias.

TABELA 1: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *H. nana* e *H. sanborni*. Classificação segundo Green & Sessions (1991).

<i>Hyla nana</i> (n=31)				
Cromossomo	T.R.(%)	R.B	I.C.	P.C.
	X ± S	X ± S.	X ± S	
1	11,57 ±0,37	2,99 ±0,33	0,25 ±0,03	SM
2	10,10 ±0,28	2,24 ±0,34	0,30 ±0,04	SM
3	9,61 ±0,24	1,11 ±0,14	0,47 ±0,03	M
4	8,19 ±0,43	2,88 ±0,36	0,25 ±0,02	SM
5	7,26 ±0,39	2,79 ±0,28	0,26 ±0,03	SM
6	7,24 ±0,33	–	–	T
7	6,75 ±0,22	2,64 ±0,43	0,28 ±0,02	SM
8	6,38 ±0,29	1,46 ±0,27	0,39 ±0,04	M
9	5,73 ±0,41	1,39 ±0,35	0,41 ±0,03	M
10	5,31 ±0,36	1,26 ±0,26	0,43 ±0,02	M
11	4,92 ±0,24	1,43 ±0,37	0,41 ±0,03	M
12	4,77 ±0,27	–	–	T
13	4,53 ±0,41	1,39 ±0,36	0,42 ±0,03	M
14	3,8 ±0,31	–	–	T
15	3,34 ±0,28	–	–	T
16	2,38 ±0,14	–	–	T

R.B.= Relação de braços, T.R.= Tamanho relativo, I.C.= Índice Centromérico, P.C.= Posição do centrômero; M.= Metacêntrico, S.M.= Submetacêntrico, T.=Telocêntrico, n.= Número de metáfases medidas.

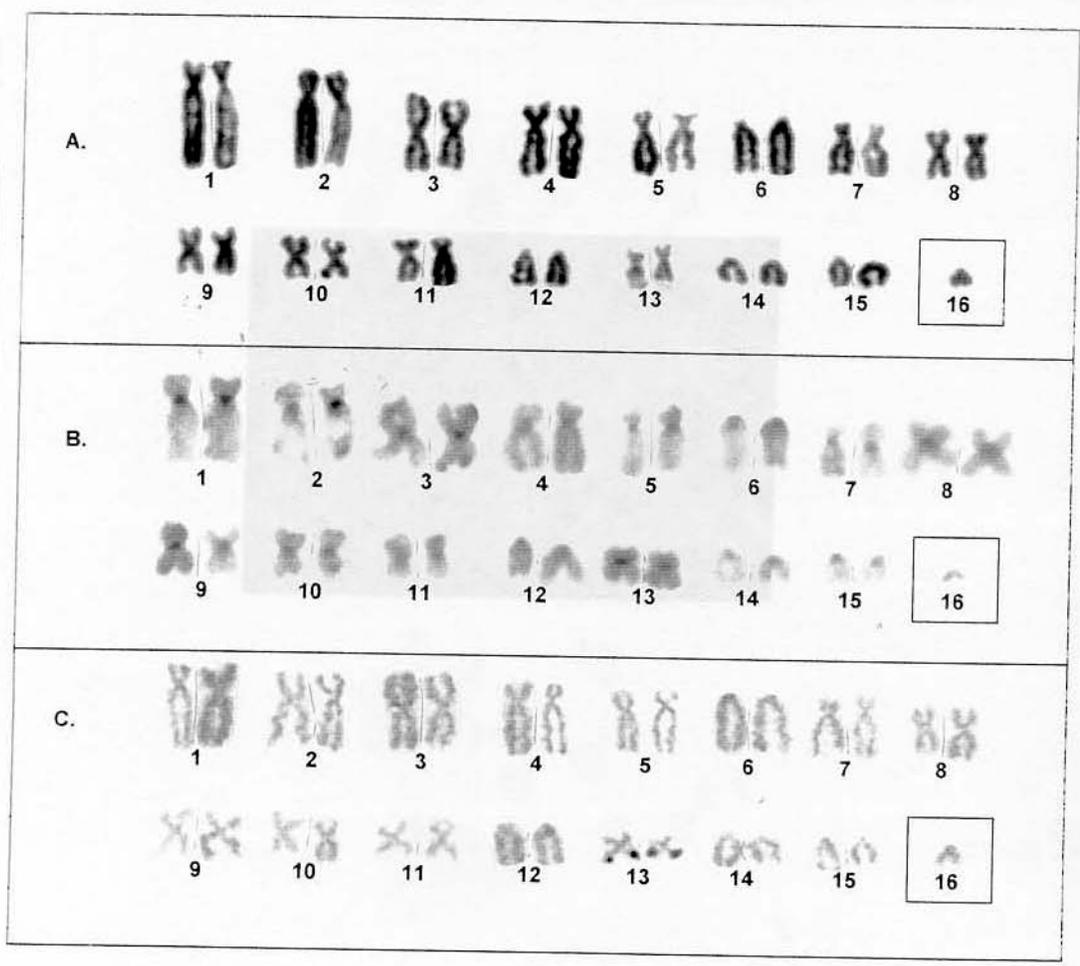


Fig. 1



Fig. 2



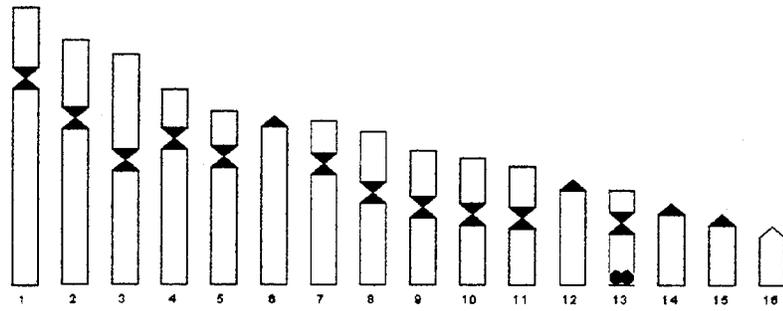


Fig. 4

Referências Bibliográficas

- Baldissera Jr., F.A.; Oliveira, P.S.L. & Kasahara, S. (1993). Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Bras. Genet.** 16 (2): 335-34.
- Beukeboom, L.W. (1994). Bewildering Bs: an impression of the 1st B chromosome conference. **Heredity** (73): 328-336.
- Belcheva, R. G. & Sofianidou, T. S. (1990). Karyological investigation of the brown frogs species (Anura, Ranidae) from Bulgaria and Greece. In: **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**, Birkhauser-Verlag, Basel, pp.141-146.
- Bogart, J.P. (1973). Evolution of anuran karyotypes. In: VIAL, J.L. eds. **Evolutionary biology of anurans**. Univ. Missouri Press, pp. 337-349.
- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. (2000). B- chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** (335), 163-178.
- Cei, J. M. (1980). Amphibians of Argentina. **Monitore Zoologico Italiano**, (N.S.). Monografia (2):1-609.
- Green, D. M., Kezer, J. & Nussbaum, R. A. (1987). Supernumerary chromosome variation and heterochromatin distribution in the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. **Chromosoma** (95): 339-344.
- Green, D. M. (1990). Miller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome** (33), 818-824.

- Green, D. M. & Sessions, S.K. (1991). Cap. 14. In: **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. 456pp.
- Guerra, M. S. (1988). In: **Introdução à Citogenética Geral**, ed. Guanabara, Rio de Janeiro, RJ. pp 97-98.
- Hewitt, G. M., East, T. M. & Shaw, M. W. (1987). Sperm dysfunction produced by B-chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus*. **Heredity** (58): 59-68.
- Howell, W. M. & Black, D. A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** (36): 1014-1015.
- Jones, R. N. & Rees, H. (1982). In: B- Chromosomes. **Academic Press**, New York. 251p.
- King, M. (1980). C-banding studies in Australian Hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** (80): 191-207.
- Langone, J. A. & Basso, N. G. (1987). Distribucion geografica y sinonima de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. **Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo**, 164 (11): 1-17.
- Langone, J. A. (1994). Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biologicos). **Museo Damaso Antonio Larrañaga** (5): 9-45.
- McAllister, B. F. & Werren, J. H. (1997). Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Chromosoma** (106): 243-253.
- Meunier-Rotival, M., Cortadas, J. & Macaya, G. (1979). Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucleic Acids Res.**(6): 2109-2123.

- Parker, J. S., Ainsworth, C. C. & Taylor, S. (1981). The B-chromosome system of *Hypochoeris maculata* II. B-effects on meiotic A-chromosome behaviour. **Chromosoma** (67): 123-143.
- Rabello, M. N. (1970). Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, 23 (1): 45-59.
- Rossa-Feres, D. de C. (1997). **Ecologia de uma comunidade de anfíbios da região noroeste do Estado de São Paulo: Microhabitat, Sazonalidade, Dieta e Nicho Multidimensional**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro.
- Schartl, M., Nanda, I., Schlupp, I., Wilde, B., Epplen, J. T., Schmidt, M. & Parzefall, J. (1995). Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. **Nature** (373), 68-61.
- Skuk, G. & Langone, J. A. (1992). Los cromosomas de cuatro especies del Género *Hyla* (Anura: Hylidae) com número diploide de $2n=30$. **Acta Zool. Lilloana** (41): 165-171.
- Stephenson, E. M., Robinson, E. S. & Stephenson, N. S. (1972). Karyotype variation within the genus *Leiopelma* (Amphibia, Anura). **Can. J. Genet. Cytol.** (14): 691-702.
- Venere, P.C.; Miyazawa, C. S. & Galetti Jr., P. M. (1999). New cases of supernumerary chromosome in characiform fishes. **Gen. Mol. Biol.** (22) : 345-349.
- Viegas-Péquignot, E. (1992). *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: **Willernson, D. ed. In situ hybridization: a practical approach**. Oxford University press, Oxford IRL Press, pp. 137-158.

IV. Conclusões gerais

1. *Hyla nana* e *H. sanborni*, provenientes de Nova Itapirema, São Paulo, apresentam complemento diplóide de $2n=30$ cromossomos, sendo que essas espécies diferem quanto à morfologia de alguns cromossomos: *H. nana* apresentou seis pares metacêntricos, cinco pares submetacêntricos e quatro pares telocêntricos, enquanto *H. sanborni* apresentou seis pares de metacêntricos, quatro de submetacêntrico e cinco telocêntricos.
2. Em quatro espécimes (9,3%) de *H. nana* foi encontrado um cariótipo com $2n=31$ cromossomos, diferindo do cariótipo com $2n=30$ cromossomos, pela presença de um pequeno cromossomo telocêntrico, considerado um supernumerário. Este cromossomo ocorre em 9,3% dos espécimes analisados, apresenta-se como um univalente em meiose I, não contém regiões organizadoras do nucléolo e não apresentou heterocromatina.
3. Quantidades relativamente pequenas de heterocromatina foram encontrados somente na região centromérica de todos os cromossomos das duas espécies estudadas e não foi encontrado nenhum heteromorfismo de tamanho da banda C. Portanto, mecanismos como aumento de heterocromatina não parece estar envolvido na diferenciação dos cariótipos dessas espécies.
4. A região organizadora do nucléolo (NOR) se encontra no par 13, metacêntrico de *H. nana*, e no par 12, telocêntrico de *H. sanborni*. Seis padrões diferentes de múltiplas NORs foram detectados em alguns indivíduos através do método de impregnação por prata e confirmados por FISH, caracterizando um polimorfismo de NOR em *H. nana*. Os polimorfismos de NOR em *H. nana* indicam grande variabilidade nesse genoma, sugerindo alta taxa de evolução cromossômica neste grupo.
5. As populações simpátricas das duas espécies estudadas neste trabalho podem, portanto, ser facilmente separadas entre si pela morfologia dos cromossomos, especialmente o número de cromossomos telocêntricos (um a mais em *H. sanborni*), e pela localização da NOR.

6. A morfologia cromossômica das populações presentemente estudadas difere das descritas na literatura para populações de outras regiões geográficas, indicando a necessidade de uma revisão sistemática desse grupo de espécies.