

IGOR SOARES DE OLIVEIRA



Sítio de vocalização, dominância e girino de *Dendropsophus werneri* (Cochran, 1952) e análise citogenética de quatro espécies sintópicas de *Dendropsophus* em área de floresta

Atlântica no Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Dr^a Marta Margarete Cestari

Co-orientador: Dr. Luís Felipe Toledo

CURITIBA

2011



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Igor Soares de Oliveira** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão do candidato.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 10 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.ª Dra. Marta Margarete Cestari
Orientadora e Presidente

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Membro

Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura
Membro

Visto:

Prof.ª Dra. Lucélia Donatti
Coordenadora do PPG-ECO

Hello darkness, my old friend...

(Paul Simon)

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela dádiva da vida e por me dar forças para poder continuar nessa jornada, mesmo sem enxergar com clareza onde devo chegar. Obrigado também por criar os anuros, criaturas esplêndidas e maravilhosas.

Gostaria de expressar meu mais sinceros agradecimentos à minha orientadora, Dr^a Marta Margarete Cestari, por aceitar me orientar, mesmo sabendo das dificuldades. Obrigado por sempre acrescentar a este trabalho e em minha formação. Sem seu apoio nem teria entrado no mestrado.

Obrigado também ao meu co-orientador, Dr. Luís Felipe Toledo, por me orientar e ensinar sobre a biologia dos anfíbios. Obrigado por todas as sugestões, idéias e apoio para o desenvolvimento deste trabalho e por me ensinar a trabalhar com agilidade.

Obrigado ao Dr. Rafael Bueno Noletto por sugerir a citogenética na dissertação e por apoiar esta idéia desde o início. Obrigado também por ensinar as técnicas citogenéticas, pelos protocolos, pelas broncas e por acompanhar o trabalho sempre que possível.

Agradeço a Moacyr Grassmann e sua família por permitirem que desenvolvêssemos este trabalho em sua propriedade e ao Louri Klemann Júnior por sugerir a localidade de Castelhanos (sem dúvida um lugar fantástico).

Também quero expressar meus agradecimentos à CAPES pela bolsa concedida e ao Simepar por ceder as informações meteorológicas.

Gostaria de agradecer à Valéria Romeiro da secretaria da PPGECO por toda a ajuda e amizade e aos professores Dr. Maurício Oswaldo Moura e Dr. Marcio Roberto Pie pela ajuda e sugestões com relação à estatística; à professora Dr^a Luciana Bolsoni Lourenço pelas sugestões citogenéticas no início do trabalho e à professora Dr^a Iris Hass pela paciência em nos ensinar o bandamento G.

Obrigado de coração ao Dr. Roberto Ferreira Artoni por nos incentivar a desenvolver esse projeto desde o início e por nos permitir trabalhar em seu laboratório na UEPG. Igualmente, agradeço ao Dr. Marcelo Ricardo Vicari, por nos ensinar a

técnica de FISH, pelas sondas, pela imensa paciência e por nos incentivar e acompanhar em seu laboratório.

Um obrigado especial à Msc. Michelle Orane Schemberger que nos acompanhou e ensinou a técnica de FISH durante dois exaustivos dias. Obrigado pela sua paciência, pelo seu tempo e por seus valiosos ensinamentos.

Um obrigado aos amigos e peladeiros de plantão Msc. Leandro Correa e Msc. Fagner Breda (Mr. Fire-fighter) pela amizade e por nos acompanhar no campo em Quatro Barras. Obrigado à Msc. Manoela Woitovicz Cardoso Costa, grande amiga, herpetóloga e professora, por sempre nos incentivar, ajudar e por nos acompanhar na difícil fase piloto. Obrigado também ao Msc. Rafael Ernesto Balen, à Msc. Giselle Xavier Perazzo e ao Luiz Fernando Kraft, pela amizade e auxílio no laboratório. Agradeço ainda aos amigos Dr. Rodriguinho M. Stuart e Dr^a Karen Kubo, Msc. João Brito, Pietro e Msc. Ana Julia, Dr. Luís Fernando Fávaro, Dr. Jean Simões Vitule, Dr. Emygdio L. A. Monteiro-Filho e ao Igor e Nadya pela amizade, incentivo e paciência.

Agradeço à minha família, ao Sr. Ricardo, D. Solange e especialmente minha mãe, Maria Inês Mitika Hara, que nunca hesitou em relação à minha educação e sempre me incentivou a continuar. Obrigado por tudo, mãe.

E finalmente quero agradecer à minha amada esposa, Msc. Adriele Karlokoski Cunha de Oliveira, que me acompanhou em todos os dias de campo e nos trabalhos em laboratório, superando o cansaço para estar sempre ao meu lado. Te amo.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
A floresta Atlântica e os anuros	3
A citogenética e os anuros	5
Justificativa	7
REFERÊNCIAS	8
Capítulo I	14
Resumo	16
Abstract	17
Introdução	18
Material e Métodos	19
Área de estudo	19
Desenho amostral	19
Análise de dados	20
Resultados	21
Discussão	23
Literatura Citada	28
Tabelas	33
Legendas de Figuras	35
Figuras	36
Capítulo II	43
Resumo	45
Abstract	46
Introdução	47
Material e Métodos	47
Resultados	48
Discussão	48
Literatura Citada	51
Tabelas	53
Legendas de figuras:	55
Figuras	56
Capítulo III	57
Resumo	59
Abstract	60
Introdução	61
Material e Métodos	62
Resultados	63
Coloração convencional	63
Bandamento C e CMA ₃ /DAPI	64
Localização de RONS e rDNA	64
Localização das regiões teloméricas	65
Discussão	65
Literatura Citada	70
Tabelas	74
Legendas de figuras	75
Figuras	76
Anexo I	83
Anexo II	86
Procedimentos citogenéticos	86
Referências	91

Resumo

Os anuros apresentam alta diversidade nos domínios da floresta Atlântica e constituem o grupo vertebrado mais ameaçado. Em parte, isso se deve à sua própria biologia e relação de dependência com o meio; mas também pode ser atribuída à perda e desconectividade de habitats, incidência de doenças e às mudanças climáticas. Neste contexto, estudos envolvendo a ecologia dos anuros são essenciais para compreender os mecanismos que estruturam suas comunidades e suas relações intra e interespecíficas. Da mesma forma, a compreensão do uso dos recursos necessários à reprodução dos anfíbios ou a partilha de nicho podem ser fundamentais para a elaboração de medidas que auxiliem na conservação desses animais. Estudos sobre a citotaxonomia dos anuros também são de grande valia para a elucidação da evolução cromossômica do grupo ou mesmo para a compreensão de suas relações filogenéticas. Neste estudo foi analisada uma assembléia de anuros em uma poça temporária em área bastante impactada, em meio à floresta Atlântica paranaense, onde a baixa heterogeneidade do ambiente parece favorecer a dominância de uma única espécie na assembléia. O pequeno Hylidae *Dendropsophus weneri*, apresentou altos índices de dominância e frequência durante seu período reprodutivo no ambiente estudado, conduzindo a assembléia a baixos valores de equitabilidade e diversidade. Apesar de *D. weneri* aparentemente ser favorecida pelo ambiente alterado, foi constatada sobreposição de nicho espacial, indicando que existe possibilidade de uso compartilhado deste recurso entre as demais espécies registradas na poça. Com relação à análise citogenética das espécies do gênero *Dendropsophus* que ocorrem no ambiente amostrado, o emprego de técnicas convencionais e moleculares evidenciaram variações em padrões previamente descritos, indicando que o gênero é cariotipicamente diverso.

Abstract

Anurans are highly diverse, especially in Atlantic forest, and constitute the most endangered group of vertebrates due to its close relationship with environment. Loss and habitat split, diseases, and climate changes constitute additional threats for anurans. Therefore, studies with anuran ecology are essential for understanding the mechanisms that structures anuran communities and their intra and interspecific interactions. Thereby, comprehension of resource use for reproduction and niche partitioning, are important for anuran conservation. Moreover, citotaxonomic studies with anurans are also pivotal for elucidation of chromosomal evolution of the group and comprehension of their filogenetic relationships. In the present study we analyzed an anuran assemblage in a temporary pond in an impacted site, surrounded by Atlantic forest, where the low environmental heterogeneity seems to favor the dominance of a single species. The little hylid frog *Dendropsophus weneri* showed high dominance and frequency during its reproductive period, leading the community to low evenness and diversity. Although *D. weneri* apparently be supported by impacted environment, niche overlap was observed, implying possibility of use by other species observed in the pond. Cytogenetic study of *Dendropsophus weneri* and other three *Dendropsophus* registered in the same site, using conventional and molecular techniques, showed variations in patterns previously described, indicating that the group must be karyotypically diverse.

INTRODUÇÃO GERAL

A floresta Atlântica e os anuros

A floresta Atlântica brasileira possuiu no passado uma grande extensão latitudinal com uma notável heterogeneidade, mas hoje restam apenas 16% de sua cobertura original, reduzidos a pequenos remanescentes com distribuição esparsa (Mamede et al., 2004; Galindo-Leal e Câmara, 2005; Silva e Casteleti, 2005; Ribeiro et al., 2009).

Essa grande perda de diversidade se deve à exploração de recursos e ao crescimento da ocupação humana sobre essas áreas, ambos em ritmo acelerado nos últimos 50 anos. Além disso, as áreas restantes da floresta Atlântica incluem não só as poucas formações de floresta restantes, como também florestas cultivadas com espécies exóticas (e.g. *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp.), o que empobrece ainda mais sua composição florística (Rodrigues, 1990; Ab'Sáber, 2003; Mamede et al., 2004; Galindo-Leal e Câmara, 2005).

Com relação aos anuros, o grupo corresponde ao mais diverso dentre os Lissamphibia e o Brasil representa o país com a maior riqueza de espécies de anuros em todo o mundo (SBH, 2010) com mais de 400 espécies ocorrendo na floresta Atlântica, sendo este o bioma com o maior número de endemismos de anuros (Duellman, 1999).

No Paraná, até 2004 o estado apresentava uma anurofauna composta por 120 espécies (Segalla e Langone, 2004), mas novos táxons foram descobertos, inclusive em áreas de abrangência da floresta Atlântica (e.g. Ribeiro et al., 2005; Alves et al., 2006). Nos últimos anos o número de trabalhos envolvendo a anurofauna paranaense aumentou; principalmente com foco na distribuição e ecologia de algumas espécies (e.g. Lingnau, 2004; Conte e Machado 2005, Conte e Rossa-Feres, 2006; 2007; Miranda et al., 2008), mas muitas populações de anfíbios ainda carecem de informação.

Anuros apresentam uma grande diversidade de modos reprodutivos e, de modo geral, são dependentes de ambiente florestal úmido devido à sua própria história de vida (Haddad e Prado, 2005). Essa íntima relação entre os anuros e o habitat os torna potenciais indicadores da real

situação de um ambiente natural, pois são sensíveis a alterações (e.g. Blaustein e Wake, 1990; Bernarde et al., 1997, Azevedo-Ramos et al., 2005; Toledo, 2009).

Outro fator importante na vida dos anuros são suas formas larvais, ou girinos. A alta diversidade dos anuros no Brasil contrasta com o reduzido número de girinos conhecidos de poucas espécies (e.g Costa et al., 2009). O modo de vida dos girinos é muito diferente dos adultos (Wells, 2007), mas o conhecimento acerca dessas formas larvais basicamente ainda é restrito a descrições, dados sobre dieta ou taxonomia (e.g. Rossa-Feres et al., 2004; Rossa-Feres e Nomura, 2006; Costa et al., 2009). A metamorfose em anuros representa uma mudança extrema, tanto na morfologia quanto em sua ecologia (Altig e McDiamird, 2007; Wells, 2007), tornando estudos sobre o desenvolvimento de girinos uma importante ferramenta para a compreensão da evolução de traços de vida do grupo (Altig e McDiamird, 2007). Da mesma forma, estudos sobre a ecologia de comunidades de girinos podem servir de auxílio para a conservação dos Anura (Thurnheer e Reyer, 2000; Rossa-Feres e Nomura, 2006)

Os anuros representam o grupo de vertebrados que mais enfrenta ameaças à sua sobrevivência devido a diversos fatores, tanto ambientais quanto pela ação humana (e.g. Garner, 2001; Collins e Storfer, 2003; Silvano e Segalla, 2005) e estudos com foco na biologia e ecologia do grupo são fundamentais para sua conservação (Silvano e Segalla, 2005). Da mesma forma, a compreensão de padrões de uso do sítio reprodutivo e a partilha de recursos entre membros da mesma espécie ou de outros táxons também são importantes para a elaboração de medidas de proteção (Wells, 1977). Apesar de alguns estudos descreverem os padrões espaciais e temporais no uso do ambiente durante eventos reprodutivos de anuros (e.g. Conte e Machado, 2005; Conte e Rossa-Feres, 2006; 2007), é de conhecimento comum que muitas espécies que ocorrem no Paraná ainda permanecem sem maiores informações. Logo, compreender padrões de estruturação das taxocenoses de anuros e a relação entre as espécies pode contribuir para medidas de proteção da anurofauna.

A citogenética e os anuros

O início dos estudos com anfíbios no Brasil teve como foco principal a taxonomia do grupo e persistiu dessa forma até meados do século XX (e.g. Miranda-Ribeiro, 1926). Com o passar do tempo, além de trabalhos taxonômicos, estudos relacionados com a ecologia de algumas espécies ganharam espaço (e.g. Heyer et al., 1990; Conte e Rossa-Feres, 2006; 2007). Na atualidade, estudos citogenéticos e moleculares desenvolvidos com anfíbios estão em andamento (e. g. Kasahara et al., 1996; Kasahara e Haddad, 1997; Amaral et al., 2000; Lourenço et al., 2000; Busin et al., 2001; Silva et al., 2004) oferecendo perspectivas para uma melhor compreensão das relações filogenéticas e evolução cariotípica do grupo. Especialmente para Anura, o estabelecimento das relações filogenéticas baseadas somente em dados morfológicos é complexo, pois os anuros possuem relativamente pouca variação morfológica (Griffithis, 1963). Neste contexto, estudos citogenéticos vêm servindo como ferramenta para a resolução de problemas de ordem sistemática promovendo entendimento de relações filogenéticas entre os anuros (e.g. Bogart, 1991).

Com relação às técnicas citogenéticas, mecanismos de evolução cariotípica podem ser detectados com base em cariótipos corados convencionalmente com Giemsa (e.g. Bogart, 1973), mas o surgimento de técnicas de bandamento e marcação cromossômica facilitaram o entendimento das relações filogenéticas entre anuros e possibilitaram a compreensão de mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica. Dentre essas técnicas, destacam-se a banda C, a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs/Ag-RON) e a coloração com fluorocromos base específicos. Estas técnicas fornecem bons resultados e têm sido usadas em análises citogenéticas de diversas espécies de anuros brasileiros (e.g. Gruber et al., 2005; Silva et al., 2006; Gruber et al., 2007; Campos et al., 2008).

A técnica de bandamento C revela regiões cromossômicas ricas em heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972). O termo heterocromatina foi atribuído, com bases em observações morfológicas, a segmentos cromossômicos que permanecem condensados durante toda a interfase

(Heitz, 1928). A heterocromatina é altamente condensada e de difícil acesso até mesmo no processo de transcrição, mas apresenta características fundamentais como capacidade de se propagar (por exemplo) podendo influenciar na expressão gênica de regiões específicas (Grewal e Jia, 2007). Apesar de sua função ser variada e ainda pouco compreendida, é de conhecimento geral que pode atuar como estrutura de auto-montagem ou como adaptador no recrutamento de proteínas que regulam processos cromossômicos (Grewal e Jia, 2007; Kasahara, 2009). A heterocromatina protege a integridade genômica tornando estruturas repetitivas recombinantes inertes e impedindo eventos de transposição potencialmente mutagênicos. Sua associação com sequências repetitivas se torna crucial na organização funcional de estruturas cromossômicas como centrômeros e telômeros (Grewal e Jia, 2007). A técnica de banda C cora seletivamente estas regiões heterocromáticas, formando bandas que geralmente estão localizadas ao redor do centrômero dos cromossomos, sendo consideradas bandas C positivas (Kasahara, 2009). De modo geral o DNA cromossômico é depurinado e desnaturado sucessivamente durante um tratamento ácido e alcalino, permitindo a marcação das regiões de interesse, ricas em DNA altamente repetitivo (Sumner, 1982).

Por outro lado, em anfíbios é comum que regiões ricas em heterocromatina constitutiva apresentem sequências repetitivas de pares de bases GC (e.g. Campos et al., 2008). Neste caso os cromossomos podem ser corados por fluorocromos base-específicos, muito úteis para revelar regiões ricas em bases repetitivas AT ou GC. O emprego de técnicas de coloração com fluorocromos é bastante promissor, sobretudo em vertebrados não-mamíferos e é comum o uso de ao menos dois fluorocromos, sendo um com especificidade para bases AT (geralmente DAPI) e outro específico para bases GC, geralmente CMA₃ (Kasahara, 2009).

Sobre as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), estas constituem sítios cromossômicos formados por numerosas cópias de genes que codificam RNA ribossômico (Long e David, 1980; Miller, 1981). Essas regiões representam uma porção variável do genoma eucarioto e a caracterização do número e posição das RONs tem sido muito utilizada em anfíbios (Gruber et al.,

2005; Silva et al., 2006; Gruber et al., 2007; Campos et al., 2008). As RONS constituem um marcador citotaxonômico para alguns grupos (Goodpasture e Bloom, 1975) e geralmente são observadas ao menos em um cromossomo do conjunto haplóide de uma espécie. Apesar da diversidade de técnicas existentes para a detecção das RONS, a mais comum é a impregnação por prata, que detecta regiões ativas na intérfase através da associação da prata com as proteínas ácidas nucleolares.

Com relação às técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é válido ressaltar que se trata de um procedimento molecular onde sondas de DNA ou RNA reagem com segmentos complementares de DNA alvo (Kasahara, 2009). De modo simplificado, o DNA é desnaturado e renaturado em um ambiente onde as sondas competem pelos sítios complementares das fitas de DNA. Fluorocromos podem ser acoplados às sondas através do acréscimo de moléculas de biotina ou digoxigenina, por meio de tratamentos com o *nick translation* ou PCR. As sondas podem ser de sequencias variadas (teloméricas, centroméricas, ribossomais, DNA repetitivo ou satélite, genoma total e outras), de acordo com o interesse do estudo, revelando a localização dessas sequencias nos cromossomos (Guerra, 2004; Kasahara, 2009).

Justificativa

Tendo em vista a riqueza da anurofauna da floresta Atlântica e os riscos aos quais o bioma está sujeito; juntamente com as ameaças sobre os anuros e a escassez de trabalhos com foco na citogenética envolvendo o grupo; é imperativo o desenvolvimento de estudos envolvendo anuros, principalmente com populações de espécies do Paraná. Acrescenta-se a isso o potencial da citotaxonomia como ferramenta capaz de auxiliar na sistemática de Anura e na compreensão de mecanismos cromossômicos e evolutivos, bem como a importância dos estudos ecológicos no fornecimento de bases para a conservação dos grupos animais.

REFERÊNCIAS

- Ab'Sáber, A. 2003. Os domínios de natureza no Brasil - Potencialidades paisagísticas. Ateliê Editorial, Cotia.
- Alves, A. C. R.; Ribeiro, L. F.; Haddad, C. F. B.; Reis, S. F. 2006. Two new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná State, southern Brazil. *Herpetologica* 62(2): 221-233.
- Altig, R., and McDiamird, R. W. 1999. Body plan. Development and morphology. In: McDiamird, R. W. and Altig, R. (eds.) *Tadpoles: The biology of anuran larvae*, pp. 24-51. University of Chicago Press, Chicago.
- Amaral, M. J. L. V.; Recco-Pimentel, S. M.; Cardoso, A. J. 2000. Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). *Caryologia* 53 (2): 283-288.
- Azevedo-Ramos, C.; Carvalho Jr., O.; Nasi, R. 2005. Animal indicators: a tool to access biotic integrity after logging tropical forests? Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia, Belém.
- Bernarde, P. S.; Machado, R. A.; Morato, S. A. A.; Moura-Leite, J. C.; Anjos, L.; Paula, A.; Rodrigues, M. D.; Silveira, G. 1997. A importância do Parque Estadual Mata dos Godoy na conservação de algumas espécies de anfíbios e répteis florestais na região de Londrina, Paraná, Brasil. *Anais do Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação* 2: 478-484.
- Blaustein, A. R.; Wake, D. B. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution* 5: 203-204.
- Bogart, J. P. 1973. Evolution of anuran karyotypes. In: J. Vial (ed.), *Evolutionary Biology of Anurans*, pp. 337-349. University of Missouri Press, Columbia.
- Bogart, J. P. 1991. The influence of the life history on karyotype evolution in frogs. In Green, D. M. e Sessions, S. K. (eds.), *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, pp. 238-257 Academic Press, San Diego.

- Busin, C. S.; Vinciprova, G.; Recco-Pimentel, S. M. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica* 110: 131-141.
- Campos, J. R. C.; Ananias, F.; Haddad, C. F. B.; Kasahara, S. 2008. Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae). *Micron* 39: 151-159
- Collins, J. P.; Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9: 89-98.
- Conte, C. E.; Machado, R. A. 2005. Riqueza de espécies e distribuição espacial e temporal em comunidade de anuros (Amphibia, Anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22 (4): 940-948.
- Conte, C. E.; Rossa-Feres, D. C. 2006. Diversidade e ocorrência da anurofauna (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23 (1): 162-175.
- Conte, C. E.; Rossa-Feres, D. C. 2007. Riqueza e distribuição espaço-temporal de anuros em um remanescente de floresta de Araucária no sudeste do Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia* 24 (4): 1025-1037.
- Costa, T. R. N.; Lingnau, R.; Toledo, L. F. 2009. The tadpole of Brazilian torrent frog *Hylodes heyeri* (Anura; Hylodidae). *Zootaxa* 2222: 66-68.
- Duellman, W. E. (ed.). 1999. Patterns of distribution of Amphibians: a global perspective. The Johns Hopkins University Press.
- Galindo-Leal, C.; Câmara, I. G. 2005. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: Galindo-Leal, C. e Câmara I. G. (Eds.) *Mata Atlântica biodiversidade, ameaças e perspectivas*, p. 3-11. Conservação Internacional, Belo Horizonte.

- Garner, T. 2001. Declining amphibians populations: a global phenomenon in conservation biology. *Animal Biodiversity and Conservation* 24 (2): 1-20.
- Goodpasture C.; Bloom S. E.; 1975. Visualization of nucleolar organizer in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Grewal, S. I. S.; Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* 8: 35-46.
- Griffiths, I. 1963. The phylogeny of the Salientia. *Biological Reviews* 38: 241-292.
- Gruber, S. L.; Haddad, C. B. F.; Kasahara, S. 2005. Evaluating the karyotypic diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with $2n=30$ chromosomes based on the analysis of ten species. *Folia Biologica* 51 (3): 68-75.
- Gruber, S. L.; Haddad, C. B. F.; Kasahara, S. 2007. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n=24$ to $2n=22$ in the genus. *Genetica* 130: 281-291.
- Guerra, M. 2004. FISH Conceitos e Aplicações na Citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Haddad, C. F. B., and Prado, C. P. A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. *BioScience* 55 (3): 207-217.
- Heitz, E. Das heterochromatin der moose. 1928. *I Jahrb Wiss Botanik* 69: 762-818.
- Heyer, W. R., Rand, A. S., Cruz, C. A. G., Peixoto, O. L., Nelson, C. E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31: 231-410.
- Kasahara, S.; Silva, A. P. Z.; Haddad, C. F. B. 1996. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). *Brazilian Journal of Genetics* 19: 239-242.

- Kasahara, S.; Haddad, C. F. B. 1997. Karyotypes of two Brazilian microhylid frogs of the genus *Chiasmocleis* including a new case of polyploidy. *Journal of Herpetology* 31 (1): 139-142.
- Kasahara, S. 2009. Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brazil.
- Lingnau, R.; Guimarães, L. D.; Bastos, R. P. 2004. Vocalizações de *Hyla wernerii* (Anura, Hylidae) no sul do Brasil. *Phyllomedusa* 3(2): 115-120.
- Long, E. O.; David, I. B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* 49: 727-764.
- Lourenço, L. B.; Garcia, P. C. A.; Recco-Pimentel, S. M.. 2000. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. *Hereditas* 133: 201-210.
- Mamede, M. C. H., Cordeiro, I., Rossi, L., Melo, M. M. R. F., Oliveira, R. J. 2004. Mata Atlântica. In Marques, O. A. V. e Duleba, W. (Eds.), Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna, p.115-132. Holos, Ribeirão Preto.
- Miller, O. L. 1981. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. *Journal of Cell Biology* 91: 15-17.
- Miranda, D. B.; Garey, M. V.; Monteiro-Filho, E. L. A.; Hartmann, M. T. 2008. Sinalização visual e biologia reprodutiva de *Dendropsophus wernerii* (Anura: Hylidae) em área de Mata Atlântica no Estado do Paraná, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 48 (29): 335-343.
- Miranda-Ribeiro, A. 1926. Notas para servirem ao estudo dos gymnobatrachios (Anura) brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional* 27: 1-227.
- Ribeiro, L. F.; Alves, A. C. R.; Haddad, C. F. B.; Reis, S. F. 2005. Two new species of *Brachycephalus* Günther, 1858 from the state of Paraná, Southern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Boletim do Museu Nacional* 519: 1-18.

- Ribeiro, M. C.; Metzger, J. P.; Martensen, A. C.; Ponzoni, F. J.; Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141-1153.
- Rodrigues, M. T. 1990. Os lagartos da floresta Atlântica, distribuição atual e pretérita e suas implicações para estudos futuros. In: II Simpósio sobre ecossistemas da costa sul brasileira. Estrutura, manejo e função, p. 404-410.
- Rossa-Feres, D. C.; Jim, J.; Fonseca, M. G. 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (4): 745-754.
- Rossa-Feres, D. C, and Nomura, F. 2006. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropica* 6 (1): 1-26.
- SBH, 2010. Brazilian amphibians – List of species. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Captured on 10/01/2011.
- Segalla, M. V.; Langone, J. A. 2004. Anfíbios. In Mikich, S. B. e Bérnils, R. S., Livro Vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná. Instituto Ambiental do Paraná, Curitiba.
- Silva, J. M. C. S.; Casteleti, C. H. 2005. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In. In. Mata Atlântica biodiversidade, ameaças e perspectivas. Belo Horizonte Conservação Internacional p. 43-59
- Silva, A. P. Z.; Garcia, P. C. A.; Martins, V. G.; Bacci, M.; Kasahara, S. 2004. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. *Amphibia-Reptilia* 25: 185-196.
- Silva, A. P. Z.; Haddad, C. F. B.; Galassi, G. G.; Kasahara, S. 2006. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analysis. *Genetica* 127: 35-44.

- Silvano, D. L.; Segalla, M. V. 2005. Conservação de anfíbios no Brasil. *Megadiversidade* 1: 79-86.
- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 83: 438-442.
- Thurnheer, S.; Reyer, H. U. 2000. Spatial distribution and survival rate of waterfrog tadpoles in relation to biotic and abiotic factors: a field experiment. *Amphibia-Reptilia* 22: 21-32.
- Toledo, L. F. 2009. Anfíbios como bioindicadores. In: Neumann-Leitão, S.; El-Dier, S. (Eds.) *Bioindicadores da qualidade ambiental*, pp. 196-208. Instituto brasileiro pró-cidadania, Recife.
- Wells, K. D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour* 25: 666-693.
- Wells, K. D. *The Ecology and behavior of amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago e Londres.

Capítulo I

Sítio de vocalização e dominância de *Dendropsophus weneri* em uma assembléia de anuros de área alterada na floresta Atlântica paranaense

Este capítulo será submetido ao periódico Journal of Herpetology

Journal of Herpetology

Oliveira et al.

Calling site and dominance of *Dendropsophus weneri* in an anuran assemblage from Atlantic forest disturbed site in southern Brazil.

Igor S. Oliveira^{1,2,4}; Adriele K. C. Oliveira^{1,2}; Marta Margarete Cestari^{1,2}; Luís Felipe Toledo³

1 *Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

2 *Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

3 *Museu de Zoologia “Prof. Adão José Cardoso”, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil.*

4 Present address: *Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

Key words: habitat use, *Dendropsophus weneri*, disturbed area, Atlantic forest

22 Resumo

23 Os anuros representam o grupo vertebrado mais ameaçado, sobretudo nos domínios da floresta
24 Atlântica. Estudos com taxocenoses de anuros são de grande importância para a compreensão de
25 relações inter e intraespecíficas, bem como para a identificação de padrões ecológicos e podem
26 fornecer bases para medidas de conservação do grupo. Neste trabalho apresentamos dados sobre
27 uma assembléia de anuros que utiliza uma pequena poça temporária como sítio de vocalização e
28 reprodução em um ambiente aberto e alterado no interior de uma área protegida da floresta
29 Atlântica. Foi identificada uma espécie dominante na assembléia, onde sua frequência e abundância
30 ao longo de seu período reprodutivo e da temporada de vocalização são maiores que de outras
31 espécies promovendo baixa equitabilidade e diversidade. Aparentemente a espécie é favorecida pela
32 baixa heterogeneidade do ambiente reprodutivo. No entanto foi identificada partilha de recurso
33 espacial na assembléia, indicando que as demais espécies podem utilizar o ambiente amostrado,
34 mas que outros fatores provavelmente dificultam uma ocupação mais equitativa da poça.

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45 Abstract

46 Anurans represent the most threatened vertebrate group, especially in Atlantic forest. Studies with
47 anuran assemblages are important to understanding inter and intraspecific relationships, as well to
48 identify ecological patterns, providing support to conservation of the group. Herein we present data
49 on an anuran assemblage that breeds in a small temporary pond in a disturbed site within the
50 Atlantic forest. We identified one single species as dominant with high levels of frequency and
51 abundance during the breed and vocalization seasons, leading the assemblage to low rates of
52 evenness and diversity. Apparently, this species is supported by low environmental heterogeneity of
53 the pond. However, the assemblage showed spatial partitioning; indicating that other species could
54 also occur in the pond, and unidentified factors must be restricting the pond occupancy by other
55 species.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67 Introdução

68 As propriedades do habitat são fundamentais para a sobrevivência das espécies animais e
69 sua relação com o ambiente pode determinar sua ocupação, permanência e sucesso através das
70 gerações (Pianka, 1967; 1973). Embora seja crescente o número de estudos envolvendo a ecologia
71 de anfíbios brasileiros, inicialmente o conhecimento sobre o uso de habitats reprodutivos para a
72 maioria dos anuros no Brasil era restrito a informações descritivas para algumas comunidades (e.g.
73 Bertoluci e Rodrigues, 2002; Prado e Pombal, 2005; Conte e Rossa-Feres, 2006), mas abordagens
74 ecológicas mais informativas, utilizando anuros como indicadores, têm ganhado espaço nos últimos
75 anos (e.g. Abrunhosa et al., 2006; Melo et al., 2007; Galdino et al., 2008; Dayrell, et al., 2009).

76 Durante o período reprodutivo anuros com estratégias de reprodução dependentes do meio
77 aquático possuem um comportamento gregário, formando assembléias. Nestes agrupamentos as
78 espécies passam a partilhar espaço e recursos, em muitos casos evitando a sobreposição de nicho
79 para permitir a coexistência (Bertoluci e Rodrigues, 2002; Abrunhosa et al., 2006; Galdino et al.,
80 2008; Dayrell et al., 2009). Essas assembléias constituem uma oportunidade única para o estudo de
81 interações intra e interespecíficas (Bertoluci e Rodrigues, 2002), bem como estudos sobre o uso do
82 ambiente reprodutivo (e.g. Hiert, 2008).

83 No entanto, em ambientes modificados, principalmente pelo homem, pode haver menor
84 variedade de microhabitats e, conseqüentemente menor riqueza (Pianka e Huey, 1971), conduzindo
85 a mudanças na estrutura das comunidades. Da mesma forma, ambientes homogêneos ou com
86 dominância de poucas espécies tendem a apresentar baixa equitabilidade e diversidade (Begon et
87 al., 2006; Olden e Rooney, 2006). Neste contexto, compreender os mecanismos que possibilitam a
88 coexistência das espécies de anuros durante determinadas épocas do ano é fundamental para a
89 entender os padrões ecológicos do grupo (Melo et al., 2007).

90 Desta forma, este estudo teve como objetivo fornecer dados sobre uma assembléia de anuros
91 em ambiente com baixa diversidade e heterogeneidade de microhabitats, a fim de fornecer
92 informações sobre taxocenoses de anuros que utilizam ambientes alterados para sua reprodução.

93 Material e Métodos

94 Área de estudo

95 Este trabalho foi desenvolvido na colônia de Castelhanos (25°47'41.97''S, 48°54'43.62''W,
96 cerca de 200 m sobre o nível do mar), uma área originalmente coberta por Floresta Ombrófila
97 Densa Submontana na Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaratuba, município de São José
98 dos Pinhais, Paraná (Figura 1). Foram realizadas sete fases de campo com duração de três dias cada
99 uma, entre outubro de 2009 e abril de 2010. Em cada fase, a coleta de dados foi iniciada no ocaso e
100 finalizada após as 3h, quando a atividade de vocalização dos anuros diminuía ou cessava. O
101 ambiente amostrado constituía de uma poça temporária (32 m x 8 m) dominada por *Brachiaria* sp.,
102 localizada em meio a áreas de pastagem, próxima à borda de floresta e mata ciliar (Figura 2A).

103

104 Desenho amostral

105 A poça foi dividida em oito transecções de 4m de largura (Figura 2B) para viabilizar a
106 amostragem do número de machos em atividade de vocalização, bem como a coleta dos dados de
107 localização para os machos cantores na poça. A ordem de amostragem das transecções em cada
108 ocasião foi definida mediante sorteio. Para cada transecção foi registrado o número de machos
109 cantores através de três censos auditivos ao longo da noite, sendo o primeiro após o início do coro,
110 outro às 23h e o último às 3h. Cada censo auditivo era realizado durante cinco minutos na margem
111 de cada transecção. Após esta etapa, cada transecção era percorrida na mesma ordem do sorteio,
112 sempre na mesma velocidade. Para machos avistados em atividade de vocalização foram registradas
113 sua distância da água, distância da margem e do limite da transecção, sua posição em relação ao
114 solo durante a vocalização e o substrato utilizado.

115 A temperatura do ar, da água e a umidade relativa do ar foram registradas no local a cada
116 censo para cada dia de coleta com auxílio de um termo-higrômetro digital. Os dados de precipitação
117 foram obtidos junto ao SIMEPAR.

118

119 Análise de dados

120 Para determinar a equitabilidade da comunidade foi realizado um teste de dominância de
121 Simpson para cada espécie durante cada mês do período amostral, seguido da análise de frequência,
122 equitabilidade de Pielou e diversidade de Shannon-Wiener (Krebs, 1999). Para o cálculo da
123 dominância e equitabilidade foi considerado o número de indivíduos em atividade de vocalização.
124 A diversidade foi considerada alta quando $H' \geq 70\% H'_{\text{máx}}$.

125 A fim de verificar a influência dos fatores climáticos (temperatura do ar e da água, umidade
126 relativa do ar e precipitação pluviométrica) sobre o número de espécies em atividade de vocalização
127 na poça, foi feita uma análise de correlação de Spearman (r_s), com valores de $p < 0,05$ considerados
128 significativos (Zar, 1999).

129 Para verificar a similaridade no uso do substrato de vocalização (solo, água e vegetação) e
130 estratificação vertical foi aplicado o teste de similaridade com índice de Morisita-Horn (C_H), com
131 posterior análise de agrupamento por média não ponderada (UPGMA) (Krebs, 1999). Nesta análise
132 *Leptodactylus cf. latrans* foi desconsiderado, pois nenhum indivíduo foi avistado em atividade de
133 vocalização. A estratificação vertical foi dividida em categorias, onde de 0 a 50 cm, as categorias
134 foram de 10 cm; e a partir de 51 cm até 150 cm, as categorias foram de 50 cm. Após esta etapa foi
135 efetuado o teste de χ^2 a fim de verificar se houve diferença na distribuição vertical entre os pares de
136 espécies mais semelhantes quanto ao uso do substrato. No teste de estratificação vertical foram
137 consideradas as espécies que utilizaram a vegetação como sítio de vocalização e apresentaram
138 similaridade maior que 0,90 (com registros superiores a cinco).

139 Foram efetuados cálculos considerando somente a espécie dominante, devido ao maior
140 volume de dados. Para avaliar a distribuição espacial horizontal da espécie dominante foi realizado
141 o teste do vizinho mais próximo de Clark e Evans (R), onde foi considerado o maior registro de
142 abundância para a espécie. Os valores de R variam de zero a um, onde valores próximos a zero
143 representam distribuição regular e valores próximos a um consistem em distribuição aleatória
144 (Krebs, 1999).

145 Também foi efetuado o teste de correlação entre fatores abióticos e número de machos
146 cantores (Zar, 1999) e foi aplicada uma análise de variância (ANOVA), com teste Tukey a
147 *posteriori* a fim de comparar as médias (Zar, 1999), para verificar flutuações nos valores de
148 abundância de machos cantores ao longo dos meses de coleta, entre as diferentes transecções e a
149 abundância de cantores ao longo da noite. Também foi aplicado o teste do qui-quadrado (χ^2) para
150 avaliar a preferência da espécie com relação ao substrato de vocalização e um teste de regressão
151 para testar se houve relação entre o número de cantores e a profundidade média da coluna de água
152 em cada transecção (Zar, 1999).

153 Em todas as análises foi verificada a distribuição normal dos dados. Valores de riqueza
154 foram transformados por [$\sqrt{x} + 0,5$]; a abundância e valores de precipitação pluviométrica foram
155 logaritmizados [$\log(x+1)$]; dados de temperatura foram transformados por [$\log x$] e a umidade por
156 [$\arccos(x)$] (Zar, 1999). As análises estatísticas foram realizadas pelo software livre PAST, versão
157 2.01 (Hammer et al., 2001).

158

159 Resultados

160 A poça temporária foi utilizada como sítio de vocalização por 10 espécies de anuros (Tabela
161 1), pertencentes a duas famílias: Hylidae (*Dendropsophus elegans*, *D. microps*, *D. minutus*, *D.*
162 *weneri*, *Hypsiboas faber*, *Scinax* sp. (aff. *alter*), *S. perereca* e *S. Rizibilis*) e Leptodactylidae
163 (*Leptodactylus* cf. *latrans* e *L. notoaktites*). A comunidade apresentou um valor de dominância de
164 0,42, uma equitabilidade de 0,39 e o H' representou 59 % do H'máx, com *D. weneri* representando
165 a espécie com maior frequência em relação às demais, ao longo de todos os meses (Tabela 2).
166 Durante o estudo foram encontradas evidências de atividade reprodutiva (fêmeas com ovos, casais
167 em amplexo ou desovas) para *D. elegans*, *D. microps*, *D. minutus*, *D. weneri*, *H. faber* e *L.* cf.
168 *latrans*.

169 O número de espécies em atividade de vocalização apresentou correlação significativa com a
170 temperatura do ar e a precipitação ($p < 0,05$), mas com uma força de interação fraca ($r = - 0,389$ e r

171 = - 0,285, respectivamente). Da mesma forma, o teste mostrou que a temperatura da água e a
172 umidade relativa do ar não apresentam relação com o número de espécies em atividade de
173 vocalização ($p > 0,05$).

174 De acordo com o teste de similaridade e agrupamento com relação ao uso dos substratos de
175 vocalização, dois grupos distintos devem ser considerados. Em um dos ramos as espécies *H. faber* e
176 *L. notoaktites* foram agrupadas de acordo com o uso do substrato (solo e água), apresentando alta
177 similaridade no uso do substrato de vocalização ($C_H = 1$, com coeficiente cofenético igual a 1),
178 enquanto que no outro ramo foram reunidas as demais espécies, que utilizaram preferencialmente a
179 vegetação da poça. Com relação à distribuição vertical no uso do sítio de vocalização, a análise de
180 similaridade e o agrupamento também evidenciaram dois grupos com semelhança acima de $C_H =$
181 0,72 com relação ao uso do substrato. *Scinax* sp. (aff. *alter*) e *S. rizibilis* ($C_H = 98$) e *D. elegans* e *D.*
182 *weneri* ($C_H = 98$) apresentaram a maior semelhança no uso do ambiente com relação à
183 estratificação vertical (Figura 5). *Dendropsophus elegans* e *D. weneri* apresentam diferenças
184 significativas no uso da vegetação quanto à altura em relação à água ($\chi^2 = 22,46$; $gl = 6$; $p < 0,05$),
185 onde *D. elegans* apresenta menor variação no uso da altura do sítio de vocalização (11 - 40 cm) e *D.*
186 *weneri* apresentou maior amplitude nos registros (0 - 120 cm).

187 Para a espécie dominante (*D. weneri*) é possível afirmar que a distribuição dos machos
188 cantores no interior da poça segue um padrão aleatório (Figura 5) ($R = 0,96$) e que o número de
189 machos em atividade de vocalização para esta espécie não está relacionado com os fatores
190 climáticos avaliados ($p > 0,005$). No entanto, de acordo com os resultados da ANOVA, existe
191 variação no número de cantores de *D. weneri* ao longo dos meses amostrados ($F_{5-17} = 27,5$; $p <$
192 0,05), nas transecções ($F_{6-363} = 12,93$; $p < 0,05$) e também ao longo da noite ($F_{2-41} = 18,23$; $p <$
193 0,05), onde o número de cantores registrados foi sempre maior no censo das 23 h. O número de
194 indivíduos em atividade de vocalização variou de zero em março a 113 em dezembro (Figura 6) e,
195 com relação à variação relacionada às transecções, a regressão linear mostrou uma interação
196 positiva significativa ($r^2 = 0,58$; $p < 0,05$) entre o número de cantores e a profundidade média da

197 coluna d'água em cada transecção (Figura 7), com transecções mais profundas apresentando maior
198 abundância de cantores.

199 *Dendropsophus weneri* apresentou ainda diferenças significativas quanto ao uso do
200 substrato de vocalização ($\chi^2 = 16,266$; gl = 3; $p < 0,005$), onde a maior parte dos registros
201 correspondem a indivíduos vocalizando em folhas na posição horizontal em relação ao solo.

202

203 Discussão

204 A temperatura do ar e a precipitação foram os fatores climáticos que exerceram maior
205 influência sobre a atividade de vocalização dos anuros no ambiente estudado. De maneira geral,
206 esses fatores, principalmente a precipitação, são considerados preponderantes para a atividade de
207 vocalização de anuros (Duellman e Trueb, 1994; Gottsberger e Gruber, 2004; Abrunhosa et al.,
208 2006; Saenz et al., 2006). Componentes abióticos podem influenciar as espécies de modos
209 diferentes, devido principalmente a características bionômicas como o modo reprodutivo,
210 determinando os padrões de distribuição temporal (Abrunhosa et al., 2006; Hiert e Moura, 2010).

211 Com relação ao uso do substrato, a semelhança observada entre *Hypsiboas faber* e
212 *Leptodactylus notoaktites* revelada pelo agrupamento, pode ser atribuída às suas estratégias
213 reprodutivas (*sensu* Haddad e Prado, 2005), onde *H. faber* (modo 4), utiliza painéis construídas no
214 nível do solo para sua oviposição e *L. notoaktites* (modo 30) usualmente deposita seus ovos em
215 câmaras subterrâneas. Em Castelhanos, ambas as espécies foram registradas utilizando o solo como
216 sítio de vocalização, mesmo em outros tipos de ambiente (Cunha et al., 2010). *Hypsiboas faber*
217 frequentemente vocaliza no solo ou em poleiros até 4 m (Martins e Haddad, 1988), mas a vegetação
218 da poça não oferece sustentação para esta espécie utilizar o estrato vertical. Em contrapartida, o
219 outro agrupamento é caracterizado pelo uso da vegetação como sítio de vocalização, o que é típico
220 das espécies de hábito escalador (e.g. Bastos e Haddad, 1999; Bertoluci e Rodrigues, 2002; Rocha
221 et al., 2008; Cunha et al., 2010). Esse agrupamento se deve a restrições morfológicas evolutivas
222 comuns e reflete o estreito nível de parentesco entre as espécies que o compõem (Faivovich et al.,

223 2005), onde a forma do corpo e tamanho dos cantores das espécies permite que utilizem e partilhem
224 os poleiros existentes no estrato vertical (Rossa-Feres e Jim, 2001). Na poça estudada os anuros
225 maiores e de maior massa corporal permaneceram sempre próximos ao solo (e.g. *H. faber* e *L.*
226 *notoaktites*), enquanto que espécies menores (*Dendropsophus elegans*, *D. microps*, *D. minutus*, *D.*
227 *weneri*, *Scinax* sp. (aff. *alter*) e *S. rizibilis*) podem fazer uso da estratificação vertical. Entretanto,
228 mesmo entre as espécies menores, a massa corporal também parece exercer influência, pois *D.*
229 *weneri* (menor que as demais) apresentou maior amplitude no uso do estrato vertical da vegetação,
230 enquanto animais um pouco maiores como *Scinax* sp. (aff. *alter*) vocalizaram próximos à água,
231 geralmente nas raízes da *Brachiaria* sp. (mais resistentes). Abrunhosa et al. (2006) atribuem a
232 partilha do ambiente reprodutivo à sucessão temporal na ocupação do ambiente, proporcionada pelo
233 modo reprodutivo das espécies, enquanto Melo et al., (2007) e Gottsberger e Gruber (2004) atestam
234 que a partilha espacial constitui um fator importante para a coexistência entre espécies. Apesar de
235 avaliada, a partilha temporal foi observada na comunidade da poça estudada e pode estar
236 relacionada com a estruturação dessa assembléia.

237 Os dados de riqueza, equitabilidade e dominância apontam *D. weneri* como a espécie
238 predominante da assembléia, destacando-a das demais. Esta espécie possui alta frequência de
239 ocorrência ao longo da temporada de vocalização, bem como altos valores de abundância. Em
240 Santos e São Vicente (estado de São Paulo) *D. weneri* é a espécie de *Dendropsophus* mais
241 abundante em oito corpos d'água amostrados (L.F. Toledo, dados não publicados). Da mesma
242 maneira, em Morretes e Pontal do Sul, no litoral paranaense, *D. weneri* apresenta notável
243 abundância frente às outras espécies, nitidamente destacando-se em número de cantores nessas
244 assembléias (obs. pess.). A heterogeneidade ambiental, principalmente vegetal, é um dos fatores
245 preponderantes no favorecimento da diversidade (Pianka, 1973; Pianka e Huey, 1971), inclusive
246 para anuros (e.g. Rossa-Feres e Jim, 2001; Conte e Rossa-Feres, 2007; Vasconcelos et al., 2009;
247 Cunha et al., 2010). Em Castelhanos o ambiente estudado é dominado por uma gramínea exótica
248 (*Brachiaria* sp.) com potencial reconhecidamente invasor (Barbosa et al., 2008) e oferece pouca

249 heterogeneidade de microhabitats. Por outro lado, *D. weneri* reúne alguns atributos de espécie
250 colonizadora e generalista, como ser abundante em sua área de ocorrência, utilizar ambientes
251 abertos para reprodução e apresentar modos reprodutivos simplificados (Pombal e Gordo, 2004;
252 Miranda et al., 2008, Cunha et al., 2010). A dominância de *Brachiaria* sp., além de proporcionar
253 baixa heterogeneidade ao sítio de vocalização, parece favorecer a permanência de *D. weneri*. Seu
254 hábito escalador e seu tamanho reduzido (Pombal e Bastos, 1998) permitem que se distribua em
255 uma amplitude maior no estrato vertical, enquanto que seu hábito territorialista, com repertório que
256 inclui sinalizações e interações agressivas (Miranda et al., 2008), inclusive com outras espécies de
257 porte similar (obs. pess.), parece habilitá-la a ocupar a poça com sucesso. Além disso, suas
258 proporções corporais lhe permitem ocupar maior diversidade de substratos que as outras espécies.
259 Em Castelhanos *D. weneri* nunca foi registrada vocalizando no interior da floresta e parece utilizar
260 somente as áreas abertas da região (Cunha et al., 2008; 2010).

261 Apesar de não testado, é provável que exista competição por espaço, tanto entre espécies de
262 maior porte (*H. faber* e *L. notoaktites*) como entre as demais, visto que ocorre sobreposição de
263 nicho espacial e coexistência (e.g. Dayrell et al., 2009). De maneira similar, o padrão aleatório de
264 distribuição horizontal de *D. weneri*, demonstra que a competição intraespecífica possui um papel
265 secundário na estruturação dessa população (e.g. Rossa-Feres e Jim, 2001; Galdino et al., 2008),
266 uma vez que foi verificada a disponibilidade de sítio de vocalização vagos no estrato vertical,
267 levando-se em conta que a espécie é territorial e costuma defender seu poleiro de canto (Miranda et
268 al., 2008). A dominância de *D. weneri* e a menor frequência das outras espécies no sítio de
269 vocalização, principalmente do gênero *Dendropsophus*, pode estar associada a outras extensões do
270 nicho, como a dimensão acústica (Rossa-Feres e Jim, 2001). Também pode ser relacionada a
271 recursos necessários às outras espécies que não estão disponíveis na poça ou ainda à existência de
272 outros sítio próximos não avaliados, onde *D. weneri* pode não ser dominante, fazendo com que a
273 poça estudada represente um ambiente excepcional para a taxocenose de Castelhanos.

274 Os fatores climáticos não tiveram influência sobre a abundância de cantores de *D. weneri*,
275 mas é consenso que diferentes espécies de anuros podem responder de com distinção às variáveis
276 climáticas, devido às suas diferentes estratégias reprodutivas (Abrunhosa et al., 2006; Hiert e
277 Moura, 2010). Apesar de *D. weneri* apresentar dois modos reprodutivos conhecidos (Pombla e
278 Gorod, 2004; Miranda et al., 2008), a estratégia reprodutiva observada para a população de
279 Castelhanos corresponde ao modo 1 (*sensu* Haddad e Prado, 2005), conferindo com o relatado por
280 Miranda et al. (2008), que sugerem que essa diferenciação de modo reprodutivo pode estar
281 relacionada ao desmatamento ou a alterações climáticas, o que poderia explicar a ausência de
282 relação entre a abundância da espécie e fatores climáticos, como observado nos resultados. No
283 entanto, algumas espécies podem ser influenciadas pela ação combinada de fatores abióticos e não
284 de uma variável específica (Hiert e Moura, 2010).

285 A variação no número de machos cantores de *D. weneri* ao longo da noite, com maior
286 registro de cantores em torno das 23 h, pode estar relacionado com a presença de fêmeas na poça
287 (e.g. Bastos e Haddad, 1999), geralmente avistadas por volta desse horário. A presença e o
288 comportamento das fêmeas são fatores que podem ocasionar variações no canto de machos com
289 efeitos sobre a seleção sexual, onde machos mais ativos podem ser favorecidos (Bosch, 2001).

290 No caso da variação com relação às transecções, foi verificada uma correlação positiva entre
291 o número de cantores e a profundidade da lâmina d'água, o que novamente pode ser explicado pelo
292 modo reprodutivo adotado por esta espécie, onde a água é essencial para sua reprodução (Pombal e
293 Gordo, 2004; Haddad e Prado, 2005; Miranda et al., 2008). Outro fator que poderia auxiliar na
294 compreensão deste padrão seria a proteção contra predadores, visto que *D. weneri* apresenta a fuga
295 e mergulho como um mecanismo defensivo (obs. pess.). Predadores representam um risco constante
296 para machos cantores durante agregações reprodutivas (e.g. Toledo et al., 2007; Oliveira et al.,
297 2010) e os anuros possuem um repertório considerável de estratégias de defesa (Marchisin e
298 Anderson, 1978; Toledo et al., 2011), onde o próprio habitat pode fornecer abrigos (Levitan e

299 Genovese, 1989). Neste caso, parcelas do habitat com lâmina d'água representariam tanto locais
300 ideais para a reprodução como refúgios contra predadores.

301

302 Agradecimentos

303 Agradecemos a Moacyr Grassmann e família, Manoela Woitovics Cardoso, ICMBio, IAP e CEEA-
304 UFPR; e à CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324 Literatura Citada

- 325 Abrunhosa, P. A., Wogel, H., and Pombal Jr., J. P. 2006. Anuran temporal occupancy in a
326 temporary pond from the Atlantic Rain Forest, south-eastern Brazil. *Herpetological Journal* 16: 115-
327 122.
- 328 Barbosa, E. G., Pivello, V. R., and Meirelles, S. T. 2008. Allelopathic evidence in *Brachiaria*
329 *decumbens* and its potential to invade the Brazilian Cerrados. *Brazilian Archives of Biology and*
330 *Technology* 51 (4): 825-831.
- 331 Bastos, R. P., and Haddad, C. F. B. 1999. Atividade reprodutiva de *Scinax rizibilis* (Bokermann)
332 (Anura, Hylidae) na floresta Atlântica, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 16 (2):
333 409-421.
- 334 Begon, M., Townsend, C. R., and Harper, J. L. 2006. *Ecology from Individuals to Ecosystems*.
335 Blackwell Publishing, Boston.
- 336 Bertoluci, J., and Rodrigues, M. T. 2002. Utilização de habitats reprodutivos e micro-habitats de
337 vocalização em uma taxocenose de anuros (Amphibia) da Mata Atlântica do sudeste do Brasil.
338 *Papéis Avulsos de Zoologia* 42 (11): 287-297.
- 339 Bosch, J. 2001. Female reciprocal calling in the Iberian midwife toad (*Alytes cisternasii*) varies
340 with male call rate and dominant frequency: implications for sexual selection. *Naturwissenschaften*
341 88: 434-437.
- 342 Conte, C. E., and Rossa-Fere, D. C. 2006. Diversidade e ocorrência temporal da anurofauna
343 (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23 (1):
344 162-175.
- 345 Conte, C., E. and Rossa-Feres, D. C. 2007. Riqueza e distribuição espaço-temporal de anuros em
346 um remanescente de floresta de Araucária no sudeste do Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia* 24
347 (4): 1025-1037.

- 348 Cunha, A. K., Oliveira, I. S., Hartmann, M. T. 2008. Anurofauna da colônia Castelhanos, APA de
349 Guaratuba, Paraná. In Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia, pp. 887.
- 350 Cunha, A. K., Oliveira, I. S., and Hartmann, M. T. 2010. Anurofauna da colônia Castelhanos, na
351 Área de Proteção Ambiental de Guaratuba, Serra do Mar paranaense, Brasil . Biotemas 23 (2): 123-
352 134.
- 353 Dayrell, J. S., Moura, M. R., Schoereder, J. H., and Feio, R. N. 2009. Os anfíbios competem por
354 sítios de voclização em poças temporárias? In Anais do III Congresso Latino Americano de
355 Ecologia, pp. 1-4.
- 356 Duellman, W., and Trueb, L. 1994. Biology of Amphibians. The John Hopkins University Press,
357 Baltimore.
- 358 Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P., Frost, D., Campbell, J., and Wheeler, W. 2005.
359 Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic
360 analysis and taxonomic revision. Bulletin of American Museum of Natural History 294: 1-240.
- 361 Galdino, C. A. B., Carvalho Jr., R. R., Noronha e Menezes, M. A. V., and Nascimento, L. B. 2008.
362 Habitat use by a tree frog species of *Scinax* (Amphibia, Hylidae) at an urban forest fragment from
363 south-eastern Brazil. Iheringia 98 (3): 412-415.
- 364 Gottsberger, B., and Gruber, E. 2004. Temporal partitionign of reproductive activity in a
365 neotropical anuran community. Journal of Tropical Ecology 20: 271-280.
- 366 Haddad, C. F. B., and Prado, C. P. A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected
367 diversity in the Atlantic forest of Brazil. BioScience 55 (3): 207-217.
- 368 Hammer, O.; Harper, D. A. T., and Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software
369 package for education and data analysis. Version 2.01, Paleontologia Electronica 4 (1): 9 pp.

- 370 Hiert, C. 2008. Dinâmica populacional e uso do espaço de *Hypsiboas leptolineatus* (Braun & Braun,
371 1977) (Anura: Hylidae) no município de Turvo, Estado do Paraná. Unpubl. Msc. Diss.,
372 Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
- 373 Hiert, C., Moura, M. O. 2010. Abiotic correlates of temporal variation of *Hypsiboas leptolineatus*
374 (Maphibia: Hylidae). *Zoologia* 27 (5): 703-708.
- 375 Krebs, C. 1999. *Ecological Methodology*. Melo Park: Addison Wesley, Longman.
- 376 Levitan, D. R., Genovese, S. J. 1989. Substratum-dependent predator-prey dynamics: patch reefs as
377 refuges from gastropod predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 130:
378 111-118.
- 379 Machisin, A., Anderson, J. D. 1978. Strategies employed by frogs and toads (Amphibia, Anura) to
380 avoid predation by snakes (Reptilia, Serpentes). *Journal of Herpetology* 12 (2): 151-155.
- 381 Martins, M., and Haddad, C. F. B. 1988. Vocalizations and reproductive behaviour in the smith
382 frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). *Amphibia-Reptilia* 9: 49-60.
- 383 Melo, G. V., Rossa-Feres, D. C., and Jim, J. 2007. Variação temporal no sítio de vocalização em
384 uma comunidade de anuros de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 7 (2): 93-
385 102.
- 386 Miranda, D. B., Garey, M. V., Monteiro-Filho, E. L. A., and Hartmann, M. T. 2008. Sinalização
387 visual e reprodutiva de *Dendropsophus weneri* (Anura: Hylidae) em área de Mata Atlântica no
388 Estado do Paraná, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 48 (29): 335-343.
- 389 Olden, J. D., and Rooney, T. P. 2006. On defining and quantifying biotic homogenization. *Global*
390 *Ecology and Biogeography* 15: 113-120.
- 391 Oliveira, I. S., Oliveira, A. K. C., Cestari, M. M., Toledo, L. F. 2010. Predation on *Dendropsophus*
392 *weneri* (Anura: Hylidae) by a licosid in the Atlantic forest, southern Brazil. *Herpetology Notes* 3:
393 299-300.

- 394 Pianka, E. 1967. On lizard species diversity: north American flatland deserts. *Ecology* 48 (3): 333-
395 351.
- 396 Pianka, E. 1973. The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics*
397 4: 53-74.
- 398 Pianka, E., and Huey, R. 1971. Bird species density in the Kalahari and the Australina deserts.
399 *Koedoe* 14: 123-129.
- 400 Pombal Jr., J. P., and Bastos, R. P. 1998. Nova espécie de *Hyla* Laurenti, 1768 do centro-oeste
401 brasileiro e a posição taxonômica de *H. microcephala wernerii* Cochran, 1952 e *H. microcephala*
402 *meridiana* B. Lutz, 1952 (Anura, Hylidae). *Boletim do Museu Nacional* 390: 1-14.
- 403 Pombal Jr., J. P., and Gordo, M. 2004. Anfíbios anuros da Juréia. In Marques, O. A. V. and Duleba,
404 W., *Estação Ecológica Juréia-Itatins: Ambiente Físico, Flora e Fauna*, pp. 243-256. Holos, Ribeirão
405 Preto, Brazil.
- 406 Prado, G. M., and Pombal Jr., J. P. 2005. Distribuição espacial e temporal dos anuros em um brejo
407 da reserva biológica de duas bocas, sudeste do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional* 63 (4): 685-
408 705.
- 409 Rocha, C. F. D., Ariani, C. V., Menezes, V. A., and Vrcibradic, D. 2008. Effects of a fire on a
410 population of treefrogs (*Scinax* cf. *alter*, Lutz) in a restinga habitat in southern Brazil. *Brazilian*
411 *Journal of Biology* 68 (3): 539-543.
- 412 Rossa-Feres, D. C., and Jim, J. 2001. Similaridade do sítio de vocalização em uma comunidade de
413 anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*
414 18 (2): 439-454.
- 415 Saenz, D., Fitzgerald, L. A., Baum, K. A., and Conner, R. N. 2006. Abiotic correlates of anuran
416 calling phenology: the importance of rain, temperature, and season. *Herpetological Monographs* 20:
417 64-82.

- 418 Toledo, L. F., Silva, R. R., Haddad, C. F. B. 2007. Anurans as prey: an exploratory analysis and
419 size relationships between predators and their prey. *Journal of Zoology* 271: 170-177.
- 420 Toledo, L. F., Sazima, I., Haddad, C. F. B. 2011. Behavioral defense of anurans: na overview.
421 *Ethology Ecology & Evolution* 23 (1): 1-25.
- 422 Vasconcelos, T. S., Santos, T. G., Rossa-Feres, D. C., and Haddad, C. F. B. 2009. Influence of
423 environmental heterogeneity of breeding ponds on anurans assemblages from southeastern Brazil.
424 *Canadian Journal of Zoology* 87: 699-707.
- 425 Zar, J. 1999. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall.

Tabelas

Tabela 1: Ocorrência temporal das espécies de anuros registradas na poça temporária avaliada na colônia de Castelhanos em São José dos Pinhais, Paraná, durante o período amostral (entre outubro de 2009 e abril de 2010).

Família/Espécie	2009			2010			
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr
Hylidae							
<i>D. elegans</i>	X		X				
<i>D. microps</i>	X		X				
<i>D. minutus</i>	X	X	X	X	X		
<i>D. wernerii</i>	X	X	X	X	X		X
<i>H. faber</i>	X	X	X	X			
<i>Scinax</i> sp.(aff. <i>alter</i>)	X		X	X	X		
<i>S. perereca</i>			X				
<i>S. rizibilis</i>			X				
Leptodactylidae							
<i>L. latrans</i>	X		X		X		
<i>L. notoaktites</i>	X	X	X		X		

Tabela 2: Valores de Abundância proporcional \pm Desvio padrão (valores Mínimos e Máximos) observados e médias de Frequência de ocorrência das espécies registradas na poça em atividade de vocalização.

Espécie	Abundância \pm Desvio padrão (Mínimo-Máximo)	Frequência
<i>D. elegans</i>	1.008 \pm 1.737 (0 - 3.932)	28.571
<i>D. microps</i>	0.749 \pm 1.748 (0 - 4.687)	28.571
<i>D. minutus</i>	3.310 \pm 3.618 (0 - 8.823)	57.142
<i>D. werneri</i>	68.329 \pm 32.195 (0 - 100)	85.714
<i>H. faber</i>	1.959 \pm 2.073 (0 - 5.40)	57.142
<i>Scinax</i> sp.(aff. <i>alter</i>)	4.343 \pm 5.020 (0 - 11.538)	57.142
<i>S. perereca</i>	2.166 \pm 5.732 (0 - 15.168)	14.285
<i>S. rizibilis</i>	0.160 \pm 0.424 (0 - 1.123)	14.285
<i>L. latrans</i>	1.122 \pm 1.445 (0 - 3.125)	42.857
<i>L. notoaktites</i>	2.562 \pm 4.226 (0 - 11.764)	57.142

Legendas de Figuras

Figura 1: Localização da colônia de Castelhanos na Área de Proteção Ambiental de Guaratuba, em São José dos Pinhais, Paraná.

Figura 2: (A) Área de estudo em poça temporária dominada por *Brachiaria* sp. (seta) em meio à pastagem; (B) limites das transecções (linhas brancas) utilizadas no estudo com distâncias de 4 m entre eles.

Figura 3: valores de temperatura do ar, temperatura da água, umidade e precipitação acumulada registrados entre outubro de 2009 e abril de 2010 na poça temporária de Castelhanos e flutuação na riqueza registrada ao longo do estudo.

Figura 4: Agrupamento com relação à similaridade de uso do estrato vertical do ambiente amostrado, onde *Scinax* sp. (aff. *alter*) (alt), *S. rizibilis* (riz), *D.elegans* (ele) e *D. weneri* (wer) apresentam similaridade acima de 96%, enquanto *D. minutus* (min) e *D. microps* (mic) apresentam menor similaridade no uso do estrato vertical do sítio de vocalização. Coeficiente cofenético igual a 0,78.

Figura 5: Distribuição horizontal de *D. weneri* na área de estudo em dezembro de 2009, evidenciando um padrão aleatório.

Figura 6: Variação no número de cantores de *D. weneri* e flutuações dos fatores climáticos ao longo do período amostral.

Figura 7: Regressão linear positiva entre o número de cantores e a profundidade média das transecções da área de estudo.

Figuras

Figura 1

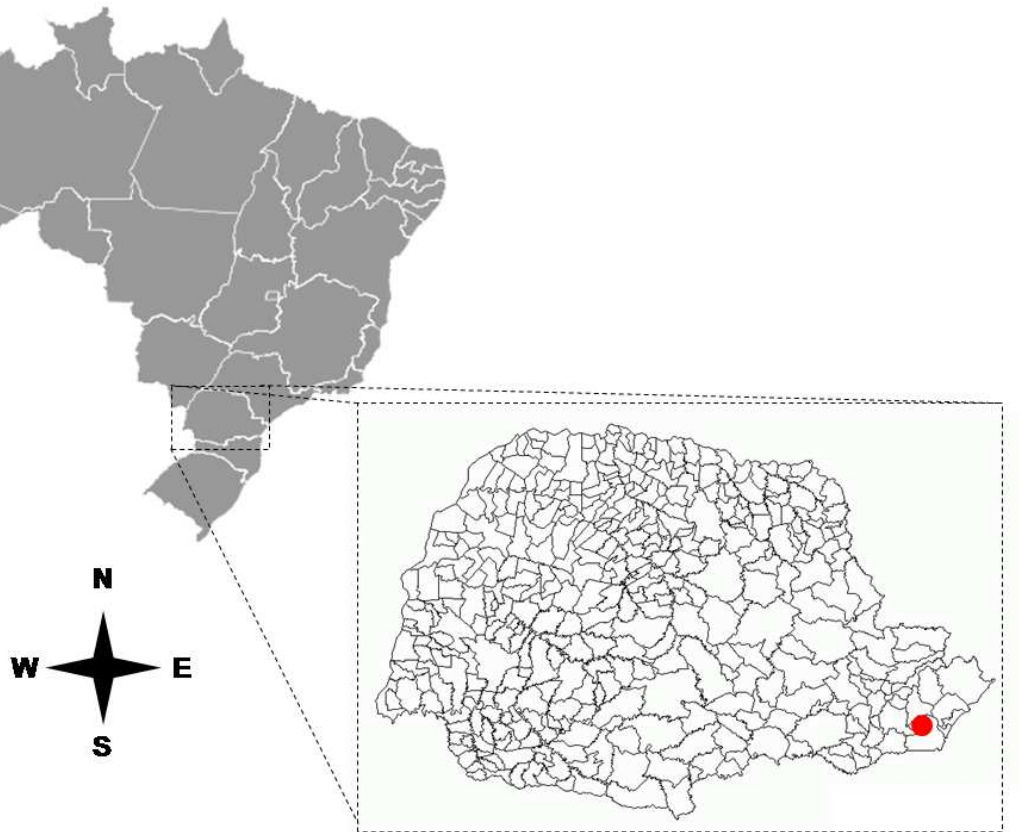


Figura 2

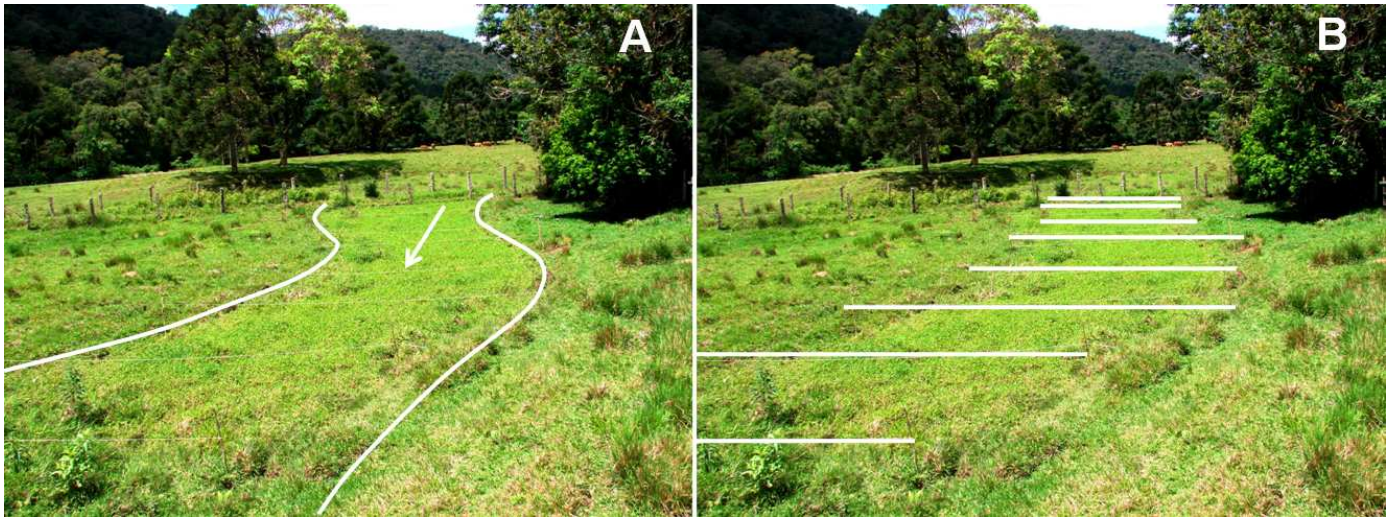


Figura 3

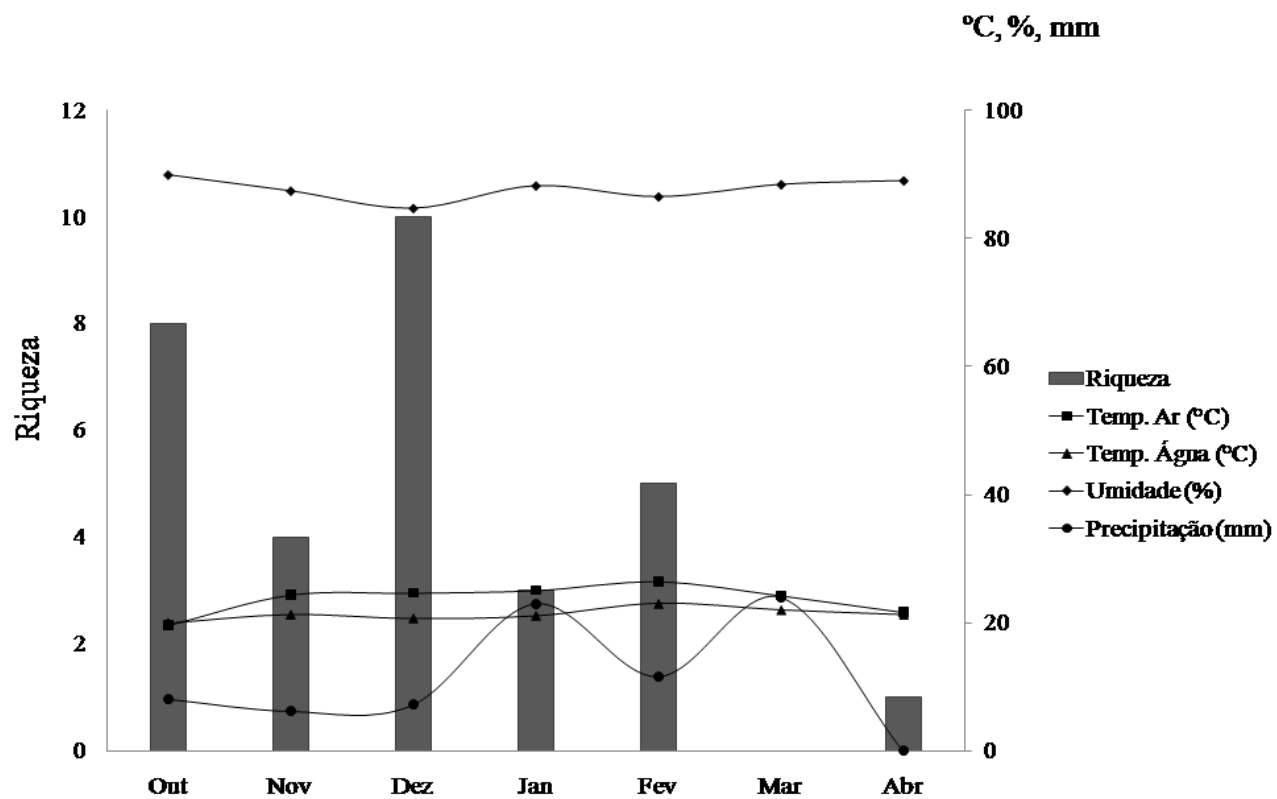


Figura 4

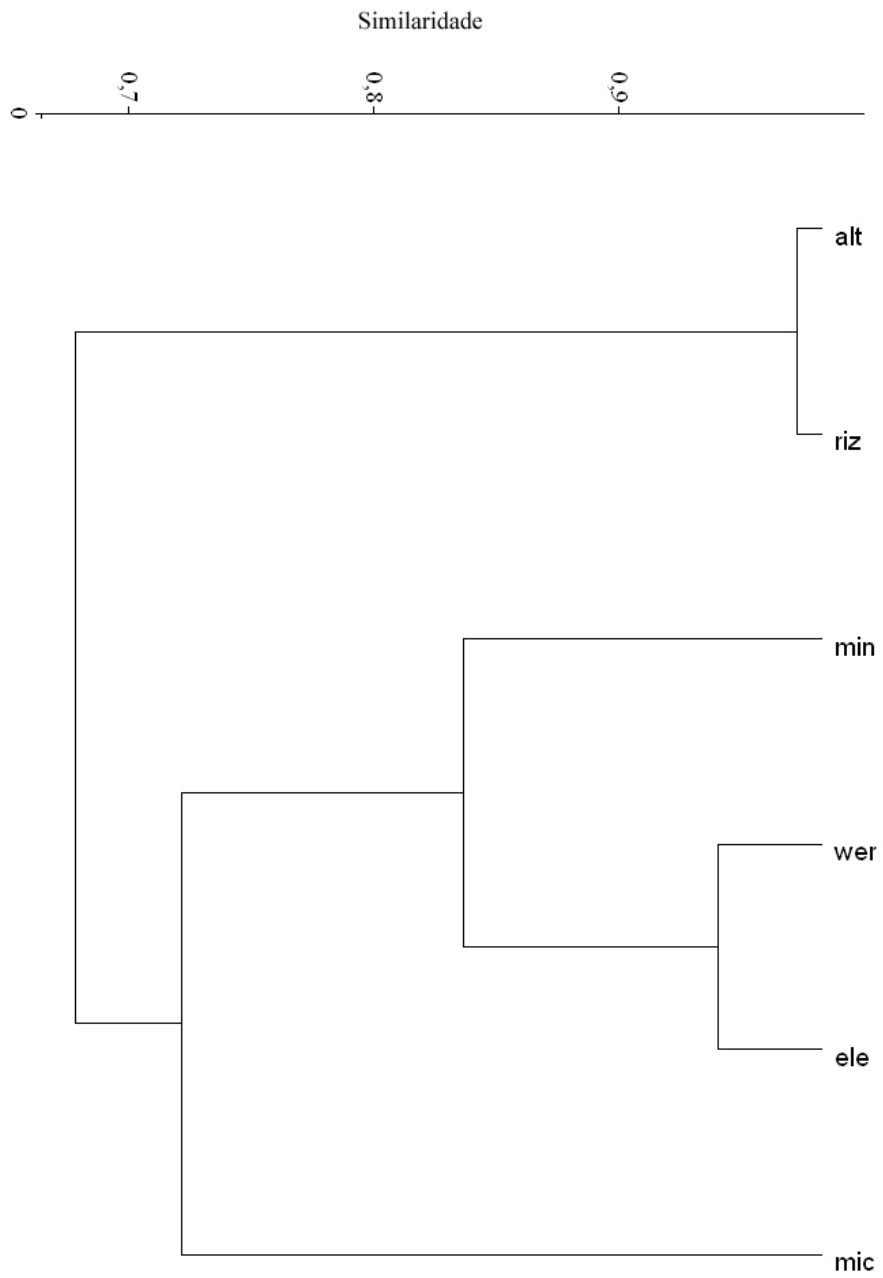


Figura 5

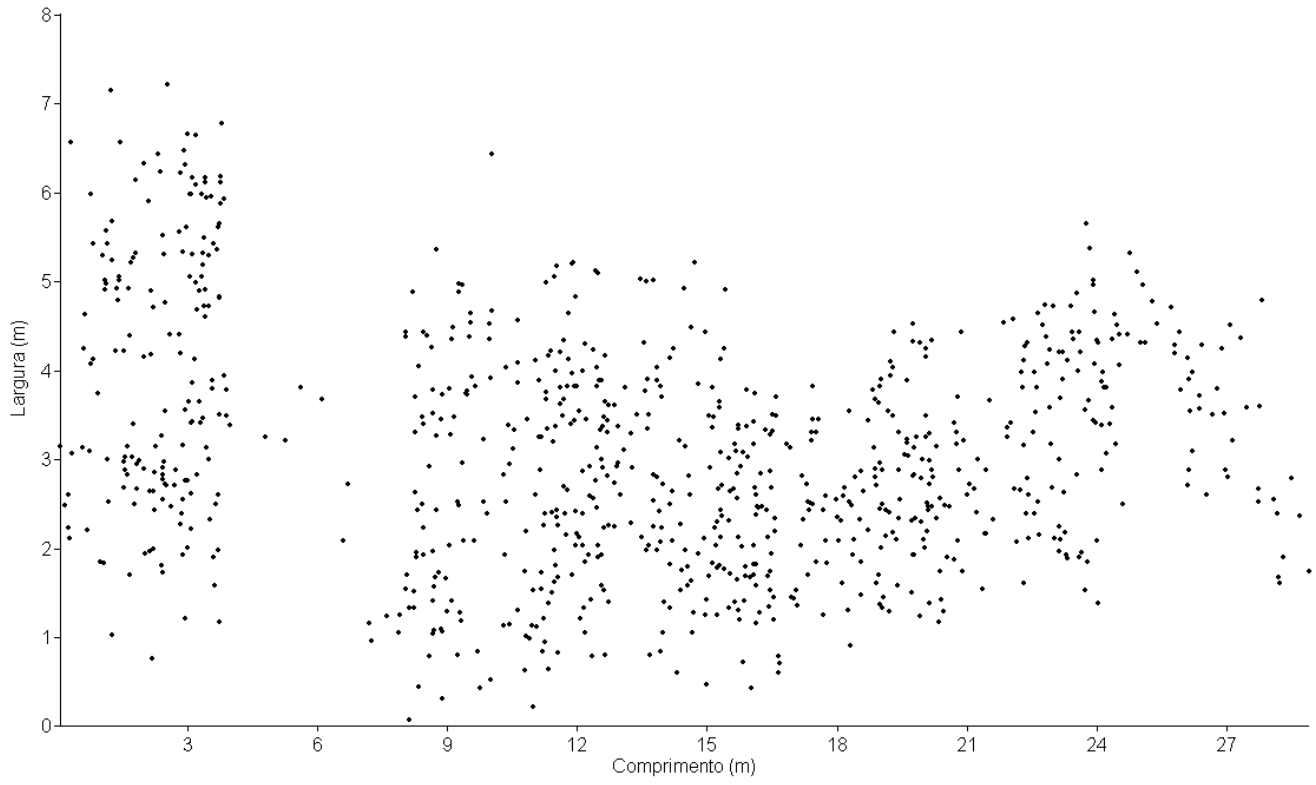


Figura 6

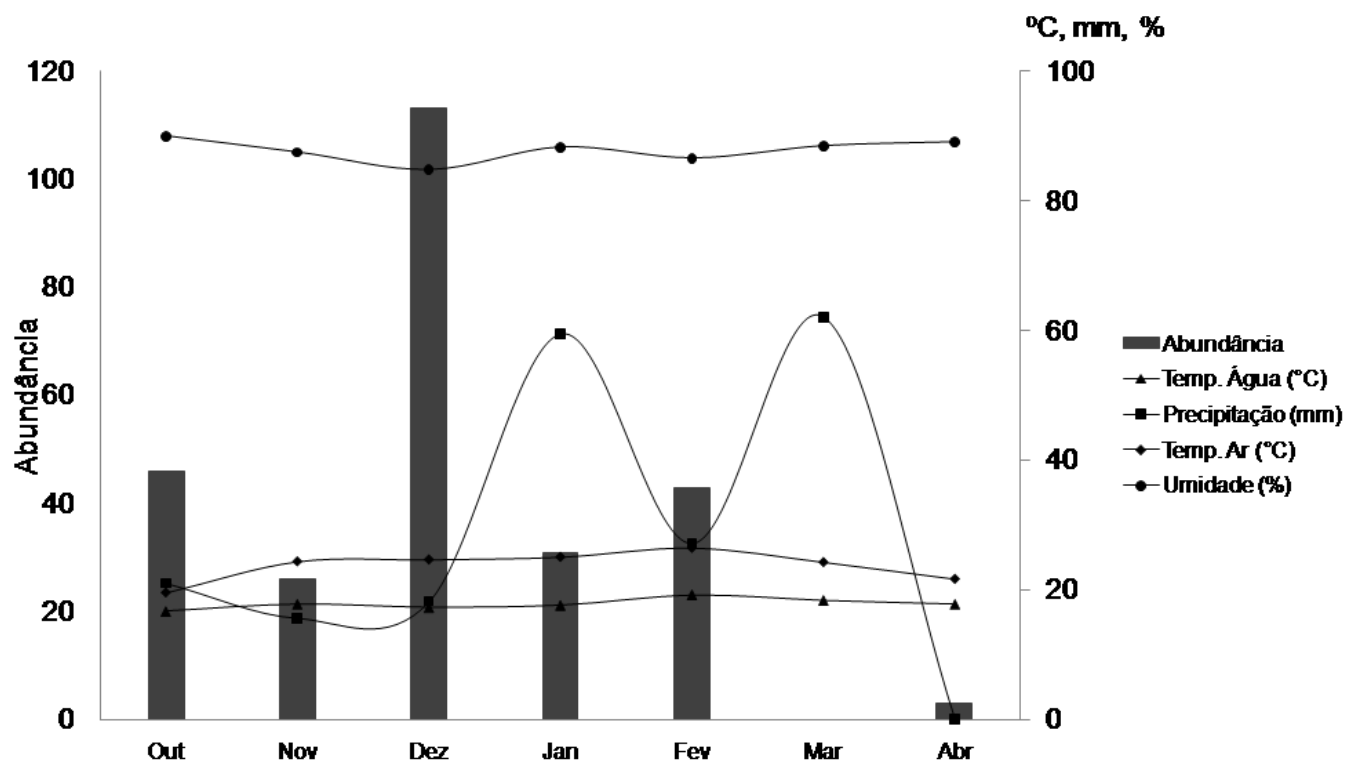
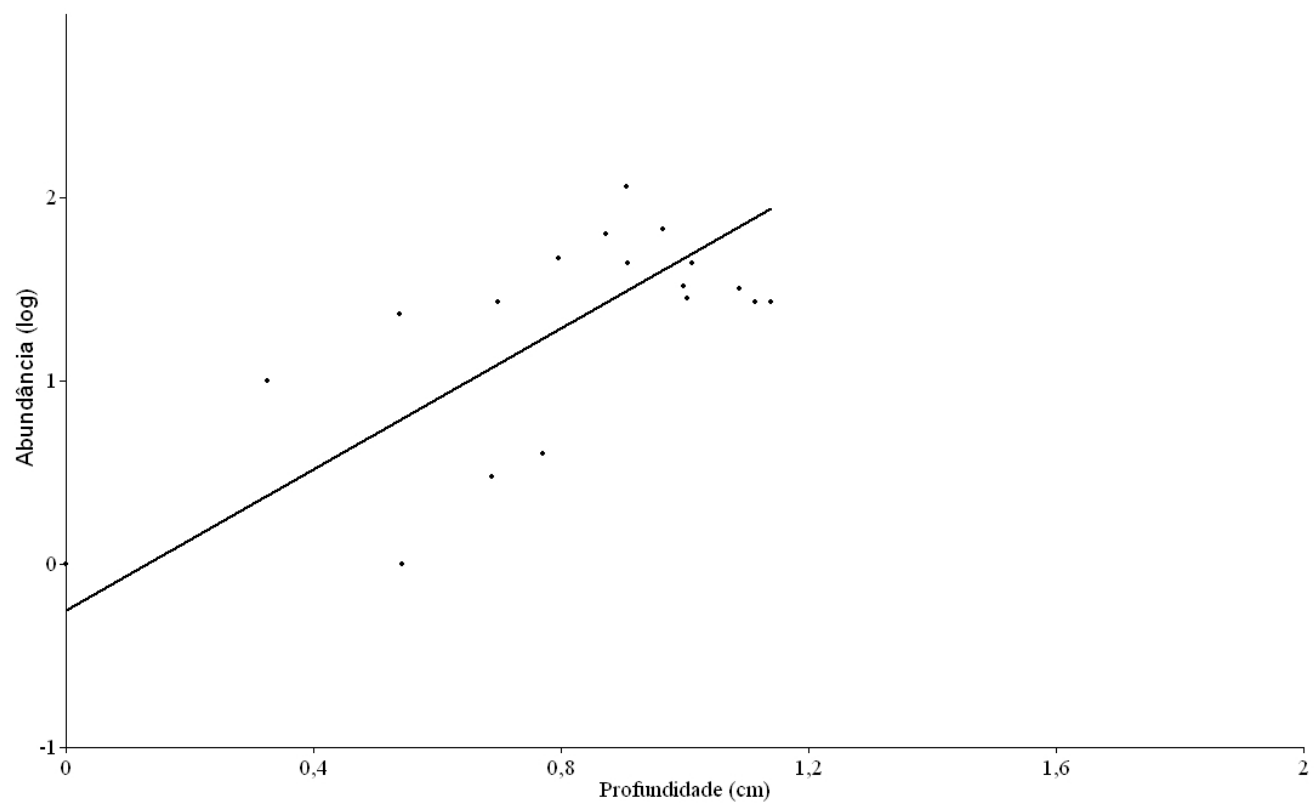


Figura 7



Capítulo II

Descrição do girino de *Dendropsophus weneri* (Anura, Hylidae)

Este capítulo será submetido ao periódico Journal of Herpetology

1 Journal of Herpetology

2 Oliveira et al.

3 Shorter communication

4

5 The tadpole of *Dendropsophus weneri* (Anura, Hylidae)

6 Igor S. Oliveira^{1,2,4}; Adriele K. C. Oliveira^{1,2}; Marta Margarete Cestari^{1,2}; Luís Felipe Toledo³

7

8 1 *Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná,*
9 *Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

10 2 *Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná,*
11 *Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

12 3 *Museu de Zoologia “Prof. Adão José Cardoso”, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de*
13 *Campinas, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil.*

14 4 Present address: *Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

15

16 Key words: *Dendropsophus weneri*, tadpole, *Dendropsophus microcephalus* group, Atlantic forest

17

18

19

20 Resumo

21 Girinos apresentam modo de vida muito diferente dos adultos, tanto no que diz respeito à maneira
22 como utilizam o meio quanto sobre a estruturação de suas assembléias. No entanto, o conhecimento
23 sobre girinos de anuros brasileiros ainda pequeno, dificultando ações de proteção relativas ao grupo,
24 bem como a compreensão de relações sistemáticas entre os anuros. Visando contribuir para o
25 conhecimento sobre girinos no Brasil, este estudo apresenta a descrição do girino de
26 *Dendropsophus weneri*, um Hylidae de pequeno porte pertencente ao grupo *D. microcephalus*,
27 endêmico da floresta Atlântica. Os girinos foram obtidos a partir de desovas de dois casais
28 coletados na Área de Proteção Ambiental de Guaratuba e foram descritos no estágio 25. Os dados
29 apresentados baseiam-se nos valores médios de 20 indivíduos e foram comparados com outros
30 girinos conhecidos do grupo *D. microcephalus*, a fim de evidenciar as similaridades morfológicas
31 dos integrantes do grupo.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43 Abstract

44 Tadpoles have a different life when compared with adults anurans, particularly with respect to
45 habitat use and structure of their assemblages. However, the knowledge on Brazilian tadpoles is
46 scarce, making difficult to protect threatened anurans, such as comprehension of anuran systematic
47 relationship. With intend to contribute to knowledge on Brazilian tadpoles; this study presents the
48 description of the tadpole of *Dendropsophus weneri*, a small hylid frog from Atlantic forest. The
49 tadpoles were obtained from eggs deposited by two couples captured in a protected area in southern
50 Brazil. Tadpoles was maintained in laboratory, but died in stage 25, before complete their
51 development. Thus we describe the tadpole based on 20 individuals, providing data about their
52 morphological characteristics, and comparing the tadpole of *D. weneri* with other nine tadpoles of
53 *Dendropsophus microcephalus* group, emphasizing their relationships based on morphology.

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65 Introdução

66 *Dendropsophus weneri* é um Hylidae de pequeno porte do grupo *D. microcephalus*
67 (Faivovich et al., 2005) com distribuição associada à floresta Atlântica dos estados de São Paulo,
68 Paraná e Santa Catarina (Frost, 2010). Aspectos de sua história natural, como eventos de predação
69 (Oliveira et al., 2010), vocalização (Lingnau et al., 2004), comportamento (Miranda et al., 2008) e
70 biologia reprodutiva (Pombal e Gordo, 2004; Miranda et al., 2008) podem ser encontrados na
71 literatura, porém seu girino permanece desconhecido.

72 Problemas na identificação de girinos frequentemente representam um obstáculo em
73 trabalhos com anuros e no desenvolvimento de programas de conservação (Rossa-Feres e Nomura,
74 2006). Além disso, similaridades morfológicas podem contribuir para elucidar relações sistemáticas
75 (e.g. D’Heursel and Haddad, 2007), tornando descrições de girinos uma ferramenta importante para
76 a conservação do grupo. Apesar do grupo *D. microcephalus* apresentar mais de trinta espécies
77 (Faivovich, 2005) poucos girinos foram descritos, implicando em dificuldades para a conservação
78 dos anuros (Rossa-Feres e Nomura, 2006).

79 A fim de contribuir para o conhecimento da biologia dos anfíbios da Mata Atlântica,
80 descrevemos o girino de *D. weneri* e comparamos com outros girinos pertencentes ao grupo *D.*
81 *microcephalus*.

82

83 Material e Métodos

84 Em fevereiro de 2010 foram coletados 52 ovos de *D. weneri* obtidos a partir de desovas de
85 dois casais capturados em uma poça temporária na Área de Proteção Ambiental (APA) de
86 Guaratuba (25°47’41.97’’S, 48°54’43.62’’W, 200 m de altitude), município de São José dos
87 Pinhais, Paraná. Os embriões foram levados ao laboratório a fim de que completassem seu
88 desenvolvimento, mas morreram no estágio 25 (Gosner, 1960). Os exemplares foram então
89 preservados em formalina 7% e depositados na coleção do Museu de Zoologia “Professor Adão
90 José Cardoso”, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas,
91 estado de São Paulo (ZUEC 17012 a 17014). A descrição baseia-se na análise de 20 girinos fixados

92 no início do estágio 25 (Gosner, 1960) e dados morfométricos e a nomenclatura seguem Altig
93 (1970) e Altig e McDiamird (1999).

94

95 Resultados

96 O girino de *D. werner* tem corpo alongado e comprimido dorso-ventralmente em vista
97 lateral (Figura 1A) e apresenta forma ovalada em vista dorsal (Figura 1B), correspondendo a 33 %
98 de seu comprimento total. O focinho é levemente triangular em vista dorsal e arredondado em vista
99 lateral. O espiráculo é sinistro, curto e estreito, sem projeção, localizado no início do terço posterior
100 do corpo. A cauda corresponde a 69 % do comprimento total, é comprimida lateralmente por toda
101 sua extensão e apresenta um flagelo terminal. A nadadeira dorsal tem margem convexa e é mais
102 ampla do que a ventral, que também tem margem convexa; ambas apresentando maior área no
103 primeiro terço da cauda. O intestino é curto e termina à direita, ventralmente na base da cauda. As
104 narinas são bem definidas e localizadas no rostro, dorso-lateralmente à boca. As distâncias
105 internasal e interorbital são similares. A boca é ventral, dirigida para baixo e para frente. O disco
106 oral é modificado em um tubo curto, correspondendo a 36 % da largura do corpo e não apresenta
107 papilas ou dentículos (Figura 1D; tabela 2).

108 Os girinos são ligeiramente translúcidos com coloração levemente acastanhada,
109 principalmente no corpo e região anterior da cauda. O dorso apresenta pigmentação castanha mais
110 intensa na região interorbital formando um desenho e linhas compostas por pigmentos entre as
111 narinas e os olhos. A cauda apresenta uma linha marrom na porção média do músculo e pigmentos
112 distribuídos esparsamente. O ventre apresenta coloração bege translúcida com pequenas manchas
113 formando estrias difusas e pigmentos distribuídos mais ou menos de forma dispersa.

114

115 Discussão

116 De acordo com diversos trabalhos (Bokermann, 1963; Cruz e Dias, 1991; Pugliese et al.,
117 2000, 2001; Carvalho-e-Silva et al., 2003; Lynch, 2006; Rossa-Feres e Nomura, 2006 e o presente
118 estudo) é possível constatar que, de forma geral, os girinos do grupo *D. microcephalus* (*sensu*

119 Faivovich et al., 2005) apresentam características comuns como corpo em forma de violino, disco
120 oral reduzido e desprovido de papilas e denticulos córneos (Tabela 2), espiráculo em posição e
121 morfologia semelhante e cauda com flagelo terminal. Ainda de acordo com estes trabalhos, apesar
122 de não mencionado de forma explícita por Cruz e Dias (1991), Carvalho-e-Silva (2003) e Lynch
123 (2006) é provável que o disco oral constitua um aparelho modificado em tubo de sucção, mas que
124 pode apresentar comprimentos variados (Pugliese et al., 2001). Os girinos de *D. berthaltutzae*, *D.*
125 *microcephalus*, *D. decipiens*, *D. oliveirai*, *D. rubicundulus* e *D. wernerii* apresentam maior
126 proporção corporal (acima de 30 %) quando comparados com as demais espécies (*D. meridianus*,
127 *D. nanus*, *D. sanborni* e *D. studerae*).

128 Em todas as espécies e possível verificar a existência de uma linha pigmentada longitudinal
129 conspícua que parte da narina, passa pelo olho e se estende até a porção posterior do corpo,
130 podendo continuar na musculatura da cauda (Bokermann, 1963; Cruz e Dias, 1991; Pugliese et al.,
131 2000; 2001; Carvalho-e-Silva et al., 2003; Lynch, 2006; Rossa-Feres e Nomura, 2006). Essa linha
132 geralmente apresenta pigmentação escurecida, mas pode ser clara em alguns casos (Pugliese et al.,
133 2000). Também é possível notar a pigmentação concentrada na região frontal interorbital em vista
134 dorsal, exceto em *D. microcephalus* onde este padrão não aparece claramente (Lynch, 2006).

135 *Dendropsophus wernerii* apresenta região ventral com padrão de pigmentação semelhante a
136 *D. meridianus*, *D. nanus* e *D. sanborni* (Bokermann, 1963; Cruz e Dias, 1991; Rossa-Feres e
137 Nomura, 2006) com pequenas manchas em forma de estrias, enquanto que *D. rubicundulus* e *D.*
138 *studerae* apresentam ventre uniforme (Pugliese et al., 2001; Carvalho-e-Silva et al., 2003) ou
139 marmoreado (Pugliese et al., 2000).

140 Os girinos do grupo *D. microcephalus* apresentam diversas características morfológicas em
141 comum, o que pode representar a estreita relação de parentesco entre as espécies que o compõem.
142 No entanto, apesar desse grupo apresentar mais de trinta espécies (Faivovich et al., 2005), somente
143 nove espécies com distribuição abrangendo o Brasil tiveram seus girinos descritos, demonstrando a
144 necessidade de maiores esforços nos estudos envolvendo as formas larvais do grupo.

145 Agradecimentos

146 Agradecemos a Moacyr Grassmann e família, Manoela Woitovics Cardoso, ICMBio, IAP e CEEA-
147 UFPR; e à CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170 Literatura Citada

- 171 Altig, R. 1970. A key to the tadpoles of the continental United States and Canada. *Herpetologica* 26
172 (2): 180-207.
- 173 Altig, R., and McDiamird, R. W. 1999. Body plan. Development and morphology. In: McDiamird,
174 R. W. and Altig, R. (eds.) *Tadpoles: The biology of anuran larvae*, pp. 24-51. University of
175 Chicago Press, Chicago.
- 176 Bokermann, W. C. A. 1963. Girinos de anfíbios brasileiros I. (Amphibia: Salientia). *Anais da*
177 *Academia Brasileira de Ciências* 23 (2): 465-474.
- 178 Carvalho-e-Silva, S. P.; Carvalho-e-Silva, A. M. P. T.; and Izeckson, E. 2003. Nova espécie de
179 *Hyla* Laurenti do grupo de *H. microcephala* Cope (Amphibia, Anura, Hylidae) no nordeste do
180 Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 20 (3): 553-558.
- 181 Cruz, C. A. G., and Dias, A. G. 1991. Girinos do grupo "Microcephala" do Estado do Rio de
182 Janeiro (Amphibia, Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 7 (4):679-683.
- 183 D'Heursel, A.; Haddad, C. F. B. 2007. Anatomy of the oral cavity of Hylidae larvae from the
184 genera *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, and *Hypsiboas* (Amphibia, Anura): Description and
185 systematic implications. *Journal of Herpetology* 41 (3): 458-468.
- 186 Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P., Frost, D., Campbell, J., and Wheeler, W. 2005.
187 Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: Phylogenetic
188 analysis and taxonomic revision. *Bulletin of American Museum of Natural History* 294: 1-240.
- 189 Frost, D. R. 2010. *Amphibian Species of the World: an online reference* Version 5.4. Accessed in
190 December, 29th, 2010. American Museum of Natural History:
191 <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>
- 192 Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on
193 identification. *Herpetologica* 16: 183-190.

- 194 Lingnau, R., Guimarães, L. D., and Bastos, R. P. 2004. Vocalizações de *Hyla weneri* (Anura,
195 Hylidae) no sul do Brasil. *Phyllomedusa* 3: 115-120.
- 196 Lynch, J. D. 2006. The tadpoles of frogs and toads found in the lowlands of northern Colombia.
197 *Revista da Academia Colombiana de Ciências* 30 (116): 443-457.
- 198 Miranda, D. B., Garey, M. V., Monteiro-Filho, E. L. A., & Hartmann, M. T. 2008. Sinalização
199 visual e biologia reprodutiva de *Dendropsophus weneri* (Anura: Hylidae) em área de Mata
200 Atlântica no Estado do Paraná, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 48 (29): 335-343.
- 201 Oliveira, I. S.; Oliveira, A. K. C.; Cestari, M. M.; and Toledo, L. F. 2010. Predation on
202 *Dendropsophus weneri* (Anura: Hylidae) by a lycosid in the Atlantic forest, southern Brazil.
203 *Herpetology Notes* 3: 299-300.
- 204 Pombal Jr., J., and Gordo, M. 2004. Anfíbios anuros da Juréia. In: Marques, O. A. V. and Duleba,
205 W. (Eds.), *Estação Ecológica Juréia Itatins: Ambiente físico, flora e fauna*, pp. 243-256. Holos,
206 Ribeirão Preto.
- 207 Pugliese, A., Alves, A. C. R., and Carvalho-e-Silva, S. P. 2000. The tadpoles of *Hyla oliveirai* and
208 *Hyla decipiens* with notes on the *Hyla microcephala* group (Anura, Hylidae). *Alytes* 18 (1-2): 73-
209 80.
- 210 Pugliese, A., Alves, A. C. R., and Pombal Jr., J. P. 2001. The tadpole of *Hyla rubicundula* (Anura:
211 Hylidae). *Journal of Herpetology* 35 (4): 686-688.
- 212 Rossa-Feres, D. C, and Nomura, F. 2006. Characterization and taxonomic key for tadpoles
213 (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropica* 6 (1):
214 1-26.

Tabelas

Tabela 1: Medidas de 20 girinos de *Dendropsophus weneri* no estágio 25 (Gosner, 1960). Valores em milímetros (mm) e apresentados como Média \pm Desvio padrão (Mínimo – Máximo).

<i>Medidas</i>	<i>Média \pm Desvio padrão (Mínimo-Máximo)</i>
Comprimento total	5.62 \pm 0.45 (4.95 - 7.11)
Comprimento do corpo	1.84 \pm 0.17 (1.57 - 2.10)
Comprimento da cauda	3.87 \pm 0.40 (3.30 - 4.71)
Altura do músculo da cauda	0.46 \pm 0.07 (0.30 - 0.55)
Altura da cauda	0.92 \pm 0.14 (0.69 - 1.20)
Distância interorbital	0.66 \pm 0.09 (0.41 - 0.80)
Distância internasal	0.65 \pm 0.09 (0.40 - 0.79)
Altura da nadadeira dorsal	0.36 \pm 0.09 (0.21 - 0.62)
Altura da nadadeira ventral	0.20 \pm 0.06 (0.09 - 0.37)
Diâmetro do olho	0.33 \pm 0.05 (0.23 - 0.43)
Diâmetro da narina	0.13 \pm 0.04 (0.07 - 0.19)
Distância olho-focinho	0.86 \pm 0.09 (0.69 - 1.04)
Distância narina-focinho	0.31 \pm 0.09 (0.15 - 0.44)
Largura do corpo	1.23 \pm 0.12 (0.82 - 1.48)
Disco oral	0.44 \pm 0.05 (0.34 - 0.56)

Tabela 2: Espécies do grupo *Dendropsophus microcephalus* mostrando o estágio do desenvolvimento da descrição, a fórmula dental (FD), presença ou ausência de papilas no disco oral, proporção do corpo em relação ao comprimento total e referências. O símbolo “*” representa espécies cujas proporções foram inferidas a partir de ilustrações presentes no trabalho original. “†” A descrição de *D. sanborni* é atribuída a Bokermann (1963) porque existem dúvidas sobre a identificação do exemplar descrito originalmente como *D. nanus* (Pugliese et al., 2001; Rossa-Feres e Nomura, 2006).

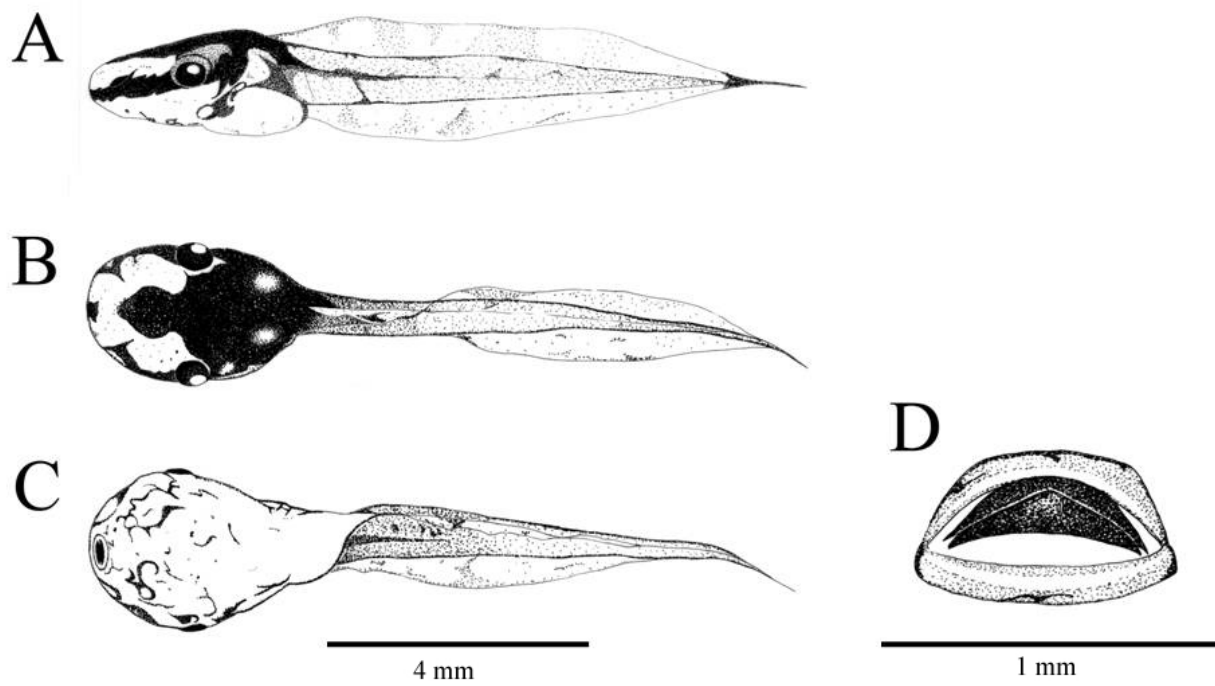
Espécie	Estágio	FD	Papilas	Corpo/Total (%)	Referência
<i>D. berthaltzae</i> *	38	0/0	presente	37	Bokermann, 1963
<i>D. decipiens</i>	37	0/0	presente	37	Pugliese et al., 2000
<i>D. meridianus</i>	33	0/0	ausente	27	Cruz e Dias, 1991
<i>D. microcephalus</i> *	36	0/0	ausente	31	Lynch, 2006
<i>D. nanus</i>	37	0/0	ausente	25	Rossa-Feres & Nomura, 2006
<i>D. oliveirai</i>	37	0/0	presente	36	Pugliese et al., 2000
<i>D. sanborni</i> *†	37	0/0	ausente	27	Bokermann 1963
<i>D. rubicundulus</i>	35	0/0	ausente	34	Pugliese et al., 2001
<i>D. studerae</i>	33	0/0	ausente	27	Carvalho-e-Silva et al., 2003
<i>D. werneri</i>	25	0/0	ausente	33	Presente estudo

Legendas de figuras:

Figura 1: Girino de *Dendropsophus weneri* em vista lateral (A), dorsal (B) e ventral (C); detalhes do disco oral e da boca evidenciando ausência de papilas e dentículos (D).

Figuras

Figura 1



Capítulo III

Análise cromossômica de quatro espécies sintópicas de *Dendropsophus* da floresta Atlântica, sul do Brasil

Este capítulo será submetido ao periódico Journal of Herpetology

Journal of Herpetology

Oliveira et al.

Chromosomal analysis of four syntopic species of *Dendropsophus* from Atlantic forest, southern
Brazil

Igor S. Oliveira^{1,2,4}; Adriele K. C. Oliveira^{1,2}; Rafael B. Noieto²; Luís Felipe Toledo³; Marta
Margarete Cestari^{1,2}

1 *Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná,
Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

2 *Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná,
Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

3 *Museu de Zoologia “Prof. Adão José Cardoso”, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de
Campinas, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil.*

4 Present address: *Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil.*

Key words: Chromosome, *Dendropsophus*, rDNA, FISH, Atlantic forest

22 Resumo

23 O gênero *Dendropsophus* é notavelmente diverso, composto atualmente por mais de 90 espécies.
24 Apresenta o número diplóide igual a 30 cromossomos como uma sinapomorfia presente em todos os
25 táxons do clado. No entanto, existe pouca informação citogenética disponível para várias espécies e
26 para diferentes populações. Neste trabalho apresentamos o cariótipo de *D. weneri* pela primeira
27 vez e fornecemos informações adicionais sobre populações de *D. elegans*, *D. microps* e *D. minutus*
28 da Mata Atlântica paranaense. Através do uso combinado de técnicas citogenéticas de coloração
29 convencionais e moleculares, foram identificados marcadores espécie-específicos relacionados com
30 padrão de bandas C, com a morfologia cromossômica e localização dos genes ribossomais 45S. A
31 técnica de FISH com sondas teloméricas não evidenciou nenhum indício de fusões cromossômicas
32 para as espécies estudadas. Os dados obtidos neste estudo são relevantes para abordagens
33 citotaxonômicas e evolutivas dos grupos e, frente aos altos níveis de biodiversidade e endemismo
34 da floresta Atlântica, aliados às ameaças que o bioma enfrenta, a ampliação do conhecimento das
35 espécies que a habitam é fundamental que visem sua conservação.

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45 Abstract

46 The genus *Dendropsophus* is highly diverse and are composed of over 90 species. The diploid
47 number of 30 chromosomes represents a synapomorphy for the group. However, information
48 available about cytogenetics of anuran species and population are scarce. Herein we present the
49 karyotype of *D. weneri* for the first time and provide additional information for populations of *D.*
50 *elegans*, *D. microps* and *D. minutus* from Atlantic forest in southern Brazil. Combining cytogenetic
51 coloration techniques (conventional and molecular), we identified some specific markers, related
52 with C banding pattern, chromosomal morphology, and location of ribosomal genes 45S. FISH
53 technique with telomeric probes showed no evidence of chromosome fusions for analyzed species.
54 Data available in this study are relevant for citotaxonomic and evolution approaches for the group,
55 and, considering the high biodiversity levels and endemism of Atlantic forest, and threats for this
56 biome, the enlargement of anuran species knowledge, including citogenetics, is essential for their
57 conservation.

58 Introdução

59 O gênero *Dendropsophus* Fitzinger, 1943 pertence à subfamília Hyalinae e possui
60 representantes distribuídos por quase toda a região neotropical com mais de 90 espécies,
61 organizadas atualmente em nove grupos filogenéticos distintos (Faivovich et al., 2005; Frost, 2010).
62 As espécies *Dendropsophus weneri*, *D. elegans*, *D. microps* e *D. minutus* pertencem
63 respectivamente aos grupos de *D. microcephalus*, *D. leucophyllatus*, *D. parviceps* e *D. minutus*
64 (Faivovich et al., 2005) e, apesar de apresentarem padrões de distribuição muito distintos, podem
65 ocorrer em simpatria, principalmente em áreas da porção oriental da floresta Atlântica brasileira
66 (Frost, 2010; IUCN, 2010).

67 Uma característica conspícua comum aos integrantes desse gênero é o número
68 cromossômico diplóide igual a 30 (Gruber et al., 2005; Faivovich et al., 2005). No entanto, apesar
69 desse caráter conservado, existem registros de variações interespecíficas relacionadas a outros
70 aspectos do cariótipo de *Dendropsophus* spp., como diferenças no Número Fundamental (NF),
71 presença de cromossomos B ou polimorfismos (Medeiros et al., 2003; Gruber et al., 2005;
72 Medeiros et al., 2006).

73 Recentemente os anfíbios sofreram mudanças significativas em sua classificação (Faivovich
74 et al., 2005; Frost et al., 2006; Grant et al., 2006) e, apesar de estudos citogenéticos e moleculares
75 constituírem ferramentas úteis para a sistemática moderna (Medeiros et al., 2006; Kasahara, 2009) é
76 de conhecimento comum que apenas uma fração dos anuros brasileiros foi estudada sob o aspecto
77 citotaxonômico.

78 O estudo citogenético de vertebrados favorece a compreensão de mecanismos evolutivos
79 (Kasahara, 2009; Pereira, et al., 2009) e, embora seja crescente o número de trabalhos citogenéticos
80 com anfíbios, de modo geral o conhecimento sobre a organização cromossômica de anuros no
81 Brasil se limita a descrições da morfologia e número cromossômico, não contemplando
82 informações obtidas a partir de técnicas mais resolutivas (Lourenço et al., 2000; Amaro-Ghilardi et
83 al., 2008; Nunes e Fagundes, 2008; Pereira, et al., 2009).

84 Nesse contexto, insere-se ainda a importância de estudos com variedades populacionais pelo
85 potencial de fornecer caracterizações mais completas ou traçar a evolução de um ou vários
86 cromossomos (Campos et al., 2009; Kasahara, 2009).

87 Portanto, visando contribuir para o conhecimento da citotaxonomia de anuros brasileiros, foi
88 desenvolvido o presente estudo, onde foram analisados os cariótipos de *D. weneri*, *D. elegans*, *D.*
89 *microps* e *D. minutus* (Figura 1) procedentes de uma localidade da floresta Atlântica do estado do
90 Paraná, fazendo uso de técnicas citogenéticas convencionais e moleculares. O cariótipo de *D.*
91 *weneri* é apresentado pela primeira vez e informações adicionais foram obtidas para as demais
92 espécies consideradas neste estudo.

93

94 Material e Métodos

95 Os exemplares analisados foram coletados no município de São José dos Pinhais
96 (25°47'41.97'' S, 48°54'43.62'' W, cerca de 200 m sobre o nível do mar) entre os meses de outubro
97 de 2009 e abril de 2010, em uma área de Floresta Ombrófila Densa Submontana, na Área de
98 Proteção Ambiental de Guaratuba (Figura 2), sob licença concedida pelo Instituto Chico Mendes de
99 Conservação da Biodiversidade (ICMBio, licença nº 16591-1 e 2), Instituto Ambiental do Paraná
100 (IAP, licença nº 114/08) e Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências
101 Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEEAA-UFPR, licença nº 411).

102 Foram coletados e analisados seis indivíduos de *Dendropsophus weneri* (três fêmeas e três
103 machos), oito indivíduos de *D. elegans* (três fêmeas e cinco machos), cinco de *D. microps* (três
104 fêmeas e dois machos) e nove de *D. minutus* (quatro fêmeas e cinco machos). Os espécimes foram
105 depositados na coleção do Museu de Zoologia “Professor Adão José Cardoso” (ZUEC 16983-
106 17011) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

107 Os cromossomos mitóticos foram nominados e classificados por inspeção visual, segundo
108 Levan et al. (1964) e foram obtidos por método direto a partir da medula óssea femoral e fígado, de
109 acordo com Badissera et al. (1993), com adaptações. Foi utilizada a coloração convencional com

110 solução de Giemsa 5 % em tampão fosfato (pH 6,8), como também bandamento C e impregnação
111 com nitrato de prata, segundo os protocolos de Sumner (1972) e Howell e Black (1980),
112 respectivamente. Também foi efetuada dupla coloração com fluorocromos diamidino-2-
113 phenylindole (DAPI) e Cromomicina A₃ (CMA₃) a fim de evidenciar regiões heterocromáticas ricas
114 em AT e GC respectivamente (Schweizer, 1980). Foram utilizadas ainda sondas ribossomais 18S
115 (Hatanaka e Galetti, 2004), marcadas com biotina e evidenciadas por streptavidina FITC conjugada
116 e contracoloração DAPI; e sondas teloméricas (TTAGGG)_n (Ijdo et al., 1991), marcadas com
117 digoxigenina e detectadas com anti-digoxigenina rodamina e contracoloração DAPI conjugadas.
118 Ambas as sondas foram amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e ligadas aos
119 respectivos sítios através de hibridização fluorescente in situ (FISH) (Pinkel et al., 1986).

120 As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axiophot e Olympus
121 BX 41 e as imagens foram capturadas com software Case Data Manager Expo 4.0 (Applied Spectral
122 Imaging) e coolSNAP-Pro, software (Media Cybernetic).

123

124 Resultados

125 Coloração convencional

126 Todas as espécies analisadas apresentaram número cromossômico diplóide igual a 30, mas
127 com a morfologia cromossômica bem distinta entre elas (Figura 3). *Dendropsophus werneri*
128 apresenta oito pares de metacêntricos (m) (3, 8, 9, 10, 11, 12, 14 e 15), cinco de cromossomos
129 submetacêntricos (sm) (1, 2, 4, 5 e 6) e dois de subtlocêntricos (st) (7, 13) com NF igual a 56. Em
130 algumas metáfases foi possível visualizar constrições secundárias no par 13, geralmente
131 homomórficas (Figura 3) e que corroboram com as RONS. Em *D. elegans* foram observados oito
132 pares de cromossomos m (3, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 13), três de sm (1, 2 e 4) e quatro de st (5, 11, 14 e
133 15), com NF = 52. Quanto a *D. microps*, foram encontrados dois padrões cariotípicos distintos
134 (citótipos); um com cinco pares de m (3, 11, 12, 13 e 14), seis de sm (1, 2, 4, 8, 9 e 10), quatro de st
135 (5, 6, 7 e 15) e NF = 54; e outro com cinco pares de m (3, 11, 12, 13 e 14), sete de sm (1, 2, 4, 5, 8,
136 9 e 10), três st (6, 7 e 15) e NF = 52. Por fim, com relação a *D. minutus* observou-se sete pares de

137 cromossomos m (3, 8, 10, 12, 13, 14 e 15), oito sm (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 e 11) e NF = 60. Ainda com
138 relação a esta espécie, foram observadas constrições secundárias em alguns cromossomos do par 13
139 frequentemente heteromórficas, mas confirmando as RONS (Figura 3).

140

141 Bandamento C e CMA₃/DAPI

142 O bandamento C mostrou um padrão bastante conservado para *D. werneri*, *D. elegans* e *D.*
143 *minutus*, com bandas na região pericentromérica dos cromossomos. Ainda nessas espécies, a
144 heterocromatina associada às Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONS) também foram bandas
145 C⁺ (positivas) em algumas metáfases analisadas. Somente *D. microps* não apresentou nenhum
146 padrão específico.

147 Em *D. werneri*, *D. elegans* e *D. minutus*, a dupla coloração CMA₃/DAPI revelou o mesmo
148 padrão obtido na banda C, revelando que as regiões heterocromáticas são ricas em GC, embora, em
149 alguns cromossomos, a marcação seja bastante sutil e o sinal fluorecente perceptível seja fraco
150 (Figura 5). Em *D. werneri* e *D. elegans* também foram observadas marcações correspondentes às
151 RONS, mostrando que essas regiões são igualmente ricas em GC. Para a espécie *D. microps* não
152 foram detectadas regiões ricas em GC.

153

154 Localização de RONS e rDNA

155 Em *D. werneri* as Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONS) foram observadas na região
156 telomérica do braço longo nos homólogos do par 13 st. De forma semelhante, em *D. elegans* as
157 marcações correspondentes às RONS foram observadas na mesma região do mesmo par
158 cromossômica (13 st) que *D. wrneri*. Para *D. microps* as RONS foram detectadas nos telômeros do
159 braço curto do par 10 sm e em *D. minutus* também foram detectadas na região telomérica, mas do
160 braço longo do par 13 sm (Figura 6.1). As constrições secundárias observadas corresponderam às
161 RONS e às regiões de rDNA em todos os casos para todas as espécies analisadas (Figura 6.2).

162

163 Localização das regiões teloméricas

164 As sequências (TTAGGG)_n foram detectadas nas regiões teloméricas dos cromossomos das
165 quatro espécies estudadas, não sendo revelado nenhum sítio intersticial (Figura 7).

166

167 Discussão

168 O número diplóide (2n) igual a 30 foi constante em todas os indivíduos de todas as espécies
169 estudadas, incluindo *D. weneri*, reforçando este carácter como uma sinapomorfia para o gênero
170 (Faivovich et al., 2005). No entanto, segundo Faivovich et al. (2005), o número diplóide igual a 30
171 ainda não pode ser considerado como uma sinapomorfia para o gênero devido ao desconhecimento
172 do número cromossômico diplóide de *Xenohyla*, gênero irmão de *Dendropsophus*. Isto evidencia a
173 importância da citogenética para a sistemática de Anura. Apesar deste caráter em comum,
174 *Dendropsophus weneri*, *D. elegans*, *D. microps* e *D. minutus* apresentaram cariótipos bastante
175 distintos em sua morfologia geral, inclusive com Número Fundamental (NF) variável, evidenciando
176 a diversidade cariotípica característica do gênero (Gruber et al., 2005).

177 Mesmo se considerarmos somente espécies de um mesmo grupo, como por exemplo o grupo
178 *D. microcephalus*, que possui informações cariotípicas a respeito de *D. berthaltzae*, *D. cruzi*, *D.*
179 *elianeae*, *D. nanus*, *D. rubicundulus*, *D. sanborni* (Medeiros et al., 2003; Gruber et al., 2005) e *D.*
180 *weneri* (presente estudo) não é possível estabelecer um padrão para o cariótipo, tanto em morfologia
181 como no NF ou par cromossômico portador das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).
182 Apesar das características comuns perceptíveis entre essas espécies, como o primeiro par
183 submetacêntrico (sm) e a presença de um par de metacêntricos (m) grandes (geralmente na posição
184 3), o número de pares subtelo-cêntricos (st) varia consideravelmente. Em parte isso pode ser
185 explicado por diferenças no sistema de ordenação dos cromossomos, uma vez que as diferenças
186 entre eles é sutil, principalmente com relação ao tamanho dos mesmos (Gruber et al., 2005).

187 O cariótipo de *D. weneri* é descrito pela primeira vez e apresenta o maior NF (56) do grupo
188 *D. microcephalus*, devido ao número reduzido de cromossomos st. De acordo com Bogart (1973) a
189 redução no número de cromossomos st em cariótipos de anuros é uma condição derivada, devido a

190 rearranjos cromossômicos como inversões pericêntricas. Neste caso, considerando-se somente esta
191 característica cromossômica, *D. weneri* poderia ocupar uma posição derivada dentro do grupo ao
192 qual pertence.

193 Em comparação com o trabalho de Gruber et al. (2005), *D. elegans*, *D. microps* e *D. minutus*
194 apresentam algumas distinções. Em *D. elegans* o padrão encontrado nos exemplares de São José
195 dos Pinhais (PR) difere consideravelmente dos de Ubatuba (SP), sobretudo com relação ao número
196 de m, sm e st. No entanto, o cariótipo de ambas as populações é muito semelhante e as diferenças
197 observadas se devem provavelmente a divergências na ordenação pelas diferenças sutis no tamanho
198 dos cromossomos (Gruber et al., 2005). Para *D. microps* também foram encontrados dois cariótipos
199 diferentes, com variações inclusive no NF (52 e 54), dada a presença de um par st adicional em um
200 espécime. Essa mesma diferença foi ressaltada em exemplares do interior de São Paulo e Santa
201 Catarina, o que sugere a existência de variação geográfica intraespecífica. E, a respeito de *D.*
202 *minutus*, o NF = 60 verificado em exemplares de São José dos Pinhais corresponde ao registrado
203 para populações do Estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul (Medeiros, 2003; Gruber et al.,
204 2005), mas novamente há diferenças no número de m e sm e a existência de variação geográfica
205 nesta espécie também é provável. Medeiros et al. (2003) ressaltam que variações geográficas no
206 cariótipo podem indicar inclusive diferenças no nível específico e que a citogenética, juntamente
207 com outras ferramentas, pode auxiliar na melhor definição do status taxonômico das espécies.

208 Apesar dos anuros de modo geral serem considerados um grupo cariológicamente
209 conservado (Nunes e Fagundes, 2008), os resultados obtidos sugerem que *Dendropsophus* spp.
210 constitui um gênero marcadamente diverso com relação à morfologia cromossômica.

211 Com relação à localização das regiões ricas em heterocromatina constitutiva, o bandamento
212 C revelou um padrão que pode ser considerado usual (e.g. Ananias et al., 2004; Gruber et al., 2005;
213 Amaro-Ghilardi et al., 2008; Campos et al., 2009), com marcações principalmente na região
214 pericentromérica de todos os cromossomos de *D. weneri*, *D. elegans* e *D. minutus*. Ainda para
215 estas espécies, a dupla coloração CMA₃/DAPI observada neste trabalho mostrou que estas bandas

216 heterocromáticas são ricas em GC, o que também parece ser recorrente (e.g. Ananias et al., 2007;
217 Campos et al., 2008; Kasahara, 2009). No entanto, para *D. microps* o bandamento C não evidenciou
218 bandas heterocromáticas e a dupla coloração não mostrou marcações GC, diferentemente do
219 observado por Gruber et al. (2005) para população de outras localidades. Segundo Kasahara (2009)
220 a heterocromatina ainda é pouco compreendida e pode variar até mesmo dentro de uma população,
221 podendo constituir uma diferenciação para a população de São José dos Pinhais. Para anuros o
222 padrão de localização da heterocromatina parece variar pouco e sua detecção revela blocos
223 geralmente na região pericentroméricas dos cromossomos (e.g. Medeiros et al., 2003; Gruber et al.,
224 2005). Atualmente sabe-se que a heterocromatina pode ter papéis variados em diferentes
225 organismos (Grewal e Jia, 2007) e estudos envolvendo este caráter em anuros devem ser
226 incentivados.

227 Com relação às Ag-RONs, a localização dos cistrons é extremamente variável entre os
228 anuros, inclusive frequentemente com casos de heteromorfismos (Amaro-Ghilardi et al., 2008). As
229 espécies consideradas neste estudo apresentaram marcações de RONs bastante diversas quando
230 comparadas entre si, mas sempre em cromossomos homomórficos, variando apenas na intensidade
231 do sinal. As sondas de rDNA revelaram o mesmo padrão observado nas Ag-RONs em todos os
232 casos. Aparentemente, a localização das RONs nas espécies do grupo *D. microcephalus* é
233 comumente variável (Medeiros et al., 2003; Gruber et al., 2005), indicando possíveis arranjos
234 cromossômicos dos cistrons da RON, como translocações por exemplo, durante o curso da evolução
235 (Raber et al., 2004; Carvalho et al., 2009).

236 Para *D. microps* e *D. minutus* as marcações das RONs corroboraram com o descrito por
237 Gruber et al. (2005). Entretanto a RON de *D. elegans*, localizada nos telômeros do par 13 st, difere
238 do descrito por Gruber et al. (2005) para espécimes de Ubatuba (par 10), indicando variação
239 geográfica. No entanto, Gruber et al. (2005) observaram uma marcação diferencial telomérica
240 heterocromática no par 14 st de algumas metáfases dessa espécie, podendo representar um sítio
241 adicional de RON. Outra possibilidade é a de que a heterocromatina apresente associação com

242 RONS, uma vez que há casos registrados desse padrão (Amaro-Ghilardi, 2008; Carvalho et al.,
243 2009). Marcações com sondas rDNA específicas tem sido utilizadas como acessórias para
244 evidenciar as RONS (e.g. Lourenço et al., 2000; Campos et al., 2009; Carvalho et al., 2009) e
245 podem revelar RONS não marcadas por impregnação pelo nitrato de prata por não estarem ativas na
246 intérfase que precederam as metáfases analisadas. No caso de *D. elegans* o emprego esta técnica
247 pode auxiliar na definição do padrão de marcação de RON dessa espécie.

248 Com relação à marcação por sondas teloméricas (TTAGGG)_n, o padrão observado para
249 todas as espécies deste estudo foi o mesmo, onde o padrão revelado foi exclusivamente telomérico,
250 como observado para espécies relacionadas de anuros com características primariamente
251 conservadas (Amaro-Ghilardi et al., 2008). Apesar de sítios teloméricos intersticiais constituírem
252 uma evidência de fusões cromossômicas durante a diferenciação cromossômica dos cariótipos
253 (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1997; Silva e Yonenaga-Yassuda, 1998 a e b; Amaro-Ghilardi et al.,
254 2008), nem sempre são evidenciados, o que tem sido atribuído à ausência desse tipo de rearranjo ou
255 à perda subsequente dessas sequencias (Kasahara, 2009).

256 Neste estudo o emprego de técnicas diferenciadas de coloração, associadas às práticas
257 convencionais, produziram resultados que reforçaram a diversidade cariotípica do gênero
258 *Dendropsophus* através da observação de diferenças no NF e na morfologia cromossômica entre as
259 espécies, bem como ausência de bandas C para a população de *D. microps* estudada, além de
260 diferenças na localização das RONS. Gruber et al. (2005) afirmam que o gênero pode ter sofrido
261 diversas inversões pericêntricas que tornaram sua morfologia cromossômica extremamente diversa,
262 explicando em parte os variados padrões observados para o grupo até o momento. Contudo, os
263 rearranjos cromossômicos que geraram essa diversidade ainda são pouco compreendidos e pouco
264 evidentes, denotando a importância da continuidade de estudos citogenéticos com diferentes
265 espécies e populações de *Dendropsophus* spp..

266

267

268 Agradecimentos

269 Agradecemos à família Grassmann pela permissão para trabalhar em sua propriedade; ao ICMBio,
270 IAP e CEEA-UFPR, pela concessão das licenças; ao Roberto Artoni, Marcelo Vicari, Michele
271 Orane, Luiz Fernando Kraft, Rafael Balen e Giselle Perazzo por toda a ajuda; e à CAPES e
272 FAPESP pelo apoio financeiro.

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297 Literatura Citada

- 298 Amaro-Ghilardi, R. C., Silva, M. J. J., Rodrigues M. T., and Yonenaga-Yassuda, Y. 2008.
299 Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of
300 telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica* 134:
301 159-168.
- 302 Ananias, F., Bombeiro, A. L., Silva, C. D. B., Silva, A. P. Z., Haddad, C. F. B., and Kasahara, S.
303 2007. Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Anura: Leiuperidae) and
304 karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implication. *Acta Zoologica Sinica*
305 53 (2): 285-293.
- 306 Ananias, F., Garcia, P. C. A., and Recco-Pimentel, S. M. 2004. Conserved karyotypes in the *Hyla*
307 *pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 140: 42-48.
- 308 Badissera Junior, F. A., Oliveira, P. S. L., and Kasahara, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian
309 *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case of supernumerary chromosome. *Revista*
310 *Brasileira de Genética* 16 (2): 335-345.
- 311 Bogart, J. 1973. Evolution of anuran karyotypes. In: J. Vial (ed.), *Evolutionary Biology of Anurans*,
312 pp. 337-349. University of Missouri Press, Columbia.
- 313 Campos, J. R. C., Ananias, F., Brasileiro, C., Yamamoto, M., Haddad, C. F. B., and Kasahara, S.
314 2009. Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae),
315 with phylogenetic considerations. *Hereditas* 146: 104-111.
- 316 Carvalho, K. A., Garcia, P. C. A., and Recco-Pimentel, S. M. 2009. NOR dispersion, telomeric
317 sequence detection in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the
318 *Aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae). *Cytogenetic and Genome Research* 126: 359-
319 367.

- 320 Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., and Wheeler, W. C.
321 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic
322 analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1-294.
- 323 Frost, D.R. 2010. Amphibian Speceis of the World: an online reference Version 5.4. Accessed in
324 December, 13th, 2010. American Museum of Natural History:
325 <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>
- 326 Frost, D., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F. B., Sá, R. O., Channing, A.,
327 Wilkinson, M., Donnellan, S. C., Raxworthy, C. J., Campbell, J. A., Blotto, B. L., Moler, P.,
328 Drewes, R. C., Nussbaum, R. A., Lynch, J. D., Green, D. M., and Wheeler, W. C. 2006. The
329 Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297: 1-371.
- 330 Grant, T., Frost, D. R., Caldwell, J. P., Gagliardo, R., Haddad, C. F. B., Kok, P. J. R., Means, B. D.,
331 Noonan, B. P., Schargel, W. J. D., and Wheeler, W. C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-
332 poison frogs and their relatives (Anura: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American*
333 *Museum of Natural History* 299: 1-370.
- 334 Grewal, S. I. S., Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* 8: 35-46.
- 335 Gruber, S. L., Haddad, C. F. B., and Kasahara, S. 2005. Evaluating the karyotypic diversity in
336 species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with 2n=30 chromosomes based on the analysis of ten species.
337 *Folia Biologica* 51 (3): 68-75.
- 338 Hatanaka, T., and Galetti, P. M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish
339 *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122 (3): 239-
340 244.
- 341 Howell, W. M., and Black, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions
342 with a protective colloidal developer. *Experientia* 36 (8): 1014-1015.
- 343 Ijdo, J. W., Wells, R. A., Baldini, A., and Reeders, S. T. 1991. Improved telomere detection using a
344 telomere repeat probe (TTAGGG) generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19 (17): 4780.

- 345 IUCN 2010. The IUCN Red List of Threatened Species. Accessed in December 13th, 2010.
346 International Union for Conservation of Nature: <http://www.iucnredlist.org>
- 347 Kasahara, S. 2009. Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Sociedade Brasileira de
348 Genética, Ribeirão Preto, Brazil.
- 349 Levan, A., Fredga, K., and Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on
350 chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- 351 Lourenço, L. B., Garcia, P. C. A., and Recco-Pimentel, S. M. 2000. Cytogenetics of two species of
352 *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. *Hereditas* 133: 201-209.
- 353 Medeiros, L. R., Rossa-Feres, D. C, and Recco-Pimentel, S. M. 2003. Chromosomal differentiation
354 of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H.*
355 *nana* . *Journal of Heredity* 94 (2): 149-154.
- 356 Medeiros, L. R., Rossa-Feres, D. C., Jim, J., and Recco-Pimentel, S. M. 2006. B-chromosomes in
357 two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). *Genetics and Molecular*
358 *Biology* 29 (2): 257-262.
- 359 Nunes, R. R. A., and Fagundes, V. 2008. Patterns of ribosomal DNA distribution in Hylid frogs
360 from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species groups. *Genetics and Molecular Biology* 31
361 (4): 982-987.
- 362 Pereira, R. R., Bastos, R. P., Cruz, A. D., Oliveira, H. H. P., Nunes, H. F., Villela, R. F., Silva, D.
363 M., and Ayres, F. M. 2009. Estudo citogenético de 23 espécies de anfíbios anuros do Cerrado do
364 Estado de Goiás, Brasil. In. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Sociedade Brasileira
365 de Genética. Águas de Lindóia, Brasil.
- 366 Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-
367 sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Science of the*
368 *United States of America* 83 (9): 2934-2938.

- 369 Raber, S. C., Carvalho, K. A., Garcia, P. C. A., Vinciprova, G., and Recco-Pimentel, S. M. 2004.
370 Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae).
371 *Phyllomedusa* 3 (1): 43-49.
- 372 Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatin
373 regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes . *Cytogenetics and Cell Genetics* 27 (2-3): 190-
374 193.
- 375 Silva, M. J. J., and Yonenaga-Yassuda, Y. 1997. New karyotypes of two related species of
376 *Oligoryzomys* genus (Cricetidae, Rodentia) involving centric fusion with loss of NORs and
377 distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences. *Hereditas* 127: 217-229.
- 378 Silva, M. J. J., and Yonenaga-Yassuda, Y. 1998(a). Heterogeneity and meiotic behaviour of B and
379 sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences by fluorescence in
380 situ hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome*
381 *Research* 6: 455-562.
- 382 Silva, M. J. J., and Yonenaga-Yassuda, Y. 1998(b). Karyotype and chromosomal polymorphism of
383 an undescribed Akodon from central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome
384 number in rodents. *Cytogenetics and Cell Genetics* 81: 46-50.
- 385 Sumner, A. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.
386 *Experimental Cell Research* 75: 304-306.

Tabelas

Tabela 1: Dados morfológicos cromossômicos (m = metacêntricos, sm = submetacêntricos, st = subtelocêntricos); Número Fundamental (NF); cromossomos portadores das RONS (AgRONS); cromossomos portadores dos rDNA, revelados por sondas 18S após FISH, mostrando a variedade nos cariótipos de *Dendropsophus* spp.. “Ψ” Dados de Medeiros et al. (2003); “†” Gruber et al. (2005) e “*” presente estudo; “-” informação não disponível.

Espécie	m	sm	st	NF	AgRONS	rDNA
<i>D. berthaltutzae</i> †	8, 9, 10, 12, 13, 14	1, 2, 3, 4, 7	5, 6, 11, 15	52	15	-
<i>D. cruzi</i> †	3, 8, 9, 10, 12, 13, 14	1, 2, 4, 6, 7	5, 11, 15	54	14	-
<i>D. elegans</i> †	3, 8, 9, 10, 13	1, 2, 4, 6, 7, 12	5, 11, 14, 15	52	10, 14	-
<i>D. elegans</i> *	3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13	1, 2, 4	5, 11, 14, 15	54	13	13
<i>D. elianae</i> †	3, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15	1, 2, 4, 7	5, 6, 11	54	11	-
<i>D. microps</i> †1	3, 8, 9, 11, 12, 13, 14	1, 2, 4, 10	5, 6, 7, 15	52	10	-
<i>D. microps</i> †2	3, 8, 9, 11, 12, 13, 14	1, 2, 4, 10	5, 6, 7, 15	52	10	-
<i>D. microps</i> *1	3, 11, 12, 13, 14	1, 2, 4, 8, 9, 10	5, 6, 7, 15	54	10	10
<i>D. microps</i> *2	3, 11, 12, 13, 14	1, 2, 4, 5, 8, 9, 10	6, 7, 15	52	10	10
<i>D. minutus</i> †	3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	1, 2, 4, 5, 6, 7	ausente	60	13	-
<i>D. minutus</i> *	3, 8, 10, 12, 13, 14, 15	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11	ausente	60	13	13
<i>D. nahdereri</i> †	3, 8, 9, 10, 12, 13, 14	1, 2, 4	5, 6, 7, 11, 15	50	1	-
<i>D. nanus</i> †	3, 8, 9, 10, 12, 13	1, 2, 4, 6, 7	5, 11, 14, 15	52	1, 13	-
<i>D. nanus</i> Ψ	3, 8, 9, 10, 11, 13	1, 2, 4, 5, 7	6, 12, 14, 15	52	1, 5, 12, 13, 14	6, 13
<i>D. rubicundulus</i> †	3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	1, 2, 4, 7	5, 6, 15	54	7	-
<i>D. sanborni</i> †	3, 8, 9, 10, 12, 13	1, 2, 4, 7	5, 6, 11, 14, 15	50	14	-
<i>D. sanborni</i> Ψ	2, 8, 9, 10, 11, 14	1, 3, 4, 6	5, 7, 12, 13, 15	50	12	12
<i>D. weneri</i> *	3, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15	1, 2, 4, 5, 6	7, 13	56	13	13

Legendas de figuras

Figura 1: indivíduos das espécies estudadas *Dendropsophus weneri* (A); *D. elegans* (B); *D. microps* (C); *D. minutus* (D) registrados em Castelhanos.

Figura 2: localização da área de estudos na colônia de Castelhanos na Área de Proteção Ambiental de Guaratuba, São José dos Pinhais, Paraná.

Figura 3: aspecto geral do cariótipo de *D. weneri* (A); *D. elegans* (B); *D. microps* (C e D) e *D. minutus* (E) revelados por coloração convencional. Constrições secundárias evidentes nos cromossomos 13 de A e 15 de E, correspondentes às marcações das RONS. A barra equivale a 10 μm .

Figura 4: Bandamento C mostrando regiões ricas em heterocromatina constitutiva concentradas na região pericentromérica dos cromossomos de *D. weneri* (A); *D. elegans* (B) e *D. minutus* (C). Barra equivalente a 10 μm .

Figura 5: Dupla coloração CMA₃/DAPI mostrando regiões ricas em GC, coincidentes com bandas C positivas, para *D. weneri* (A), *D. elegans* (B) e *D. minutus* (D). A seta em B mostra região correspondente à RON. Para *D. microps* (C) nenhuma região rica em GC foi evidenciada. Barra equivalente a 10 μm .

Figura 6: (6.1) Ag-RONs positivas mostrando pares cromossômicos portadores das RONS; par 13 st de *D. weneri* (A), par 13 st de *D. elegans* (B), par 10 sm de *D. microps* (C) e par 13 m de *D. minutus* (D); (6.2) localização das regiões de rDNA (setas) reveladas por sonda 18S após FISH para *D. weneri* (A), *D. elegans* (B), *D. microps* (C) e *D. minutus* (D), todas correspondentes às RONS. Barra equivalente a 10 μm .

Figura 7: Localização das sequências teloméricas para *D. weneri* (A), *D. elegans* (B), *D. microps* (C) e *D. minutus* (D), evidenciando marcações exclusivamente nos telômeros, reveladas por sondas (TTAGGG)_n após FISH. Barra equivalente a 10 μm .

Figuras

Figura 1

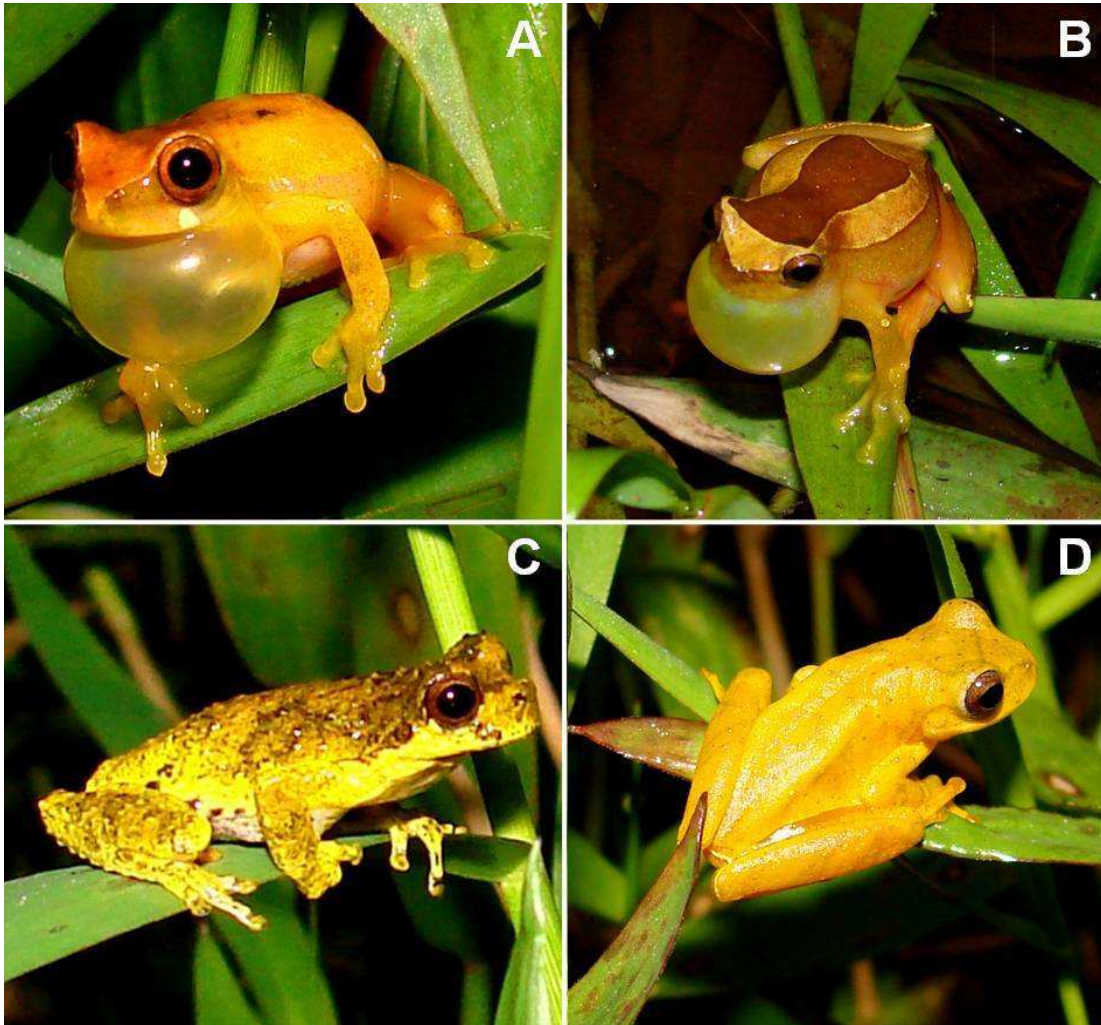


Figura 2

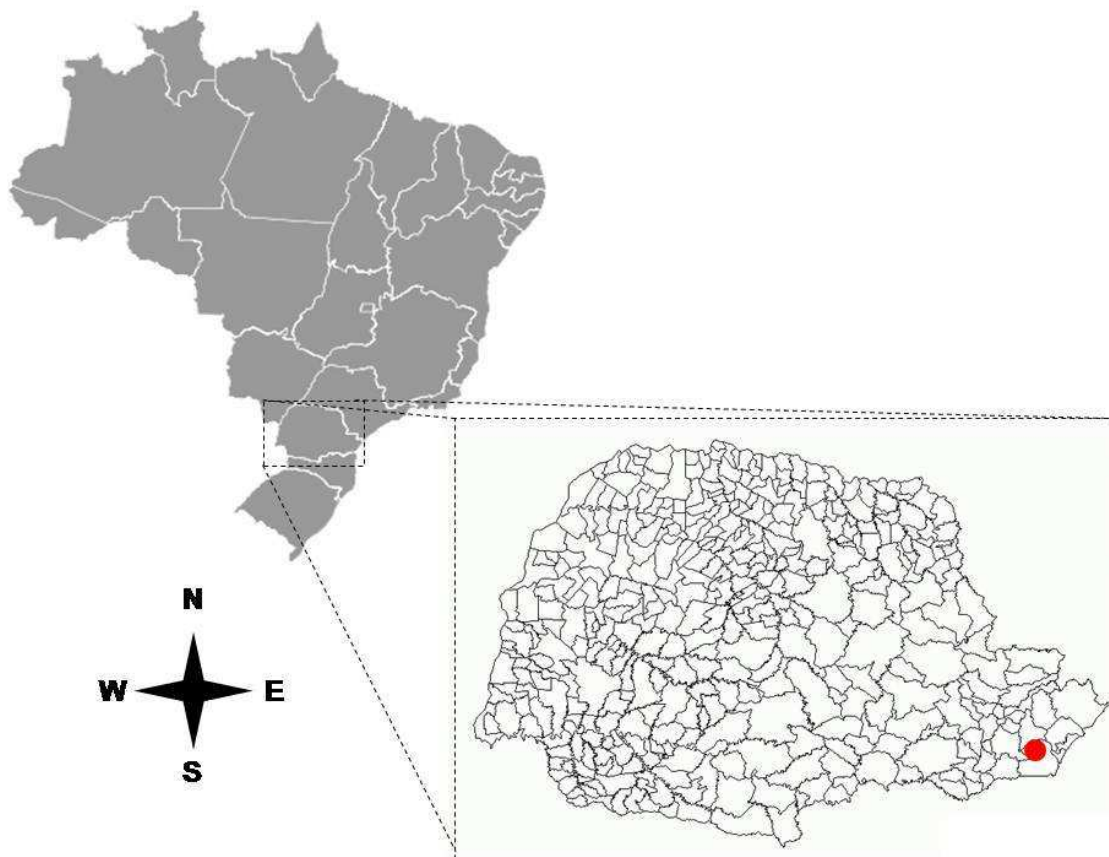


Figura 3

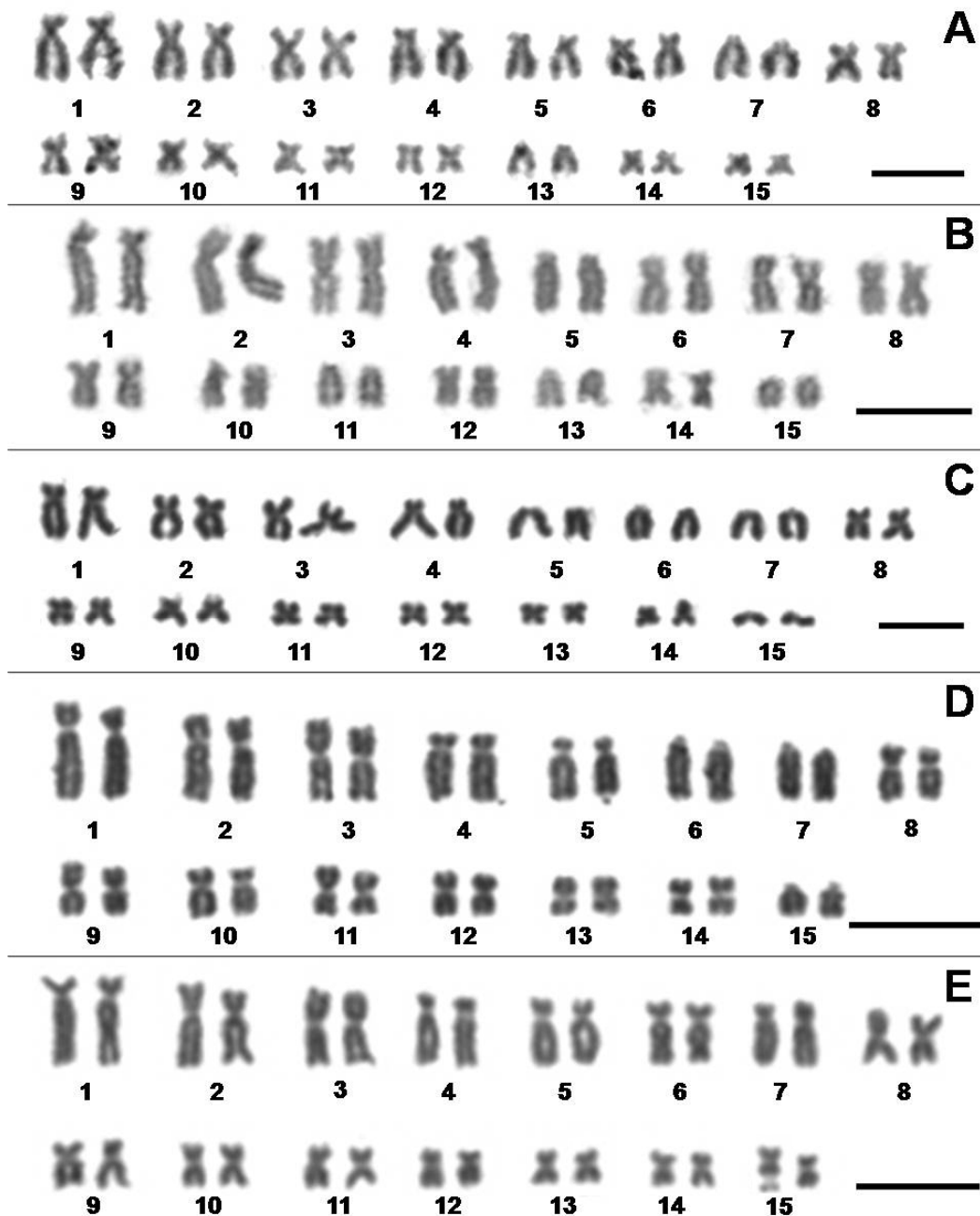


Figura 4

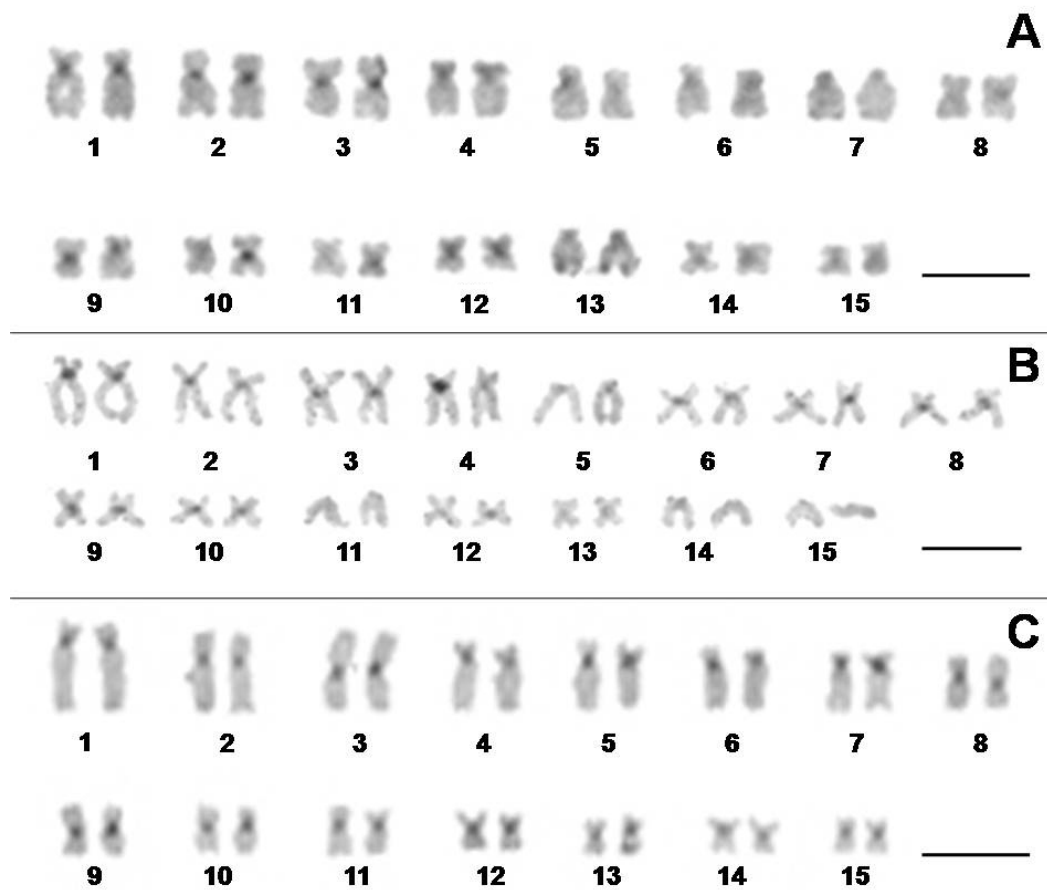


Figura 5

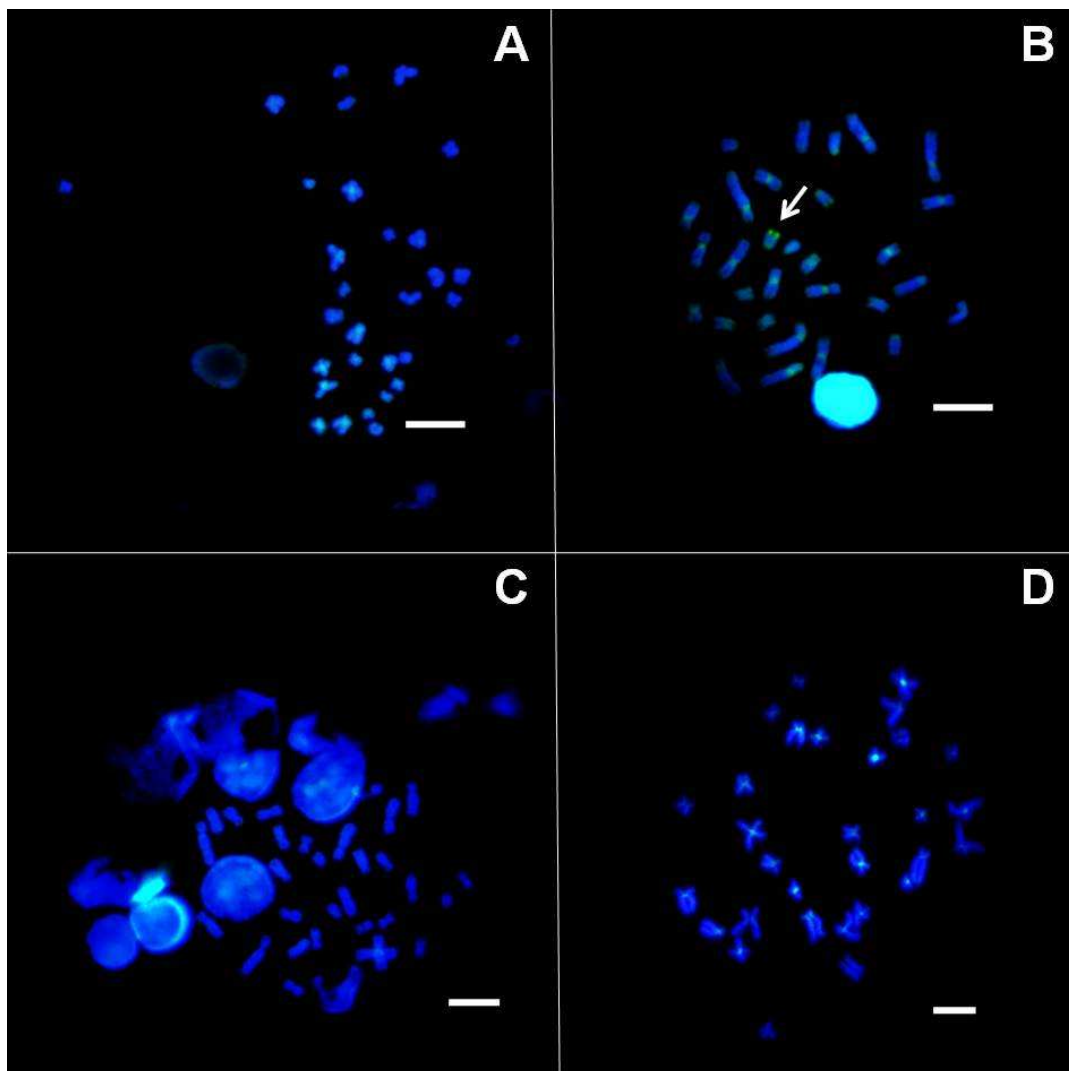


Figura 6

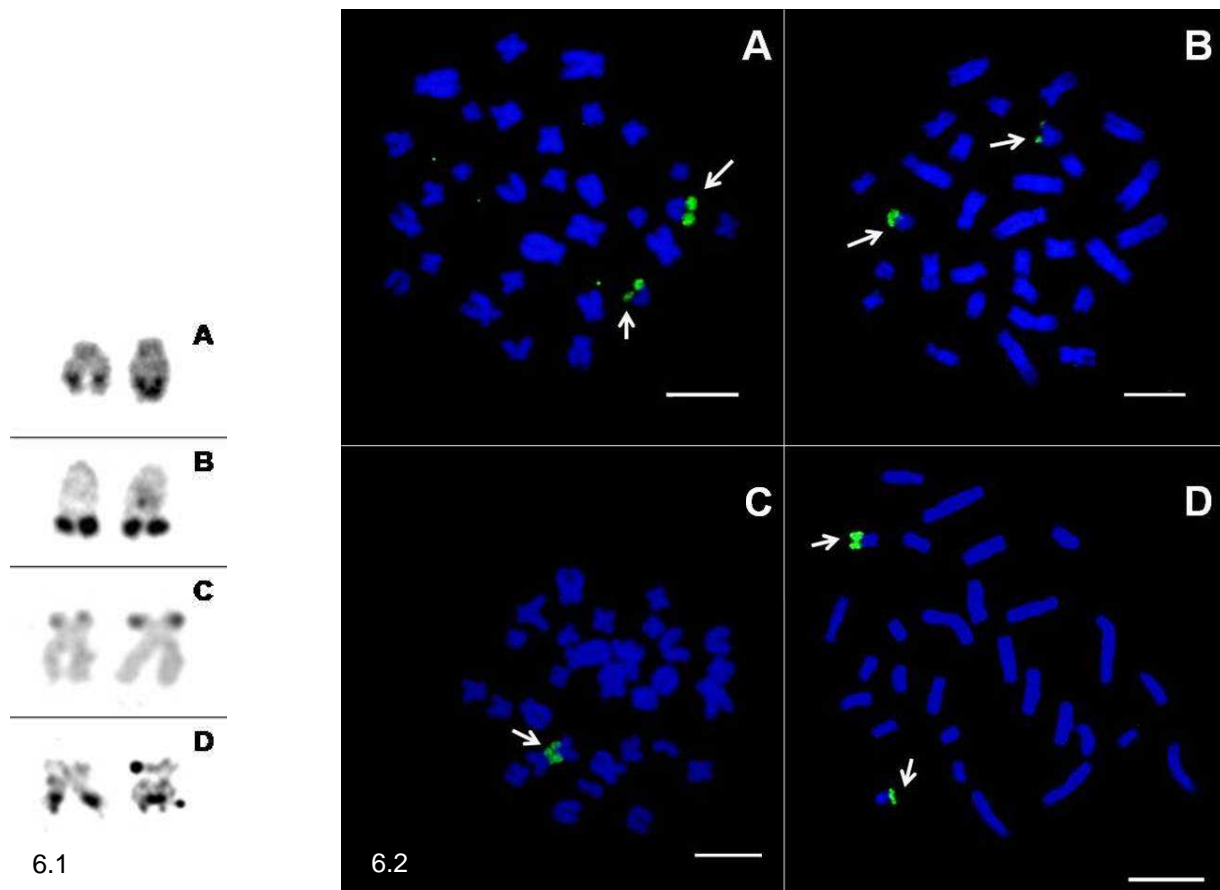
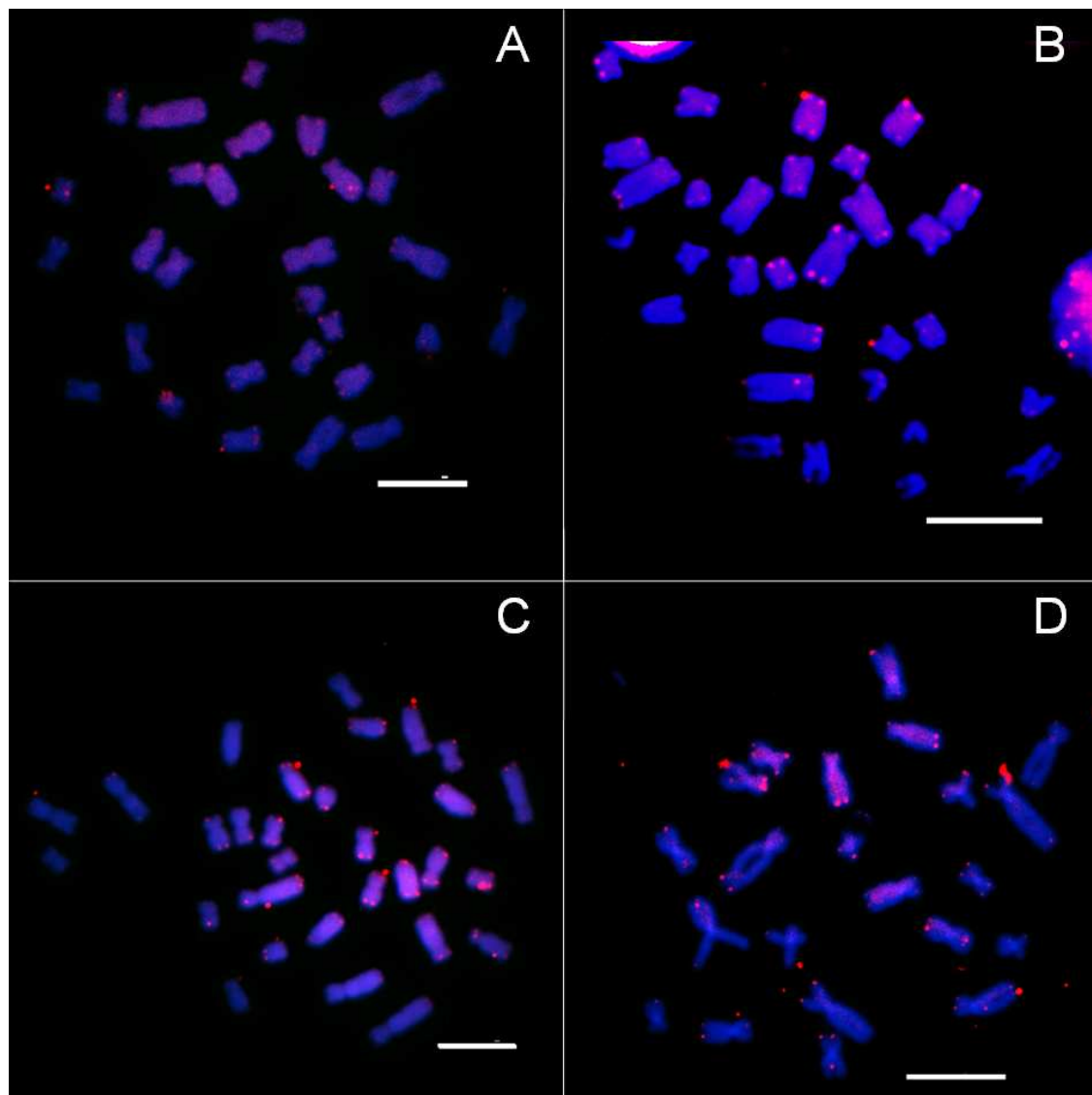


Figura 7



Anexo I

Predation on *Dendropsophus weneri* (Anura: Hylidae) by a lycosid in the Atlantic forest, southern Brazil

Predation on *Dendropsophus weneri* (Anura: Hylidae) by a lycosid in the Atlantic forest, southern Brazil

Igor S. Oliveira^{1*}, Adriele K. C. Oliveira¹, Marta M. Cestari¹, Luís Felipe Toledo²

Invertebrates are important prey items of anurans (e.g., Santos, Almeida and Vasconcelos, 2004). However, depending on their relative size to anurans, they can turn from prey into predators (reviews in Toledo 2005; Toledo, Ribeiro and Haddad, 2007). Predation events are not frequently observed in nature, but the presence of a wide range of potential predators may indicate that such events may be more common than observed (Pombal, 2007). Apparently, predation by spiders upon post-metamorphic anurans is a common interaction in the wild and, therefore, spiders have been claimed to be one of the most important anuran invertebrate predator (Menin, Rodrigues and Azevedo, 2005; Toledo, 2005).

During a field survey on 19th December 2009 in the Área de Proteção Ambiental de Guaratuba (municipality of São José dos Pinhais, Paraná state, southern Brazil) predation on an adult male of *Dendropsophus weneri* (Cochran, 1952) by a wolf spider (Lycosidae) was observed. Predation occurred at 2:32 am. in a flooded area with predominant *Brachiaria* sp. inside a pristine Atlantic Forest site (25°47'41.97" S, 48°54'43.62" W, about 299 m a. s.l.). While the male *D. weneri* was trying to release itself, holding the spider's legs and trying to escape, the spider was strongly attached to frog by the abdomen at the water surface (Figure 1A). The spider introduced its chelicerae into the frog's abdomen, and remained motionless, even with the frog's movements in an attempt to escape. After almost one and a half hour the wolf spider moved from the water surface to

about 10 cm up in the vegetation, carrying the dead frog and eating it (Figure 1B). Both spider and frog were not collected, but registered by photography and video images. The identification of the species is assured by the collection of several conspecific individuals in the same pond during another ongoing study.

The genus *Dendropsophus* is commonly preyed upon by spiders (Bernarde, Souza and Kokubum, 1999; Toledo, 2005; Pombal, 2007; Santana, Silva and Oliveira, 2009), and other invertebrates (Toledo, 2003; Castanho and Rocha, 2005; Forti, Fischer and Encarnação, 2007). Solitary and venomous predators usually prefer prey with similar size, and may select prey in regard to the energetic cost related to predation (Toledo, Ribeiro and Haddad, 2007). The case reported here may corroborate this prediction.

Acknowledgements. We thank to Moacyr Grassman and their family for permission to work in their property and CAPES for financial support during field survey. LFT thanks FAPESP for a grant and a scholarship.

References

- Bernarde, P.S., Souza, M.B., Kokubum, M.C.N. (1999): Predation on *Hyla minuta* Peters, 1872 (Anura, Hylidae) by *Ancylometes* spp. (Araneae, Pisauridae). *Bioc.* 7(1): 199-203.
- Castanho, L. M., Rocha, R.P. (2005): Harvestmen (Opiliones: Gonyleptidae) predation on treefrogs (Anura: Hylidae). *Rev. Ib. Aracnol.* 11: 43-45
- Forti, L.R., Fischer, H.Z., Encarnação, L.C. (2007): Treefrog *Dendropsophus elegans* (Wied-Neuwied, 1824) (Anura: Hylidae) as a meal to *Otostigmus tibialis* Brölemann, 1902 (*Chilopoda*: Scolopendridae) in the tropical rainforest in southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 67(3): 583-584.
- Menin, M., Rodrigues, D.J., Azevedo, C.S. (2005): Predation on amphibians by spiders (Arachnida, Araneae) in the Neotropical region. *Phyllomedusa* 4(1): 39-47.
- Pombal JR., J.P. (2007): Notas sobre predação em uma taxocenose de anuros no sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 24(3): 841-843.
- Santana, D.J., Silva, E.T., Oliveira, E.F. (2009): Predação de *Dendropsophus elegans* (Anura, Hylidae) por *Phoneutria nigri-venter* (Araneae, Ctenidae) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Bol. Mus. Bio. Mello Leitão* (N. Sér.) 26: 59-65.
- 1 Laboratório de Citogenética Animal, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Avenida Cel. Francisco H. dos Santos s/n, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil;
e-mail ISO: poecilogyrus@yahoo.com.br;
e-mail AKCO: adriele_cunha@yahoo.com.br
e-mail MMC: margaces@ufpr.br
- 2 Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Avenida Cel. Francisco H. dos Santos s/n, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil;
e-mail LFT: toledolf2@yahoo.com

* corresponding author



Figure 1. Wolf spider (Lycosidae) preying upon a male *Dendropsophus weneri* in a flooded site of the Brazilian Atlantic Forest. A) Spider killing the frog by spiking chelicerae into frog's abdomen at water surface; B) Spider eating the frog on the vegetation upon the water.

Santos, E.M., Almeida, A.V., Vasconcelos, S. D. (2004): Feeding habits of six anuran (Amphibia: Anura) species in a rainforest fragment in Northeastern Brazil. *Iher. Sér. Zool.* **94**(4): 433-438.

Toledo, L.F. (2003): Predation on seven South American anuran species by water bugs (Belostomatidae). *Phyllomedusa* **2**(2): 105-108.

Toledo, L.F. (2005): Predation of juvenile and adult anurans by invertebrates: current knowledge and perspectives. *Herpetol. Rev.* **36**(4): 395-400

Toledo, L.F., Ribeiro, L.S., Haddad, C.F.B. (2007): Anurans as prey: an exploratory analysis and size relationship between predators and their prey. *J. of Zool.* **271**: 170-177

Anexo II

Procedimientos citogenéticos

Obtenção de metáfases mitóticas por método direto, segundo Cole e Leavens (1971) e Baldissera et al. (1993) com adaptações

- Injeção abdominal intraperitoneal de solução aquosa de fermento biológico e dextrose na proporção 1 : 2;
- Após 48 h, injeção abdominal intraperitoneal de solução de colchicina 0,1 % (0,1 mL / 10g de massa corporal);
- Após 4 h, anestésiar o espécime com lidocaína 5 % e extrair o fígado e a medula óssea;
- Tratar com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075 M;
- Desagregar o tecido até a obtenção de uma solução homogênea e deixar descansar por 40 minutos na solução de KCl a 37 °C;
- Pingar três gotas de fixador (metanol e ácido acético na proporção 3 : 1) e deixar em descanso por 10 minutos;
- Centrifugar por 8 minutos a 6000 rpm (rotações por minuto) e descartar o sobrenadante;
- Completar com solução de fixador, re-suspender o material e deixar em descanso overnight no congelador;
- Centrifugar por 8 minutos a 6000 rpm, descartar o sobrenadante e re-suspender o material;
- Repetir esse processo mais duas vezes e armazenar 2 mL do material no congelador.

Coloração convencional com Giemsa

- Pingar três gotas da solução em lâmina limpa sobre vapor de banho-maria a 50 °C, aguardando até a completa secagem do material;
- Corar com solução de Giemsa 5 % em tampão fosfato com pH 6,8 durante 10 minutos;
- Retirar o excesso de corante com água destilada e aguardar a completa secagem antes de analisar.

Bandamento C (Sumner, 1972)

- Após a montagem as lâminas foram mergulhadas em de solução 0,2 N de ácido clorídrico (HCl) durante 15 minutos a 25 °C e depois lavadas com água destilada;
- Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) 5 % a 25 °C, permanecendo por 1 minuto e 30 segundos;
- Após esse tempo o material foi lavado em solução de HCl 1 N e em seguida em água destilada;
- As lâminas seguiram então para megalho em solução salina 2 x SSC a 50 °C durante 25 minutos;
- Finalmente foram então lavadas com água destilada e coradas com Giemsa 5 % por 10 minutos para posterior análise.

Ag-RON (Howell e Black, 1980)

- Após o preparo das lâminas, pingar uma gota solução de gelatina incolor e duas gotas de nitrato de prata (AgNO_3) a 50 %.
- Cobrir cuidadosamente com lamínula e levar para incubar em câmara úmida a 60 °C por 3 minutos até a solução adquirir coloração castanho-dourado;
- Lavar com água destilada e deixar secar naturalmente.

Dupla coloração CMA₃/DAPI (Schweizer, 1976)

- Após preparar a lâmina, depositar 80 µL de solução de Cromomicina A₃ (CMA₃) sobre a lâmina, cobrir com lamínula limpa de deixar descansar em câmara escura em baixa temperatura durante 1 hora e 30 minutos;
- Retirar a lamínula, lavar com água destilada e secar levemente;

- Colocar 80 μ L de solução diamidino-2-phenilindole com Antifading (DAPI/Antifading), cobrir com lamínula e deixar descansar em câmara escura em baixa temperatura por, no mínimo, 15 minutos.

Localização do rDNA com sonda 18S e seqüências teloméricas (TTAGGG)_n por FISH (Pinkel et al., 1986)

- Lavar lâminas preparadas com solução tampão 1 x (NaCl 0,137 M, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,46 mM) em agitação durante 5 minutos em temperatura ambiente;
- Desidratar em série alcoólica gelada (70, 85 e 100 %) por imersão por 5 minutos em cada solução;
- Adicionar 90 μ L de RNase 10 mg / mL (0,4 % RNase / 2 x SSC), cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida a 37 °C durante 1 hora;
- Lavar as lâminas com agitação por 5 minutos em 2 x SSC, retirar a lamínula e repetir o processo mais duas vezes;
- Lavar em PBS 1 x por 5 minutos;
- Mergulhar as lâminas em formaldeído 1 % em PBS 1 x com MgCl₂ 50 mM durante 10 minutos em temperatura ambiente;
- Lavar em PBS 1 x durante 5 minutos;
- Desidratar em série alcoólica gelada;
- Mergulhar as lâminas em solução de formamida 70 % em 2 x SSC e deixar em banho-maria a 70 °C por 5 minutos (desnaturação do DNA);
- Mergulhar imediatamente as lâminas em etanol 70 % gelado (- 20 °C) durante 5 minutos e proceder com série alcoólica;

- Cobrir cada lâmina com 50 μL de solução de hibridização (50 % formamida, sulfato dextrano 10 %, 2 x SSC e sonda (18S ou (TTAGGG)_n) amplificada e marcada por PCR) e sobrepor lamínula;
- Incubar o material em câmara úmida escura a 37 °C overnight;
- Lavar as lâminas em formamida 15 % em 0,2 x SSC pH 7,0 durante 10 minutos em agitação a 42 °C, retirar a lamínula e repetir a lavagem;
- Lavar com 0,1 x SSC em banho-maria a 60 °C durante 5 minutos, e repetir o processo mais duas vezes;
- Lavar em solução de Tween 20 (0,05 % em 2 x SSC) durante 5 minutos;
- Colocar 90 μL de leite em pó 5 % em 4 x SSC e cobrir com lamínula por 15 minutos em câmara úmida;
- Lavar o material em solução de Tween 20 por 5 minutos, remover a lamínula e repetir a lavagem;
- Colocar 80 μL de Streptavidina-FITC (1 μL / 500 μL de leite) e deixar incubar por 30 minutos em câmara úmida e escura em temperatura ambiente;
- Mergulhar e agitar em temperatura ambiente por três vezes em Tween 0,5 % / 4 x SSC;
- Desidratar em série alcoólica por 5 minutos;
- Cobrir as lâminas com 80 μL de DAPI/Antifading e, após 15 minutos, analisar em microscópio de epifluorescência.

Referências

- Baldissera Junior, F. A.; Oliveira, P. S. L.; Kasahara, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case of supernumerary chromosome. *Revista Brasileira de Gnética* 16 (2), 335-345.
- Cole, C. J.; Leavens, C. R. 1971. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetological Review* 3: 102.
- 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.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 83 (9): 2934-2938.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58: 307-324.
- Sumner, A. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.