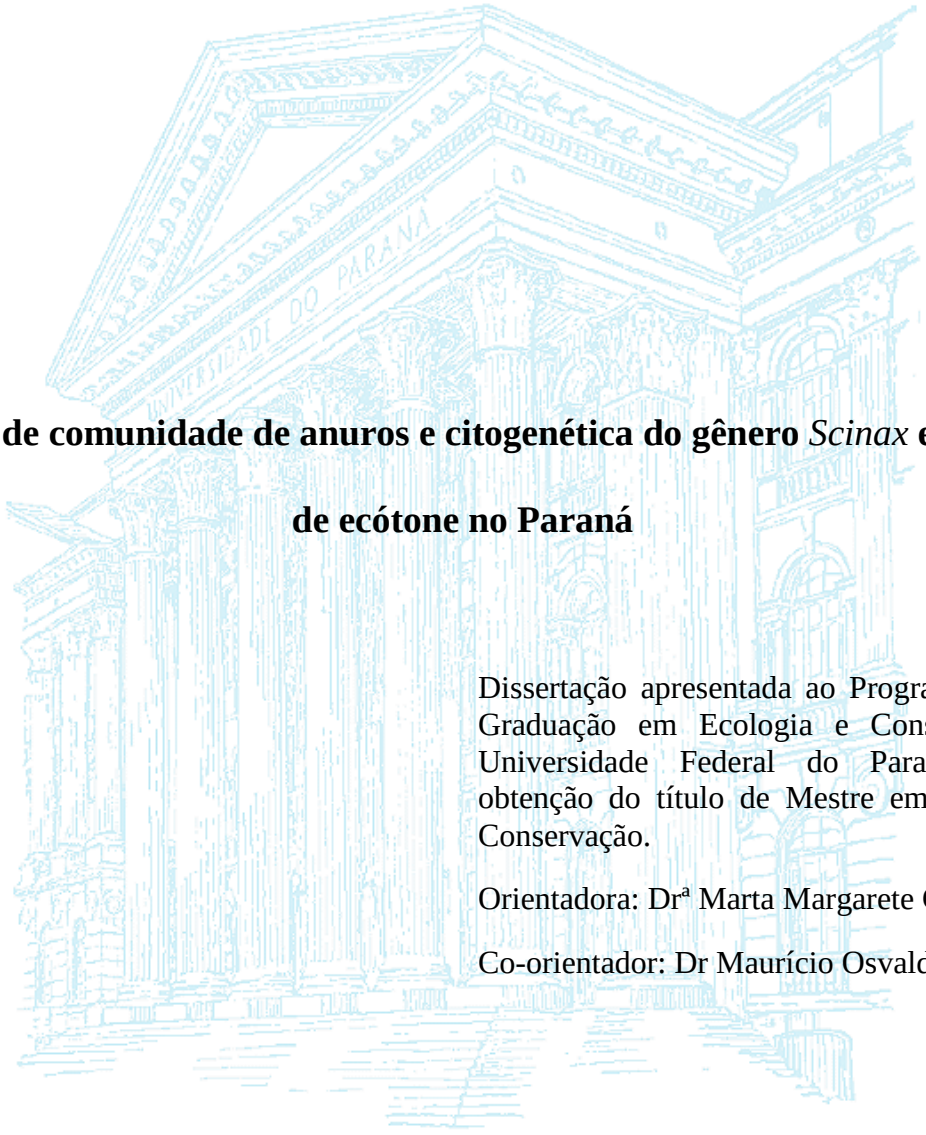
Adriele Karlokoski Cunha de Oliveira



Estudo de comunidade de anuros e citogenética do gênero *Scinax* em área de ecótone no Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Drª Marta Margarete Cestari

Co-orientador: Dr Maurício Osvaldo Moura

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 **Adriele Karlokoski Cunha** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

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

Curitiba, 10 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Marta Margarete Cestari
Orientadora e Presidente

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Membro

Prof. Dr. Carlos Eduardo Conte
Membro

Visto:

Profª. Dra. Lucélia Donatti
Coordenadora do PPG-ECO

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990, Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1595 – Fax (41) 3266-2042 – ecologia@ufpr.
www.ecologia.ufpr.br

Ao Igor por tudo, sempre

“Que vida boa, sapo caiu na lagoa...”

Victor Chaves

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por todas as realizações.

À minha orientadora, Drª Marta Margarete Cestari, um “Muito Obrigada!” pela oportunidade e colaboração. Mesmo sabendo que seria um desafio, esteve sempre disposta em me ajudar com dicas muito valiosas.

Agradeço ao meu co-orientador, Dr Maurício Osvaldo Moura, pelo auxílio no delineamento do trabalho e pelo apoio.

Ao Dr Rafael Bueno Noleto por ter incentivado o desenvolvimento do trabalho com citogenética. Por todos os ensinamentos e pela ajuda na elaboração da dissertação.

Ao professor Dr Roberto Ferreira Artoni pela parceria e pela disposição em nos ajudar. Obrigada pelas conversas de incentivo e por entender sempre com tranqüilidade todas as situações. Agradeço pela amizade estabelecida entre nós e pelas críticas e sugestões sempre bem vindas!

Ao professor Dr Marcelo Ricardo Vicari, pela compreensão e por ter cedido espaço e equipamentos para a elaboração das técnicas citogenéticas. Agradeço de maneira especial a ajuda e paciência da doutoranda Michelle Orane Schemberger quando nos acompanhou em laboratório. À professora Drª Iris Hass por ter se proposto a ajudar nos métodos citogenéticos.

Ao Dr Carlos Eduardo Conte pelo auxílio na identificação das espécies e pelas sugestões. Obrigada pela confiança e pela disponibilidade em me ajudar.

À Mariana Rosa Ribeiro e sua família por permitirem a realização das fases de campo em sua propriedade.

A todos meus colegas e amigos tornaram essa fase da minha vida mais divertida e mais “leve” e que entenderam que eu não podia dar-lhes atenção porque estava em campo ou no laboratório nos finais de semana e feriados!

Um agradecimento especial à Msc. Ana Júlia Donatti, uma amiga que ganhei com o mestrado, que me apoiou nas horas mais difíceis destes dois anos e que sempre trouxe alegria com seu jeito especial. Agradeço também ao Pietro Foggiato, por sua amizade. Obrigada por todos os momentos únicos que passei com vocês!

À Msc. Manoela Woitowicz Cardoso Costa, pela amizade, pelo incentivo desde o início da minha caminhada na herpetologia e por seus conselhos sempre valiosos.

À minha querida amiga, bióloga Tharine Vieira Caetano por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, sempre me apoiando e trazendo uma palavra de conforto.

Aos mais que amigos, Dr Rodrigo Stuart e Drª Karen Kubo. A participação deste casal nas nossas vidas trouxe muitos momentos inesquecíveis e maravilhosos, além de todo o exemplo de dedicação e competência. Também agradeço por eles me "emprestarem" seus cachorros e gatos de vez em quando!

À querida Elis Regina Ribas por sua amizade e por ter se tornado mais especial em nossas vidas.

Aos meus novos primos, Nadya e Igor pelo carinho e compreensão.

Ao amigo, Msc. Leandro Corrêa pelos momentos divertidos de convivência e por sua valiosa ajuda em campo.

Ao Msc. Fagner Breda pelas conversas de incentivo, pelos momentos de risadas e pela participação em campo.

Ao sempre divertido Msc. Flávio Osório (Flavinho) por nos fazer acreditar que "tudo vai dar certo".

Às preciosas companhias em campo do mestrando Louri Klemann Jr e da bióloga Marina Pereira.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal pelos momentos de convivência e pela ajuda. Ao Msc. Rafael Balen pelas discussões sobre o tempo das nossas bandas C e por alegrar sempre o ambiente. À Msc. Giselle Perazzo pelas conversas esclarecedoras e pelo auxílio. Ao mestrando Luis Fernando Kraft (Kabelo), pela ajuda na preparação de material e pelos ensinamentos.

A todos os professores da PPGECO e à Valéria Romeiro por tornar tudo mais fácil e mais descontraído e por toda sua atenção.

À Capes pela bolsa durante o período de estudo. Às autorizações emitidas pelo IBAMA e pelo Comitê de Ética. Ao Instituto Tecnológico SIMEPAR pelos dados meteorológicos.

Aos meus pais, Ricardo e Solange, e meu irmão, Rodrigo, pelo carinho, apoio e compreensão. Mesmo sem entender direito como é essa vida de bióloga, sempre me deixaram livre para tomar minhas decisões. Agradeço também à minha sogra Maria Inês, pelo incentivo sempre.

E é claro, de maneira mais que especial, agradeço ao Msc. Igor Soares de Oliveira, meu querido esposo, por tudo. Desde o inicio da minha caminhada como bióloga sempre esteve ao meu lado, sendo meu melhor amigo e meu companheiro de trabalho. À sua paciência e incentivo nos momentos que penso em desistir. Ao seu carinho e amor que me fazem querer seguir em frente sempre. Obrigada por me fazer feliz e por proporcionar momentos inesquecíveis ao seu lado. Amo você, lindo.

Sumário

Resumo Geral 1
Abstract 2
Introdução Geral 3
Anuros da Mata Atlântica 3
Estudos citogenéticos em anuros 4
Caracteres citogenéticos e técnicas de marcação 5
Justificativa 7
Literatura Citada 8
CAPÍTULO I 13
Abstract 14
Resumo 15
Introdução 16
Material e Métodos 17
Área de Estudo 17
Coleta de dados 17
Análises estatísticas 19
Resultados 21
Composição de espécies 21
Distribuição temporal 21
Distribuição espacial 22
Discussão 24
Composição de espécies 24
Distribuição temporal 26
Distribuição espacial 27
Considerações Finais 28
Literatura Citada 29
Tabelas 37
Legendas de Figuras 42
Figuras 44
CAPÍTULO II 53
Resumo 55
Abstract 56
Introdução 57
Material e Métodos 58
Resultados 59
Coloração convencional 59
Bandamento C e CMA_3/DAPI 59
RONs e rDNA 60
Sequência telomérica 61
Discussão 61
Literatura Citada 67
Tabelas 74
Legendas das Figuras 75
Figuras 76
ANEXO 83
Procedimentos citogenéticos 84
Obtenção de metáfases mitóticas - método direto 84
Coloração cromossômica convencional com Giemsa 85
Bandamento C 85
Coloração com Nitrato de Prata – Ag-RON 85
Dupla coloração CMA_3/DAPI 86
Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda 18S e sequências teloméricas $(TTAGGG)_n$ 86
Literatura citada 88

Resumo Geral

A perda de habitats traz conseqüências para a diversidade e apesar da devastação florestal, a Mata Atlântica abriga grande riqueza de anuros. Conhecimentos sobre distribuição e ecologia aliados aos estudos citogenéticos e taxonômicos são importantes para o estabelecimento da história evolutiva das espécies. Trabalhos com anuros do Paraná, tanto ecológicos como citogenéticos, estão em seu início, o que por sua vez restringe o conhecimento sobre distribuição dos táxons e dificulta o estabelecimento de propostas conservacionistas. Este estudo foi desenvolvido em ecótone na Mata Atlântica paranaense com o objetivo de avaliar a composição de espécies e suas distribuições temporais e espaciais entre agosto de 2009 e julho de 2010. Além disso, táxons do gênero *Scinax* foram estudados citogeneticamente, quanto a morfologia cromossômica, padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva, localização de Regiões Organizadoras de Nucléolo, sondas de rDNA e sequências teloméricas. Foram registrados altos índices de riqueza e diversidade nos ambientes amostrados, o que pode ser explicado pela localização da área em ecótone e pela heterogeneidade do habitat. A atividade de vocalização dos machos foi correlacionada positivamente com fatores abióticos, sendo que mais espécies vocalizaram nos meses mais quentes e chuvosos. Houve segregação no uso dos sítios de vocalização, para os quais hilídeos distribuíram-se de maneira horizontal e vertical no habitat, enquanto que os não hilídeos ocuparam ambientes apenas na dimensão horizontal. Com relação à citogenética, as quatro espécies de *Scinax* apresentaram 2n=24 e NF=48, com algumas diferenças na morfologia dos cromossomos. Bandas C estiveram predominantemente nas regiões pericentroméricas, e em *S.* aff. *alter*, foram detectadas marcações teloméricas. A maioria das espécies apresentou um par de RON e em *S. catharinae* foi detectado um par não homólogo. As RONs foram confirmadas por FISH (18S), que também revelou sítios adicionais de rDNA em *S. catharinae*. As sequências teloméricas foram restritas às regiões terminais dos cromossomos de *S. rizibilis* e *S. perereca*. Em *S.* aff *alter* foram encontrados sítios teloméricos intersticiais.

Abstract

The habitat loss has consequences for the diversity, and despite the devastation of forests, the Atlantic Forest has a high richness of frogs. Knowledge about the distribution and ecology herewith data about cytogenetic and taxonomy are important for establishing the evolutionary history of species. Ecologically and cytogenetics studies with anurans of Parana are in their beginning, difficult the knowledge about the distribution of taxa and the establishment of conservation proposals. This study was developed in Parana Atlantic Forest ecotone in order to assess the species composition and their temporal and spatial distributions between August 2009 and July 2010. Furthermore, taxa of the genus *Scinax* were studied cytogenetically, as the chromosome morphology, distribution patterns of constitutive heterochromatin, localization of Nucleolar Organizer Regions, rDNA probes and telomeric sequences. We recorded high levels of richness and diversity in the study sites, which can be explained by the location of the area in ecotone and the heterogeneity of the habitat. The calling activity of males was positively correlated with environmental factors, and more species called in warmer and rainy months. There was segregation in the use of calling sites, for which hylids were distributed to horizontally and vertically in the habitat, while not hylids frogs occupied environments only in the horizontal dimension. With respect cytogenetics, the four species of *Scinax* had 2n = 24 and NF = 48, with some differences in morphology of chromosomes. C-bands were predominantly in pericentromeric regions, and in *S.* aff. *alter* telomeric markers were detected. Most of species showed one pair of NOR, and *S. catharinae* had not homologous pair. The NORs were confirmed by FISH (18S), which also revealed additional rDNA sites in *S. catharinae*. Telomeric sequences were restricted to terminal regions of the chromosomes of *S. rizibilis* and *S. perereca* while in *S.* aff *alter* interstitial telomeric sites were found.

Introdução Geral

Anuros da Mata Atlântica

A Mata Atlântica vem sendo degradada de forma progressiva ao longo dos anos, resultando na perda e fragmentação de habitats, o que já levou a extinção local de muitas espécies (Pinto e Brito, 2005). Atualmente seus remanescentes florestais não ultrapassam 16% da sua cobertura original (Ribeiro et al., 2009) e a porcentagem destas áreas inclui não só as poucas formações de floresta primária, como também florestas secundárias e florestas cultivadas com espécies exóticas, empobrecendo assim sua composição florística (Ab'Saber, 2003; Câmara, 2005).

Fatores como desmatamento, poluição de corpos d'água, perda de habitats e alteração de ambientes podem afetar negativamente a sobrevivência de várias espécies e diminuir a abundância e a diversidade de anfíbios anuros, impactando fortemente algumas populações (Tocher et al., 1997).

Devido à heterogeneidade de solos e relevos, mesmo na restrita distribuição que apresenta atualmente, a Mata Atlântica é apontada como uma das regiões que mantem a maior diversidade (Myers et al., 2000; Mamede et al., 2004) constando entre os cinco principais *hotspots* mundiais de diversidade (Myers et al., 2000; Mamede et al., 2004; Galindo-Leal e Câmara, 2005).

O Brasil possui a maior riqueza de anuros do mundo com aproximadamente 900 espécies (SBH, 2010), sendo mais de 400 ocorrentes na Mata Atlântica (Toledo et al., 2008), bioma brasileiro com o maior número de endemismos de anuros (Duellman, 1999; Haddad e Prado, 2005).

O modo de vida dos anuros, caracterizado pela transição entre ambientes durante seu desenvolvimento, juntamente com a grande diversidade de seus modos reprodutivos, os relacionam intimamente com o meio e os expõe a praticamente todos os tipos de habitats

(Duellman e Trueb, 1986; Haddad e Prado, 2005; Wells, 2007), o que permite que sejam utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental (Duellman e Trueb, 1986).

Devido à alta dependência dos anuros das características do meio tem-se observado que os fatores abióticos, como o regime de chuvas, heterogeneidade da vegetação e temperatura, tem maior efeito na estruturação de comunidades do que os fatores ecológicos, como competição e predação (Parris, 2004; Wells, 2007; Werner et al., 2007; Vasconcelos et al., 2009).

Estudos publicados com taxocenoses de anuros nos domínios da Mata Atlântica no Paraná ainda são poucos: Bernarde e Anjos (1999), Machado et al. (1999), Bernarde e Machado (2000), Machado e Bernarde (2002), Conte e Machado (2005), Conte e Rossa-Feres (2006 e 2007), Armstrong e Conte (2010) e Cunha et al., (2010). A carência de conhecimento sobre ecologia e distribuição das espécies é um aspecto negativo que dificulta o planejamento e tomada de decisões sobre medidas de conservação do grupo (Garcia e Vinciprova, 2003; Silvano e Segalla, 2005).

Estudos citogenéticos em anuros

Os estudos citogenéticos de anuros tiveram seu início entre as décadas de 60 e 70 e enfocavam na sua maioria a descrição dos cariótipos das espécies, com técnicas de coloração convencional e descrição somente do número e forma dos cromossomos (e.g. Bogart, 1973). A partir da década de 70 foram desenvolvidos métodos e técnicas que promoveram o aparecimento de marcações ao longo dos cromossomos, o que facilitou a identificação individual e iniciou o entendimento de relações filogenéticas entre anuros e os mecanismos evolutivos envolvidos nas diferenciações cariotípicas (Kasahara, 2009). Dentre estas técnicas encontram-se o bandamento C, bandamentos com enzimas de restrição, método de Ag-NOR, coloração com fluorocromos e hibridização *in situ* (Lourenço, 1996).

Desde então as análises citogenéticas tem descrito vários fenômenos cromossômicos que, ao contrário do observado em nível morfológico, tem mostrado grande variabilidade em Anura (e.g. Medeiros et al., 2003). Alguns táxons possuem cariótipos com grande variabilidade, assim como a disposição de Regiões Organizadoras de Nucléolo e as regiões heterocromáticas (e.g. Busin et al., 2001; Aguiar et al., 2002) enquanto que para outros a evolução cariotípica tem se mostrado bastante conservativa (e.g. Ananias et al., 2004).

Caracteres citogenéticos e técnicas de marcação

A heterocromatina pode ser definida por segmentos cromossômicos que permanecem fortemente condensados durante a intérfase (Heitz, 1928) que se manifestam por apresentar heteropicnose positiva ou negativa, com maior ou menor coloração relacionada à condensação da cromatina no cromossomo (Guerra, 1988). As formações de heterocromatina podem exibir diversas propriedades, tais como proteger a integridade cromossômica reprimindo transcrições e recombinações potencialmente mutagênicas, organizar as funções de estruturas cromossômicas (centrômeros e telômeros), mediar a segregação dos cromossomos permitindo a interação de longo alcance que podem propagar a expressão de genes clonais contribuindo para o desenvolvimento de diversas linhagens celulares (Grewal e Jia, 2007). Apesar das diversas propriedades atribuídas à heterocromatina, várias características apontam para que este seja um termo com ampla definição, podendo designar entidades distintas, com algumas propriedades em comum (Kasahara, 2009). A técnica de banda C produz coloração seletiva destas regiões heterocromáticas, formando blocos escuros, presentes na maioria das vezes nas regiões centroméricas dos cromossomos, denominados bandas C (Guerra, 1988).

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) são sítios cromossômicos formados por numerosas cópias de genes que codificam RNA ribossômico (Miller, 1981). Este método pode constituir um excelente marcador citotaxonômico para alguns grupos, pois podem variar de modo inter e intra-específico ou inter e intra-individual quanto ao número,

localização, intensidade e tamanho (Goodpasture e Bloom, 1975). As Regiões Organizadoras de Nucléolo podem estar associadas às constrições secundárias, pois é onde se situam os genes que produzem determinados tipos de RNA ribossomais, os quais vão constituir grande parte do nucléolo (Guerra, 1988). Estas constrições podem ser fortemente coradas com o nitrato de prata, que possui grande afinidade por proteínas nucleolares (Howell e Black, 1980; Guerra, 1988).

Outra maneira de coloração dos cromossomos é o emprego de substâncias conhecidas como fluorocromos, que ao serem examinados sob luz UV e filtros específicos, emitem padrões fluorescentes que diferenciam regiões cromossômicas de acordo com a riqueza de bases nitrogenadas (Kasahara, 2009). Em vertebrados, geralmente são utilizados dois tipos de fluorocromos, um com especificidade para bases AT ou GC, como os diamidino-2-phenylindole (DAPI) e Cromomicina A_3 (CMA_3) respectivamente (Kasahara, 2009).

A técnica de hibridização florescente *in situ* (FISH) consistiu em um avanço nas análises cromossômicas por possibilitar uma caracterização mais detalhada do que as outras técnicas (Guerra, 1988; Kasahara, 2009). De maneira geral, o FISH promove a reação de sequências complementares de determinados segmentos de RNA ou DNA, chamados de sondas, diretamente com o DNA - alvo presente nos cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos (Guerra, 2004). São incorporadas às sondas moléculas de biotina ou digoxigenina por meios de tratamentos enzimáticos (geralmente por PCR ou *nick translation*), que após a hibridação, são detectadas por anticorpos ligados a fluorocromos (Kasahara, 2009).

Justificativa

Tendo em vista que o Brasil possui a maior riqueza de anfíbios do mundo e que muitas espécies ocorrem e são endêmicas da Mata Atlântica, a fragilidade do grupo frente às alterações ambientais e a acelerada descaracterização do bioma, é muito importante o desenvolvimento de trabalhos com o grupo, principalmente no Paraná, que é o estado com um dos maiores remanescentes florestais. Baseado neste cenário e na estreita ligação entre anuros e o ambiente imposto pelas restrições fisiológicas do grupo, o conhecimento de características populacionais básicas, como período reprodutivo, tipo de micro-habitat utilizado para a reprodução e variações temporais e espaciais, passam a ser fundamentais tanto para a efetiva avaliação do estado de conservação de determinada área quanto para avaliar as respostas à fragmentação de habitats (e.g. Tocher et al., 1997; Garcia e Vinciprova, 2003).

Com relação à citogenética, há poucos trabalhos desenvolvidos com anuros brasileiros, principalmente com espécies paranaenses. Estudos envolvendo estas análises podem trazer novas informações a respeito das relações taxonômicas e evolutivas das espécies, principalmente se considerarmos que em anuros há uma dificuldade em estabelecê-las com análises morfológicas (e.g. Medeiros et al., 2003; Nunes e Fagundes, 2008).

Literatura Citada

AB'SABER, A. 2003. **Os domínios de natureza no Brasil - potencialidades paisagísticas**. Cotia, Ateliê Editorial.

AGUIAR-JR, O.; A. P. LIMA & S. M. RECCO-PIMENTEL. 2002. Cytogenetic analysis of four dartpoison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura, Dendrobatidae). **Herpetologica** 58:293-303.

ANANIAS, F., P. C. A. GARCIA, & S. M. RECCO-PIMENTEL. 2004. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas** 140: 42-48.

ARMSTRONG, C. G. & C. E. CONTE. 2010. Taxocenose de anuros (Amphibia:Anura) em uma área de Floresta Ombrófila Densa no sul do Brasil. **Biota Neotropica** 10 (1): 39-46.

BERNARDE, P. S. & L. ANJOS. 1999. Distribuição espacial e temporal da anurofauna do Parque estadual Mata dos Godoy, Londrina, Paraná, Brasil. **Comunicaçõs do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS** 12: 127-140.

BERNARDE, P. S. & R. A. MACHADO. 2000. Riqueza de espécies, ambientes de reprodução e temporada de vocalização da anurofauna em Três Barras do Paraná, Brasil (Amphibia: Anura). **Cuadernos de Herpetología** 14 (2): 93-104.

BOGART, J. P. 1973. Evolution of anuran karyotypes, p. 337-349. In: J. L. VIAL (Ed.). **Evolutionary biology of anurans**. University Missouri Press.

BUSIN, C. S., G. VINCIPROVA & S. M. RECCO-PIMENTEL. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica** 110: 131-141.

CÂMARA, I. G. 2005. Breve história da conservação da Mata Atlântica, p. 31-42. In: C. GALINDO-LEAL & I. G. CÂMARA (Eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Belo Horizonte, Conservação Internacional.

CONTE, C. E. & R. A. MACHADO. 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. & D. C. ROSSA-FERES. 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. & D. C. ROSSA-FERES. 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.

CUNHA, A. K., I. S. OLIVEIRA & M. T. HARTMANN. 2010. Anurofauna da Colônia Castelhanos, na Área de Proteção Ambiental de Guaratuba, Serra do Mar paranaense, Brasil. **Biotemas** 23(2): 123-134.

DUELLMAN, W. E. 1999. **Patterns of distribution of amphibians: a global perspective**. Baltimore and London, The John Hpkins University.

DUELLMAN, W. E. & L. TRUEB. 1986. **Biology of amphibians**. New York, McGraw-Hill.

GALINDO-LEAL, C. & I. G. CÂMARA. 2005. *Status* do hotspot Mata Atlântica: uma síntese, p. 3-11. In: C. GALINDO-LEAL & I. G. CÂMARA (Eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Belo Horizonte, Conservação Internacional.

GARCIA, P. C. & G. VINCIPROVA. 2003. Anfíbios, p. 85-100. In: C. S. FONTANA, G. A. BENCKE & R. E. REIS (Eds.). **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, EDIPUCRS.

GOODPASTURE, C. & S. E. BLOOM. 1975. Visualization of nucleolar organizer in mammalia chromosomes using ssilver staining. **Chromosoma** 53: 37-50.

GREWAL, S. I. S. & S. JIA. 2007. Heterochromatin revisited. **Nature** 8: 35-46.

GUERRA, M. 1988. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara.

GUERRA, M. 2004. Hibridização *in situ*: princípios básicos, p. 1-32. In: M. GUERRA (Ed.). **FISH Fluorescent *in situ* Hybridization: Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

HADDAD, C. F. B. & C. P. A. PRADO. 2005. Reproductive modes in frogs and therir unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience** 55: 207-217.

HEITZ, E. 1928. Das heterochromatin der moose. **I Jahrb Wiss Botanik** 69: 762-818.

HOWELL, W. M. & D. A. BLACK. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer. **Experientia** 36: 1014-1015.

KASAHARA, S. 2009. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

LOURENÇO, L. B. 1996. **Estudo citogenético comparativo de *Edalorhina perezi* e *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)**. Dissertação de Mestrado (p. 100p). Campinas: Universidade Estadual de Campinas.

MACHADO, R. A. & P. S. BERNARDE. 2002. Anurofauna da Bacia do Rio Tibagi, p. 297-306. In: M. E. MEDRI, E. BIANCHINI, O. A. SHIBATTA & J. A. PIMENTA (Eds.). **A bacia do rio Tibagi .** Londrina, Dos Autores.

MACHADO, R. A., P. S. BERNARDE, S. A. A. MORATO & L. ANJOS. 1999. Análise comparada da riqueza de anuros entre duas áreas com diferentes estados de conservação no município de Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 16 (4): 997-1004.

MAMEDE, M. C., I. CORDEIRO, L. ROSSI, M. M. MELO & R. J. OLIVEIRA. 2004. Mata Atlântica, p. 115-132. In: O. A. MARQUES & W. DULEBA (Eds.). **Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna**. Ribeirão Preto, Holos.

MEDEIROS, L. R., D. C. ROSSA-FERES & S. M. RECCO-PIMENTEL. 2003. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. **Journal of Heredity** 94 (2): 149-154.

MILLER, O. L. 1981. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. **Journal of Cell Biology** 91: 15-17.

MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, G. A. FONSECA & J. KENT. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858.

NUNES, R. R. A. & V. FAGUNDES. 2008. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species groups. **Genetics and Molecular Biology** 31 (4): 982-987.

PARRIS, K. M. 2004. Environmental and spatial variables influence the composition of frog assemblages in sub-tropical eastern Australia. **Ecography** 27: 392-400.

PINTO, L. P. & M. C. BRITO 2005. Dinâmica da perda de biodiversidade na Mata Atlântica brasileira: uma introdução, p. 27-42. In: C. GALINDO-LEAL & I. G. CÂMARA (Eds.). **Mata**

Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. Belo Horizonte, Conservação Internacional.

RIBEIRO, M. C. J. P. METZGER, A. C. MARTENSEN, F. J. PONZONI & M. M. HIROTA. 2009. The brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142: 1141-1153.

SBH. 2010. **Brazilian amphibians - list of species**. Available online at: http://www.sbherpetologia.org.br. [Access at: December, 20th, 2010].

SILVANO, D. L. & M. V. SEGALLA. 2005. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade** 1: 79-86.

TOCHER, M. D., C. GASCON & B. ZIMMERMAN. 1997. Fragmentation effects on a Central Amazonian frog community, p. 124-137. In: W. F. LAURANCE & R. O. BIERREGAARD JR. (Eds.). **Tropical forest remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities**. Chicago, University of Chicago Press.

TOLEDO, L. F., C. F. B. HADDAD & C. P. A. PRADO. 2008. **Anfíbios da Mata Atlântica**. Pinheiros, Neotropica.

VASCONCELOS, T. S., T. G. SANTOS, D. C. ROSSA-FERES & C. F. B. HADDAD. 2009. Influence of the environmental heterogeneity of breeding ponds on anuran assemblages from southeastern Brazil. **Canadian Journal of Zoology** 87: 699-707.

WELLS, K. D. 2007. **The ecology and behavior of amphibians**. Chigago, The University of Chicago Press.

WERNER, E. E., D. K. SKELLY, R. A. RELYEA & K. L. YUREWICZ. 2007. Amphibian species richness across environmental gradients. **Oikos** 116: 1697-1712.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE, DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL E ESPACIAL DE ANUROS EM ECÓTONE NO PARANÁ

Este artigo será submetido para o periódico

Zoologia

DIVERSIDADE, DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL E ESPACIAL DE ANUROS (AMPHIBIA) EM ECÓTONE NO PARANÁ

Adriele Karlokoski Cunha de Oliveira[1]*; Igor Soares de Oliveira[1];
Maurício Osvaldo Moura[3]; Marta Margarete Cestari[2]

1 - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Av. Cel. Francisco H. dos Santos s/n, 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

2 - Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (UFPR). Av. Cel. Francisco H. dos Santos s/n, 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

3 - Departamento de Zoologia (UFPR). Av. Cel. Francisco H. dos Santos s/n, 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil

* Corresponding author – Adriele Karlokoski Cunha de Oliveira: Universidade Federal do Paraná. Av. Cel. Francisco H. dos Santos s/n, 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail: akcoliveira@gmail.com

Abstract

In this study, the diversity, temporal and spatial distribution of anuran assemblage were determined in an ecotone area of Parana Atlantic Forest between August 2009 and July 2010. We recorded 26 species belonging to eight families and fifteen genera. Samples were collected in four water bodies by the search in the breeding sites method, which facilitated the meeting of 88% of species. The species accumulation curve showed variation at the end of sampling, with estimated richness of 26 ± 2.93. The four habitats sampled showed high diversity and were grouped according to their taxa composition, and heterogeneous environments showed most species. The diversity was high and could be the result of the location of the area in ecotonal region. Most males vocalized during the warmer and rainy months, and there was a positive correlation between abundance and richness with abiotic data. The use of calling sites was evaluated by establishing some factors and despite the high similarity between the use of substrates of vocalization, species segregation in the use of horizontal and vertical space. The hylids showed spatial segregation in horizontal and vertical dimensions, while the not hylids segregated only horizontally.

Key words: anurans, community, seasonality, Atlantic forest.

Resumo

No presente estudo avaliou-se a diversidade e a distribuição temporal e espacial da taxocenose de anuros em uma área de ecótone na Mata Atlântica paranaense entre agosto de 2009 e julho de 2010. Foram registradas 26 espécies pertencentes a oito famílias e quinze gêneros. As amostragens foram realizadas em quatro corpos d'água pelo método de busca em sítios de reprodução, que possibilitou o encontro de 88% das espécies. A curva de acumulação de espécies apresentou variação ao final da amostragem, com riqueza estimada de 26±2,93. Os quatro habitats amostrados apresentaram alta diversidade e foram agrupados quanto a sua riqueza, sendo que ambientes mais heterogêneos possuíram maior número de espécies. A diversidade encontrada nos ambientes foi alta e pode ser resultado da localização da área em região ecotonal. A maioria dos machos vocalizou nos meses mais quentes e chuvosos e houve correlação positiva entre abundância e riqueza com dados abióticos. O uso de sítios de vocalização foi avaliado através do estabelecimento de alguns fatores e apesar da alta similaridade entre o uso dos substratos de vocalização, as espécies apresentaram segregação quanto ao uso do espaço horizontal e vertical. Os hilídeos apresentaram segregação espacial nas dimensões horizontais e verticais, enquanto que os não hilídeos segregaram apenas horizontalmente.

Palavras chave: anurofauna, comunidade, sazonalidade, Mata Atlântica.

Introdução

A perda e a fragmentação de habitats ocasionada por exploração de recursos naturais constituem a maior ameaça para a diversidade (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). O modo de vida dos anuros, caracterizado pela transição entre ambientes durante seu desenvolvimento, juntamente com a grande diversidade de modos reprodutivos que exibem, os relacionam intimamente com o meio e os expõe a praticamente todos os tipos de habitats (DUELLMAN & TRUEB, 1986; HADDAD & PRADO, 2005; WELLS, 2007).

Devido à alta dependência dos anuros das características físicas do meio, tem-se observado que os fatores abióticos, como o regime de chuvas, heterogeneidade da vegetação e temperatura, possuem maior efeito na estruturação de comunidades do que os fatores ecológicos, como competição e predação (PARRIS, 2004; WELLS, 2007; WERNER *et al*., 2007; VASCONCELOS *et al*., 2009).

Das 877 espécies de anfíbios registradas no Brasil (SBH, 2010), mais de 400 ocorrem na Mata Atlântica (TOLEDO *et al*., 2008) com alta taxa de endemismo (DUELLMAN, 1999). Todavia, atualmente o bioma pode ser considerado como um dos ecossistemas mais devastados e seriamente ameaçados do mundo (MYERS *et al*., 2000), o que por sua vez tem efeito negativo na sobrevivência de várias espécies, diminuindo a diversidade, a abundância e impactando fortemente as populações de anuros (TOCHER *et al*., 1997).

Considerando a importância ecológica dos Anura e da Mata Atlântica, os estudos com taxocenoses de anuros nos domínios do bioma no Paraná ainda são poucos (BERNARDE & ANJOS, 1999; MACHADO *et al*., 1999; BERNARDE & MACHADO, 2000; MACHADO & BERNARDE, 2002; CONTE & MACHADO, 2005; CONTE & ROSSA-FERES, 2006 e 2007; ARMSTRONG & CONTE, 2010; CUNHA *et al*., 2010). Esse panorama de carência de conhecimento sobre a distribuição das espécies e estrutura de comunidades no Paraná é um aspecto negativo que dificulta o planejamento e tomada de decisões sobre medidas de conservação do grupo (GARCIA & VINCIPROVA, 2003; SILVANO & SEGALLA, 2005). Dessa

maneira, o presente estudo teve como objetivo geral determinar a estrutura espacial e temporal de uma comunidade de Anura em uma região de transição vegetacional. Especificamente foi realizado o levantamento, riqueza, uso de habitats e distribuição sazonal em uma área de Mata Atlântica no município de Quatro Barras, no Paraná.

Material e Métodos

Área de Estudo

O estudo foi desenvolvido na Reserva Ambiental Serelepe (25°21’44’’S,48°59’28’’W) localizada no Município de Quatro Barras, Região Metropolitana de Curitiba, Paraná (Figura 1). A área possui 110 hectares com altitude média de 900 m e está situada no limite norte do Parque Estadual Serra da Baitaca (Morro do Anhangava). O clima pode ser caracterizado como subtropical úmido mesotérmico (Cfb de Köppen) com ocorrência de geadas severas e freqüentes.

A área de estudo encontra-se em região ecotonal entre Floresta Ombrófila Densa (FOD) e Floresta Ombrófila Mista (FOM), sendo constituída, portanto, de diferentes composições florísticas destas duas formações (VELOSO *et al.*, 1991; RODERJAN *et al.*, 2002). Historicamente no local de estudo foram desenvolvidas atividades de extrativismo mineral e vegetal, agricultura extensiva e pequenas edificações, o que resultou na degradação do ambiente. A área está em recuperação natural há mais de 20 anos, permitindo uma caracterização, de maneira geral, de formações de capoeira (fase inicial arbórea), capoeirão (fase intermediária) e poucas áreas de formação secundária.

Coleta de dados

Foram realizadas 12 visitas com freqüência mensal, cada fase com duração de três dias, entre agosto de 2009 e julho de 2010, totalizando 165 horas/pessoa de esforço amostral.

Quatro corpos d’água foram selecionados na área de estudo, em regiões principalmente de capoeira, que possuem habitats propícios para a reprodução dos anuros (Figura 1):

Ponto 1 – P1 – duas lagoas artificiais com formato ovalado, utilizadas no passado para a criação de peixes, conectadas por um pequeno curso de água. As margens das lagoas são planas, cimentadas (cerca de 50 cm) e recobertas por vegetação herbácea e arbustiva após esta estrutura. No interior são encontrados troncos caídos e há vegetação arbórea, com associação de epífitas, cercando o perímetro das lagoas.

Ponto 2 – P2 – lagoa natural com forma arredondada conectada a um pequeno córrego e localizada em uma clareira. Nesta lagoa as margens são planas e recobertas por vegetação herbácea e arbustiva, com agrupamentos de herbáceas e macrófitas no espelho d'água. Todo o perímetro é cercado por formação arbórea pouco densa.

Ponto 3 – P3 – lagoa de formato irregular formada por represamento de córrego d'água. Com margens planas, recobertas de vegetação herbácea, arbustiva e arbórea e solo recoberto por serapilheira. Em seu interior há muitos troncos caídos, vegetação seca e grande quantidade de macrófitas. Fica inserida em uma região com alta densidade de vegetação arbórea.

Ponto 4 - P4 – lagoa de contorno irregular formada pelo represamento de um pequeno córrego. As margens são acidentadas com alternância entre porções planas e barrancos, onde existe grande quantidade de vegetação seca e plantas aquáticas. Todo o perímetro é cercado, desde a margem, por vegetação predominantemente arbustiva e arbórea.

Durante o mês de março, as lagoas dos pontos 3 e 4 ficaram sem água, devido ao rompimento acidental da barragem que as formava. Em abril, no entanto, a barragem foi restabelecida e o nível da água voltou ao normal.

A amostragem de espécies foi realizada pelo método de procura em sítio de reprodução (*sensu* SCOTT & WOODWARD, 1994) no qual o perímetro de cada corpo d'água foi percorrido lentamente e as espécies foram registradas pela vocalização ou pelo registro visual. Para cada dia de amostragem, a ordem dos pontos foi escolhida mediante sorteio, sendo que cada corpo d'água era vistoriado duas vezes por noite. Foram realizadas visitas ocasionais diurnas e realização de busca ativa pelas espécies (não padronizada) a fim de auxiliar no inventário.

A abundância das espécies foi considerada como o maior número de indivíduos contabilizados para cada noite de amostragem (GOOTTSBERGER & GRUBER, 2004). A abundância mensal de cada espécie foi considerada igual a da noite com maior abundância, enquanto que a abundância total para cada corpo d'água foi considerada como a maior contagem de indivíduos registrada durante o período de estudo (BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002).

Exemplares testemunhos foram depositados na Coleção Científica de Amphibia do Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista, Campus São José do Rio Preto, São Paulo.

Análises estatísticas

Para avaliar a eficiência da amostragem, foi construída a curva de acumulação de espécies de acordo com a ocorrência mensal (presença e ausência) dos táxons registrados por todos os métodos de amostragem (COLWELL, 2006).

A relação entre os quatro pontos amostrados no presente estudo foi determinada pelo índice de similaridade de Jaccard (C_j) com a construção de dendrograma por análise de agrupamento com o algoritmo UPGMA (KREBS, 1999). Também foram calculados índices de diversidade de Shannon-Wiener (H' – log base e) e de equitabilidade (e) de Pielou para cada ambiente (KREBS, 1999). A diversidade teórica máxima foi obtida pelo logaritmo da riqueza de cada ponto amostrado, segundo Krebs (1999). Para análise de abundância de cada espécie foi considerado o mês com a maior contagem de machos cantores. A diversidade foi considerada alta quando: H'≥1,0; e≥0,7 e H'≥70% H'máx (CONTE & ROSSA-FERES, 2006).

As relações entre riqueza e abundância de machos cantores com as variáveis abióticas foram determinadas por análise de correlação (ZAR, 1999). Foram consideradas as médias para cada fase de temperaturas (da água e do ar) e de umidade relativa do ar, assim como os valores de precipitação do dia anterior a cada coleta. Dados referentes a cada fase de campo (temperatura do ar e água, e umidade relativa) foram obtidos em campo com termo-

higrômetro e dados diários de precipitação foram fornecidos pelo Instituto Tecnológico SIMEPAR.

O uso de sítios de vocalização foi analisado nos quatro pontos amostrados, através da determinação dos fatores: 1) tipo de substrato - vegetação herbácea, arbustiva ou arbórea, bromélias, pteridófitas, solo ou serapilheira, parcialmente submerso ou flutuando em corpo d'água; 2) altura de empoleiramento – medida dos machos empoleirados na vegetação durante a atividade de vocalização; 3) posição com relação à margem – distância do macho cantor até a margem ou a ocupação do interior do corpo d'água.

A distribuição espacial dos anuros para cada ambiente amostrado foi analisada pelo Índice de Similaridade de Morisita-Horn (C_H), com posterior agrupamento por UPGMA (KREBS, 1999). Para avaliar a representatividade das matrizes de similaridade, foi utilizado o coeficiente de correlação cofenético (r), sendo considerados adequados $r \geq 8$. Foram consideradas para esta análise as espécies que apresentaram no mínimo cinco observações para cada ambiente (ROSSA-FERES & JIM, 2001). Para pares de espécies com elevada similaridade foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) a fim de verificar a diferença na utilização do habitat quanto à altura de empoleiramento e posição em relação ao corpo d'água – dentro ou fora (distância até a margem).

A fim de homogeneizar as amostras e reduzir a variância dos dados, os valores de temperaturas e precipitação foram logaritmizados. Dados referentes aos valores de umidade relativa foram transformados com arcoseno a fim de linearizar suas proporções. O número de machos cantores registrados por noite foi transformado com [log(x+1)] e a riqueza por ($\sqrt{x}$+0,5) (ZAR, 1999).

As análises estatísticas foram realizadas com os softwares EstimateS (COLWELL, 2006) e PAST 2.01 (HAMMER *et al*., 2001).

Resultados

Composição de espécies

No presente estudo, 26 espécies foram registradas pertencentes a oito famílias e quinze gêneros: Brachycephalidae, Bufonidae, Cycloramphidae, Hylidae, Hylodidae, Leiuperidae, Leptodactylidae e Ranidae. A família Hylidae apresentou a maior riqueza, com 14 espécies, enquanto que as famílias Brachycephalidae, Cycloramphidae, Hylodidae e Ranidae tiveram os menores números de representantes, cada uma com uma espécie (Tabela I e Figura 2).

A curva de acumulação de espécies, construída em função da ocorrência mensal das espécies não tendeu a uma assíntota, mostrando variação ao final das amostragens, com riqueza estimada de 26±2,93 (Figura 3). A amostragem em sítios de reprodução possibilitou o levantamento de 88% das espécies encontradas neste estudo. As demais espécies foram registradas em encontros ocasionais e por busca ativa não padronizada.

A análise espacial entre os pontos amostrados separou os ambientes em dois grandes grupos, um formado somente por P1 e outro formado por P2+P3+P4 (Figura 4). Os pontos que apresentaram maior similaridade entre si foram P3 e P4 (C_j=0,84).

A diversidade de espécies, calculada pelo índice de Shannon-Wiener (H') variou entre 1,62 e 2,62, enquanto a equitabilidade (e) variou entre 0,66 e 0,86 (Tabela II). Em todos os pontos a diversidade teórica máxima foi maior que 80%. Os ambientes P3 e P4 possuem maior riqueza, ambos com 16 espécies cada, e os maiores valores de diversidade. No entanto, mesmo possuindo riqueza idêntica, o valor do índice de diversidade em P4 foi menor do que em P3 (Tabela II) em conseqüência da maior uniformidade na abundância das espécies encontrado em P3 (e=0,86).

Distribuição temporal

Das 26 espécies registradas no presente estudo, 19 foram encontradas em atividade de vocalização (Tabela III), a maioria durante a noite. Os meses mais quentes e com maiores precipitações apresentaram maior número e abundância de espécies vocalizando (Figura 5 e

6). O contrário também pode ser observado, em que menos espécies em atividade de vocalização foram encontradas entre abril e julho, meses mais frios e com menores valores de precipitação acumulada. A umidade relativa do ar manteve-se sem muitas variações ao longo do estudo.

Houve correlação positiva entre o número de espécies em atividade de vocalização com as temperaturas da água ($r=0,40$; $p<0,05$), do ar ($r=0,65$; $p<0,05$) e com a precipitação ($r=0,52$; $p<0,05$), mas não com a umidade relativa do ar ($r=0,20$; $p>0,05$) (Tabela IV). A abundância total das espécies foi positivamente correlacionada com todos os fatores abióticos: temperatura da água ($r=0,56$; $p<0,005$), temperatura do ar ($r=0,43$; $p<0,05$), precipitação ($r=0,47$; $p<0,05$) e umidade relativa do ar ($r=0,54$; $p<0,005$) (Tabela IV).

Distribuição espacial

A análise de agrupamento em P1 separou o hilídeo *Scinax perereca*, que utilizou vários tipos de vegetação como substrato, dos não hilídeos *Physalaemus lateristriga* e *Proceratophrys boiei* que vocalizaram na maioria das vezes no chão sobre serapilheira. Estas duas últimas espécies apresentaram elevada similaridade ($C_H=0,97$) no uso de substrato (Figura 7), porém diferiram em suas distâncias das margens ($\chi^2=13,816$; $gl=2$; $p<0,0001$), em que *P. lateristriga* utilizava áreas mais próxima dos corpos d'água do que *Proceratophrys boiei* (Tabela V).

No ponto 2 as espécies foram divididas em dois grandes grupos com relação ao uso de substrato de vocalização, um relativo às espécies que ocuparam predominantemente herbáceas e plantas aquáticas (*Hypsiboas bischoffi* e *S.* aff. *alter*) e outro composto pelas espécies que vocalizaram com corpo parcialmente submerso (*Hypsiboas prasinus* e *Rhinella abei*) (Figura 8). A maior similaridade ($C_H=0,82$) foi encontrada entre *Hypsiboas prasinus* e *Rhinella abei*, mas que, no entanto, diferiram nas distâncias de vocalização das margens ($\chi^2=13,816$; $gl=2$; $p<0,0001$). *Rhinella abei* ocorreu exclusivamente dentro da lagoa enquanto *H. prasinus* apresentou maior amplitude de ocupação, ocorrendo desde o chão até 1 m de altura (Tabela

V). As duas espécies também vocalizam em alturas diferentes (χ^2=10,828; gl=1; p<0,001). *Rhinella abei* vocalizou preferencialmente na lâmina d'água enquanto que *H. prasinus* utilizou várias alturas de empoleiramento (Tabela V).

Para P3, das 16 espécies que vocalizaram, seis foram avaliadas quanto à distribuição espacial. A análise de agrupamento separou primeiramente *Physalaemus lateristriga* das outras cinco espécies. Subsequentemente, *Scinax perereca* foi separada dos demais hilídeos, seguida de *Dendropsophus microps* (Figura 9). As espécies com maior similaridade no uso do substrato de vocalização foram *Dendropsophus minutus* e *Sphaenorhynchus* sp. (C_H=0,94). A sobreposição espacial dessas espécies não foi total, porque diferiram na altura de empoleiramento (χ^2=13,816; gl=2; p<0,001), onde *D. minutus* ocorreu exclusivamente entre 1 e 50 cm enquanto que *Sphaenorhynchus* sp. vocalizou em um espectro mais amplo de espaço (Tabela V).

O ponto 4 foi o ambiente para o qual mais espécies foram avaliadas quanto ao uso de sítios de vocalização. Da mesma forma que para P3, *Physalaemus lateristriga* foi separada dos hilídeos no primeiro momento do agrupamento. Posteriormente, formaram-se dois grandes grupos, como mostrado na figura 10. O par de espécies com maior similaridade (C_H=0,94) foi formado por *Dendropsophus minutus* e *Hypsiboas prasinus* que não apresentaram diferença quanto à utilização da parte interna ou externa da lagoa (χ^2=2,706; gl=1; p=0,11). No entanto, houve segregação espacial quanto a altura de empoleiramento (χ^2=13,816; gl=2; p<0,001), para o qual, *D. minutus* apresentou maior amplitude (Tabela V). *Hypsiboas bischoffi* e *Phyllomedusa distincta* também foram bastante similares na utilização do substrato (C_H=0,90), porém apresentaram diferenças quanto a altura de empoleiramento (χ^2=16,266; gl=3; p<0,001) e distância da margem da lagoa (χ^2=18,467; gl=4; p<0,001) (Tabela V).

Discussão

Composição de espécies

Das 26 espécies encontradas, 11 foram exclusivas deste estudo para a região de Quatro Barras (e.g. BERNARDE & MACHADO, 2000). A riqueza de espécies de anuros obtida pelos resultados do presente estudo representa cerca de 20% da anurofauna conhecida para o Paraná, se considerarmos que o Estado tem mais de 130 espécies registradas (e.g. SEGALLA & LANGONE, 2004; RIBEIRO *et al*., 2005; ALVES *et al*., 2006, TOLEDO *et al*., 2007; STEINBACH-PADILHA, 2008; CONTE *et al*., 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Este número de espécies é considerado alto para regiões de Floresta Ombrófila Mista e pode ser resultado de sua localização em região ecotonal, assim como ocorre em São José dos Pinhais (CONTE & ROSSA-FERES, 2006).

A família Hylidae foi a que apresentou o maior número de espécies, o que já foi constatado para diferentes áreas do bioma Mata Atlântica (HADDAD & SAZIMA, 1992; POMBAL & GORDO, 2004; VASCONCELOS & ROSSA-FERES, 2005; CONTE & ROSSA-FERES, 2006; ARMSTRONG & CONTE, 2010) além de ser considerado um padrão para a região Neotropical (HEYER *et al*., 1990; DUELLMAN, 1988).

A curva de acumulação de espécies mostrou variação no final das fases de campo, o que indica que mais espécies podem ser amostradas na área de estudo. A amostragem em sítios de reprodução permitiu o levantamento de 88% das espécies. Embora a riqueza encontrada seja alta, a utilização de outros métodos poderia ter aumentado a eficiência de encontro dos anuros, principalmente de espécies com desenvolvimento direto (e.g. CONTE & ROSSA-FERES, 2006; CUNHA *et al*., 2010). Além disso, algumas espécies dificilmente são encontradas por busca em sítios de vocalização devido aos seus padrões reprodutivos explosivos, em que os machos vocalizam poucos dias por ano (WELLS, 2007).

A heterogeneidade ambiental possui um papel importante na determinação do número de espécies que são capazes de utilizar determinado ambiente e na estruturação de

comunidades (CARDOSO *et al*., 1989; HUSTON, 1994). Vários estudos tem demonstrado que ambientes complexos e heterogêneos facilitam a coexistência de mais espécies quando comparados a ambientes homogêneos (CONTE & ROSSA-FERES, 2007; SANTOS *et al*., 2007; VASCONCELOS *et al*., 2009). Assim, diferenças na composição da comunidade entre os quatro ambientes amostrados podem ser explicadas pelas distinções na heterogeneidade ambiental de cada ponto. Os pontos 3 e 4 apresentaram maior similaridade de anurofauna e maior riqueza. Estes pontos são os mais semelhantes entre si e possuem a maior variedade de microambientes para a ocorrência dos anuros. Por ficarem inseridos em um local mais protegido pela mata, estes ambientes podem também oferecer melhores condições para a reprodução das espécies (e.g. HADDAD & PRADO, 2005; CONTE & ROSSA-FERES, 2006, CUNHA *et al*., 2010). O ponto 2, mesmo com a considerável variedade de microambientes, é mais homogêneo devido a distância maior que há entre a lagoa e a mata.

P1 foi o ponto mais distinto e que apresentou menor riqueza. Com relação à fisionomia vegetal, também pode ser considerado o mais diferente e o menos heterogêneo, principalmente por ser um local artificial e que oferece menor variedade de microambientes para a ocupação das espécies. Mesmo assim, oferece condições para a ocorrência e reprodução de alguns anuros, como é o caso de *Scinax catharinae* que utilizou somente este ambiente para a reprodução.

É importante também salientar que no ponto 1 foi registrada a ocorrência de *Lithobates cathesbeianus*, uma espécie exótica invasora que atualmente ocupa várias regiões da Mata Atlântica (GIOVANELLI *et al*., 2007). Esta espécie pode ser considerada uma forte ameaça às populações de anuros (ALFORD & RICHARDS, 1999) principalmente por se comportar como predadora (TOLEDO *et al*., 2007).

A diversidade estimada no presente estudo pode ser considerada alta, pois foi maior que 80% da diversidade teórica máxima em todos os ambientes. A alta diversidade pode ser interpretada como resultado da localização da área de estudo em região ecotonal. Ecótones

são considerados como portadores de paisagens dinâmicas com grande oferta de habitats para diversos organismos, com potencial para manter maior diversidade que áreas adjacentes, abrigando organismos tanto das regiões próximas quanto seres característicos de ambiente ecotonal (ODUM, 2004). Este é um fenômeno bastante notado em diferentes tipos de comunidades, que geralmente se apresentam mais densas e mais diversas na zonas transicionais (e.g. NAIMAN *et al*., 1989; SENFT, 2009)

Distribuição temporal

Fatores abióticos exercem grande influência na atividade reprodutiva dos anuros (DUELLMAN & TRUEB, 1994; WELLS, 2007). Em regiões tropicais úmidas que não apresentam sazonalidade bem marcada entre 11 e 16% das espécies se reproduzem ao longo do ano (BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002), diferentemente do que ocorre em regiões tropicais com chuvas sazonais em que as espécies reproduzem-se preferencialmente na estação chuvosa (DUELLMAN, 1978; PRADO *et al*., 2005).

Fatores climáticos tais como quantidade de precipitação e temperatura da água influenciam fortemente a temporada de vocalização e os padrões reprodutivos (DUELLMAN & TRUEB 1994; SAENZ *et al*., 2006). No entanto, a temperatura possui importância secundária na regulação da atividade reprodutiva de anuros tropicais (HEYER, 1973).

As maiores riquezas e abundâncias de espécies em atividade de vocalização de Quatro Barras ocorreram durante os meses mais quentes e chuvosos do ano. Mesmo não havendo sazonalidade bem marcada, as baixas temperaturas aliadas às menores precipitações inibiram a atividade de vocalização da maioria das espécies nos meses de junho e julho. Este padrão também foi encontrado para outras regiões de Mata Atlântica (HEYER *et al*., 1990; POMBAL, 1997; BERNARDE & ANJOS, 1999; TOLEDO *et al*., 2003; CONTE & MACHADO, 2005; CONTE & ROSSA-FERES, 2006). O padrão de distribuição temporal das espécies encontradas em Quatro Barras é semelhante ao encontrado por Conte e Rossa-Feres (2006) em São José dos Pinhais e pode ser considerado como intermediário entre regiões sazonais e regiões tropicas úmidas.

A perda da água dos pontos 3 e 4 pode ter afetado o registro de espécies vocalizando e suas abundâncias. As figuras 5 e 6 mostram uma diminuição da riqueza e abundância em março, o que poderia ser explicado pelas quedas de temperaturas e precipitação. Todavia, as médias registradas para esse mês são semelhantes as do mês anterior (fevereiro), que possui valores maiores de abundância e riqueza. Os resultados obtidos para março, portanto, podem ter sido influenciados por ambos os acontecimentos.

Distribuição espacial

As espécies que vocalizaram nos ambientes amostrados apresentaram, de maneira geral, baixa sobreposição no uso do sítio de vocalização. Mesmo quando o substrato utilizado foi muito similar entre duas espécies, houve segregação de altura do poleiro ou quanto à posição em relação aos corpos d'água. Segregações nos sítios de vocalização foram encontradas em outros estudos (HÖDL, 1977; BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002) e podem estar relacionadas aos modos reprodutivos das espécies (e.g. HADDAD & PRADO, 2005).

As espécies que vocalizaram em sua maioria sobre o solo ou serapilheira apresentaram segregação espacial na dimensão horizontal, como observado em outros estudos (PRADO & POMBAL, 2005; CONTE & ROSSA-FERES, 2007). Já os hilídeos, de maneira geral, tiveram diferenças no uso de sítios de vocalização em ambas as dimensões, horizontal e vertical. Por possuírem discos adesivos estes anuros podem ocupar o habitat de maneira vertical, o que favorece a segregação espacial, podendo ainda ser um dos fatores para que hilídeos constituam a maior parte da diversidade em taxocenoses (CARDOSO *et al.*, 1989; POMBAL, 1997).

A distribuição espacial dos membros da família Hylidae é influenciada também pelo tamanho e massa dos indivíduos (HÖDL, 1977) sendo que as espécies grandes e pesadas geralmente vocalizam sobre o chão ou sobre poleiros mais resistentes, enquanto que as espécies menores utilizam principalmente ramos e folhas de vegetação herbácea emergente ou marginal (HÖDL, 1977; POMBAL, 1997; PRADO & POMBAL, 2005). Em Quatro Barras este

mesmo padrão pode ser observado, para o qual espécies maiores (*Aplastodiscus albosignatus*, *Hypsiboas bischoffi*, *H. faber*, *H. prasinus* e *Scinax perereca*) utilizaram por mais vezes substratos mais robustos como arbustos, árvores ou estiveram em água com o corpo apoiado em vegetação, enquanto que espécies de tamanho reduzido (*Dendropsophus microps*, *D. minutus* e *Sphaenorhynchus* sp.) utilizaram preferencialmente vegetação herbácea terrestre ou aquática. Da mesma forma como o observado por Rossa-Feres e Jim (2001), a sobreposição no uso das características ambientais como distância da margem, altura e tipo de substrato teve maior relação com o tamanho corporal do que com o nível de parentesco das espécies.

Considerações Finais

A taxocenose estudada apresenta cerca de 20% das espécies registradas para o Paraná. Por estar inserida em uma região ecotonal entre FOM e FOD, a riqueza e a diversidade de Quatro Barras foram consideradas altas, mostrando que a localidade, mesmo que em fase de regeneração, proporciona ambientes propícios para vários anuros. A utilização do método de busca em sítios de reprodução permitiu o registro de 88% dos táxons e a curva de acumulação de espécies indicou que mais anuros podem ser encontrados na região, o que pode servir de incentivo para o desenvolvimento de mais estudos de anurofauna em novas localidades.

Os dados deste estudo também mostram que a atividade dos anuros é influenciada pelos fatores abióticos e que a taxocenose de Quatro Barras possui um padrão de distribuição temporal intermediário entre regiões sazonais e regiões tropicais úmidas. Mesmo quando as espécies sobrepuseram sua distribuição temporal, houve segregação e diferenciação quanto ao uso do sitio de vocalização, ou ainda quanto à distância do macho da lagoa ou altura de empoleiramento. Todos os tipos de segregação demonstram como ocorre a estruturação desta taxocenose de anuros.

Literatura Citada

ALFORD, R. A. & S. J. RICHARDS. 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 30:133-165.

ALVES, A. C. R., L. F. RIBEIRO, C. F. B. HADDAD & S. F. REIS. 2006. Two new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from the Atlantic Forest in Paraná State, Southern Brazil. **Herpetologica** 62 (2): 221-233.

ARMSTRONG, C. G. & C. E. CONTE. 2010. Taxocenose de anuros (Amphibia:Anura) em uma área de Floresta Ombrófila Densa no sul do Brasil. **Biota Neotropica** 10 (1): 39-46.

BERNARDE, P. S. & L. ANJOS. 1999. Distribuição espacial e temporal da anurofauna do Parque estadual Mata dos Godoy, Londrina, Paraná, Brasil. **Comunicaçõs do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS** 12: 127-140.

BERNARDE, P. S. & R. A. MACHADO. 2000. Riqueza de espécies, ambientes de reprodução e temporada de vocalização da anurofauna em Três Barras do Paraná, Brasil (Amphibia: Anura). **Cuadernos de Herpetología** 14 (2): 93-104.

BERTOLUCI, J. & J. T. RODRIGUES. 2002. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia** 23: 161-167.

CARDOSO, A. J., G. V. ANDRADE & C.F.B. HADDAD. 1989. Distribuição espacial em comunidades de anfíbios (Anura) no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia** 49 (1): 241-249.

COLWELL, R. K. 2006. **EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8**. Available online at: http:purl.oclc.org/estimates. [Access at: November, 10th, 2010].

414 CONTE, C. E. & R. A. MACHADO. 2005. Riqueza de espécies e distribuição espacial e temporal
415 em comunidade de anuros (Amphibia, Anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná,
416 Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 22 (4): 940-948.

417 CONTE, C. E. & D. C. ROSSA-FERES. 2006. Diversidade e ocorrência da anurofauna
418 (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**
419 23 (1): 162-175.

420 CONTE, C. E. & D. C. ROSSA-FERES. 2007. Riqueza e distribuição espaço-temporal de anuros
421 em um remanescente de Floresta de Araucária no sudeste do Paraná. **Revista Brasileira de**
422 **Zoologia** 24 (4): 1025-1037.

423 CONTE, C. E., M. V. GAREY, R. LINGNAU, M. X. SILVA, C. ARMSTRONG & M. T. HARTMANN.
424 2009. Amphibia, Anura, *Limnomedusa macroglossa*, *Dendropsophus anceps*, *D.*
425 *berthalutzae*, *D. seniculus*, *Scinax littoralis*: New state records, distribution extension, and
426 filling gaps. **Check List** 5 (2): 202-209.

427 CUNHA, A. K., I. S. OLIVEIRA & M. T. HARTMANN. 2010. Anurofauna da Colônia Castelhanos,
428 na Área de Proteção Ambiental de Guaratuba, Serra do Mar paranaense, Brasil. **Biotemas**
429 23(2): 123-134.

430 DUELLMAN, W., E. 1978. The Biology of an Equatorial Herpetofauna in Amazonian Ecuador.
431 Miscellaneous Publication of Museum of Natural History of University of Kansas 65: 1-352.

432 DUELLMAN, W., E. 1988. Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American
433 tropics. **Annual of Missouri Botanical Garden** 75: 79-104.

434 DUELLMAN, W. E. & L. TRUEB. 1986. **Biology of amphibians**. New York, McGraw-Hill.

435 DUELLMAN, W. & L. TRUEB. 1994. **Biology of Amphibians**. Baltimore, The John Hopkins
436 University Press.

437 DUELLMAN, W. E. 1999. **Patterns of distribution of amphibians: a global perspective**.
438 Baltimore and London, The John Hpkins University.

439 GARCIA, P. C. & G. VINCIPROVA. 2003. Anfíbios, p. 85-100. In: C. S. FONTANA, G. A. BENCKE
440 & R. E. REIS (Eds.). **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do**
441 **Sul**. Porto Alegre, EDIPUCRS.

442 GIOVANELLI, J. G. R., C. F. B. HADDAD & J. ALEXANDRINO. 2007. Predicting the potential
443 distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil.
444 **Biological Invasions** 10: 585- 590.

445 GOOTTSBERGER, B. & E. GRUBER. 2004. Temporal partitioning of reproductive activity in a
446 neotropical anuran community. **Journal of Tropical Ecology** 20: 271-280.

447 HADDAD, C. F. B. & I. SAZIMA, I. 1992. Anfíbios anuros da Serra do Japi, p. 188-211. In: L. P.
448 C. MORELLATO (Ed.). **História Natural da Serra do Japi: Ecologia e preservação de uma**
449 **área florestal no Sudeste do Brasil. C**ampinas, UNICAMP.

450 HADDAD, C. F. B. & C. P. A. PRADO. 2005. Reproductive modes in frogs and therir
451 unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience** 55: 207-217.

452 HAMMER, O., D. A. T. HARPER & P. D. RYAN. 2001. PAST: Paleontological Statistics software
453 package for education and data analysis. Version 2.01. **Paleontologia Electronica** 4 (1): 1-9.

454 HEYER, W. R. 1973. Ecological interactions of frog larvae at a seasonal tropical location in
455 Thailand. .**Journal of Herpetology** 7 (4): 337-361.

456 HEYER, W. R., A. S. RAND, C. A. G. CRUZ, O. L. PEIXOTO & C. E. NELSON. 1990. Frogs of
457 Boracéia. **Arquivos de Zoologia 31**: 231-410.

458 KREBS, C. 1999. **Ecological Methodology**. Melo Park: Addison Wesley, Longman.

459 HÖDL,W. 1977. Call differences and calling site segregation in anuran species from Central
460 Amazonian floating meadows. **Oecologia** 28: 351-363.

461 HUSTON, M. A. 1994. **Biological diversity: the coexistence of species on changing**
462 **landscapes**. Cambridge, Cambridge University.

463 MACHADO, R. A. & P. S. BERNARDE. 2002. Anurofauna da Bacia do Rio Tibagi, p. 297-306.
464 In: M. E. MEDRI, E. BIANCHINI, O. A. SHIBATTA & J. A. PIMENTA (Eds.). **A bacia do rio**
465 **Tibagi .** Londrina, Dos Autores.

466 MACHADO, R. A., P. S. BERNARDE, S. A. A. MORATO & L. ANJOS. 1999. Análise comparada
467 da riqueza de anuros entre duas áreas com diferentes estados de conservação no município de
468 Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 16 (4): 997-1004.

469 MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, G. A. FONSECA & J. KENT. 2000. Biodiversity hotspots for
470 conservation priorities. **Nature** 403: 853-858.

471 NAIMAN, R. J., H. DÉCAMPS & F. FOURNIER. 1989. Ecotone functions, p. 20-43. In: NAIMAN,
472 R. J., H. DÉCAMPS & F. FOURNIER (Eds.). **The role of land/inland water ecotones in**
473 **landscape management and restoration: a proposal for collaborative research**. Paris,
474 Unesco.

475 ODUM, E. P. 2004. **Fundamentos de Ecologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
476 OLIVEIRA, A. K. C., I. S. OLIVEIRA, M. T. HARTMANN, N. R. SILVA & L. F. TOLEDO. 2011.
477 Amphibia, Anura, Brachycephalidae, *Brachycephalus hermogenesi* (Giaretta and Sawaya,
478 1998): new species record in the state of Paraná, southern Brazil and geographic distribution
479 map. **Check List** 7 (1): 17-18.

480 PARRIS, K. M. 2004. Environmental and spatial variables influence the composition of frog
481 assemblages in sub-tropical eastern Australia. **Ecography** 27: 392-400.

POMBAL JR., J. P. 1997. Distribuição espacial e temporal de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia** 57: 583-594.

POMBAL JR., J. P. & M. GORDO. 2004. Anfíbios anuros da Juréia, p. 243-356. In: O. A. V. MARQUES & W. DULEBA (Eds). **Estação Ecológica Juréia Itatins: Ambiente físico, flora e fauna.** Ribeirão Preto, Holos.

PRADO, C. P. A., M. UETANABARO & C. F. B. HADDAD. 2005. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brasil. **Amphibia-Reptilia** 26: 211-221.

PRADO, G. M. & POMBAL JR, J. P. 2005. Distribuição espacial e temporal dos anuros em um brejo da reserva biologica de duas bocas, sudeste do Brasil. **Arquivos do Museu Nacional** 63 (4): 685-705.

PRIMACK, R. B. & E. RODRIGUES. 2001. **Biologia da Conservação**. Londrina, Planta.

RIBEIRO, L. F., A. C. R. ALVEZ, C. F. B. HADDAD & S. F. REIS. 2005. Two new species of *Brachycephalus* Günther, 1858 from the state of Paraná, Southern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae).**Boletim do Museu Nacional, Zoologia** 519: 1-18.

RODERJAN, C. V., F. GALVÃO, Y. S. KUNIYOSHI & G. G. HATSCHBACH. 2002. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná. **Revista & Ambiente** 24: 78-118.

ROSSA-FERES, D. C. & J. JIM. 2001. Similaridade do sítio de vocalização em uma comunidade de anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 18 (2): 439-454.

SAENZ, D., L. A. FITZGERALD, K. A. BAUM & R. N. CONNER. 2006. Abiotic correlates of anuran calling phenology: the importance of rain, temperature, and season. **Herpetological Monographs** 20: 64-82.

SANTOS, T. G., D. C. ROSSA-FERES & L. CASATTI. 2007. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. **Iheringia** 97(1): 37-49.

SBH. 2010. **Brazilian amphibians - list of species**. Available online at: http://www.sbherpetologia.org.br. [Access at: December, 20th, 2010].

SCOTT JR, N. J. & B. D. WOODWARD. 1994. Surveys at breeding sites, p. 84-92. In: W. R. HEYER, M. A. DONNELLY, R. W. MCDIARMID, L. A. HAYEK & M. S. FOSTER (Eds.) **Measuring and monitoring biological diversity - Standard methods for amphibians**. Washington D. C., Smithsonian Institution Press.

SEGALLA, M. V. & J. A. LANGONE. 2004. Anfíbios, p. 537-577. In: S. B. Mikich & R. S. Bérnils (Eds.). **Livro vermelho da fauna ameaçadas no estado do Paraná**. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná.

SENFT, A. R. **Species diversity patterns at ecotones**. Dissertação de Mestrado (p. 55) Chapel Hill: University of North Carolina.

SILVANO, D. L. & M. V. SEGALLA. 2005. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade** 1: 79-86.

STEINBACH-PADILHA, G. C. 2008. A new species of *Melanophryniscus* (Anura, Bufonidae) from the Campos Gerais region of Southern Brazil. **Phyllomedusa** 7 (2): 99-108.

TOCHER, M. D., C. GASCON & B. ZIMMERMAN. 1997. Fragmentation effects on a Central Amazonian frog community, p. 124-137. In: W. F. LAURANCE & R. O. BIERREGAARD JR.

(Eds.). **Tropical forest remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities**. Chicago, University of Chicago Press.

TOLEDO, L. F., J. ZINA & C. F. B. HADDAD. 2003. Distribuicao espacial e temporal de uma comunidade de anfibios anuros no municipio de Rio Claro, São Paulo, Brasil. **Holos Environment** 3(2): 136-149.

TOLEDO, L. F., GARCIA, P. C. A., R. LINGNAU, C. F. B. HADDAD. 2007. A new species of *Sphaenorhynchus* (Anura; Hylidae) from Brazil. **Zootaxa** 1658: 57-68.

TOLEDO, L. F., R. S. RIBEIRO & C. F. B. HADDAD. 2007. Anuran as a prey: an exploratory analysis and size relationships between predators and their prey. **Journal of Zoology** 271: 170-177.

TOLEDO, L. F., C. F. B. HADDAD & C. P. A. PRADO. 2008. **Anfíbios da Mata Atlântica**. Pinheiros, Neotropica.

VASCONCELOS, T. S. & D. C. ROSSA-FERES. 2005. Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (Amphibia, Anura) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica** 5 (2): 1-14.

VASCONCELOS, T. S., T. G. SANTOS, D. C. ROSSA-FERES & C. F. B. HADDAD. 2009. Influence of the environmental heterogeneity of breeding ponds on anuran assemblages from southeastern Brazil. **Canadian Journal of Zoology** 87: 699-707.

VELOSO, H. P., A. I. RANGEL-FILHO & J. C. LIMA. 1991. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro, IBGE.

WELLS, K. D. 2007. **The ecology and behavior of amphibians**. Chigago, The University of Chicago Press.

548 WERNER, E. E., D. K. SKELLY, R. A. RELYEA & K. L. YUREWICZ. 2007. Amphibian species
549 richness across environmental gradients. **Oikos** 116: 1697-1712.

550 ZAR, J. 1999. **Biostatistical Analysis**. Upper Saddle River: Prentice Hall.

Tabelas

Tabela I. Espécies e Famílias de anfíbios anuros registradas em Quatro Barras, Paraná, Brasil, entre os meses de agosto de 2009 e julho de 2010. Ambientes de encontro das espécies - P1, P2, P3 e P4, com – representando ausência nos ambientes.

Famílias e Espécies	Ambiente
Brachycephalidae	
Ischnocnema guentheri (Steindachner, 1864)	P1,P3,P4
Bufonidae	
Rhinella abei (Baldissera, Caramaschi, and Haddad, 2004)	P2,P3,P4
Rhinella icterica (Spix, 1824)	-
Cycloramphidae	
Proceratophrys boiei (Wied-Neuwied, 1824)	P1,P2,P3,P4
Hylidae	
Aplastodiscus albosignatus (Lutz and Lutz, 1938)	P1,P2,P3,P4
Bokermannohyla circumdata (Cope, 1871)	P1, P2
Dendropsophus microps (Peters, 1872)	P3.P4
Dendropsophus minutus (Peters, 1872)	P2,P3,P4
Hypsiboas bischoffi (Boulenger, 1887)	P1,P2,P3,P4
Hypsiboas faber (Wied-Neuwied, 1821)	P2,P3,P4
Hypsiboas prasinus (Burmeister, 1856)	P1,P2,P3,P4
Scinax aff.a*lter*	P2,P3,P4
Scinax catharinae (Boulenger, 1888)	P1, P3
Scinax fuscovarius (Lutz, 1925)	-
Scinax perereca Pombal, Haddad, and Kasahara, 1995	P1,P2,P3,P4
Scinax rizibilis (Bokermann, 1964)	P3.P4
Sphaenorhynchus sp.	P2,P3,P4
Phyllomedusa distincta Lutz, 1950	P3.P4
Hylodidae	
Crossodactylus sp.	P1
Leiuperidae	
Physalaemus cuvieri Fitzinger, 1826	P2,P3,P4
Physalaemus lateristriga (Steindachner, 1864)	P1,P2,P3,P4
Leptodactylidae	
Leptodactylus latrans (Steffen, 1815)	P4
Leptodactylus gr. *marmoratus*	P2.P3
Leptodactylus notoaktites Heyer, 1978	P2
Paratelmatobius sp.	-
Ranidae	
Lithobates catesbeianus (Shaw, 1802)	P1

Tabela II. Valores de riqueza, diversidade (H’), equitabilidade (e), diversidade teórica máxima (H’máx.) e porcentagem da diversidade teórica máxima (%H’máx.) nos quatro ambientes amostrados em Quatro Barras, Paraná.

	Riqueza	H’	e	H’máx.	%H’máx.
P1	6	1,62	0,84	1,79	90%
P2	14	2,23	0,66	2,63	84%
P3	16	2,62	0,86	2,77	94%
P4	16	2,47	0,74	2,77	89%

Tabela III. Temporada de vocalização das espécies de anfíbios anuros registradas em Quatro Barras durante o período de estudo (agosto de 2009 a julho de 2010).

Espécies	2009						2010					
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
I. guentheri		■	■	■								
R.abei	■	■	■					■		■	■	
P. boiei	■	■	■	■								
A. albosignatus	■	■	■	■	■					■	■	
D. microps	■	■	■	■								
D. minutus	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	
H. bischoffi	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
H. faber			■	■	■	■	■	■				
H. prasinus	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
S. aff *alter*		■	■	■	■	■	■					
S. perereca	■	■	■	■	■	■	■				■	
S. rizibilis		■	■	■								
Sphaenorhynchus sp.	■	■	■	■	■	■	■	■				
P. distincta		■	■	■								
P. cuvieri			■	■	■	■						
P. lateristriga	■	■	■	■	■	■	■	■				
L. latrans				■		■	■					
L. gr. *marmoratus*				■								
L. notoaktites				■	■							

Tabela IV. Dados de correlação da riqueza e abundância das espécies de anuros registradas em Quatro Barras, Paraná, em atividade de vocalização com dados abióticos. Valores de $p \leq 0,05$ são significativos.

Dados abióticos	Riqueza		Abundância	
	r	p	r	p
Temperatura do ar	0,64	<0,0001	0,43	0,01
Temperatura da água	0,40	0,02	0,56	0,0008
Precipitação	0,52	0,002	0,47	0,006
Umidade relativa do ar	0,20	0,26	0,54	0,001

Tabela V. Abundância de machos das espécies de anuros distribuídos nas alturas de empoleiramento e nas distâncias até as margens dos corpos d'água, nos quatro ambientes amostrados em Quatro Barras, Paraná, entre agosto de 2009 e julho de 2010.

Espécie	Empoleiramento				Distância até a margem					
	0	1-50 (cm)	51-100 (cm)	> 101 (cm)	0	1-50 (cm)	51-100 (cm)	101-150 (cm)	150-200 (cm)	> 201 (cm)
P1										
P. boiei	6	0	0	0	0	0	1	1	1	3
P. lateristriga	6	1	0	0	0	6	1	0	0	0
S. perereca	0	17	6	2	0	0	9	8	5	3
P2										
H. bischoffi	8	60	9	0	24	19	6	10	8	10
H. prasinus	19	8	3	0	26	4	3	1	1	1
R.abei	8	0	0	0	8	0	0	0	0	0
S. aff *alter*	1	3	2	0	6	0	0	0	0	0
P3										
D. microps	1	35	2	2	29	10	1	0	0	0
D. minutus	0	47	0	0	47	0	0	0	0	0
H. bischoffi	1	12	6	1	8	3	4	2	2	1
P. lateristriga	7	0	0	0	0	2	1	2	1	1
S. perereca	0	3	4	2	4	1	1	1	1	1
Sphaenorhynchus sp.	2	15	2	1	20	0	0	0	0	0
P4										
H. bischoffi	1	52	12	2	15	14	16	7	2	13
P. distincta	1	2	5	1	1	5	2	1	0	1
D. minutus	6	34	1	0	36	5	0	0	0	0
P. lateristriga	6	0	0	0	0	1	0	4	0	1
S. perereca	0	9	12	4	2	3	7	7	0	6
H. prasinus	0	25	7	0	27	3	2	0	1	0
Sphaenorhynchus sp.	4	2	2	0	7	1	0	0	0	0

Legendas de Figuras

Figura 1. Localização do município de Quatro Barras, Paraná, Brasil e os quatro ambientes amostrados no presente estudo (P1, P2, P3 e P4) durante agosto de 2009 e julho de 2010..

Figura 2. Algumas das espécies de anuros encontradas em Quatro Barras. *Ischnocnema guentheri* (a); *Rhinella abei* (b); *Proceratophrys boiei* (c); *Aplastodiscus albosignatus* (d); *Bokermannohyla circumdata* (e); *Dendropsophus microps* (f); *Dendropsophus minutus* (g); *Hypsiboas bischoffi* (h); *Hypsiboas faber* (i); *Hypsiboas prasinus* (j); *Scinax* aff. *alter* (k); *Scinax catharinae* (l); *Scinax perereca* (m); *Scinax rizibilis* (n); *Sphaenorhynchus* sp. (o); *Phyllomedusa distincta* (p); *Physalaemus lateristriga* (q); *Paratelmatobius* sp. (r). Fotos: Igor Soares de Oliveira

Figura 3. Curva de acumulação de espécies calculada com base na ocorrência mensal das espécies de anuros em Quatro Barras durante o período de estudo (agosto de 2009 até julho de 2010) com valores de riqueza observada e riqueza estimada. Os dados foram aleatorizados 1000 vezes.

Figura 4. Similaridade (Jaccard) quanto à composição de espécies entre os quatro ambientes (P1, P2, P3 e P4) amostrados em Quatro Barras, Paraná.

Figura 5. Número de espécies em atividade de vocalização, médias mensais de temperatura do ar, temperatura da água, umidade relativa do ar (URA) e precipitação acumulada, entre agosto de 2009 e julho de 2010, em Quatro Barras, Paraná.

Figura 6. Abundância mensal dos anuros, médias mensais de temperatura do ar, temperatura da água, umidade relativa do ar (URA) e precipitação acumulada, entre agosto de 2009 e julho de 2010, em Quatro Barras, Paraná.

Figura 7. Similaridade (Morisita-Horn) no uso de substrato de vocalização entre as espécies presentes no ponto 1 em Quatro Barras. O coeficiente de correlação cofenético é de 1. As espécies são: *Scinax perereca* (Spe); *Physalaemus lateristriga* (Pla); *Proceratophrys boiei* (Pbo).

Figura 8. Similaridade (Morisita-Horn) no uso de substrato de vocalização entre as espécies presentes no ponto 2 em Quatro Barras. O coeficiente de correlação cofenético é de 0,89. As espécies são: *Scinax* aff. *alter* (Sal); *Hypsiboas bischoffi* (Hbi); *Hypsiboas prasinus* (Hpr); *Rhinella abei* (Rab).

Figura 9. Similaridade (Morisita-Horn) no uso de substrato de vocalização entre as espécies presentes no ponto 3 em Quatro Barras. O coeficiente de correlação cofenético é de 0,94. As espécies são: *Scinax perereca* (Spe); *Dendropsophus minutus* (Dmn); *Sphaenorhynchus* sp. (Sph); *Hypsiboas bischoffi* (Hbi); *Dendropsophus microps* (Dmc); *Physalaemus lateristriga* (Pla).

Figura 10. Similaridade (Morisita-Horn) no uso de substrato de vocalização entre as espécies presentes no ponto 4 em Quatro Barras. O coeficiente de correlação cofenético é de 0,90. As espécies são: *Scinax perereca* (Spe); *Phyllomedusa distincta* (Pdi); *Hypsiboas bischoffi* (Hbi); *Dendropsophus minutus* (Dmn); *Hypsiboas prasinus* (Hpr); *Sphaenorhynchus* sp. (Sph); *Physalaemus lateristriga* (Pla).

Figuras

Figura 1

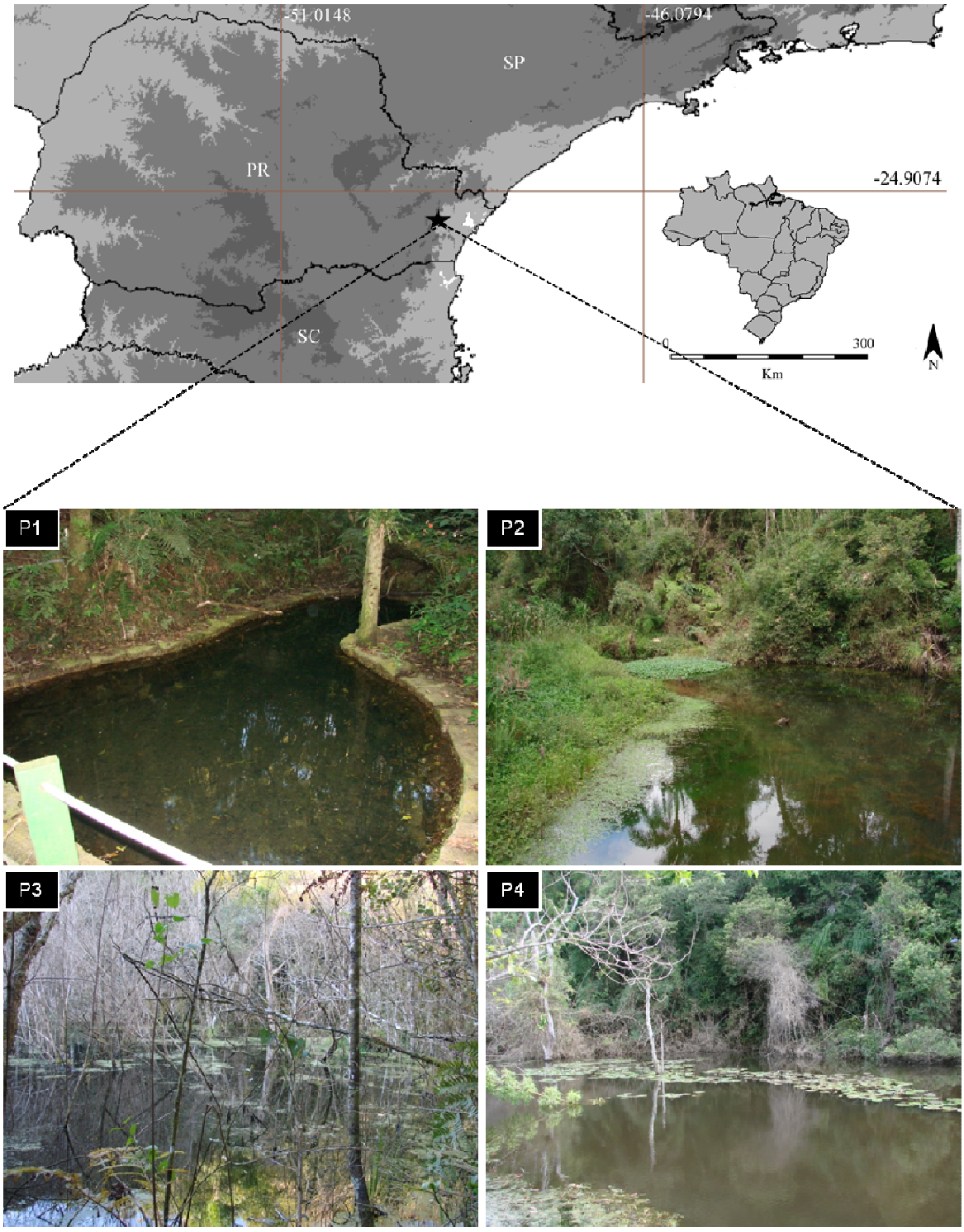
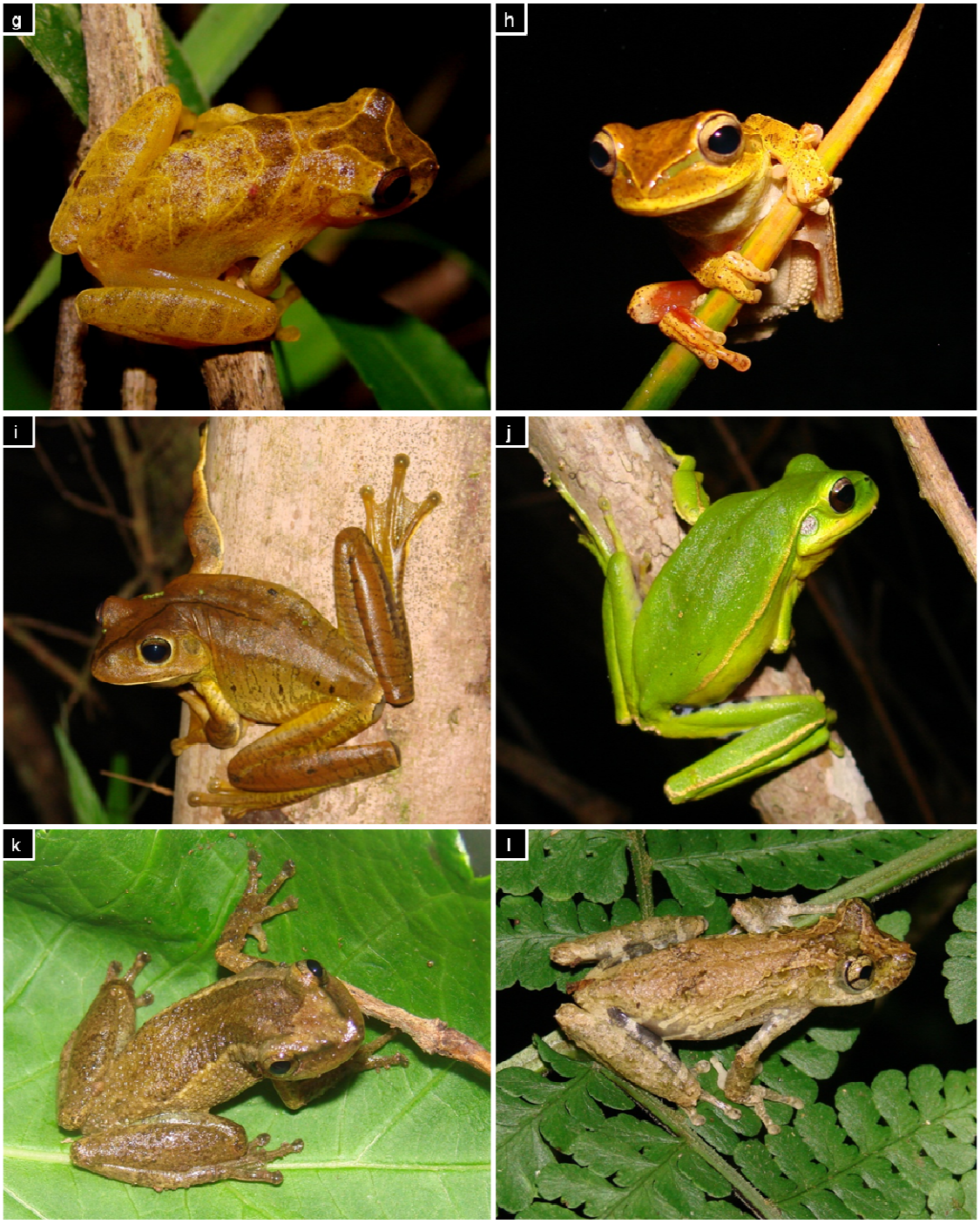


Figura 2

continua



continua

m
n
o
p
q
r

Figura 3

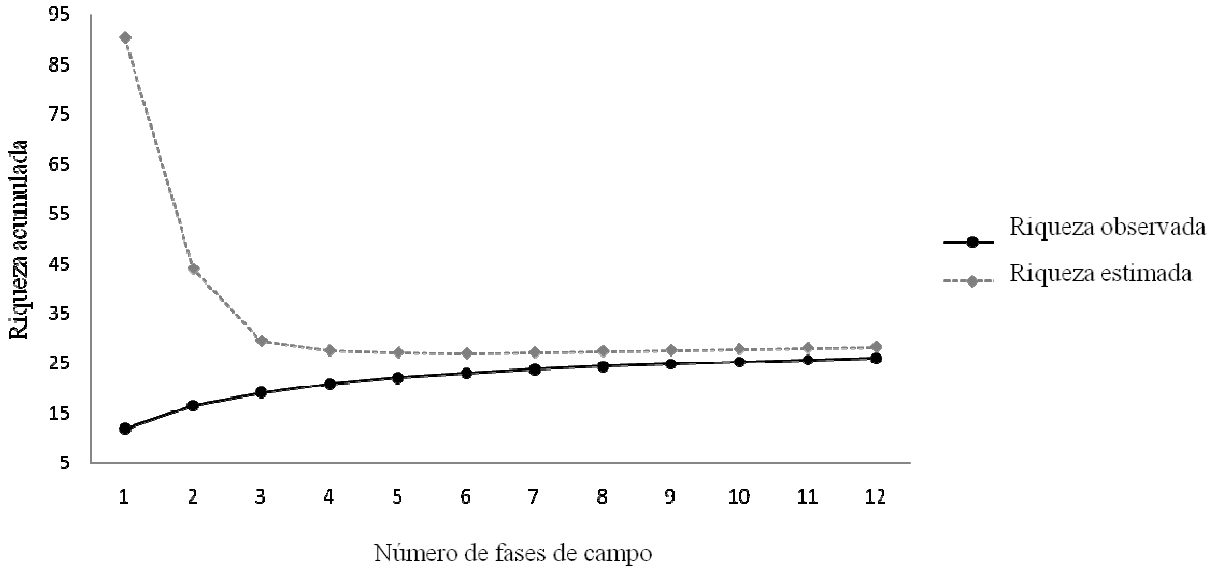

95
85
75
65
55
45
35
25
15
5
Riqueza acumulada
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Número de fases de campo
Riqueza observada
Riqueza estimada

Figura 4

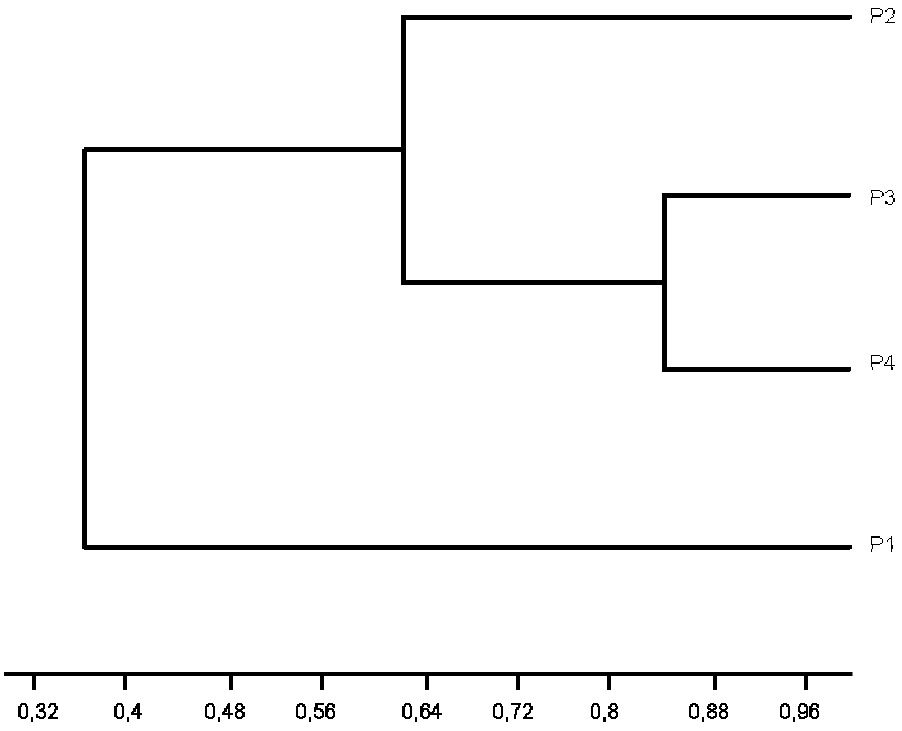


Figura 5

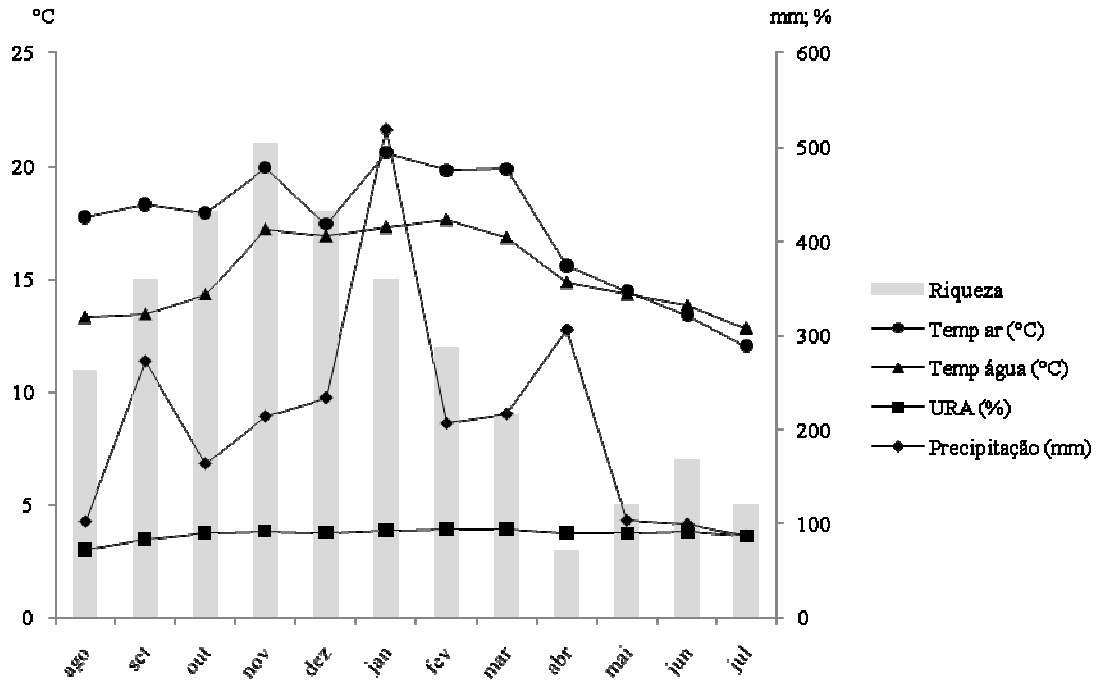


Figura 6

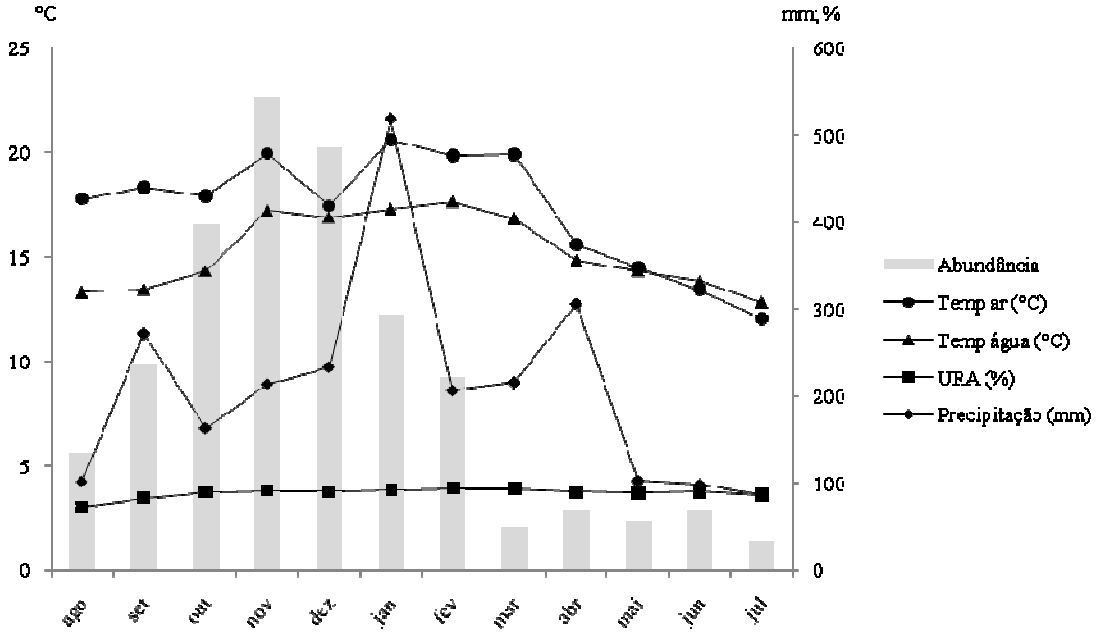


Figura 7

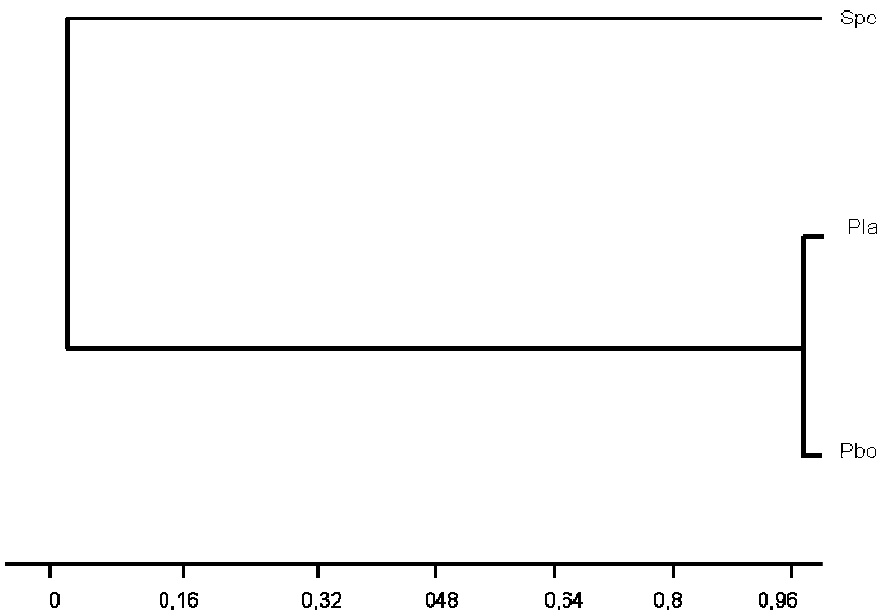


Figura 8

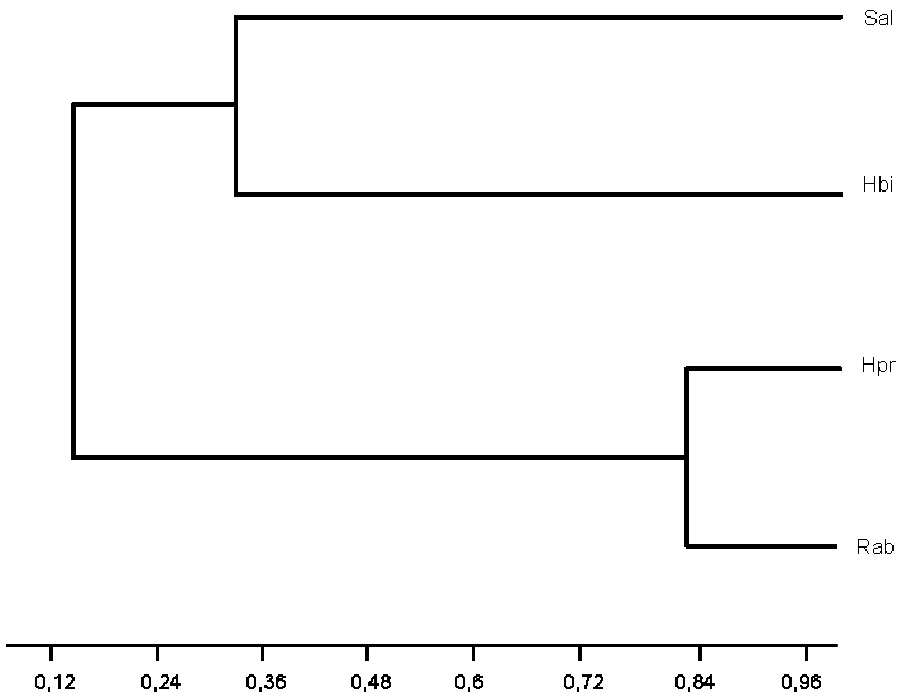


Figura 9

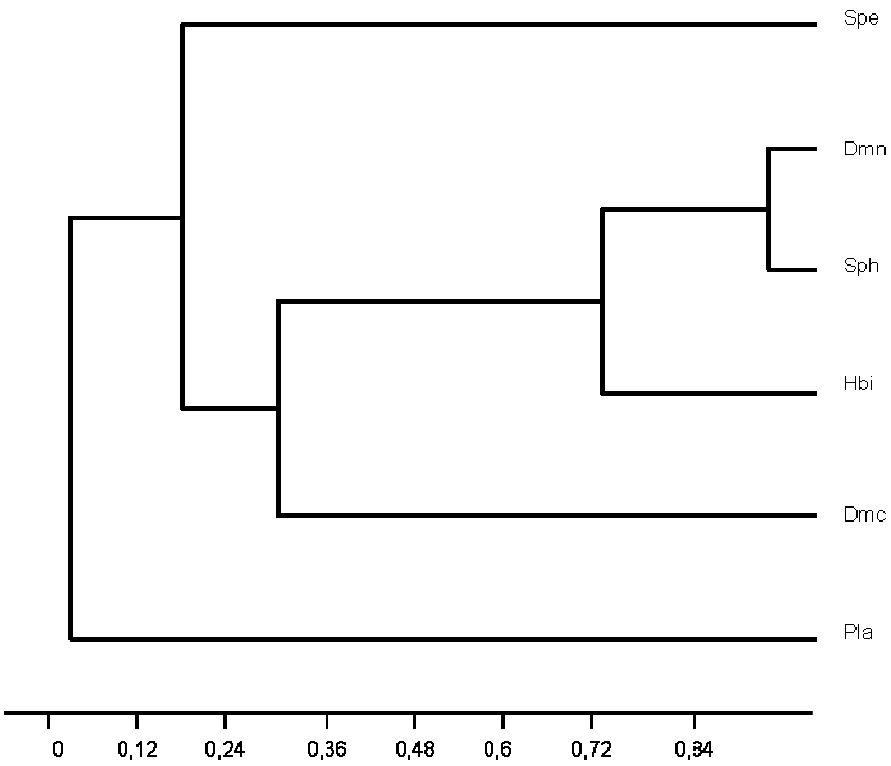
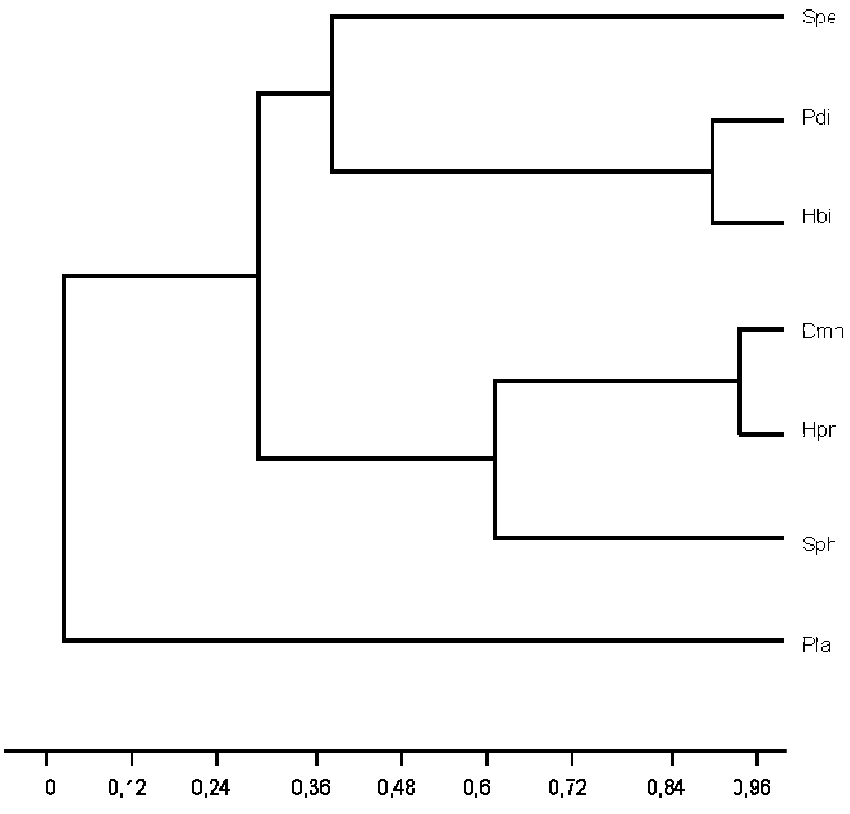


Figura 10



CAPÍTULO II

ESTUDO CITOGENÉTICO DE ANUROS DO GÊNERO *Scinax* (HYLIDAE) DA FLORESTA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL

Este artigo será submetido para o periódico

Journal of Herpetology

Journal of Herpetology

CYTOGENETIC STUDY OF ANURANS OF GENUS *Scinax* (HYLIDAE) FROM ATLANTIC FOREST, SOUTHERN BRAZIL

Adriele K. C. Oliveira[1,2,4]*; Igor S. Oliveira[1,2]; Rafael B. Noleto[2];
Maurício O. Moura[3]; Marta M. 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 - *Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil*

Key words: karyotype, fluorochrome, rDNA, FISH, Atlantic Rainforest

Present Address: *Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 81531-980, Brazil*

Resumo

Espécies pertencentes aos clados *Scinax catharinae* e *Scinax ruber*, provenientes de uma região da Mata Atlântica do Paraná foram estudadas citogeneticamente. Foram analisados o cariótipo com aplicação de citogenética clássica, padrões de distribuição de heterocromatina (banda C e CMA_3/DAPI), localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), identificação de rDNA e de sequências teloméricas para *Scinax catharinae*, *S. rizibilis*, *S.* aff. *alter* e *S. perereca*. Todas as espécies apresentaram número diplóide de 2n=24 e morfologia cromossômica semelhante, com NF=48. Houve diferença no número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos entre os clados analisados. Blocos de heterocromatina constitutiva estiveram localizadas predominantemente nas regiões pericentroméricas, exceto para *S.* aff. *alter*, em que foram detectadas algumas marcações teloméricas. A técnica de impregnação por prata revelou um par de RON para a maioria das espécies e um par não homólogo em *S. catharinae*. Todas as RONs foram confirmadas por FISH (18S), que também revelou sítios adicionais de rDNA em *S. catharinae*. As sequências teloméricas foram restritas às regiões terminais de todos os cromossomos de *S. rizibilis* e *S. perereca*. Em *S.* aff. *alter* foram encontrados sítios teloméricos intersticiais.

Palavras chave: cariótipo, fluorocromo, rDNA, FISH, Mata Atlântica

Abstract

Specimens of *Scinax catharinae* clade and *S. ruber* clade from Atlantic Rainforest of Paraná were studied cytogenetically. The chromosome number and morphology, heterochromatin pattern (C-banding and CMA_3/DAPI), and location of the Nuclear Organizer Region (NOR), rDNA, and telomeric sequences in *Scinax catharinae, S.* aff. *alter*, *S. rizibilis* and *S. perereca* were analyzed. These species had diploid numbers of 2n=24 and very similar chromosome morphology, with FN=48. However, the karyotypes of *S. catharinae* clade and *S. ruber* clade differed from each other in the number of metacentric and submetacentric chromosomes. Constitutive heterochromatin was predominantly located at pericentromeric regions, excepting *S.* aff. *alter* that presented some markings in telomeric regions. Silver staining revealed one pair of Ag-NORs for three species, and a non homologous pair for *S. catharinae*. The NORs were confirmed by FISH that revealed some additional sites of rDNA in *S. catharinae*. Telomeric sequences were restricted to the end of all chromosomes for *S. rizibilis* and *S. perereca*. Some interstitial telomeric sites were detected in *S.* aff. *alter*.

Key words: karyotype, fluorochrome, rDNA, FISH, Atlantic Rainforest

Introdução

Scinax Wagler, 1830 é o maior gênero de Hylinae, com atualmente 98 espécies distribuídas pelo Brasil, Uruguai, Argentina, México, Trinidad e Tobago e Santa Lucia (Frost, 2010). Faivovich et al. (2005) dividiram o táxon em dois clados, *Scinax catharinae* e *Scinax ruber*. As espécies *S. catharinae* (Boulenger, 1888) e *S. rizibilis* (Bokermann, 1964) fazem parte do clado *S. catharinae*, enquanto que *S. alter* (Lutz, 1973) e *S. perereca* Pombal, Haddad e Kasahara, 1995, pertencem ao clado *S. ruber*, todas as espécies usualmente encontradas na Mata Atlântica (Faivovich, 2002; Frost, 2010).

Informações citogenéticas a respeito de *Scinax* são restritas à descrição do número cromossômico, localização das RONs e bandamento C (e. g. Beçak, 1968; Barrio e Pistol de Rubel, 1970; Rabello, 1970; Bogart, 1973; Anderson, 1991; Baldissera et al., 1993; Pombal et al., 1995; Nunes e Fagundes, 2008; Neri et al., 2009; Aguiar et al., 2010).

Recentemente a sistemática de *Scinax* foi revisada com base em dados morfológicos e moleculares (Faivovich, 2002), porém ainda existem muitas questões filogenéticas não esclarecidas dentro do grupo (Faivovich et al., 2005). Mesmo sabendo-se que estudos citogenéticos podem contribuir para o conhecimento da sistemática e evolução dos anuros (Kasahara, 2009), pouco se sabe sobre as populações brasileiras e a maioria dos estudos realizados é baseada em técnicas descritivas e pouco resolutivas (Baldissera et al., 1993; Pombal et al., 1995; Amaro-Ghilardi et al., 2008; Nunes e Fagundes, 2008).

No presente estudo, com o intuito de contribuir para o conhecimento da citogenética do gênero *Scinax*, foi avaliada a similaridade cariotípica de *S. catharinae*, *S. rizibilis*, *S.* aff. *alter* e *S. perereca*, pertencentes a uma área no município de Quatro Barras, inserida no bioma Mata Atlântica. Foram utilizadas técnicas de coloração convencionais, coloração combinada com fluorocromos (Cromomicina A_3 e DAPI) e hibridização fluorescente *in situ*. Os resultados deste trabalho fornecem informações inéditas sobre a citogenética do grupo e permitem a elaboração de algumas inferências a respeito de suas relações filogenéticas.

Material e Métodos

Sete indivíduos de *S. catharinae* (4 machos e 3 fêmeas) (Figura 1a), 6 de *S. rizibilis* (4 machos e 2 fêmeas) (Figura 1b), 3 de *S.* aff. *alter* (todos machos) (Figura 1c) e 6 de *S. perereca* (3 machos e 3 fêmeas) (Figura 1d) foram coletados em uma área de Mata Atlântica, no município de Quatro Barras, Paraná (25º21'44"S 48º59'28"W). As coletas foram realizadas entre os meses de agosto de 2009 e julho de 2010 com licença concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, nº 16591-1 e 16591-2). Os exemplares das 4 espécies foram depositados na Coleção Científica de Amphibia do Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista, Campus São José do Rio Preto, São Paulo e todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Paraná (processo nº 410).

Cromossomos mitóticos foram obtidos a partir da medula óssea e do fígado pelo método direto adaptado de Baldissera et al., 1993. Para a caracterização da morfologia cromossômica foi utilizada coloração convencional com solução de Giemsa (5% em tampão fosfato com pH 6,8). A heterocromatina constitutiva foi detectada com o método de bandamento C (Sumner, 1972) e as RONs foram evidenciadas por coloração por nitrato de prata (Ag-RONs) segundo Howell e Black (1980). A coloração combinada com os fluorocromos diamidino-2-phenylindole (DAPI) e Cromomicina A_3 (CMA_3) evidenciou regiões heterocromáticas ricas em pares de base A-T e G-C respectivamente (Schweizer, 1980). A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi usada para a localização dos genes ribossomais 45S através da sonda da subunidade 18S de *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti, 2004) e de seqüências teloméricas $(TTAGGG)_n$ (IJdo et al., 1991). As sondas foram marcadas pela incorporação com biotina e com digoxigenina 11–dUTP (Roche Applied Science) por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), respectivamente. Os sinais de hibridização

foram detectados usando os conjugados streptavidina–fluoresceína isotiocianato (FITC) e anti–digoxigenina–rodamina (Pinkel et al., 1986).

As metáfases foram analisadas nos microscópios de epiluorescência Carl Zeiss Axiophot e Olympus BX41 e as imagens foram capturadas através dos softwares Case Data Manager Expo 4.0 (Applied Spectral Imaging) e coolSNAP-Pro (Media Cybernetic). Os cromossomos mitóticos foram classificados por inspeção visual, de acordo com Levan et al. (1964). O cálculo do número fundamental de braços (NF) foi realizado com base nos cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, apresentando dois braços e acrocêntricos, com apenas um braço.

Resultados

Coloração convencional

Todas as espécies analisadas possuem número diplóide similar com 2n=24 cromossomos e NF=48 (Figura 3). Os táxons pertencentes ao clado *Scinax catharinae* (Figura 3a e b) apresentaram 5 pares metacêntricos (8-12) e 7 pares submetacêntricos (1-7). As espécies do clado *S. ruber* (Figura 3c e d) apresentaram 7 pares metacêntricos (1, 7-12) e 5 pares submetacêntricos (2-6). Constrições secundárias foram encontradas na porção terminal no braço longo de um cromossomo do par 4 e no braço curto, próximo ao centrômero de um cromossomo do par 5 em *S. catharinae* (Figura 3a). Em *S. rizibilis* também foi possível observar constrição secundária no braço curto nos dois homólogos do par 5 (Figura 3b). Entre as espécies em que foi possível analisar ambos os sexos (*S. rizibilis* e *S. perereca*), não foram observadas diferenças entre os cariótipos de machos e fêmeas.

Bandamento C e CMA_3/DAPI

O bandamento C revelou blocos de heterocromatina distribuídos predominantemente na região pericentromérica (Figura 4), com exceção para *S.* aff *alter* que apresentou bandas C em regiões teloméricas em vários cromossomos (Figura 4c). Para *S. rizibilis* não foi obtida

nenhuma metáfase em que regiões com concentração de heterocromatina estivessem evidenciadas (Figura 4b).

Em *S. catharinae*, *S.* aff. *alter* e *S. perereca*, a dupla coloração CMA_3/DAPI mostrou padrão semelhante ao obtido na banda C com marcação na região pericentromérica, revelando que estas regiões são ricas em GC (Figura 5a, c e d). Em *S. catharinae* e *S.* aff. *alter* também foram observadas marcações em locais referentes às RONs (Figura 5a e c), sugerindo que estas regiões também são ricas em GC. A maioria das marcações da dupla coloração foi tênue com sinal fluorescente muito fraco. Em *S. rizibilis* não foram detectadas regiões marcadas com CMA_3, porém na coloração DAPI foi observado sítio com marcação negativa na região da RON (Figura 5b).

RONs e rDNA

A localização de sítios de Ag-RON variou entre os táxons analisados. A maioria das espécies apresentou um par de cromossomos homólogos portador das RONs (Figura 6): região intersticial do braço curto próxima ao centrômero do par 5 em *S. rizibilis*; região telomérica do braço longo do par 4 de *S.* aff. *alter*; região telomérica do par 12 em *S. perereca.* Somente em *S. catharinae* foram detectadas RONs em duas regiões em cromossomos não homólogos, com marcação intersticial no braço longo próxima à região terminal no cromossomo 4 e marcação intersticial no braço curto próxima ao centrômero do cromossomo 5 (Figura 6a). Há associação das constrições secundárias com as RONs em *S. catharinae* e em *S. rizibilis.*

A localização das RONs evidenciada pelo nitrato de prata (Ag-RONs) foi confirmada em todas as espécies pela hibridização fluorescente *in situ* com sonda específica de rDNA 18s (Figuras 6 e 7). No entanto, em *S. catharinae* foram evidenciados mais 4 sítios com a marcação da sonda (Figuras 6 e 7a), presente nos homólogos dos cromossomos 4 e 5 (portadores da RON), na região intersticial do braço longo no cromossomo 3 e na região

intersticial do cromossomo 9. Foi detectado heteromorfismo entre as marcações dos pares homólogos (que coincidem com a região de Ag-RONs).

Sequência telomérica

A sequência (TTAGGG) foi positiva nas regiões teloméricas de *S. rizibilis*, *S.* aff. *alter* e *S. perereca* (Figura 8). A sonda telomérica também hibridizou nas regiões centroméricas dos cromossomos 1 e 2 de *S.* aff. *alter* (Figura 8b).

Discussão

Os cariótipos analisados das quatro espécies de *Scinax* apresentaram 2n=24 e NF=48, padrão encontrado no gênero (Faivovich, 2002). Estudos citogenéticos realizados em espécies com este número diplóide revelam um cariótipo muito similar, com pequenas diferenças na sua morfologia e tamanho dos cromossomos (Baldissera et al., 1993).

Apesar do grande número de espécies do gênero *Scinax*, poucas foram estudadas citogeneticamente (Tabela 1), sendo que dentre estas, a maioria dos trabalhos é baseada em descrições do número e morfologia dos cromossomos com uso de coloração convencional e algumas técnicas de bandamento (e.g. Baldissera et al. 1993; Pombal et al., 1995; Nunes e Fagundes, 2008).

Dentre as espécies abordadas no presente estudo, *S. catharinae* teve somente seu número diplóide modal descrito por Bogart (1973), sendo que os resultados obtidos para a população de Quatro Barras corroboram este estudo. Todos os dados citogenéticos obtidos para *S. rizibilis* são inéditos e estão de acordo com o padrão encontrado para outras espécies do clado para o qual pertence. Outras espécies do clado *Scinax catharinae* apresentaram pequenas variações na morfologia de alguns cromossomos (e.g. Nunes e Fagundes, 2008; Neri et al., 2009), porém ainda existem poucos dados para comparações mais conclusivas.

O cariótipo de uma população do Espírito Santo de *S. alter* foi descrito por Nunes e Fagundes (2008) como possuindo 6 pares metacêntricos (1, 8-12), 5 pares submetacêntricos (2-5, 7) e um par subtelocêntrico (6). Todavia, de acordo com Pombal et al. (1995 a e b),

populações reconhecidas como *S. alter* devem se tratar de um complexo de espécies, principalmente pelas diferenças de coloração, de tamanho corporal e de vocalização. As diferenças citogenéticas entre as populações de Quatro Barras (presente estudo) e do Espírito Santo (Nunes e Fagundes, 2008) comprovam que há pelo menos duas espécies dentro desse complexo.

Para *S. perereca*, a população de Quatro Barras apresentou 7 pares metacêntricos (1, 7-12) e 5 pares submetacêntricos (2-6), padrão semelhante aos indivíduos analisados por Pombal et al. (1995 a), os primeiros a descrever o cariótipo desta espécie, porém com pequena variação na classificação de alguns cromossomos. Outra população desta espécie do Paraná também apresentou similaridade cariotípica, mas também com algumas variações (Oliveira et al., 2009). Essas diferenças podem ser explicadas pelo sistema de ordenação dos cromossomos adotado por cada um dos autores ou pela resolução das imagens. Todavia, existe a possibilidade de variações interespecíficas, interpopulacionais, e rearranjos cromossômicos, assim como sugerido para outras espécies de hilídeos (Medeiros et al., 2003 e 2006). A localização da RON, no entanto, é a mesma para as três populações, indicando que tais cromossomos se mantém conservados.

As regiões ricas em heterocromatina constitutiva foram encontradas predominantemente na região pericentromérica dos cromossomos em *S. catharinae*, *S.* aff. *alter* e *S. perereca*, característica bastante conservada nos anuros e encontradas para outras espécies, com pouca variação (Medeiros et al., 2003; Ananias et al., 2004; Gruber et al., 2005; Amaro-Ghilardi et al., 2008; Campos et al., 2009). Em *S.* aff. *alter* foram também encontradas várias bandas C^+ em regiões terminais, o que já foi encontrado para outras espécies de anuros (Busin et al., 2006; Lourenço et al., 2006), porém se tratando da primeira ocorrência para *Scinax*. Segundo King (1991), muitas espécies de anuros possuem diversidade interespecífica na quantidade e distribuição de heterocromatina em seus genomas, o que sugere que a amplificação dessas regiões seja uma tendência evolutiva em Amphibia. Ganhos

ou perdas de regiões de bandas C também podem estar relacionadas com o emparelhamento não-homólogo na meiose, uma propriedade típica das sequências repetitivas que constituem a heterocromatina (Kasahara, 2009).

A identificação de marcadores cromossômicos usando diferentes bandamentos pode ser uma importante ferramenta para a taxonomia e sistemática em anuros, especialmente nos grupos com morfologia externa conservada e com grande homogeneidade no cariótipo convencional (King, 1990; Kuramoto, 1990; Kasahara, 2009). No entanto, em muitos casos, os cariótipos são quase indistinguíveis, mesmo com técnicas de bandamento (Baldissera et al., 1993; Kasahara et al., 1996). Todas as espécies apresentaram bandas heterocromáticas ricas em GC, evidenciadas pela dupla coloração CMA_3/DAPI, o que tem sido reportado para anuros (Ananias et al., 2007; Campos et al., 2008; Kasahara, 2009).

Scinax rizibilis não teve bandas heterocromáticas evidenciadas e tão pouco apresentou marcações ricas em GC. Somente foi observado sítio com marcação negativa para a coloração DAPI referente às RONs. Regiões Organizadoras de Nucléolo possuem alta riqueza de bandas GC, porém a ausência de sinal fluorescente em *S. rizibilis* com o marcador CMA_3 pode levar a resultados não conclusivos sobre a ocorrência de RONs em determinados cromossomos (Kasahara, 2009). Além disso, a falta de marcação com CMA_3 pode representar uma variação do padrão geral observado em anuros (e.g. Medeiros et al., 2003; Gruber et al., 2005), podendo ainda ser uma característica da população estudada (Kasahara, 2009). Também não podemos descartar a possibilidade de ser uma marcação falsa com DAPI, pois a coloração não é muito específica para bandas AT, o aparecimento do sinal em *S. rizibilis* não significa necesariamente a presença dessas bandas (Artoni, com. pess.).

Dentre as técnicas de bandamento cromossômico, a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo com impregnação por prata (Ag-RON) é particularmente interessante para análise cariotípica dos anuros, pois estas regiões funcionam como excelentes marcadores cromossômicos (Silva et al., 2006). O padrão de ocorrência de um par de RONs

por genoma diplóide encontrado em *S. rizibilis*, *S.* aff. *alter* e *S. perereca* está de acordo com os resultados referentes à maioria dos anuros (e. g. Schmid, 1982; King, 1990) o que segundo King (1990) é uma condição primitiva em Anura. Para estas espécies não foi detectado heteromorfismo de tamanho das RONs, o que pode indicar que este fato está relacionado a um fator proteção contra recombinação nas regiões organizadoras de nucléolos, oferecida pelos blocos de heterocromatina banda C-positivas que geralmente as circundam (Schmid, 1982; Lourenço, 1996). Por outro lado, a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões das RONs pode promover heteromorfismos sendo que essas características ainda precisam ser elucidadas. As RONs detectadas por este método nos cariótipos descritos neste estudo coincidem com a localização de constrições secundárias observadas em cromossomos corados com Giemsa para *Scinax catharinae* e *S. rizibilis.* Para essas espécies também houve correspondência entre sítios de RONs e as marcações com sondas de rDNA, como encontrado para diferentes espécies (Schmid et al., 1995; King et al., 1990; Lourenço et al., 2008).

Em *S. catharinae* foi encontrado heteromorfismos de RONs em todas as metáfases analisadas, com marcações nas porções intersticiais do braço longo próxima ao telômero e nas regiões intersticiais do braço curto próxima ao centrômero dos pares 4 e 5 respectivamente. A presença de múltiplos pares de RONs pode ser considerada uma apomorfia nos cariótipos diplóides de anuros (King et al., 1990) e tem sido relatada para várias espécies (e. g. Silva et al., 1999; Lourenço et al., 2008). De acordo com Schmid (1978), RONs muito pequenas não podem ser detectadas pela técnica de Ag-RON por causa de seu tamanho. Casos de variações nos padrões de Ag-RON podem ser decorrentes de atividade gênica diferencial, diferentes quantidades de unidades de transcrição ou ainda de ausência total de sequências de rDNA (Kasahara, 2009). Os tamanhos das RONs podem ainda variar de maneira intraindividual na mesma espécie devido a diferenças no número de cópias do gene ribossomal presente em cada RON (Schmid, 1982).

O emprego da hibridização *in situ* também permitiu a identificação de mais dois sítios de rDNA em *S. catharinae*. Com a técnica de Ag-RON que marca apenas os organizadores nucleolares que estiveram em atividade de transcrição na intérfase que precede àquela metáfase, torna-se necessário o emprego de técnicas mais resolutivas que identifiquem os sítios de RONs independentemente de atividade genética prévia (Kasahara, 2009). Embora vários estudos mostrem que algumas RONs permanecem inativas, os mecanismos de interação entre as diferentes RONs, assim como suas interações com outras regiões do genoma, que interferem na regulação da atividade dos cistrons de rDNA ainda são pouco conhecidos (Lourenço, 1996).

As marcações com sonda telomérica $(TTAGGG)_n$ revelaram padrão semelhante para *S. rizibilis, S.* aff. *alter* e *S. perereca,* com sinal fluorescente nas regiões teloméricas de todos os cromossomos. No entanto *S.* aff. *alter* apresentou sinais fluorescentes para a sonda telomérica na região pericentromérica dos cromossomos dos pares 1 e 2. Estas marcações de sítios teloméricos intersticiais (ITS) podem constituir evidências de rearranjos estruturais, como fusão cêntrica e fusão em tandem, durante a diferenciação cromossômica dos cariótipos (Silva e Yonenaga-Yassuda, 1997 e 1998 a e b; Amaro-Guilardi et al., 2008) e já foram encontrados em algumas espécies de Hylidae (Meyne et al., 1990; Wiley et al., 1992). Por outro lado, sinais de hibridação em ITS ou em regiões centroméricas, sem que exista a indicação de fusão, podem estar associados à presença de sequências repetitivas similares às dos telômeros (Kasahara, 2009).

A aplicação de diferentes técnicas de coloração juntamente com as técnicas convencionais, como realizado no presente estudo, geralmente fornecem melhores caracterizações cariotípicas em anuros, assim como a identificação de padrões espécie-específicos (Amaro-Ghilardi et al., 2008). De maneira geral, o gênero *Scinax* possui estrutura cariotípica bem conservada e neste estudo fica evidente a proximidade entre as espécies pertencentes ao mesmo clado, de acordo com a classificação de Faivovich et al. (2005). A

elaboração deste trabalho dá início ao conhecimento citogenético mais aprofundado destas quatro espécies e novos estudos em diferentes populações devem ser incentivados.

Literatura Citada

Aguiar, R. C. S., Sousa, C. C. N., Carvalho, W. F., Gonçalves, M. W., Oliveira, H. H. P., Da Cruz, A. D., Ribeiro, C. L., Bastos, R. P., and Silva, D. M. 2010. Análise cariotípica de 24 espécies de anfíbios anuros de áreas antropizadas do bioma cerrado do estado de Goiás. In: Resumos do 56° Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá, Brazil.

Amaro-Ghilardi, R. C., Silva, M. J. J., Rodrigues, M. T., and Yonenaga-Yassuda, Y. 2008. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetica 134: 159-168.

Ananias, F., Bombeiro, A. L., Silva, C. D. B., Silva, A. P. Z., Haddad, C. F. B., and Kasahara, S. 2007. Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Anura: Leiuperidae) and karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implications. Acta Zoologica Sinica 53 (2): 285-293.

Ananias, F., Garcia, P .C. A., and Recco-Pimentel, S. M. 2004. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchela* species group (Anura, Hylidae). Hereditas , 140: 42-48.

Anderson, K. 1991. Chromosome evolution in Holoartic *Hyla* treefrogs. In: M. G. Green, and S. K. Sessions (eds.), Amphibian Cytogenetics and Evolution, pp. 299-331. Academic Press, San Diego.

Baldissera Jr, F. A., Oliveira, P. S. L., and Kasahara, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case of supernumerary chromosome. Revista Brasileira de Genética 16 (2): 335-345.

Barrio, A., and Pistol de Rubel, D. 1970. Caracteristicas del cariotipo de los pseudidos (Amphibian, Anura). Physis 29: 505-510.

359 Beçak, M. L. 1968. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. Caryologia 21 (3):
360 191-208.

361 Bogart, J. P. 1973. Evolution of anuran karyotypes. In: J. L. Vial (ed.), Evolutionary Biology
362 of Anurans, pp. 337-349. University Missouri Press, Columbia.

363 Busin, C. S., Lima, A. P., Prado, C. P. A., Strüssmann, C., Siqueira Jr, S., and Recco-
364 Pimentel, S. M. 2006. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus*
365 *limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). Micron 37: 355-362.

366 Campos, J. R., Ananias, F., Haddad, C. F., and Kasahara, S. 2008. Karyotypic similarity
367 among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern
368 Brazil (Anura, Brachycephalidae). Micron 39: 1-9.

369 Campos, J. R., Ananias, F., Brasileiro, C., Yamamoto, M., Haddad, C. F. B., and Kasahara, S.
370 2009. Chromosome evolution in three brazilian *Leptodactylus* species (Anura,
371 Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. Hereditas 146: 104-111.

372 Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of Scinax (Anura:Hylidae). Cladistics 18: 367-393.

373 Faivovich, J., Haddad, C. F. B., Garcia, P. C. A., Frost, D. R., Campbell, J. A., and Wheeler,
374 W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae:
375 phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bulletin American of Natural History , 294: 6-
376 228.

377 Frost, D.R. 2010. Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.4. Accessed
378 in December 23th, 2010. American Museum of Natural History:
379 http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia.

Gruber, S. L., Haddad, C. F. B., and Kasahara, S. 2005. Evaluating the karyotipic diversity in species of *Hyla* (Anura:Hylidae) with 2n=30 chromosomes based on analysis of ten species. Folia Biologica 51 (3): 68-75.

Hatanaka, T., and Galetti, P. M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). Genetica 122 (3): 239-244.

Howell, W. M., and Black, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer. Experientia 36 (8): 1014-1015.

IJdo, J. W., Wells, R. A., Baldini, A., and Reeders, S. T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) generated by PCR. Nucleic Acids Research 19 (17): 4780.

Kasahara, S. 2009. Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brazil.

Kasahara, S., Silva, A. P. Z., and Haddad, C .F. B. 1996. Chromosome banding in three species of brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). Brazilian Journal of Genetics 19 (2): 237-242.

Kasahara, S., Silva, A. P., Gruber, S. L., and Haddad, C. F. B. 2003. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. Cytogenetic and Genome Research 103: 155-162.

King, M. 1990. Amphibian. In: B. John (ed.), Animal Cytogenetics, pp. 1-241. Borntraeger, Berlin/Stuttgart, Germany.

401 King, M. 1991. The evolution of the heterochromatin in the Amphibia genome. In: D. M.
402 Green and S. K. Sessions (eds.), Amphibian Cytogenetics and Evolution, pp. 359-391.
403 Academic Press, San Diego.

404 King, M., Contreras, N., and Honeucutt, R. L. 1990. Variation within and between nucleolar
405 regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S and 28S "in situ" hybridization.
406 Genetica 80: 17-29.

407 Kuramoto, M. 1990. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. Bulletin of
408 Fukuoka University Education 39; 83-127.

409 Levan, A., Fredga, K., and Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on
410 chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

411 Lourenço, L. B. 1996. Estudo Citogenético Comparativo de *Edalorhina perezi* e *Physalaemus*
412 *petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Unpubl. Msc Diss., Universidade Estadual de
413 Campinas, Campinas, Brazil.

414 Lourenço, L. B., Bacci Jr, M., Martins, V. G., Recco-Pimentel, S. M., and Haddad, C. F. B.
415 2008. Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and
416 *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). Genetica 132: 255-266.

417 Lourenço, L. B., Nascimento, J. A., Andrade, G. V., Rossa-Feres, D. C., and Recco-Pimentel,
418 S. M. 2006. Chromosomal analysis of the leptodactylids *Pleurodema diplolistris* and
419 *Physalaemus nattereri* (Amphibia, Anura). Amphibia-Reptilia 27: 481-489.

420 Medeiros, L. R., Rossa-Feres, D. C., and Recco-Pimentel, S. M. 2003. Chromosomal
421 differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR
422 polymorphism in *H. nana*. Journal of Heredity 94 (2): 149-154.

Medeiros, L. R., Rossa-Feres, D. C., Jim, J., and Recco-Pimentel, S. M. 2006. B-chromosomes in two brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). Genetics and Molecular Biology 29 (2): 257-262.

Meyne, J., Baker, R. J., Hobart, H. H., Hsu, T. C., Ryder, O. A., Ward, O. G., Wiley J. E., Wurster-Hill, D. H., Yates, T. L., and Moyzis, R. K. 1990. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)n sequence in vertebrate chromosomes. Chromosoma 99 (1): 3-10.

Neri, T. S., Medrado, A. S., Oliveira, R. V., Freire, I. V., Costa, M. A., and Siqueira, S. 2009. Estudo citogenético de três espécies de *Scinax* (Anura, Hylidae) no município de Jequié-BA. In: Resumos do 55° Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, Brazil.

Nunes, R. R. A., and Fagundes, V. 2008. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão 23: 21-36.

Oliveira, I. S., Cunha, A. K., Noleto, R. B., Gallego, L. F. K., Toledo, L. F., and Cestari, M. M. 2009. Citogenética comparativa de duas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do estado do Paraná. In: Anais do Workshop – Anfíbios uma abordagem cromossômica e molecular. Campinas.

Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. 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.

Pombal Jr, J. P., Haddad, C. F. B., and Kasahara, S. 1995(a). A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with comments on the genus. Journal of Herpetology 29 (1): 1-6.

Pombal Jr., J. P., Bastos, R. P., and Haddad, C. F. B. 1995(b). Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) do sudeste do Brasil e comentários taxonômicos. Naturalia 20: 213-225.

Rabello, M. N. 1970. Chromosomal studies in Brazilian anurans. Caryologia 23: 45-49.

Schmid, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66: 361-388.

Schmid, M. 1982. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. Chromosoma 87: 327-344.

Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F., and León, P. 1995. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). Cytogenetics and Cell Genetics 69: 18-26.

Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatin regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. Cytogenetics and Cell Genetics 27 (2-3): 190-193.

Silva, A. P. Z., Haddad, C. F. B., Galassi, G. G., and Kasahara, S. 2006. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. Genetica 127: 35-44.

Silva, A. P. Z., Haddad, C. F. B., and Kasahara, S. 1999. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvievi* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hereditas 131: 131-145.

Silva, M. J. J., and Yonenaga-Yassuda, Y. 1997. New karyotipes of two related species of *Oligoryzomys* genus (Cricetidae, Rodentia) involving centric fusion with loss of NORs and distribution of telomerica (TTAGGG)n sequences. Hereditas 127: 217-229.

Silva, M. J. J., and Yonenaga-Yassuda, Y. 1998(a). Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)n sequences by fluorescence in situ hydridization int the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). Chromosome Research 6: 455-562.

Silva, M. J. J., and Yonenaga-Yassuda, Y. 1998(b). Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. Cytogenetics and Cell Genetics 81: 46-50.

Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research 75: 304-306.

Wiley, J. E., Meyne, J., Little, M. L., and Stout, J. C. 1992. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs. Cytogenetic and Cells Genetic 61: 55-57.

Tabela 1. Dados cromossômicos de *Scinax*: m=metacêntrico; sm=submetacêntrico; st=subtelocêntrico; 2n=número diplóide; NF=número fundamental; cromossomos portadores das RONs; cromossomos portadores dos rDNA evidenciados por FISH; (-) dados não disponíveis. Resultados do presente estudo e disponíveis em literatura.

Clado	Espécie	m	sm	st	2n	NF	AgRON	rDNA	Localidade	Referência
Scinax catharinae	*S. argyreornatus*	8,9,10,11,12	1,2,3,4,5,7	6	24	48	-	-	Espírito Santo	Nunes e Fagundes, 2008
	S. brieni	-	-	-	24	48	-	-	-	Bogart, 1973
	S. catharinae	-	-	-	24	48	-	-	-	Bogart, 1973
	S. catharinae	8,9,10,11,12	1,2,3,4,5,6,7		24	48	4,5	3,4,5,9	Quatro Barras – Paraná	Presente estudo
	S. kautskyi	1,2,7,8,9,11,12	3,4,6,10,12	5	24	48	12	-	Bahia	Neri et al., 2009
	S. perpusillus	-	-	-	24	48	-	-	-	Bogart, 1973
	S. rizibilis	8,9,10,11,12	1,2,3,4,5,6,7		24	48	5	5	Quatro Barras – Paraná	Presente estudo
Scinax ruber	*S. alter*	1,8,9,10,11,12	2,3,4,5,7	6	24	48	-	-	Espírito Santo	Nunes e Fagundes, 2008
	S. aff. *alter*	1,9,10,11,12	2,3,4,5,6,7,8		24	48	4	4	Quatro Barras – Paraná	Presente estudo
	S. fuscomarginatus	-	-	-	24	48	-	-	-	Rabello, 1970
	S. fuscovarius	-	-	-	24	48	-	-	-	Anderson, 1991
	S. fuscovarius	1,2,8,9,10,11,12	3,4,5,6,7		24	48	12	-	Rio Casca – Minas Gerais Rio Claro – São Paulo	Baldissera et al., 1993
	S. fuscovarius	1,2,8,9,11	4,6,7,10,12	3,5	24	48	12	12	Rio Claro, Santa Maria da Serra e Itatiba – São Paulo	Kasahara et al., 2003
	S. fuscovarius	1,2,7,8,9,11,12	3,4,6,10,12	5	24	48	10	-	Bahia	Neri et al., 2009
	S. fuscovarius	1,7,8,9,10,11,12	2,3,4,5,6		24	48	12	12	Castelhanos – Paraná	Oliveira et al., 2009
	S. hayii	-	-	-	24	48	-	-	-	Beçak, 1968
	S. perereca	1,8,9,10,11,12	2,3,4,5,6,7		24	48	12	-	Ribeirão Branco – São Paulo	Pombal et al., 1995
	S. perereca	1,7,8,9,10,11,12	2,3,4,5,6		24	48	12	12	Castelhanos – Paraná	Oliveira et al., 2009
	S. perereca	1,9,10,11,12	2,3,4,5,6,7,8		24	48	12	12	Quatro Barras – Paraná	Presente estudo
	S. rostratus	-	-	-	24	48	-	-	-	Bogart, 1973
	S. squalirostris	-	-	-	24	48	-	-	-	Barrio e Pistol de Rubel, 1970
	S. x-signatus	1,2,7,8,9,11,12	3,4,6,10,12	5	24	48	10	-	Bahia	Neri et al., 2009

Legendas das Figuras

Figura 1. Espécies analisadas no presente estudo provenientes do município de Quatro Barras, Paraná, coletadas durante agosto de 2009 e julho de 2010. (a) *Scinax catharinae*; (b) *S. rizibilis*; (c) *S.* aff. *alter*; (d) *S. perereca.*

Figura 2. Localização de Quatro Barras, Paraná, Brasil.

Figura 3. Cariótipos das espécies de *Scinax.* (a) *Scinax catharinae*; (b) *Scinax rizibilis*; (c) *Scinax* aff. *alter*; (d) *Scinax perereca*. (a e b) Clado *Scinax catharinae*; (c e d) e Clado *Scinax ruber*. Barra = 10µm.

Figura 4. Bandamento C de *Scinax.* (a) *Scinax catharinae*; (b) *Scinax rizibilis*; (c) *Scinax* aff. *alter*; (d) *Scinax perereca*. Barra = 10µm.

Figura 5. Dupla coloração CMA_3/DAPI de *Scinax* com a maioria das marcações na porção pericentromérica. (a) *Scinax catharinae*; (b) *Scinax rizibilis*; (c) *Scinax* aff. *alter*; (d) *Scinax perereca*. Setas em (a) e (c) indicam marcação no local das RONs. Setas em (b) indicam marcação negativa em DAPI nas RONs. Barra = 10µm.

Figura 6. Pares cromossômicos portadores das RONs marcados por Ag-RON e por FISH com sondas 18S.

Figura 7. Metáfases mitóticas após FISH com sonda ribossomal 18S. (a) *Scinax catharinae*; (b) *Scinax rizibilis*; (c) *Scinax* aff. *alter*; (d) *Scinax perereca*. As setas indicam a posição do rDNA 18S. Barra=10µm.

Figura 8. Distribuição da sequência telomérica $(TTAGGG)_n$ após FISH em *Scinax*, evidenciando padrão de marcação telomérica e marcações em sítios teloméricos intersticiais (seta). (a) *Scinax rizibilis*; (b) *Scinax* aff. *alter*; (c) *Scinax perereca*. Barra=10µm.

Figuras

Figura 1

Figura 2

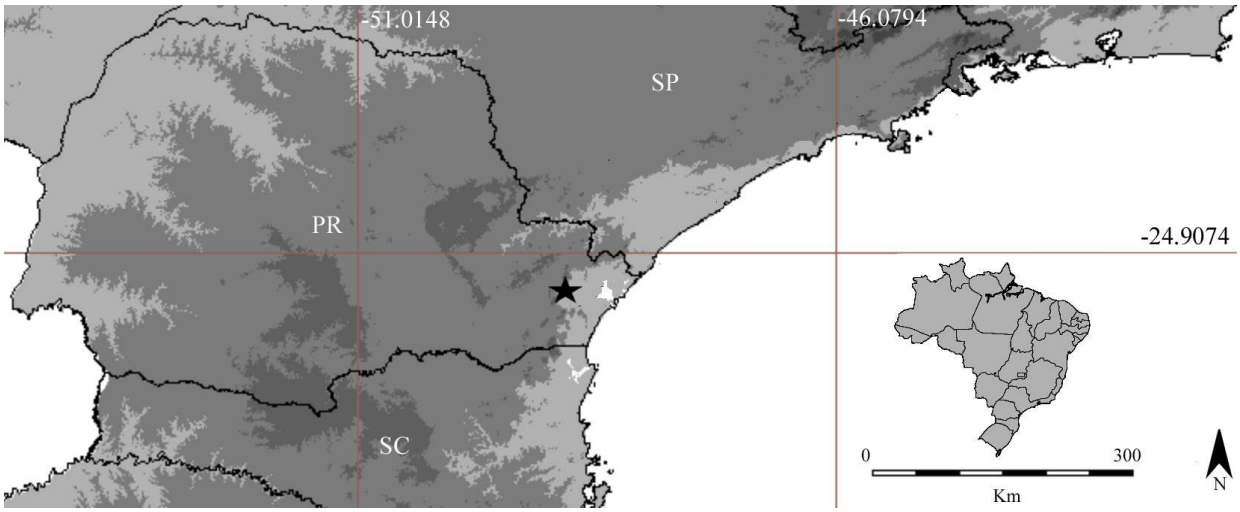


Figura 3

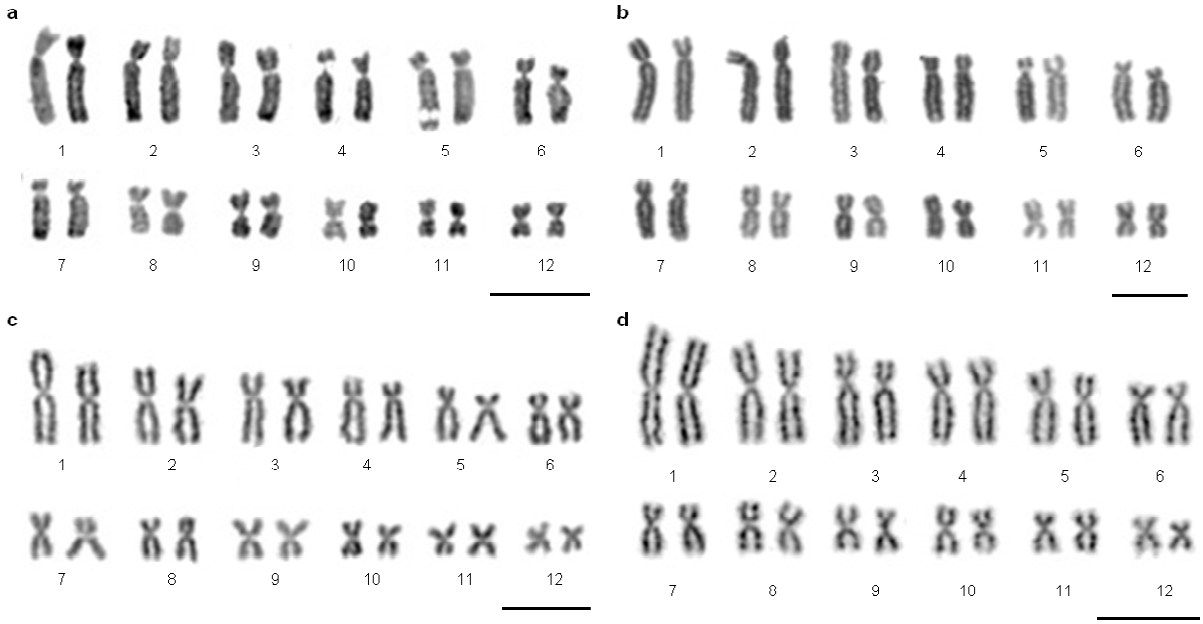


Figura 4

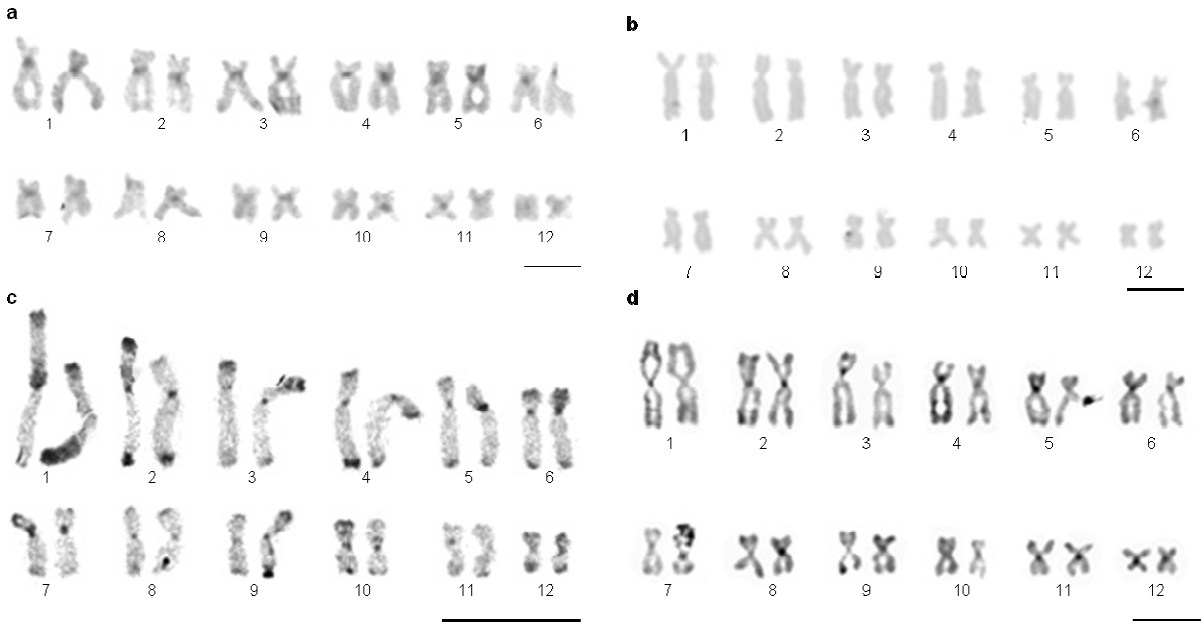


Figura 5

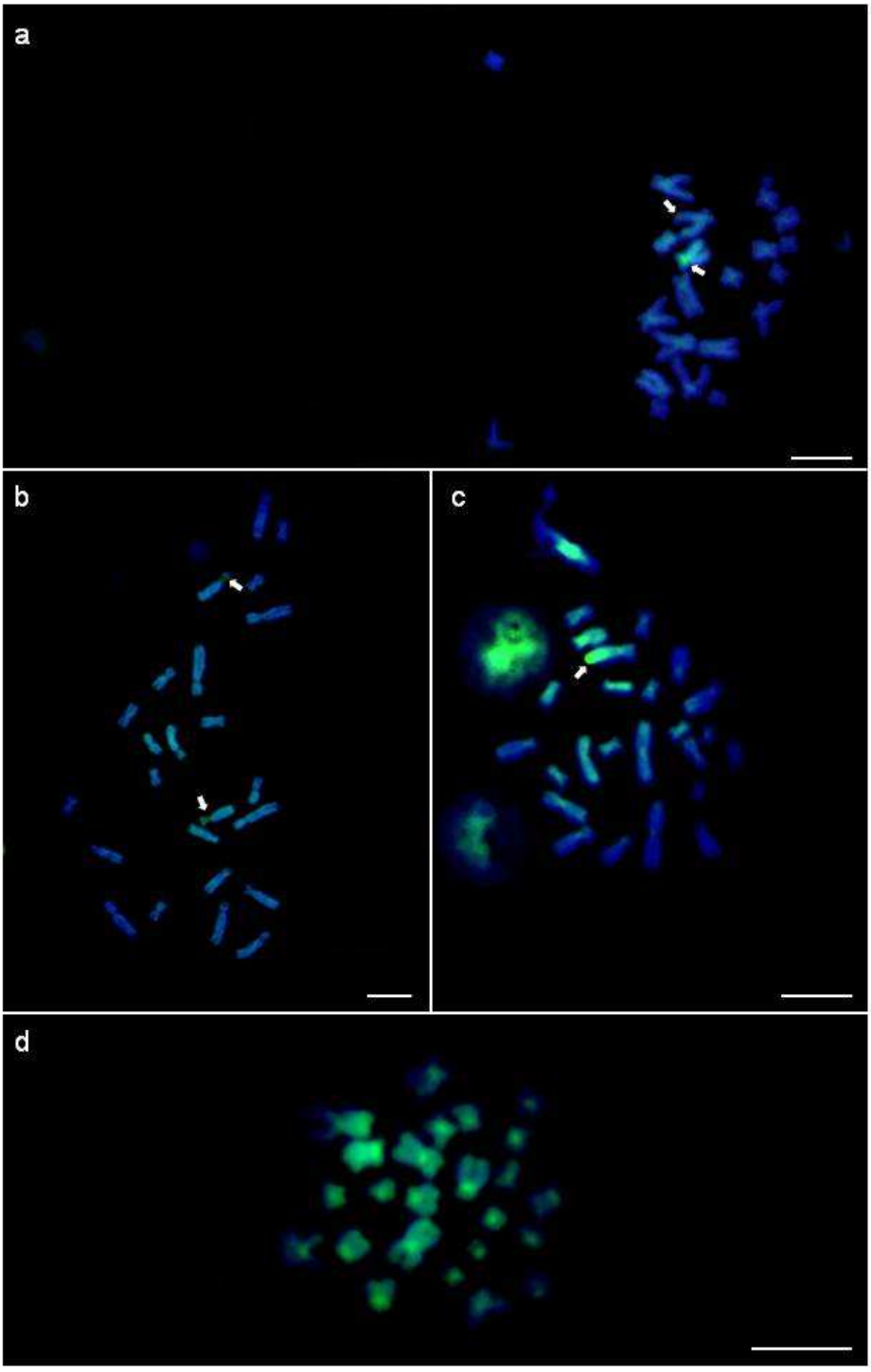


Figura 6

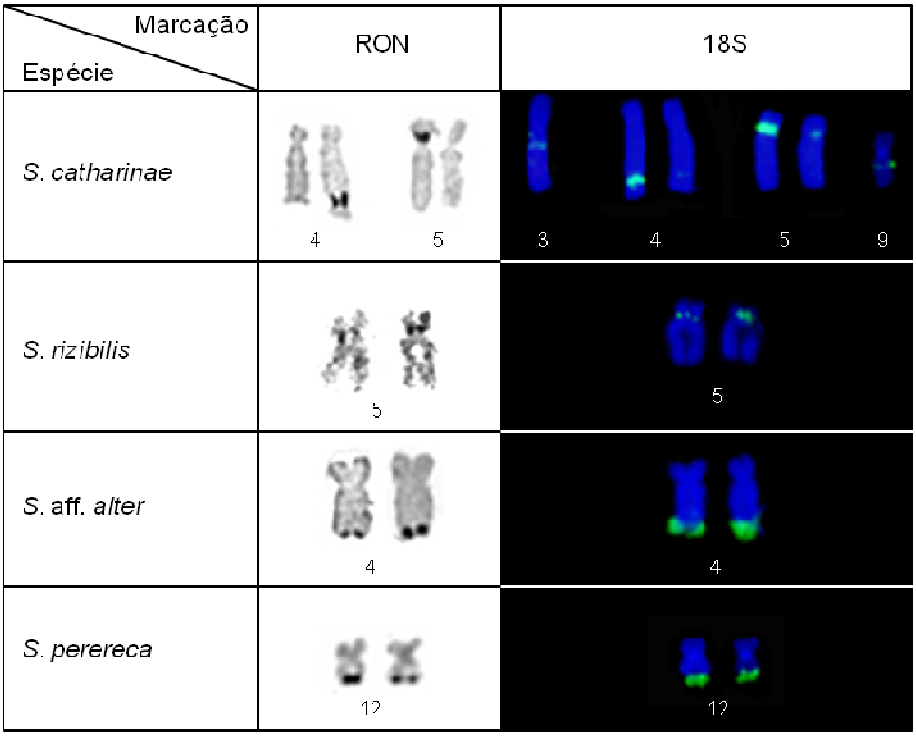

Marcação
Espécie
RON
18S
S. catharinae
4
5
3
4
5
9
S. rizibilis
5
5
S. aff. alter
4
4
S. perereca
12
12

Figura 7

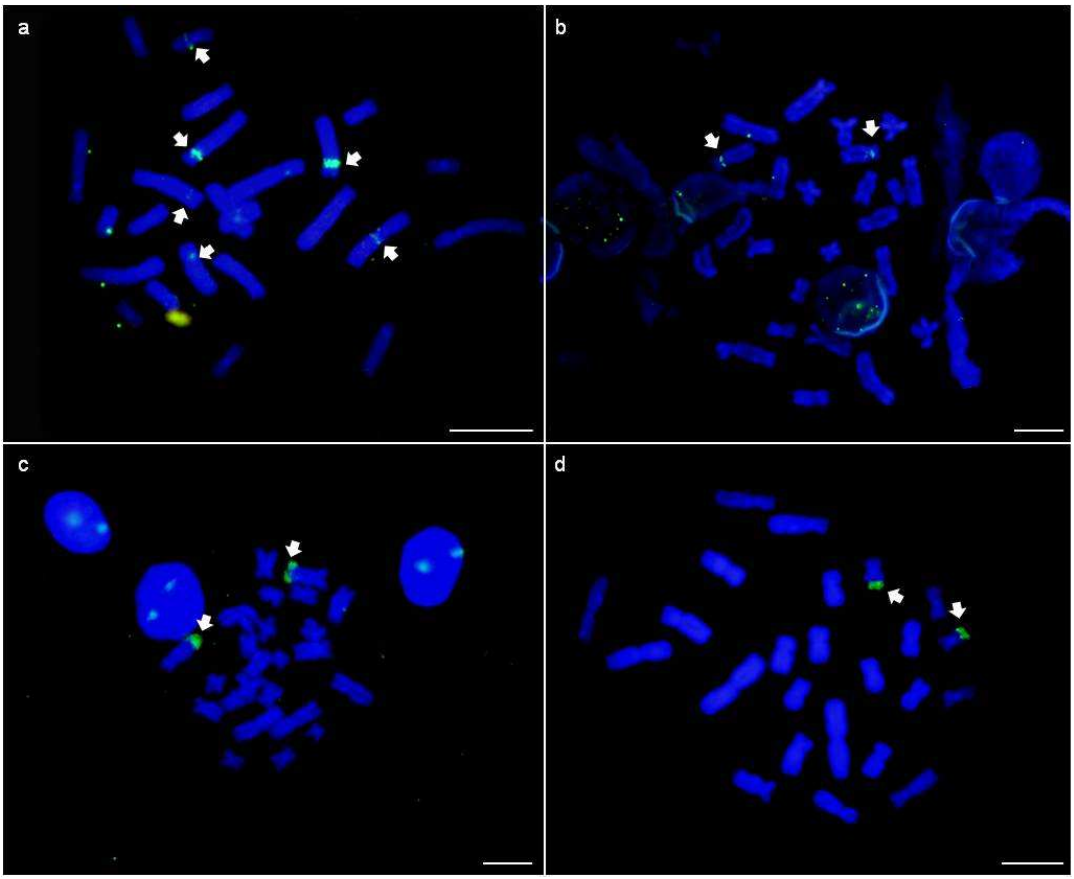
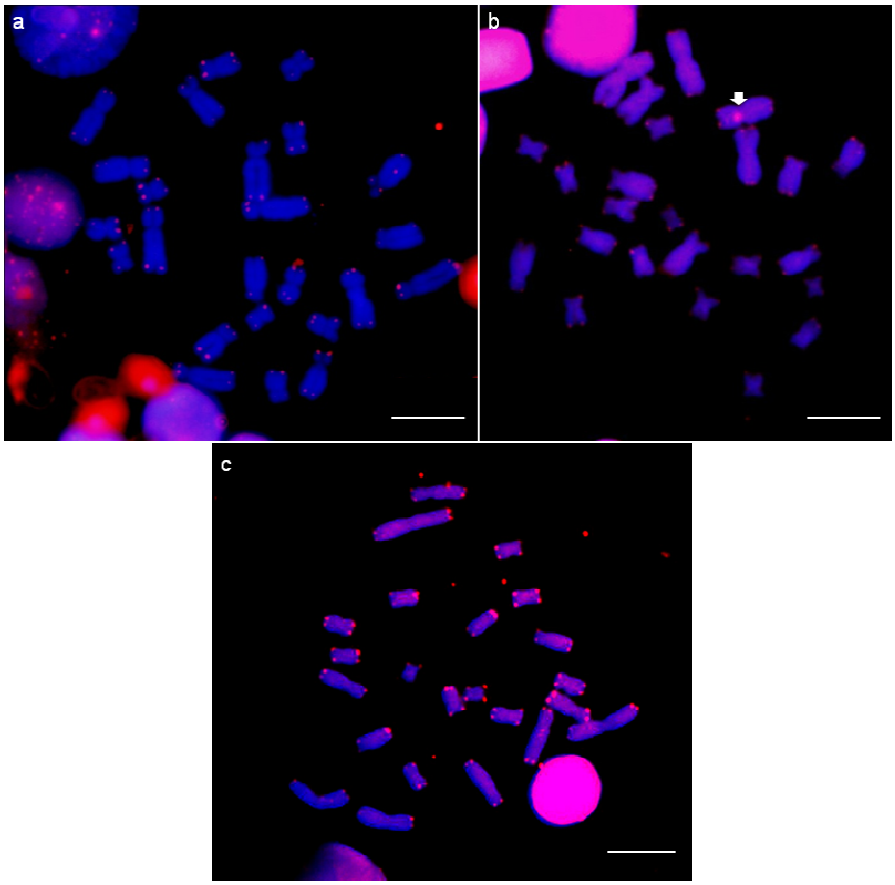


Figura 8



ANEXO

PROCEDIMENTOS CITOGENÉTICOS

Procedimentos citogenéticos

Os procedimentos citogenéticos foram realizados para as espécies *Scinax catharinae*, *S. rizibilis*, *S.* aff. *alter* e *S. perereca* coletadas na área de estudo.

Obtenção de metáfases mitóticas - método direto

Foram utilizados os métodos descritos por Cole e Leavens (1971) e Baldissera et al. (1993) com algumas adaptações.

- Injetar intraperitonealmente no abdômen solução aquosa com fermento biológico e dextrose com as proporções de 0,1ml para cada 10g de massa corporal;
- Após um período de 48 horas, injetar intraperitonealmente no abdômen solução de colchicina 0,1% (proporção de 0,1ml/10g de massa corpórea);
- Após 4 horas, anestesiar o exemplar com lidocaína 5%;
- Retirar a medula óssea do fêmur e o fígado e tratá-los com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075 M;
- Desagregar os tecidos para obter solução homogênea;
- Deixar o tecido em solução de KCl por 40 min. a 37°C;
- Após este período, adicionar 3 gotas de fixador (metanol e acido acético, proporção 3:1) e deixar descansar por 10 min.;
- Homogeneizar a solução e centrifugar por 8 min., com 6000 rpm;
- Descartar o sobrenadante, completar com fixador e re-suspender o material;
- Deixar o material descansar overnight no congelador;
- Centrifugar por 8 min. com 6000 rpm, descartar o sobrenadante, completar com fixador e homogeneizar o material;
- Repetir este processo por mais duas vezes;
- Armazenar 2 ml do material no congelador.

Coloração cromossômica convencional com Giemsa

- Pingar três gotas do material em lamina de vidro limpa, sobre vapor de banho-maria a 60°C;
- Aguardar a secagem completa do material;
- Preparar solução de Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8);
- Corar a lamina com a Giemsa por 10 min;
- Retirar o excesso de corante com água destilada e deixar secar naturalmente.

Bandamento C

Para evidenciar os blocos de heterocromatina constitutiva, foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com adaptações.

- Mergulhar as lâminas já montadas em solução de acido clorídrico (HCl) a 0,2 N a 25°C e deixar por 15 min.;
- Lavá-las com água destilada e deixar secar completamente;
- Mergulhar as lâminas (uma de cada vez) em solução de hidróxido de bário ($Ba(OH)_2$) 5% a 25 ºC, por 3,5 min.;
- Lavar as lâminas em solução de HCl 1N a 25 ºC;
- Lavá-las em seguida com água destilada e deixar secar levemente;
- Mergulhar as lâminas em solução salina de 2xSSC a 50ºC por 25 min;
- Lavar em água destilada e corar com Giemsa 5% por 10 min antes da análise.

Coloração com Nitrato de Prata – Ag-RON

Para a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo foi utilizado o método descrito por Howell e Black (1980).

- Após preparar as lâminas, pingar sobre elas uma gota de solução coloidal revelaora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada, com adição de 0,5 ml de ácio fórmico) e duas gotas de Nitrato de Prata (1g de $AgNO_3$ dissovida em 2ml de água destilada);

- Cobrir com lamínula e levar para incubação em câmara úmida a 60°C por 3 min até que a mistura das soluções adquira coloração castanho-dourado;
- Lavar com água destilada e deixar secar naturalmente.

Dupla coloração CMA_3/DAPI

Para evidenciar regiões heterocromáticas ricas em pares G-C e A-T foi utilizada a coloração combinada com fluorocromos CMA3/DAPI, de acordo com Schweizer (1976).

- Após preparo das lâminas, adicionar 80µL de solução de cromomicina sobre cada lâmina, cobrir com lamínula limpa e deixar em câmara escura em refrigerador por 1h30min;
- Retirar a lamínula, lavar com água destilada e secar levemente;
- Adicionar 80µL de solução DAPI/antifading, cobrir com lamínula limpa, retirar o excesso da solução com papel e deixar em câmara escura por pelo menos 15 min antes da análise.

Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sonda 18S e sequências teloméricas $(TTAGGG)_{n.}$

O método aplicado seguiu Pinkel et al. (1986), com algumas adaptações.

- Lavar as lâminas montadas com solução em tampão PBS 1x em temperatura ambiente, durante 5 min em agitação;
- Desidratar em série alcoólica gelada (70, 85 e 100%) por imersão, por 5 min cada, e secá-las;
- Adicionar sobre cada lâmina 90µL de RNAse 10 mg/mL (0,4% RNAse/2xSSC), cobrir com lamínula limpa e incubar em câmara úmida a 37°C por 1 hora;
- Lavá-las com 2xSSC por 5 min em agitação por três vezes;
- Lavar em PBS 1x por 5 min;
- Mergulhar as lâminas em formaldeído 1% em PBS 1x com $MgCl_2$ 50mM em temperatura ambiente, durante 10 min;

- Desidratar em série alcoólica gelada (70, 85 e 100%) por imersão, por 5 min cada, e secá-las;
- Desnaturar o DNA, mergulhando as lâminas em solução de formamida 70% em 2xSSC e deixar em banho-maria a 70ºC por 5min;
- Mergulhar imediatamente as lâminas em etanol 70% gelado (-20ºC) durante 5 min e proceder com a série alcoólica;
- Cobrir cada lâmina com 50µL de solução de hibridização (50% formamida, sulfato dextrano 10%, 2xSSC e sonda (18S ou $(TTAGGG)_n$) marcada por PCR) e sobrepor lamínulas;
- Incubar o material em câmara úmida escura a 37ºC overnight;
- Lavar as lâminas em formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 durante 10min a 42ºC em agitação;
- Retirar a lamínula e repetir a lavagem;
- Lavar com 0,1xSSC em banho-maria a 60ºC durante 5min. Repetir este mesmo processo mais duas vezes;
- Lavar em solução de Tween 20 (0,05% em 2xSSC) durante 5min;
- Adicionar em cada lâmina 90µL de leite em pó 5% em 4xSSC e cobrir com lamínula por 15 min em câmara úmida;
- Lavar o material em solução de Tween 20 por 5min por duas vezes;
- Adicionar 80µL de Streptavidina-FITC (1µL/500µL deleite) em cada lâmina e deixar em câmara úmida em temperatura ambiente por 30 min;
- Lavar com Tween 0,5%/ 4xSSC por três vezes em agitação;
- Desidratar em série alcoólica por 5min;
- Cobrir cada lâmina com 80µL de DAPI/Antifading;
- Aguardar noo mínimo 15 min antes de analisá-las em microscópio de epifluorescência.

Literatura citada

BALDISSERA, F., P. OLIVEIRA, P. & S. KASAHARA. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case of supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética** 16 (2): 335-345.

COLE, C. J. & C. R. LEAVENS. 1971. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetological Review** 3: 102.

HOWELL, W. M. & D. A. BLACK. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer. **Experientia** 36: 1014-1015.

PINKEL, D., T. STRAUME & J. GRAY. 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** 83: 304-306.