

LUIZ FERNANDO KRAFT GALLEGO



**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ANFÍBIOS SIMPÁTRICOS ORIUNDOS DA
FLORESTA ATLÂNTICA**

Monografia apresentada para conclusão do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete
Cestari

CURITIBA

2008

LUIZ FERNANDO KRAFT GALLEGO



**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ANFÍBIOS SIMPÁTRICOS ORIUNDOS DA
FLORESTA ATLÂNTICA**

**CARIÓTIPOS DE TRÊS ESPÉCIES DA FAMÍLIA HYLIDAE: UM ESTUDO
COMPARATIVO CONTRIBUINDO PARA O CONHECIMENTO CITOGENÉTICO DO
GRUPO**

Monografia apresentada para conclusão do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete
Cestari

CURITIBA

2008

SUMÁRIO

LISTA DE IMAGENS/ TABELAS	iii
RESUMO.....	iv
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Sucinta consideração sobre os anfíbios anuros.....	5
1.2 Considerações sobre a citogenética de anfíbios anuros.....	7
1.3 Consideração sobre os anuros da Floresta Atlântica.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Local de coleta.....	11
3.2 Material biológico.....	11
3.3 Métodos.....	13
3.3.1 Obtenção de metáfases mitóticas	13
3.3.2 Coloração Convencional – Giemsa.....	14
3.3.3 Bandamento C.....	14
3.3.4 Coloração das regiões organizadoras de nucléolos Ag-Nors.....	14
3.3.5 Dupla Coloração CRM/DAPI.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4. 1 <i>Bufo abei</i>	16
4. 2 <i>Bokermannohila hylax</i>	18
4. 3 <i>Trachycephalus mesophaeus</i>	21
4. 4 <i>Hypsiboas bychorfi</i>	24
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE IMAGENS

FIGURA 1 – EXEMPLAR DE <i>B. abei</i>	11
FIGURA 2 – EXEMPLAR DE <i>B. hylax</i>	12
FIGURA 3 – EXEMPLAR DE <i>T. mesophaeus</i>	12
FIGURA 4 – EXEMPLAR DE <i>H. byrchofi</i>	12
FIGURA 5 - CARIÓTIPO DE <i>B. abei</i>	16
FIGURA 6 – BANDEAMENTO C E MARCAÇÃO AG-NOR EM <i>B. abei</i>	17
FIGURA 7 - CARIÓTIPOS DE <i>B. hylax</i>	18
FIGURA 8 – BANDEAMENTO C E MARCAÇÃO AG-NOR EM <i>B. hylax</i>	19
FIGURA 9 – REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EVIDENCIADAS COM CROMOMICINA A3/DAPI EM <i>B. hylax</i>	20
FIGURA 10 – CARIÓTIPO DE <i>T. mesophaeus</i>	21
FIGURA 11 – BANDEAMENTO C E MARCAÇÃO AG-NOR EM <i>T. mesophaeus</i>	22
FIGURA 12 – REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EVIDENCIADAS COM CROMOMICINA A3/DAPI EM <i>T. mesophaeus</i>	23
FIGURA 13 – CARIÓTIPO DE <i>H. Hylax</i>	24
FIGURA 14 – BANDEAMENTO C E MARCAÇÃO AG-NOR EM <i>H. Hylax</i>	25
FIGURA 15 – REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EVIDENCIADAS COM CROMOMICINA A3/DAPI EM <i>H. Hylax</i>	26
FIGURA 16 – CLADOGRAMA DE CARACTERES CITOGENÉTICOS.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– MATRIZ DE DADOS PARA CONSTRUÇÃO DO CLADOGRAMA.....	31
--	----

RESUMO

A Floresta Atlântica possui uma vasta fauna de anfíbios anuros, embora estudos citogenéticos deste grupo seja pouco representativos quando comparados aos de peixes e mamíferos. Nesse trabalho foram caracterizados os cariótipos de quatro espécies pertencentes a Floresta Atlântica paranaense: *Bufo abei*, pertencente a família Bufonidae, e *Bokermannohyla hylax*, *Trachycephalus mesophaeus* e *Hypsiboas bychorfi* pertencentes a família Hylidae. Essa é a primeira descrição citogenética para a espécie *B. Hylax*, e os resultados demonstram características bem conservadas no cariótipo, já que todos os exemplares das quatro espécies possuem apenas cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e um par portador de regiões organizadora de nucléolos (NORs) ativo. Dentro da família Hylidae o $2n = 24$ também é conservado, porém o padrão de bandas C, regiões ricas em GC/AT e localização das NORs é diversificado.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre os anfíbios anuros

Anfíbios são animais de pele fina e úmida, na qual não o correm pêlos ou escamas externas. São animais incapazes de manter a temperatura de seu corpo constante apenas por mecanismos internos, por isso são chamados animais de sangue frio ou peilotérmicos. A pele fina, rica em vasos sanguíneos e glândulas, permite-lhes que a utilizem na respiração, absorção de água e defesa. Quando necessitam de água encostam a região ventral de seu corpo na água e a absorvem pela pele. As glândulas são de dois tipos: mucosas para produção de muco e serosas, que produzem veneno. Todo o anfíbio produz substâncias tóxicas, mas com grande diferença nos níveis de toxicidade e os acidentes com humanos somente acontecerão se tais substâncias entram em contato com nossas mucosas ou sangue. Podem ser aquáticos ou terrestres. As formas aquáticas respiram através de brânquias, através da pele ou através de pulmões. As terrestres respiram geralmente tanto através dos pulmões quanto pela pele. Alimentam-se de minhocas, insetos, aranhas, e de outros vertebrados como pequenos mamíferos (POUGH 2008).

Reproduzem-se através de ovos que originam uma larva e posteriormente um adulto através do processo de metamorfose. Seus ovos são depositados em locais úmidos ou na água, pois não possuem casca para protegê-los da dessecação. Estudos de fósseis sugerem que o grupo teria evoluído a partir dos peixes pulmonados de nadadeira lobada e servido de ancestral para os répteis, além de ser o primeiro vertebrado em habitat terrestre. Em relação aos peixes (seus antecessores) os anfíbios possuem maior independência da água, contudo ainda não representam seres verdadeiramente terrestres, tendo a necessidade de viver em locais úmidos mesmo quando adultos. Surgiram no Devoniano e foram os primeiros animais terrestres. Embora seus antepassados pré-históricos tenham atingido tamanhos muito grandes, a

maioria dos anfíbios atuais não passa de 20 cm de comprimento, os menores podendo chegar a menos de 1 cm (POUGH 2008).

Os anfíbios tendem a habitar as regiões próximas ao Equador, sendo mais concentrados na região tropical. Apesar disso, algumas espécies possuem adaptações que lhes permitem viver em regiões frias, em grandes altitudes e até em desertos. Dessa maneira, existem cerca de 4.500 espécies descritas de anfíbios que se distribuem por todos os continentes, exceto a Antártida. São elementos importantíssimos nas cadeias e teias ecológicas, principalmente como controladores de insetos e outros invertebrados, sendo ora presas, ora predadores. No geral, são bons indicadores biológicos e ambientais, já que necessitam de um ecossistema equilibrado (associação entre meio biótico e abiótico) para manterem sua diversidade. Em termos ecológicos são importantes no fluxo de energia na cadeia trófica de uma ambiente porque convertem cerca de 90% do que consomem em massa corpórea, diferentemente dos seres endotérmicos. Dessa forma, os anfíbios apresentam taxas de crescimento muito elevadas, e por isso tornam-se ótimas presas de seres maiores (POUGH 2008).

A família Hylidae engloba os anuros conhecidos popularmente como pererecas ou relas. A principal característica desse grupo é a presença de ventosas na parte terminal dos dedos. Possui cerca de 880 espécies distribuídas em quatro subfamílias (FROST, 2004). No entanto, a existência de caracteres morfológicos altamente conservados, dificulta as investigações taxonômicas e filogenéticas, dado o alto grau de semelhança entre as espécies, havendo a necessidade do uso de métodos mais detalhados.

A citogenética tem se mostrado uma ferramenta interessante na caracterização das espécies de anfíbios e envolvendo todo um estudo referente aos cromossomos quanto à posição do centrômero, características morfológicas, organização estrutural, replicação, e evolução cariótipica. Gera dados de alta relevância quando aliada a outras linhas como a taxonomia tradicional e a ecologia, podendo contribuir na identificação de espécies crípticas e taxonomicamente problemáticas.

1.2 Considerações sobre a citogenética de anfíbios anuros

A citogenética é uma ciência híbrida, constituída de citologia e genética. Está embasada no fato do material hereditário de um organismo encontrar-se arranjado nos cromossomos. Essa forma de arranjo torna possível a economia em número de unidades segregacionais, aumentando a eficiência da segregação, reduzindo o perigo de ganho ou perda de outras unidades individuais, além de possibilitar uma difusão entre os componentes cromossômicos (SWANSON; MERZ; YOUNG, 1969).

Os cromossomos encontrados nos anfíbios são em grande parte metacêntricos e submetacêntricos, muito raramente subtelocêntricos ou acrocêntricos. Microcromossomos só estão presentes em casos raros, por exemplo, em *Rana temporaria* (SCHMID et. al, 1985). A poliploidização é um fenômeno difundido nos anuros que representa um papel importante na especiação e evolução deste grupo. Em nenhuma outra classe de vertebrados isto ocorre de forma tão freqüente e naturalmente como em Amphibia. Muitos estudos encontraram na família Hylidae, animais triplóides e tetraplóides, já na família Ranidae não há relatos de poliplóides. Experimentalmente, foram produzidos poliplóides submetendo os ovos a temperaturas ou choques de pressão (SCHMID et. al, 1985). SCHMID relatou uma população tetraplóide em Anura ($4n=44$) e observações das fases meióticas revelaram pareamento quadrivalente, o qual envolvia os quatro cromossomos supostamente homólogos. Os vários passos da evolução que levaram à variabilidade cariotípica entre as famílias de Anura devem ter surgido devido, principalmente, a alterações cromossômicas, do tipo fusão cêntrica (BEÇAK et. al, 1970). Os cromossomos de anfíbios diferem da maioria das outras classes de vertebrados, na freqüência de regiões de heterocromatina constitutiva (MIURA, 1995). Na maioria dos cariótipos de anuros estudados há de 3 a 5 blocos de heterocromatina. HEPPICH (1978) descreveu o padrão de banda C em *Rana esculenta*, *Rana ridibunda* e *Rana lessonae*. As três espécies do gênero apresentam heterocromatina constitutiva nos centrômeros, alguns telômeros, na constrição

secundária do par 10 e algumas bandas intercalares. Esse padrão se repete em estudos feitos em várias espécies do gênero *Hyla* (GRUBER et. al, 2002). Na maioria dos cariótipos de anuros a heterocromatina constitutiva está presente em centrômeros, telômeros e próximas às RONS mas, raramente, em posições intercalares. Durante a meiose, pareamentos desiguais podem ocorrer nas regiões organizadoras de nucléolos e trocas de cromátides podem levar a polimorfismos no tamanho das RONS, o que ocorre também em peixes. A maioria das espécies de Anuros examinadas possuem um só par homólogo de RONS no cariótipo.

De acordo com uma compilação feita por GRUBER (2002), menos de uma centena de espécies pertencentes a família Hylidae foram cariotipadas e esses estudos estão geralmente restritos a análises de mitose e meiose com coloração convencional. A sub-família Hylinae tem sido considerada como conservadora já que a maioria das espécies exibe cariótipo semelhante, com $2n=24$ e número fundamental de braços igual a 48, com poucas descrições para $2n=30$ e $2n=48$. Entretanto observa-se que mesmo conservando-se o número diplóide há uma grande variabilidade na localização das RONS e distribuição da heterocromatina.

1.3 Consideração sobre os anuros da Floresta Atlântica.

Na Floresta Atlântica são conhecidas cerca de 340 espécies de anfíbios, somando-se espécies das Ordens Anura e Gymnophiona. De acordo com o nível atual de conhecimento, cerca de 24% das espécies de anuros de Mata Atlântica, aproximadamente 80 espécies, são conhecidas apenas da sua localidade-tipo; dentre estas, oito espécies são restritas a apenas uma localidade do sul da Bahia (HADDAD e ABE, 1999). Grupos filogenéticos inteiros estão restritos à Mata Atlântica, como é o caso da Família Brachycephalidae, considerada como endêmica desta formação. Uma situação comum na Mata Atlântica é a ocorrência de espécies raras em locais restritos, o que aumenta as chances de declínios populacionais e extinções (exemplos de

espécies talvez extintas são *Holoaden bradei*, *H. luederwaldti*, *Paratelmatoobius lutzii*, entre outras).

A grande extensão da mata atlântica que gera variações no clima e fauna pode gerar diferenças nas pressões de seleção em cada região. Ainda levando em conta que várias populações de anfíbios acabam isoladas pela fragmentação dessas áreas, há grande probabilidade de diversificações em diferentes populações da mesma espécie. MARCELINO (2005), apresentou um trabalho sobre variação genética entre duas populações de *Hypsiboas bischoffi* pertencentes ao Paraná e São Paulo. Suas análises filogenéticas através dos métodos de Máxima Verossimilhança, Máxima Parcimônia e de inferências Bayesianas revelaram um padrão filogeográfico concordante com a diversidade fenotípica observada: duas linhagens divergentes. Logo, as populações de Anfíbios da Floresta podem exibir variações nos seus cariótipos, valorizando o estudo de espécies que já foram cariotipadas em outras regiões.

2 Objetivos

O objetivo principal desse trabalho foi caracterizar citogeneticamente a espécie *Bokermannohyla hylax*, pertencente a fragmentos da mata Atlântica próxima a cidade de Morretes. *B. hylax* é uma espécie que surgiu após a desfragmentação de alguns indivíduos do gênero *Hyla* no trabalho “The amphibian tree of life” publicado em 2006 que parece ser a revisão mais aceita para taxonomia desse grupo até o momento.

Hypsiboas bychorfi e *Trachycephalus mesophaeus* foram utilizadas para, além de descrever pela primeira vez o cariótipo dessas populações da Floresta Atlântica paranaense, possibilitar uma comparação citogenética entre espécies próximas.

Bufo abei é uma espécie de ampla distribuição nacional devido a sua grande capacidade de adaptação. Também está presente na mata Atlântica e foi cariotipada nesse trabalho para ser usado como um representante externo a família Hylidae na construção de um cladograma voltado para características citogenéticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de coleta.

As coletas foram realizadas nas proximidades da cidade de Morretes no Paraná. Os espécimes foram localizados, normalmente pelo seu canto, e capturados manualmente. As amostras foram constituídas totalmente por machos. Depois foram transportados vivos até o laboratório de citogenética da UFPR e mantidos em terrários. Após mortos, os animais foram fixados em formol 10% por um dia e transferidos para um vidro com álcool 70%. Os anfíbios foram tombados no museu de ciências naturais da UFPR.

3.2 Material biológico

As espécies utilizadas nesse estudo foram: *Bufo abei* (Figura 1), *Bokermannohyla hylax* (Figura 2), *Trachycephalus mesophaeus* (Figura 3) e *Hypsiboas bychorfi* (Figura 4).



FIGURA.1: Exemplar de *Bufo abei*.

(fonte: <http://www.herpetologie.naturkundemuseum-bw.de>)



FIGURA.2: Exemplar de *B. hylax*

(fonte: <http://www.herpetologie.naturkundemuseum-bw.de>)



FIGURA.3: Exemplar de *T. mesophaeus*.

(fonte: <http://www.herpetologie.naturkundemuseum-bw.de>)



FIGURA.4: Exemplar de *H. byrchofi*.

(fonte: <http://www.herpetologie.naturkundemuseum-bw.de>)

3.3 Métodos

3.3.1. Obtenção de metáfases mitóticas (COLE; LEAVENS, 1971).

Para obter metáfases mitóticas foi injetada, intraperitonealmente, solução de colchicina na concentração entre 0,01% a 0,1%, na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso do animal. Após duas horas o espécime foi sacrificado em uma solução de álcool. Com o auxílio de pinças e tesouras os fêmures, foram retirados. Após dissecada a musculatura, as epífises foram cortadas. Com auxílio de uma seringa, foram feitas lavagens sucessivas dos fêmures com solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075M, até a retirada total da medula óssea que foi recolhida em uma placa de Petri. Procedimento similar foi empregado para obtenção de suspensão celular a partir do fígado. Nesses casos, parte do órgão é colocada em solução hipotônica e a liberação das células foi feita desagregando o tecido com pinças e também com auxílio de uma seringa sem agulha.

Após obter a medula ou desagregar o fígado a suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga e incubada a 37°C, durante 45 minutos. Decorrido esse tempo, a pré-fixação foi feita adicionando à suspensão cerca de 6 gotas de fixador Carnoy (metanol e ácido acético, na proporção 3:1), gelado e preparado no momento do uso, por cinco minutos. Então, a solução foi centrifugada entre 900 a 1000 rpm, durante 7 minutos. Após retirado e descartado o sobrenadante, o botão de fundo foi ressuspensão com uma pipeta Pasteur. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Após a última centrifugação, e retirado o sobrenadante, foi colocado 1,5 ml de fixador Carnoy, ressuspensão o material e armazenado em microtubo do tipo Eppendorf no freezer à -20°C.

3.3.2 Coloração Convencional – Giemsa.

A coloração tradicional foi utilizada para análise do número, morfologia e fórmula cromossômica dos cariogramas das espécies em questão. O microtubo foi retirado do freezer, o material foi ressuspenso e a solução gotejada sobre vapor de água de um banho maria a 60°C. Em seguida, as preparações foram coradas com uma solução de Giemsa (5%) mais tampão fosfato (95%) por 10 minutos, a temperatura ambiente.

3.3.3 Bandamento C (Sumner, 1972).

A técnica utilizada para identificar as bandas C foi a de SUMNER (1972) com algumas modificações. Depois de montadas, as lâminas foram envelhecidas em estufa de 45°C por 1 dia. As preparações cromossômicas foram mergulhadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2M por 20 minutos a temperatura ambiente, em seguidas lavadas com água destilada. Na seqüência as lâminas foram mergulhadas por 2 minutos numa solução de Hidróxido de Bário ($Ba(OH)_2$) 5% a 60°C. As lâminas então, foram rapidamente lavadas em HCl 0,2M para remover o excesso de Hidróxido de Bário. Após esse procedimento as lâminas foram transferidas para uma solução salina de 2XSSC a 60°C em banho termostático por 25 minutos. Por fim, a preparação foi lavada com água destilada e corada com Giemsa a 10% por 10 minutos.

3.3.4 Coloração Ag-RON (Howell; Black 1980).

Esta técnica foi utilizada para evidenciar as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) por impregnação argêntica. As lâminas receberam 2 gotas de Nitrato de Prata ($AgNO_3$) a 50% e 1 gota de gelatina com pipetas individuais. As soluções foram misturadas suavemente e cobertas em seguida com uma lamínula. As lâminas foram colocadas dentro da câmara úmida (placa de Petri com papel filtro umedecido com água e dois suportes de vidro para apoiar a lâmina), que foi levada até uma estufa de

60°C até a preparação adquirir uma coloração marrom-dourado (em média 5 minutos). Após esse procedimento a lâmina foi lavada com água corrente e secada ao ar.

3.3.5 Dupla Coloração CMA3/DAPI (Schweizer, 1980).

A dupla coloração CMA3/DAPI é utilizada para evidenciar regiões ricas em AT (DAPI) e regiões GC (Cromomicina). Foi colocado cerca de 80µl da solução de cromomicina sobre cada lâmina. Esta foi coberta com uma lamínula e deixada por 1 hora em uma câmara escura. A lamínula deve ser deixada escorrer e em seguida lavada com água corrente. Após a preparação secar, foi adicionada 80µl de solução DAPI/Antifading, retirando-se o excesso com papel filtro. Após todos os passos concluídos o material foi analisado em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro azul e verde.

4 RESULTADOS

4.1 *Bufo abei*

B. abei apresentou $2n=22$ ($NF=44$) (Figura 5), e heterocromatina restrita as regiões centroméricas em todos os cromossomos. Apenas um par de regiões organizadoras de nucléolos ativa foi evidenciada, e está localizada na região pericentromérica do braço curto do par 9 (Figura 6).

FIGURA.5: Cariótipo em coloração convencional por GIEMSA da espécie *Bufo abei*.

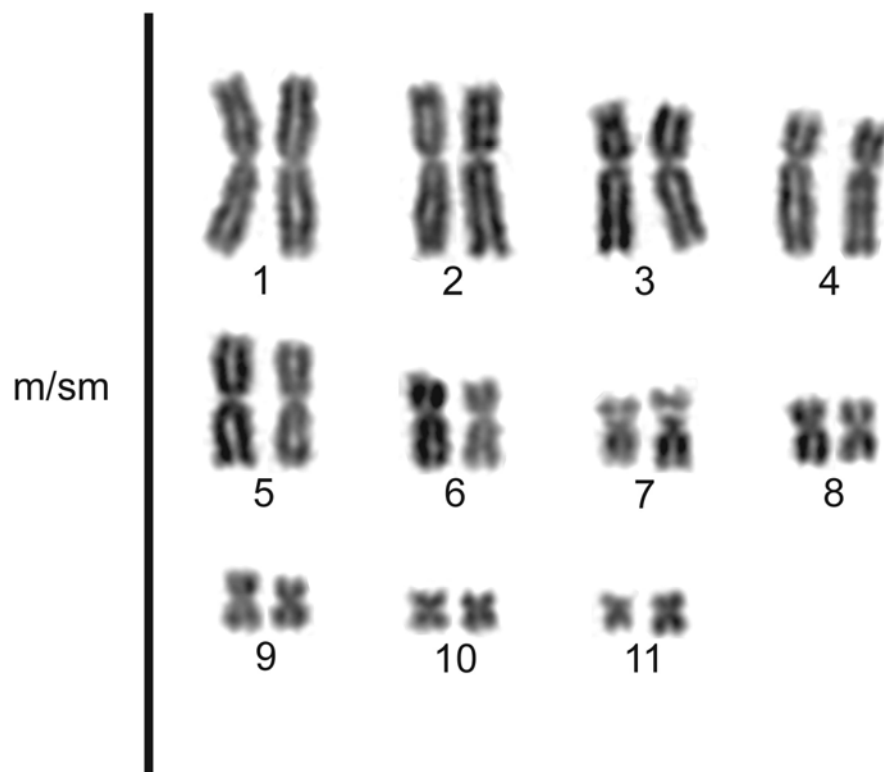


FIGURA.6: Bandamento C em *B. abei*. Em destaque o par portador das RONS evidenciado pela impregnação por prata.



4.2 *Bokermannohyla hylax*

B. hylax apresentou $2n=24$ ($NF=48$) (Figura 7). Foi evidenciada heterocromatina nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, nas regiões teloméricas dos pares 3, 5, 7, 9 e 12 e nas regiões pericentroméricas dos pares 3, 4 e 6 (Figura 8). Essas regiões foram GC positivas, salvo a marcação terminal do braço curto do par 9. Essa região é a portadora do único par de regiões organizadoras de nucléolos ativa e foi fortemente marcada pelo DAPI (Figura 9).

FIGURA.7: Cariótipo em coloração convencional por GIEMSA da espécie *Bokermannohyla hylax*.

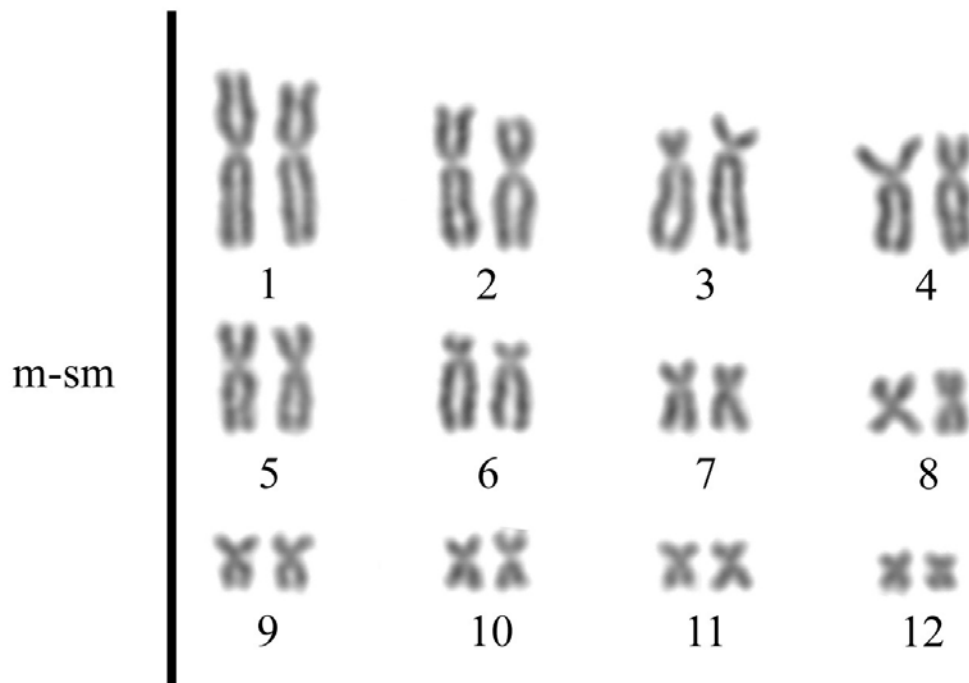


FIGURA.8: Bandamento C em *Bokermannohyla hylax*. Em destaque o par portador das RONS evidenciado pela impregnação por prata.

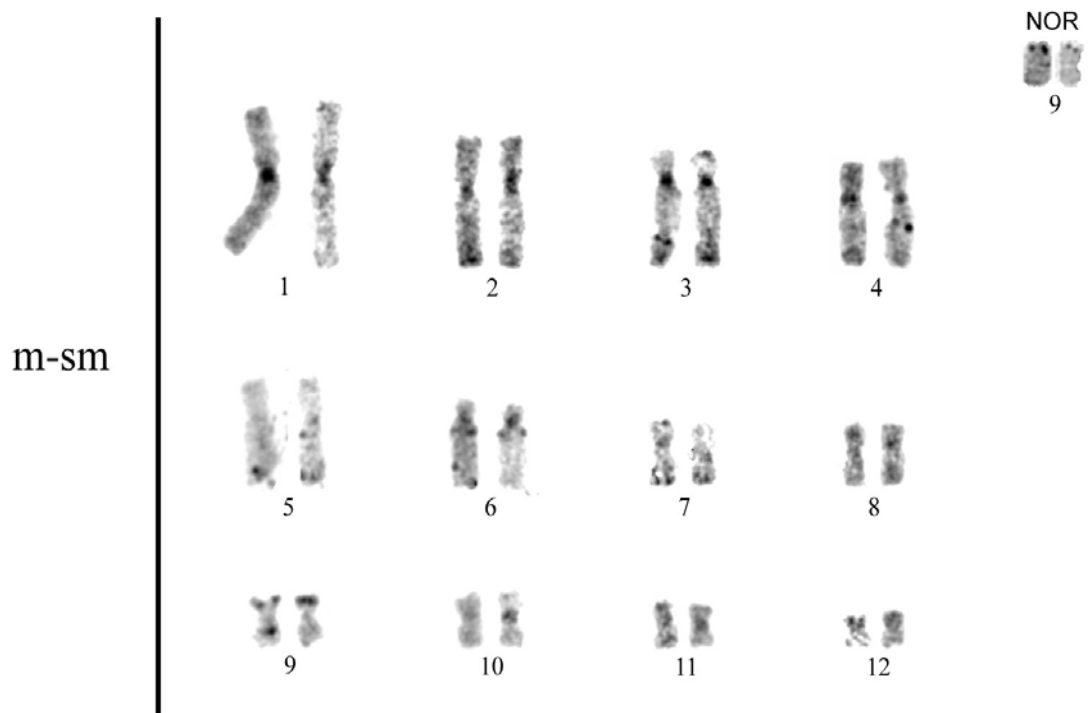
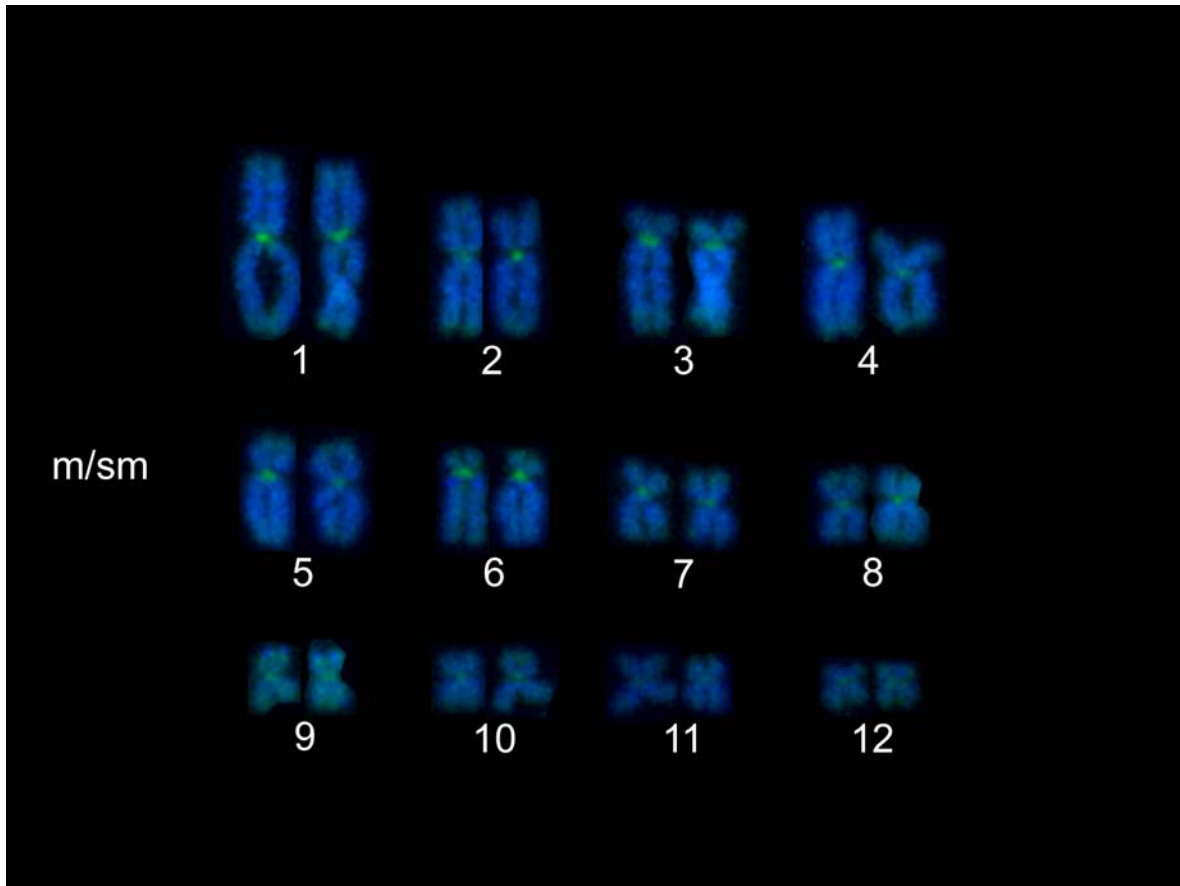


FIGURA.9: Cariótipo de *B. hilax* corado pelo fluorocromo Cromomicina A3 (GC específico) e contra-corado com o fluorocromo DAPI (AT específico).



4.3 *Trachycephalus mesophaeus*

Trachycephalus mesophaeus apresentou $2n=24$ (NF=48) (Figura 10). Foram evidenciadas regiões heterocromáticas nas regiões centroméricas e teloméricas de todos os cromossomos, e nas regiões pericentroméricas dos pares 4, 6 e 7 (Figura11). Essas regiões foram todas GC positivas. Inclusive a região terminal do braço longo do par 10, o qual é portador da RON (Figura12).

FIGURA.10: Cariótipo em coloração convencional por GIEMSA da espécie *Trachycephalus mesophaeus*.

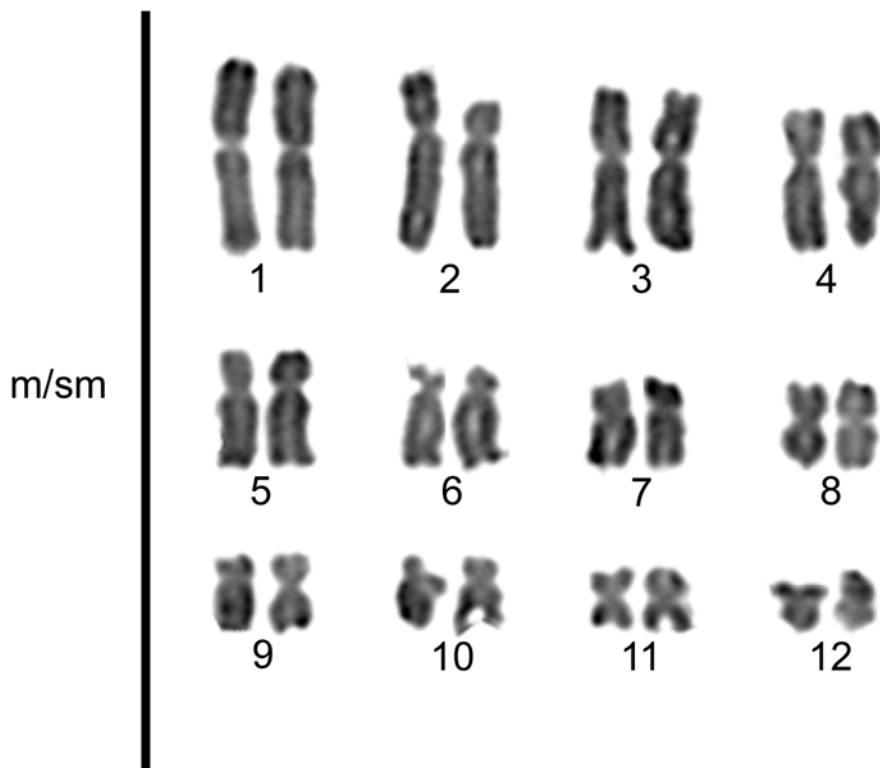


FIGURA.11: Bandamento C em *Trachycephalus mesophaeus*. Em destaque o par portador das RONS evidenciado pela impregnação por prata.

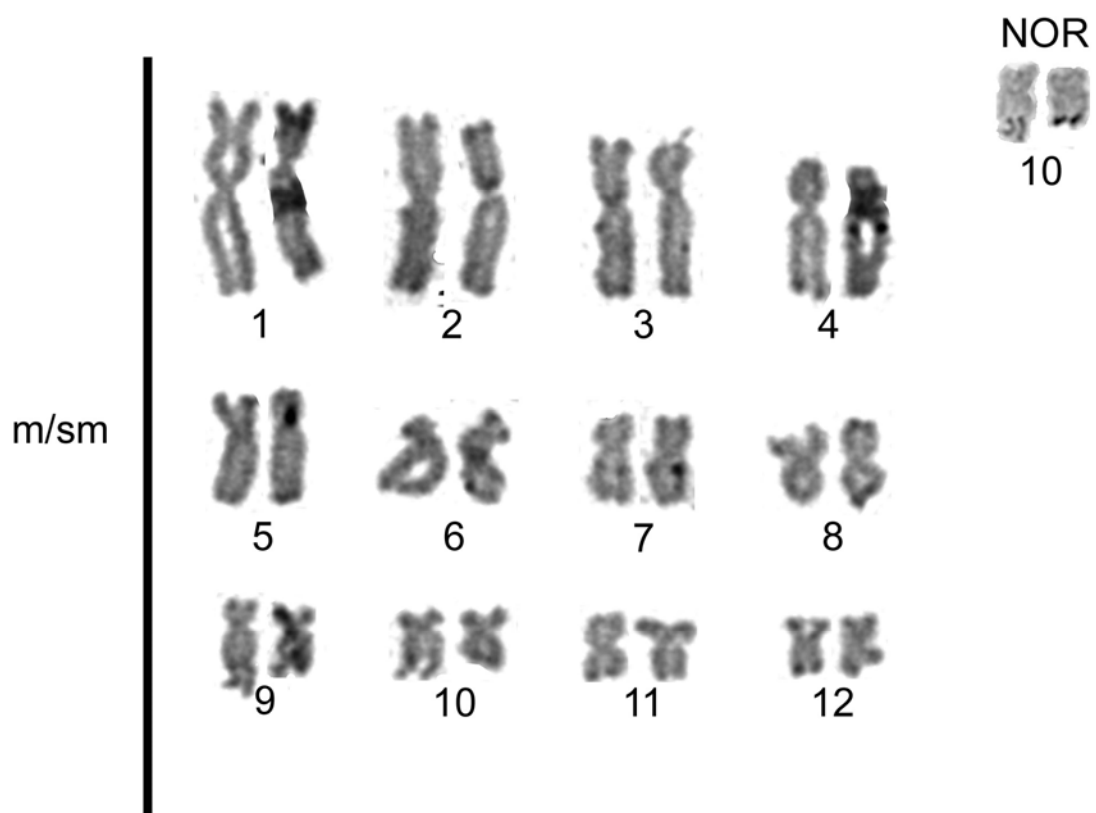
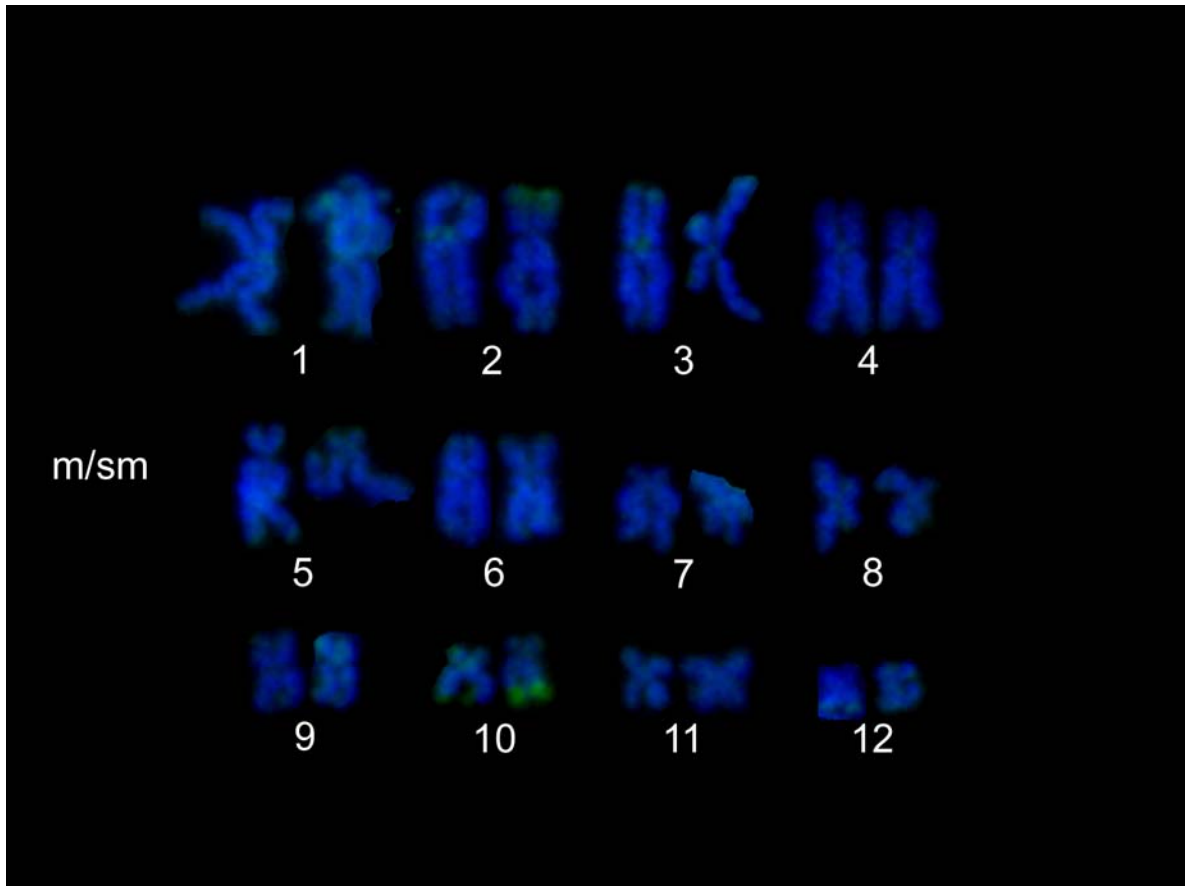


FIGURA.12: Cariótipo de *T. mesophaeus* corado pela coloração pelo fluorocromo Cromomicina A3 (GC específico) e contra-corado com o fluorocromo DAPI (AT específico).



4.4 *Hypsboas bychorfi*.

Hypsboas bychorfi apresentou $2n=24$ (NF=48) (Figura 13), sem marcações positivas para heterocromatina. Apenas um par de regiões organizadoras de nucléolos ativa foi evidenciada, e esta localizada na região pericentromérica do braço longo do par 7 (Figura 14). A dupla coloração CMA/DAPI não evidenciou nenhuma região com marcações predominantemente AT ou GC (Figura 15).

FIGURA.13: Cariótipo em coloração convencional por GIEMSA da espécie *Hypsboas bychorfi*.

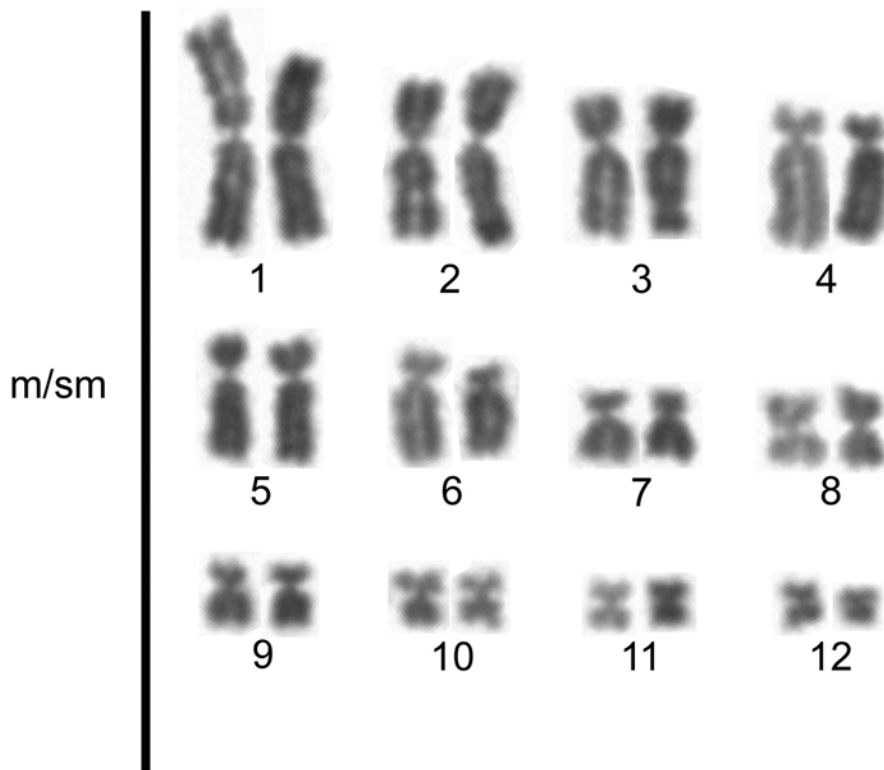


FIGURA.14: Bandamento C em *Hypsboas bychorfi*. Em destaque o par portador das RONS evidenciado pela impregnação por prata.

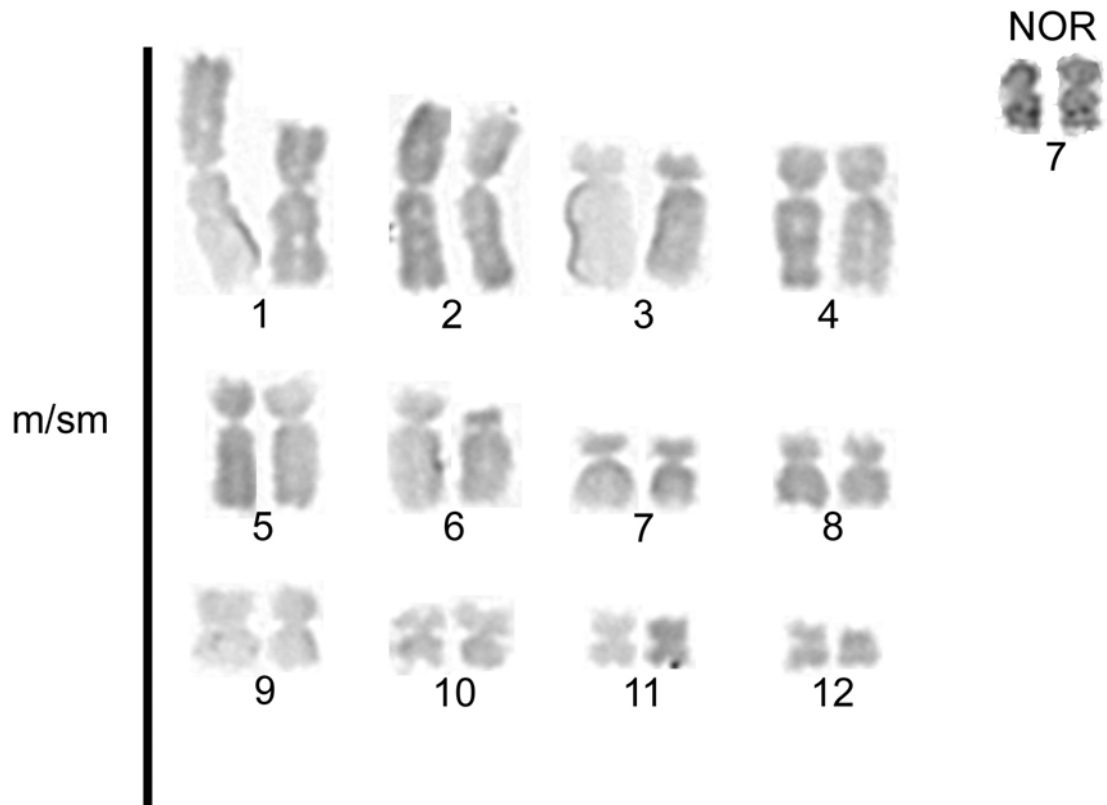
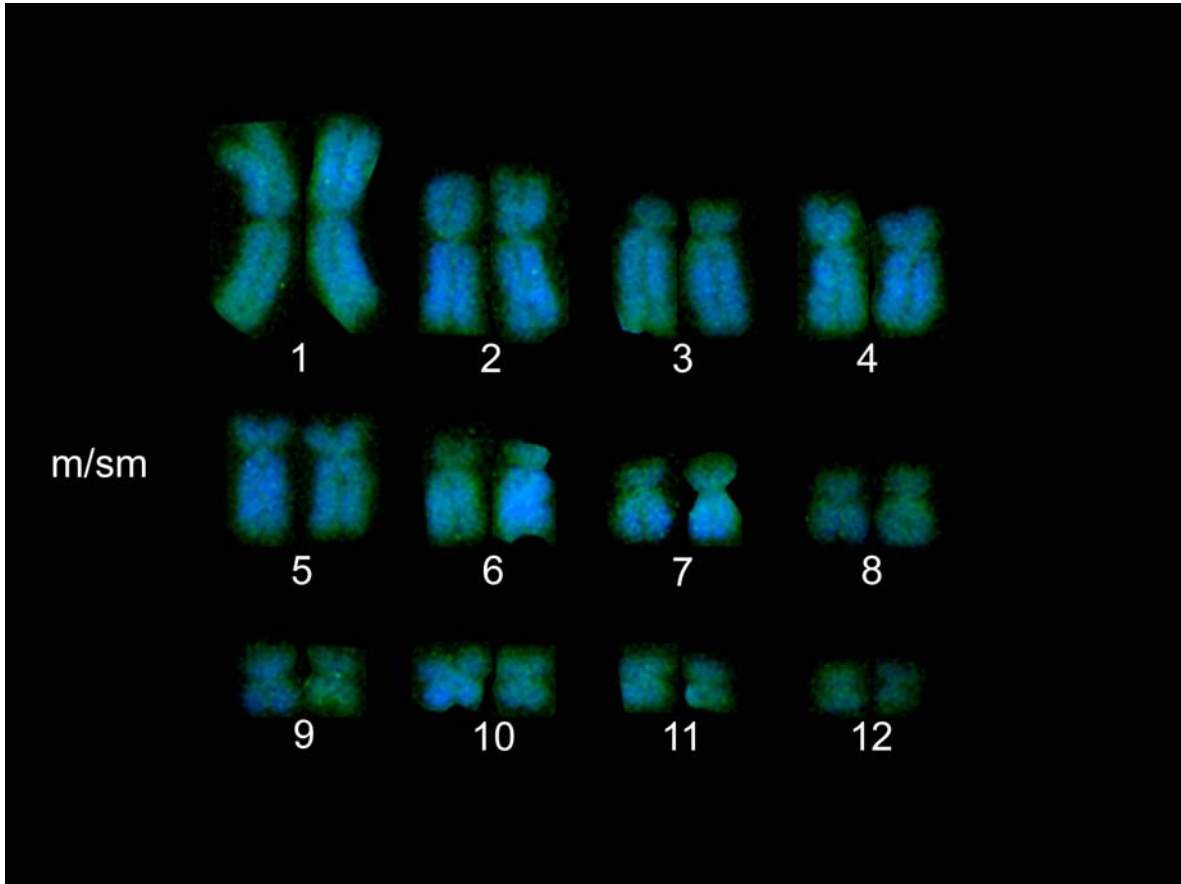


FIGURA.15: Cariótipo de *Hypsboas bychorfi* corado pelo fluorocromo Cromomicina A3 (GC específico) e contra-corado com o fluorocromo DAPI (AT específico).



5 DISCUSSÃO

A partir da análise dos cariótipos pode-se perceber que há plesiomorfias entre os grupos estudados. A primeira delas é a ocorrência exclusiva de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos nas quatro espécies, corroborando com outros estudos já realizados em anfíbios anuros. A ocorrência de cromossomos subtelo-cêntricos e acrocêntricos ocorre em ocasiões mais raras como em algumas espécies do gênero *Epipedobates* (MYERS, 1987) e grupos do gênero *Hyla* levando a um aumento no número diplóide das populações.

Bufo abei é uma das espécies de sapos mais abundantes no Brasil. Seguindo a filogenia dos anfíbios anuros representa a espécie que tem as características mais basais dentro do presente estudo, com $2n=22$ (NF=44). Esses números são comuns dentro do grupo dos bufos, mas não podem representar uma característica que os separe de outros anuros já que, por exemplo, a família Dendrobatidae apresenta número diplóide variando de 22 a 26 cromossomos (AGUIAR-JR., 2004). As outras três espécies estudadas: *B. hylax*, *T. mesophaeus* e *H. bychorfi*, pertencentes a família Hylidae, apresentaram $2n=24$ e NF=48. A ausência de cromossomos subtelo-acrocêntricos está relacionada ao fato de que o aumento do número diplóide dentro do grupo está associado a rearranjos do tipo fissão cêntrica, uma vez que números diplóides superiores a 24 são compostos de cromossomos supranumerários e/ou presença de cromossomos unibraquiais (subtelo/acrocêntrico).

As regiões heterocromáticas, nos anfíbios anuros, são geralmente menos diversificadas quando comparadas aos padrões observados em espécies de mamíferos e peixes pois, o bandamento C se restringe à marcações centroméricas como o observado em *Rhinella abei*, e de 3 a 5 grandes blocos heterocromáticos em outras espécies (MIURA, 1995). *B. hylax* também apresentou seus centrômeros heterocromáticos, mas alguns cromossomos tiveram marcações positivas em regiões pericentroméricas (pares 3, 4 e 6), e teloméricas (pares 3, 5, 7, 9 e 12). Esse padrão é muito parecido com *T. mesophaeus* que teve bandas C em todos os telômeros, centrômeros e em algumas regiões pericentroméricas (pares 4, 6 e 7). *H. bychorfi* não

teve nenhuma região heterocromática marcada, mesmo depois de repetidas tentativas e mudanças no protocolo. Logo, pode ser que essa espécie não tenha realmente regiões heterocromáticas passíveis de evidência pela técnica.

Apenas um par de regiões organizadoras de nucléolos foi observado nas quatro espécies, uma característica basal não só para os anfíbios como para os vertebrados. Múltiplos pares portadores são considerados um estado apomórfico e são encontrados em poucas espécies dentro dos anuros (LOURENÇO et. al, 1998; SCHMID, 1978). Já quanto a localização das RONS tende a variar bastante. Em *Rhinella abei* as RONS podem ocorrer em regiões pericentroméricas, terminais e subterminais dependendo das populações analisadas (SCHMID, 1978). Em *Bufo abei*, as RONS do exemplar analisado estavam no par 9, na parte subterminal do braço curto e são heterocromáticas. *B. hylax* também tem o par 9 como portador e a RON heterocromática, mas nessa espécie ela está na região terminal no braço curto do cromossomo. *T. mesophaeus* tem a sua RON no par 10, na região terminal do braço longo, e novamente essa região é heterocromática. Já *H. bychorfi* possui a RON na região subtlocêntrica do par 07, mas essa região não parece ser heterocromática. Essa variação quanto a localização da RON em cada espécie pode ter ocorrido principalmente por inversões durante a história evolutiva de cada espécie, pois estas regiões portadoras da RON são normalmente compostas por DNA altamente repetitivo, o qual é propício às transposições e/ou ampliações em tandem de rDNA. Dessa maneira podem ser explorados como marcadores espécie específicos em estudos de comparação populacional.

A técnica de dupla coloração DAPI/CMA3 foi aplicada apenas nas espécies da família Hylidae e demonstrou um padrão misto das heterocromatinas centroméricas e relacionadas com as RONS. Em *B. hylax* os centrômeros foram todos GC positivos, mas as marcações da RON estavam fortemente marcadas pelo DAPI, indicando a riqueza de pares AT. Esse resultado se repete em *H. bychorfi* a qual parece ter apenas o par portador da RON com uma marcação positiva para pares AT, corroborando com os resultados negativos encontrados na técnica de banda C. *B. hylax* e *H. bychorfi* já foram agrupadas juntas no antigo gênero *Hyla*, mas suas características citogenéticas

justificam a separação desses grupos em clados distintos, além de que entre as quatro espécies estudadas, elas são as mais próximas cariotipicamente. As regiões portadoras das RONS serem ricas em AT é uma característica derivada que ocorre nas duas espécies, podendo ter sido herdada de um ancestral comum. Em *T. mesophaeus* a dupla coloração DAPI/CRMA3, junto com os resultados do bandamento C, revelaram que suas regiões heterocromáticas são ricas em GC, e a região da RON, ao contrário das outras pererecas estudadas, também foi GC positivas. As marcações teloméricas ricas em GC apareceram mais freqüentes nesse grupo do que em *B. hylax*. Em comum com *B. hylax*, *T. mesophaeus* demonstrou dominância de pares GC nos centrômeros. Não foi empregada a técnica de dupla coloração DAPI/CRMA₃ em *B. abei*, mas segundo trabalhos prévios apenas as regiões centroméricas e a heterocromatina em volta da RON são GC positivos. (KASAHARAA et. al, 2003).

5.1 Cladograma

Com os resultados obtidos no presente estudo foi possível construir um cladograma referente às características citotaxonômicas utilizando o método de HENNING. *B. abei* foi utilizado como grupo externo, já que esta dentro do grupo dos bufonídeos. As características utilizadas foram:

A,0-Ausência de cromossomos Subtelocêntricos e/ou Acrocêntricos.

A,1-Presença de cromossomos Subtelocêntricos e/ou Acrocêntricos.

B,0-Presença de apenas um par de regiões organizadoras de nucléolos ativa.

B,1-Presença mais de um par de regiões organizadoras de nucléolos ativa.

C,0-Presença de bases GC em alta quantidade próxima das RONS.

C,1-Presença de bases AT em alta quantidade próxima das RONS.

D,0-Número diplóide igual a 22.

D,1-Número diplóide igual a 24.

E,0- Número fundamental igual a 44.

E,1- Número fundamental igual a 48.

F,0- Presença de bandas heterocromatina apenas centromérica.

F,1- Presença de bandas heterocromaticas centroméricas, pericentroméricas e terminas.

F,2- Ausência de heterocromatina.

G,0- RON na região pericentromérica do braço curto do par 9.

G,1- RON na região terminal do braço curto do par 9.

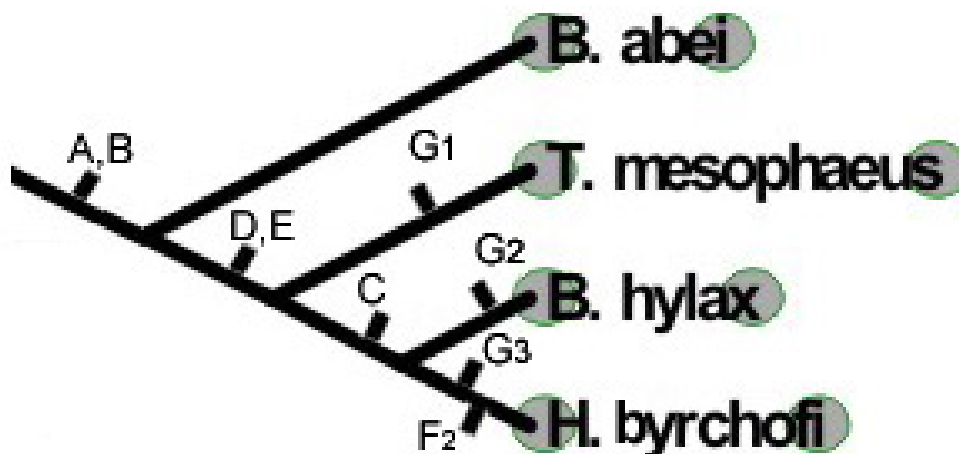
G,2- RON na região terminal do braço longo do par 10.

G,3- RON na região pericentromérica do braço longo do par 7.

TABELA.1: Matriz de dados citogenéticos das espécies *B. abei*, *B. hylax*, *T. mesophaeus*, *H. byrchofi*.

	A	B	C	D	E	F	G
<i>B. abei</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. hylax</i>	0	0	1	1	1	1	1
<i>T. mesophaeus</i>	0	0	0	1	1	1	2
<i>H. byrchofi</i>	0	0	1	1	1	2	3

FIGURA.16: Cladograma obtido através de caracteres citogenéticos das espécies *B. abei*, *B. hylax*, *T. mesophaeus*, *H. byrchofi*.



O objetivo desse cladograma foi simular um estudo de evolução cromossômica na família Hylidae. A macroestrutura dos cariótipos indica caracteres bem conservados que sustentam o cladograma. Mas quando aumentam os números de características

utilizadas, ou seja, de técnicas empregadas cada espécie exibe características próprias no seu padrão cromossômico.

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a citogenética é uma ótima ferramenta para auxiliar a taxonomia dos anfíbios, já que pode-se obter marcadores espécie específicos. A macroestrutura cariotípica verificada apresenta tendência à manutenção do número diplóide basal para a família Hylidae, especialmente em relação ao número cromossômico diplóide. O número constante e os polimorfismo de localização dos genes ribossomais, verificados entre as espécies propõe que a condição de RON simples seja a condição ancestral para o caráter passando por diferentes processos de rearranjo durante a evolução cromossômica. A heterocromatina está reduzida nesse grupo em relação a outros vertebrados. Enfim, os dados cariotípicos obtidos não permitem inferências seguras a respeito da evolução da família Hylidae, necessitando mais estudos com um maior número amostral de indivíduos, principalmente fêmeas, e de espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDISSERA, JR. FA, BATISTIC. RF. Estudos citogenéticos em banda C e RON de algumas espécies de anuros brasileiros. In: Abstracts of the 38th Congresso Nacional de Genética, Caxambu, MG, Brasil, September 1992.

BEÇAK, M.L., DENARO L. e BEÇAK, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in amphibians. *Cytogenetics* 9 1970.

COLE, C.J., LEAVENS, C.R. Chromosome preparations of amphibian and reptiles: improved technique. *Herpetol. Rev.* 3:102. 1971

FORD, C.E., HAMERTON, J.L. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Tech.*, 31:247-251. 1956

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F.B.; De Sa R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHELLER, W.C. *The Amphibian Tree of Life*. <http://amphibiatree.org/?q=node/126>. 2006

GRUBER, S.L. Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (Anura, Hylidae) dos grupos com $2n = 24$ e $2n = 30$, com técnicas de coloração diferencial. Universidade Estadual Paulista. 2002

HADDAD, C.F.B. & ABE, A. Anfíbios e Répteis. In: Workshop Floresta Atlântica e Campos Sulinos. http://www.bdt.org.br/workshop/mata.atlantica/BR/rp_anfib 1999

HEPPICH, S. Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta*. *Z. Zool. Syst. Evol. Forsch.* 16: 27–39. 1978

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. (1978). Controlling silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a. 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015, 1980. 1978

KASAHARAA , S.; ZAMPIERI Silva A.P.; GRUBERA S.L.; HADDAD C.F.B. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil *Cytogenet Genome Res* 2003;103:155-162. 2003

LOURENÇO LB, RECCO PIMENTEL SM; CARDOSO AJ. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 6:621-628. 1998

Marcelino, V.R.; GIOVANELLI, J.G.; HADDAD, C.F. Filogeografia comparada de anuros do sul da Mata Atlântica: contrastando hipóteses de diversificação biológica. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. 2005

MIURA I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla*, and *Bufo* (Amphibia: Anura). *Chromosoma* 103:567–574. 1995

POUGH, F. HARVEY. *A vida dos vertebrados*, editora Atheneu, 4ª edição, 2008.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia, I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*. 1950

SCHWEIZER. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324. 1980

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

SWANSON, C.P.; MERZ, T.; YOUNG, W.J. Citogenética. Editora da Universidade de São Paulo, Editora Polígono. 1969