
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Biologia Celular e Molecular

**SIMILARIDADE CARIOTÍPICA ENTRE *Barycholos*
ternetzi E CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO
Eleutherodactylus DO SUDESTE DO BRASIL (ANURA,
LEPTODACTYLIDAE, ELEUTHERODACTYLINAE)**

João Reinaldo da Cruz de Campos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular)

Fevereiro
2006

**SIMILARIDADE CARIOTÍPICA ENTRE *Barycholos ternetzi*
E CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO *Eleutherodactylus* DO
SUDESTE DO BRASIL (ANURA, LEPTODACTYLIDAE,
ELEUTHERODACTYLINAE)**

João Reinaldo da Cruz de Campos

Orientadora: **Sanae Kasahara**

Co-orientador: **Fernando Ananias**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular)

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil

2006

- 597.8 Campos, João Reinaldo da Cruz de
C198s Similaridade cariotípica entre *Barycholos ternetzi* e cinco espécies do gênero *Eleutherodactylus* do Sudeste do Brasil (Anura, Leptodactylidae, Eleutherodactylinae) / João Reinaldo da Cruz de Campos. -- Rio Claro, [86p], 2006.
f. : il. figs., gráfs., tabs.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Instituto de Biociências
Orientador: Sanae Kasahara
Co-orientador: Fernando Ananias
1. Anuro. 2. Cromossomo. 3. Citogenética. 4. Coloração diferencial. 5. Anfíbios. I. título

*Nunca, jamais desanimeis,
embora venham ventos
contrários*

Santa Paulina

*Dedico este trabalho aos meus pais
João (in memoriam) e Cida, que mesmo
sem entender o que fiz me apoiaram
incondicionalmente, sempre*

Agradeço especialmente à Dra. Sanae Kasahara pela excelente orientação, amizade e exemplo de profissionalismo e competência; e ao amigo André Bombeiro pelo convívio e companheirismo durante quase toda a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e co-orientador Dr. Fernando Ananias, que sempre me apoiou e acreditou em mim;

À Dra. Ana Paula Zampieri Silva, uma das grandes responsáveis pela minha vinda a Rio Claro;

Ao Dr. Célio F. B. Haddad pelas coletas e identificação dos anuros, e pelas discussões sobre a sistemática e taxonomia dos grupos em estudo;

A todos que fazem ou fizeram parte do nosso grupo de pesquisa, principalmente ao Thiago, Gal, Simone, Eduardo e João; embora alguns tenham optado por rumos diferentes estarão sempre em meus pensamentos;

Aos funcionários do Instituto de Biociências de Rio Claro, especialmente Lucila, Neuza, Mônica e Gerson pela amizade e pelas conversas divertidas durante os “lanchinhos”;

À Cristiane Miléo, não só pelo apoio nas questões de informática, mas principalmente pela pessoa maravilhosa que é;

Aos professores e amigos do Departamento de Biologia, em especial às Dras. Doralice, Carmem, Maria Isabel, Ana Maria e, particularmente à Dra. Patrícia pelo auxílio na técnica de FISH;

Aos grandes amigos Rogilene, Dani e Fred, pessoas fantásticas que merecem todo o meu carinho;

A todos os amigos e colegas de laboratório, especialmente ao Márcio, Marielle, Janaína, Isabela, Thaís, Márcia, Tatiana, Renata, Juliana, Douglas, Zé Augusto, Rosângela e Sandra, muito obrigado pela simpatia de sempre e pelos inúmeros momentos de descontração;

Aos amigos do 4º CBI de 2005, Jaqueline, Xyne, Marcela, Priscila Hayashi, Cíntia (e Oz), Nádia, Gustavo, Luiz, Rubén, Mônica, entre outros, obrigado pela companhia de sempre no RU e pelos divertidos encontros culinários feitos em casa;

Aos amigos e professores da Universidade Braz Cubas de Mogi das Cruzes, que sempre me apoiaram e torceram por mim, especialmente ao Kleber, Adriana, Cátia, Juliana, Regina, Edson, Viviane e Ziva Maria;

Ao Flamarion e Elisete, que muito carinhosamente me acolheram e me fizeram parte de sua família;

À chefia do Departamento de Biologia de Rio Claro pela facilidade no uso das instalações do IB;

Aos funcionários da Biblioteca, principalmente à Moema, pelo auxílio nos COMUTs;

Ao Dr. Vladimir Pavam Margarido e ao Dr. Luis Antonio Carlos Bertollo do laboratório de Genética e Evolução de Peixes da UFSCar, pela facilidade na realização da técnica de FISH;

Ao Programa de Capacitação de Pessoal (CAPES) pelo apoio financeiro concedido e pela bolsa de Mestrado;

Ao Programa de Caracterização, Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade do Estado de São Paulo (BIOTA-FAPESP), pelo auxílio financeiro ao trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela ajuda financeira ao grupo de pesquisa;

A todos os meus familiares, especialmente aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e compreensão durante a minha ausência;

E, finalmente, a Deus, por permitir que tantas pessoas maravilhosas façam parte da minha vida.

Sumário

	página
I. RESUMO.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUÇÃO.....	5
IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1. Considerações sobre os gêneros <i>Barycholos</i> e <i>Eleutherodactylus</i>	9
2. Citogenética do gênero <i>Eleutherodactylus</i>	16
V. OBJETIVOS.....	26
VI. MATERIAL.....	28
VII. MÉTODOS E TÉCNICAS.....	34
1. Obtenção das preparações cromossômicas a partir de medula óssea, fígado, baço e testículo, segundo BALDISSERA Jr <i>et al.</i> (1993), com modificações.....	34
2. Obtenção das preparações cromossômicas a partir de intestino e testículo, segundo SCHMID (1978), com modificações.....	35
3. Preparação de lâminas.....	36
4. Coloração convencional com Giemsa.....	36
5. Marcação de regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RONs), segundo HOWELL e BLACK (1980), com modificações.....	37
6. Coloração da heterocromatina (banda C), segundo SUMNER (1972), com modificações.....	37
7. Coloração por fluorocromos GC e AT específicos, segundo SCHWEIZER (1980) e CHRISTIAN <i>et al.</i> (1998), com modificações.....	38
8. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda de DNAr, segundo GALETTI Jr e MARTINS (1999), com modificações.....	39
9. Análises cromossômicas.....	40
VIII. RESULTADOS.....	42
IX. DISCUSSÃO.....	63
X. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

I. RESUMO

Estudos citogenéticos comparativos foram realizados em seis espécies de Eleutherodactylinae, da região Sudeste do Brasil: *Barycholos ternetzi*, *Eleutherodactylus binotatus*, *E. juipoca*, *Eleutherodactylus* sp., *E. guentheri* e *E. parvus*. Foram feitas análises, em alguns casos pela primeira vez, com coloração pelo Giemsa, Ag-RON, banda C, coloração por CMA₃ e DAPI e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr.

Todas as espécies apresentaram $2n=22$ e grande similaridade nos cariótipos com coloração convencional, apesar da variação dos pares 8, 10 e 11 que são telocêntricos em algumas espécies e submetacêntricos em outras. *Barycholos ternetzi* e *Eleutherodactylus binotatus* com NF=38 têm esses três pares telocêntricos e os demais cromossomos, metacêntricos ou submetacêntricos; *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp. com NF=40 mostraram apenas os pares 8 e 11 telocêntricos; e *E. guentheri* e *E. parvus* com NF=44 apresentaram os pares 8, 10 e 11 com dois braços cromossômicos, assim como os demais elementos do cariótipo. Diferentemente do observado nas espécies de *Eleutherodactylus* com Ag-RONs em apenas um par de cromossomos, isto é, no par 1 em *E. binotatus*, no par 11 em *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp. e no par 6 em *E. guentheri* e *E. parvus*, *B. ternetzi* mostrou sítios Ag-positivos nos cromossomos dos pares 1, 4, 5, 9 e 11, com apenas 1 a 3 marcações por metáfase em cada indivíduo. Contudo, o par principal com Ag-RON na espécie parece ser o 11, como em *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp. O sítio da RON foi

comprovado pela técnica de FISH em *E. binotatus* e em um dos exemplares de *B. ternetzi* que mostrou marcação de Ag-RON do tipo 9p 11p11p.

As espécies mostraram padrão centromérico de banda C, mas bandas intersticiais ou teloméricas foram observadas em alguns casos. As mais marcantes são as de *E. binotatus* de localidades distintas, o que é sugestivo de diferenças populacionais no padrão de bandas C. A coloração com CMA₃ e DAPI, contracolorados ou não com DA, evidenciou a natureza molecular de algumas regiões repetitivas nos cariótipos de *B. ternetzi*, *E. binotatus*, *E. juipoca*, *E. guentheri* e *E. parvus*. Em um macho de *E. binotatus*, foi observado um extenso heteromorfismo envolvendo pelo menos cinco diferentes pares, provavelmente como conseqüência de múltiplas translocações recíprocas. Tais rearranjos devem explicar o aparecimento de multivalentes na meiose desse, assim como de um outro macho, ainda que não tenha mostrado heteromorfismo cromossômico.

Apesar das discrepâncias, principalmente na morfologia dos pares 8, 10 e 11 e em alguns padrões de bandamento, pode-se dizer que as cinco espécies de *Eleutherodactylus* mostram uma grande uniformidade no padrão cariotípico, o que justificaria a constituição de um conjunto de espécies do Sudeste e Sul do Brasil. Sem dúvida, *B. ternetzi* poderia fazer parte desse conjunto, devido à sua grande semelhança cariotípica em relação a esses *Eleutherodactylus*, enfatizando-se que a espécie compartilha também de vários outros caracteres do referido gênero.

II. ABSTRACT

Comparative cytogenetic studies were carried out in six species of Eleutherodactylinae of Southeastern Brazil: *Barycholos ternetzi*, *Eleutherodactylus binotatus*, *E. juipoca*, *Eleutherodactylus* sp., *E. guentheri*, and *E. parvus*. Chromosome analyses, in some cases for the first time, were based on standard Giemsa staining, Ag-NOR, C banding, CMA₃ and DAPI fluorochrome staining, and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with an rDNA probe.

All the species showed $2n=22$ and great similarity in the standard stained karyotypes, despite the variation in the chromosome pairs 8, 10 and 11, which are telocentric in some species and submetacentric in others. In *B. ternetzi* and *E. binotatus* with $NF=38$, these three chromosome pairs are telocentric, whereas the remainder are metacentric or submetacentric; *E. juipoca* and *Eleutherodactylus* sp. with $NF=40$ had just pairs 8 and 11 as telocentric; and *E. guentheri* and *E. parvus* with $NF=44$ had bi-armed chromosome pairs 8, 10, and 11, as well as the other chromosomes in the karyotype. Differently to what is observed in the species of *Eleutherodactylus* with a single chromosome pair bearing Ag-NOR, that is, in pair 1 in *E. binotatus*, pair 11 in *E. juipoca* and *Eleutherodactylus* sp., and pair 6 in *E. guentheri* and *E. parvus*, *B. ternetzi* showed Ag-positive sites in the chromosomes of pairs 1, 4, 5, 9, and 11, with only one to three labelings per metaphase in each individual. Nevertheless, the main chromosome pair with Ag-NOR in the species seems to be the 11th, as in *E. juipoca* and *Eleutherodactylus*

sp. The NOR site was confirmed by FISH technique in *E. binotatus* and in one of the specimens of *B. ternetzi*, bearing Ag-NOR pattern of 9p 11p11p type.

All the species showed centromeric C banding pattern, but interstitial or telomeric bands have been observed in some cases. The most remarkable bands correspond to those observed in *E. binotatus* from distinct localities, suggesting interpopulational differences in the C banding pattern. The fluorochromes CMA₃ and DAPI, with or without DA counterstaining, provided the molecular content of some repetitive regions in the karyotypes of *B. ternetzi*, *E. binotatus*, *E. juipoca*, *E. guentheri*, and *E. parvus*. One male of *E. binotatus* had an extensive heteromorphism involving at least five different pairs, probably as a consequence of multiple reciprocal translocations. Such rearrangements might be responsible for the meiotic multivalent chains seen in this specimen, as well as in another male although, not exhibiting chromosome heteromorphism.

Despite the discrepancies observed mainly in the morphology of pairs 8, 10, and 11 and in some banding patterns, the five species of *Eleutherodactylus* share a great uniformity in the karyotypes, so that an assemblage of *Eleutherodactylus* species from Southeastern and Southern Brazil might be suggested. Undoubtedly, *B. ternetzi* could be included in such assemblage, due to its karyotypic similarity with these *Eleutherodactylus* representatives, emphasizing that *B. ternetzi* also shares several other characters of the referred genus.

III. INTRODUÇÃO

Desde o início da ocupação da terra pelos anfíbios, há aproximadamente 350 milhões de anos, os animais passaram por várias e extensas modificações na sua morfologia, fisiologia e ecologia, adaptando-se aos mais diversos ambientes e condições climáticas. De acordo com DUELLMAN e TRUEB (1994), a classe Amphibia se divide nas subclasses Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia, sendo essa a mais abundante. Cerca de 85% das espécies dessa última subclasse são da ordem Anura, as quais são representadas pelos sapos, rãs e pererecas (POUGH *et al.*, 1999). As demais espécies estão incluídas nas ordens Caudata (10%) e Gymnophiona (5%). Os anfíbios anuros são quase cosmopolitas, com ocorrência em, praticamente, todas as regiões do globo, com exceção da Antártida, altas latitudes no Ártico, algumas ilhas oceânicas e desertos extremamente secos (DUELLMAN e TRUEB, 1994; FROST, 2004).

Em um grupo com um grande número de espécies descritas, como é o caso dos Anura, não são incomuns os questionamentos sobre a taxonomia e sistemática devidos, em parte, à imprecisão ou à falta de dados que possam caracterizar as espécies de forma adequada. Isso tem suscitado a realização, nos últimos anos, de extensas revisões na ordem (FAIVOVICH, 2002; FAIVOVICH *et al.*, 2004; FAIVOVICH *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2005), com a utilização dos parâmetros baseados na morfologia externa, bioacústica, modo de reprodução, ecologia e distribuição geográfica, além daqueles obtidos em estudos citogenéticos e, cada vez mais, em análises moleculares. É importante aqui

ênfatar o recente estudo de FAIVOVICH *et al.* (2005), no qual foi realizada uma ampla revisão da sistemática da família Hylidae, com ênfase na subfamília Hylinae, com o suporte dos dados de seqüenciamento de DNA mitocondrial e nuclear. No referido trabalho, os autores reclassificaram uma série de espécies, fazendo grandes alterações no estado sistemático da família Hylidae, inclusive com a exclusão da subfamília Hemiphractinae, alocando-a em Leptodactylidae, além de modificações na nomenclatura de espécies, algumas até transferidas para outros gêneros.

Os primeiros estudos de cariótipo de anfíbios são da década de 30, realizados, de início, com base em observação somente de células meióticas e, a partir da década de 60, com análises de preparações mitóticas, graças ao uso da colchicina e da solução hipotônica, o que levou, desde então, a um aumento no número de publicações em citogenética de anuros (revisões em MORESCALCHI, 1973, 1979; KING, 1990; KURAMOTO, 1990). Os trabalhos pioneiros sobre os cariótipos de representantes da anurofauna brasileira foram realizados, não só por citogeneticistas do Brasil (BEÇAK *et al.*, 1966; BEÇAK, 1968; RABELLO, 1970; DENARO, 1972; FORESTI, 1972; LUCCA *et al.*, 1974, entre outros) como, também, por pesquisadores do exterior (BOGART, 1970b, 1973, entre outros), tendo em comum o fato de se basearem apenas em análises com coloração convencional. Tais trabalhos limitavam-se, na maioria das vezes, na apresentação do número diplóide ou haplóide, na descrição da morfologia dos cromossomos e, em alguns deles, havia relatos da posição de constrições secundárias e satélites. Apesar da carência de informações, hipóteses sobre os mecanismos mais prováveis de evolução cromossômica foram sugeridas como sendo as fusões cêntricas e a poliploidia com base no número e na morfologia dos cromossomos.

Um outro salto qualitativo na citogenética de anuros ocorreu na década de 70 com o uso de técnicas de coloração diferencial, padronizadas inicialmente para cromossomos humanos e adaptadas para os vertebrados em geral, inclusive, os anfíbios. A partir de então, a marcação da heterocromatina pelo bandamento C e das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RONs) tornou-se rotineira em trabalhos de citogenética de anuros e permitiu análises detalhadas dos cromossomos e, conseqüentemente, estudos comparativos mais efetivos

entre diferentes grupos de espécies ou populações (comentários em BATISTIC, 1984; KING, 1990; SCHMID *et al.*, 1990).

Subseqüentemente, outros procedimentos que promovem a diferenciação dos cromossomos foram padronizados, constituindo-se nos chamados métodos de citogenética molecular, alguns dos quais passaram a ser freqüentemente aplicados em anuros (SCHMID *et al.*, 1990), inclusive nos representantes da nossa fauna. Embora essas metodologias sejam conhecidas como de citogenética molecular, é importante enfatizar que nem todos os procedimentos envolvem a manipulação do material genético, mas são assim referidos por fornecerem algum tipo de informação sobre a natureza e organização molecular de regiões cromossômicas específicas e até sobre o funcionamento e regulação de certos genes, como os ribossomais. Dentre os métodos de citogenética molecular, destacamos aqueles que empregam a incorporação do análogo de base 5-bromodeoxiuridina (BrdU) na molécula de DNA no momento de sua replicação, a coloração com fluorocromos AT ou GC-específicos e, sobretudo, os baseados na hibridação *in situ* fluorescente (FISH) de sondas, principalmente, de DNAr e teloméricas.

Nos últimos anos, tem-se observado o uso crescente de diferentes abordagens na citogenética de anfíbios anuros, tanto no exterior como no Brasil, inclusive em nosso laboratório. Os trabalhos têm revelado casos de variantes estruturais de autossomos, presença de supernumerários e de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. É importante ressaltar que tais descobertas têm, de algum modo, contribuído para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação dos cariótipos, o que é muito importante para o entendimento da evolução cromossômica e das relações de parentesco entre diferentes grupos taxonômicos. Além disso, têm fornecido dados relevantes para se conhecer a estrutura e organização dos cromossomos, bem como para a citotaxonomia e identificação de novas entidades específicas, como nos casos de complexo de espécies e de espécies crípticas.

Apesar da anurofauna brasileira possuir uma grande diversidade, um número relativamente pequeno de espécies foi estudado sob o ponto de vista citogenético, sendo esse número ainda menor com o uso de técnicas mais resolutivas. Considerando-se a importância do emprego de marcação

cromossômica para diferenciar cariótipos bastante uniformes quando visualizados pela análise convencional, pretendeu-se, no presente trabalho, realizar uma caracterização mais detalhada dos cromossomos de *Barycholos ternetzi* e de espécies de *Eleutherodactylus*, algumas ainda não cariotipadas. A finalidade foi a de obtenção de subsídios para avaliar, do ponto de vista citogenético, as relações de parentesco que parecem existir entre esses dois gêneros.

IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Considerações sobre os gêneros *Barycholos* e *Eleutherodactylus*

Atualmente, a ordem Anura é dividida em 33 famílias com mais de 350 gêneros, que incluem cerca de 5000 espécies (FROST, 2004). Segundo esse autor, a família Leptodactylidae compreende 49 gêneros agrupados em cinco subfamílias: a Ceratophryinae, com seis gêneros; a Cycloramphinae, com 10; a Leptodactylinae, com 10; a Telmatobiinae, com 11; e a Eleutherodactylinae que, com o maior número de representantes entre os vertebrados, isto é cerca de 750 espécies, possui 12 diferentes gêneros, sendo eles *Adelophryne*, *Atopophrynus*, *Barycholos*, *Dischidodactylus*, *Eleutherodactylus*, *Euparkerella*, *Geobatrachus*, *Holoaden*, *Ischnocnema*, *Phrynopus*, *Phyllonastes* e *Phyzelaphryne*.

Uma classificação precisa dos gêneros da subfamília Eleutherodactylinae é, sobremaneira, dificultada pela grande variabilidade morfológica interespecífica, como ausência ou presença dos dentes vomerianos, discos nos dedos e até mesmo a observação de diferentes caracteres da cintura escapular (DUELLEMAN e TRUEB, 1994). Assim sendo, ainda existem muitas dúvidas relativas à taxonomia e sistemática da subfamília como, por exemplo, as que dizem respeito aos gêneros *Barycholos* Heyer, 1969 e *Eleutherodactylus* Duméril e Bibron, 1841.

O gênero *Barycholos* apresenta apenas duas espécies descritas, *B. ternetzi* (Miranda-Ribeiro, 1937) e *B. pulcher* (Boulenger, 1898) com ocorrência nos cerrados do Brasil Central e nos pântanos do Pacífico do Equador, respectivamente (LYNCH, 1980; FROST, 2004). Muitos questionamentos

taxonômicos existem no gênero *Barycholus*, seja pela sua semelhança morfológica com representantes de *Eleutherodactylus*, ou até mesmo, pela distância geográfica que separa as duas espécies. *Barycholus ternetzi* foi descrito com base em coleta realizada em Vão Maranhão, estado de Goiás, Brasil, recebendo inicialmente o nome de *Paludicola ternetzi* Miranda-Ribeiro, 1937. Conforme relato em CARAMASCHI e POMBAL Jr (2001), BOKERMANN (1966, *apud* CARAMASCHI e POMBAL Jr, 2001) transferiu, mais tarde, a espécie para o gênero *Physalaemus* Fitzinger, 1945 sem fazer maiores comentários, provavelmente porque *Paludicola* foi sinonimizado com *Physalaemus* por PARKER (1927 *apud* CARAMASCHI e POMBAL Jr, 2001). A nomenclatura *Physalaemus ternetzi* foi usada novamente por LYNCH (1970 e 1971, *apud* CARAMASCHI e POMBAL Jr, 2001), que associou a espécie com o grupo de *Physalaemus cuvieri*. Recentemente, CARAMASCHI e POMBAL Jr (2001) compararam *Barycholus savagei* Lynch, 1980 encontrado nos estados brasileiros de Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais, com o holótipo de *Paludicola ternetzi* depositado no Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (MNHN) sob tomo MNHN 1946-327, e sugeriram que ambas correspondem a uma só espécie. Portanto, *Barycholus savagei* seria sinônimo de *Paludicola ternetzi*, passando a referida espécie a ser denominada *Barycholus ternetzi* (Miranda-Ribeiro, 1937). O gênero *Barycholus* já foi considerado próximo de *Eleutherodactylus* por diversas características (HEYER, 1969; CARAMASCHI e POMBAL JR, 2001), particularmente no que se refere às espécies *Barycholus pulcher* e *Eleutherodactylus nigrovittatus* Andersson, 1945, ambas com distribuição geográfica bastante próxima, na região noroeste da América do Sul (LYNCH, 1980). De fato, HEYER (1969) ao descrever o gênero *Barycholus* relata que é muito próximo de alguns *Eleutherodactylus* de tamanho pequeno, porém, as espécies de *Barycholus* não possuem sulcos ou estrias nos discos dos dedos dos pés, o que é característico de representantes desse último gênero. Outra característica que diferencia os dois gêneros é o tipo de mesosterno, calcificado e bífido em *Barycholus*, enquanto cartilaginoso e laminar em *Eleutherodactylus*. Entre as semelhanças que os aproximam está o modo de reprodução com desenvolvimento direto, já definido em *B. ternetzi* (CARAMASCHI e POMBAL Jr,

2001) e sugerido por HEYER (1969) para *B. pucher*, com base na observação de grandes ovos com diferentes colorações encontrados nas fêmeas.

Diferentemente de *Barycholos*, o gênero *Eleutherodactylus* possui um número muito grande de espécies descritas, mais de 700 (FROST, 2004), constituindo-se no gênero mais abundante entre os vertebrados. De acordo com CASTANHO e HADDAD (2000), só no Brasil são conhecidas mais de 30 espécies, com ocorrência por todo o território nacional, muitas delas em simpatria. Segundo esses autores, só na região Sul e Sudeste são registradas 22 espécies. O número de representantes descritos para *Eleutherodactylus* tem aumentado substancialmente com o passar dos anos: FROST (1985) listou aproximadamente 400 espécies, DUELLMAN e TRUEB (1994) relataram mais de 500 e FROST (2002), cerca de 680, o qual na sua mais recente atualização (FROST, 2004) menciona uma relação que ultrapassa 700 espécies. Alguns herpetólogos, contudo, estimam que esse número possa ser bem maior, acima de 1000, devido ao fato de muitas espécies novas não terem sido sequer coletadas e outras permanecerem depositadas em coleções científicas ainda sem uma descrição formal ou com erros de identificação (CASTANHO e HADDAD, 2000; PADIAL e De La RIVA, 2005). Nesse caso, o número de espécies de *Eleutherodactylus* no território brasileiro deve, certamente, estar muito além de 30.

As espécies do gênero *Eleutherodactylus* ocupam uma grande variedade de habitats, do semiaquático ao arbóreo, o que favorece sua adaptação a diferentes condições climáticas. Tal fato explica a ampla distribuição geográfica, que vai do Sul dos Estados Unidos, onde foram introduzidas, até a Argentina (FROST, 2004). Os *Eleutherodactylus* possuem maior ocorrência nas florestas úmidas das montanhas andinas, em baixas altitudes da floresta Amazônica, na Mata Atlântica e nas clareiras dos Cerrados da América do Sul. De acordo com SCHARTZ e HENDERSON (1991, *apud* BOGART e HEDGES, 1995), embora sejam encontrados em quase todo o continente americano e com especiação muito acentuada nas Antilhas, em algumas ilhas oceânicas é o único gênero de Anura encontrado ou o gênero predominante em outras. É importante, também, ressaltar a notável radiação de representantes do gênero nas ilhas do Caribe, com mais de 125 espécies conhecidas, enquanto no Norte da América do Sul e

na América Central estão ainda em estágio de grande radiação e especiação (SCHMID, 2002a).

As chances de sucesso reprodutivo nos *Eleutherodactylus* são grandemente aumentadas pelo fato das espécies possuírem desenvolvimento direto, com exceção de *E. jasperi*, de Porto Rico, que é ovovivíparo com fertilização interna, assim como *E. coqui*, embora esse não apresente ovoviviparidade (DUELLMAN e TRUEB, 1994; FROST, 2004). Tais modos de reprodução devem ter contribuído para ampla distribuição das espécies de *Eleutherodactylus* em diferentes habitats.

Devido ao grande número de representantes e a variabilidade de formas encontradas, incluindo variação no padrão de coloração, uma extensa confusão taxonômica e sistemática envolve as espécies de *Eleutherodactylus*. Diversas tentativas de agrupamentos foram, então, feitas para as espécies do gênero, porém, ainda são bastante confusos. Em uma delas, LYNCH (1976) propôs três grupos de espécies para a região Sul e Sudeste, o grupo de *E. binotatus*, o de *E. lacteus* e o de *E. parvus* (Tabela 1). HEYER (1984) descartou a monofilia do grupo de *E. binotatus*, com a criação do *cluster* de *E. guentheri*, no qual incluiu, entre outras, espécies anteriormente alocadas no grupo de *E. binotatus*, além de considerar *E. henselli* como sinonímia de *E. guentheri* (Tabela 2). Mais tarde, LYNCH e DUELLMAN (1997), analisando a sistemática, ecologia e biogeografia de algumas espécies de *Eleutherodactylus* da América do Sul, descartaram a monofilia do grupo de *E. guentheri*, que havia sido sugerida por HEYER (1984), e propuseram vários agrupamentos para os representantes brasileiros descritos até aquela data (Tabela 3). As espécies que antes pertenciam ao grupo de *E. binotatus* de LYNCH (1976), nele permanecem até hoje. Recentemente, SIQUEIRA Jr *et al* (2004) afirmaram que os dados citogenéticos por eles obtidos não concordam com a inclusão de *E. guentheri* no grupo morfológico de *E. binotatus*, como proposto por LYNCH (1976), e que o *cluster* *E. guentheri* de HEYER (1984) é mais consistente com os seus resultados.

Atualmente, o grupo morfológico de *E. binotatus* inclui *E. binotatus* (Spix, 1824), *E. epipedus* Heyer, 1984, *E. erythromerus* Heyer, 1984, *E. gualteri* Lutz, 1974, *E. guentheri* (Steindachner, 1864), *E. izecksohni* (Caramaschi e Kisteumacher, 1989), *E. juipoca* Sazima e Cardoso, 1978, *E. nasutus* (Lutz,

1925), *E. octavioi* Bokermann, 1965 e *E. oeus* Heyer, 1984 (CASTANHO e HADDAD, 2000). Além do grupo de *E. binotatus*, outros seis agrupamentos foram propostos por LYNCH e DUELLMAN (1997), sendo eles o grupo de *E. lacteus* (cinco espécies), *E. parvus* (duas espécies), *E. unistrigatus* (sete espécies), *E. ramagii* (duas espécies), *E. sulcatus* (uma espécie) e *E. conspicillatus* (nove espécies).

Algumas espécies, também de ocorrência no Sul e Sudeste, não foram incluídas em nenhum dos grupos morfológicos conhecidos para representantes do gênero nessas regiões do Brasil, como é o caso de *E. bilineatus*, *E. crepitans*, *E. dundee*, *E. gehrti*, *E. manezinho*, *E. paranaensis*, *E. randorum*, *E. spanios*, *E. venancioi* e *E. vinhai* (HEYER, 1985; GARCIA, 1996; LANGONE e SEGALLA, 1996; CASTANHO E HADDAD, 2000; FROST, 2004).

Tabela 1. Proposta de agrupamento das espécies de *Eleutherodactylus* da região Sul e Sudeste do Brasil, de acordo com LYNCH (1976)

GRUPO	ESPÉCIES
<i>Eleutherodactylus binotatus</i>	<i>E. binotatus</i>
	<i>E. gualteri</i>
	<i>E. guentheri</i>
	<i>E. nasutus</i>
	<i>E. octavioi</i>
	<i>E. plicifer</i>
	<i>E. henselli</i>
	<i>E. hoehnei</i>
<i>Eleutherodactylus lacteus</i>	<i>E. lacteus</i>
	<i>E. nigriventris</i>
	<i>E. venancioi</i>
<i>Eleutherodactylus parvus</i>	<i>E. parvus</i>
	<i>E. pusillus</i>

Tabela 2. Proposta de agrupamento das espécies do grupo de *E. guentheri*, de acordo com HEYER (1984)

GRUPO	ESPÉCIES
<i>Eleutherodactylus guentheri</i>	<i>E. epipedus</i>
	<i>E. erythromerus</i>
	<i>E. gualteri</i>
	<i>E. guentheri</i>
	<i>E. nasutus</i>
	<i>E. oeus</i>

Tabela 3. Proposta de agrupamento de algumas espécies de *Eleutherodactylus*, de acordo com LYNCH e DUELLMAN (1997)

GRUPO	ESPÉCIES
<i>Eleutherodactylus binotatus</i>	<i>E. binotatus</i>
	<i>E. epipedus</i>
	<i>E. erythromerus</i>
	<i>E. gualteri</i>
	<i>E. guentheri</i>
	<i>E. heterodactylus</i>
	<i>E. izecksohni</i>
	<i>E. juipoca</i>
	<i>E. nasutus</i>
	<i>E. octavioi</i>
	<i>E. oeus</i>
	<i>E. plicifer</i>
<i>Eleutherodactylus lacteus</i>	<i>E. bolbodactylus</i>
	<i>E. hoehnei</i>
	<i>E. holti</i>
	<i>E. lacteus</i>
	<i>E. nigriventris</i>
<i>Eleutherodactylus parvus</i>	<i>E. parvus</i>
	<i>E. pusilus</i>
<i>Eleutherodactylus unistrigatus</i>	<i>E. altamazonicus</i>
	<i>E. carvalhoi</i>
	<i>E. marmoratus</i>
	<i>E. ockendeni</i>
	<i>E. unistrigatus</i>
	<i>E. ventrimarmoratus</i>
	<i>E. zimmermanae</i>
<i>Eleutherodactylus ramagii</i>	<i>E. paulodutraii</i>
	<i>E. ramagii</i>
<i>Eleutherodactylus sulcatus</i>	<i>E. sulcatus</i>
<i>Eleutherodactylus conspicillatus</i>	<i>E. chiastonotus</i>
	<i>E. conspicillatus</i>
	<i>E. fenestratus</i>
	<i>E. guttoralis</i>
	<i>E. lanthanites</i>
	<i>E. malkini</i>
	<i>E. peruvianus</i>
	<i>E. vilarse</i>
	<i>E. zeuctotylus</i>

2. Citogenética do gênero *Eleutherodactylus*

O número de representantes da família Leptodactylidae estudados sob o ponto de vista citogenético é relativamente pequeno, ainda que tenha aumentado ao longo do tempo, face às 1100 espécies descritas em FROST (2004). De fato, as revisões da década de 90 de KING (1990) e KURAMOTO (1990) relatam, respectivamente, dados de cerca de 170 e 200 espécies e, na recente atualização realizada por AMARO-GHILARDI (2005), esse número chega a mais de 260 leptodactylídeos. Esses correspondem em boa parte a representantes da subfamília Eleutherodactylinae e a quase totalidade deles a espécies de *Eleutherodactylus*, com exceção de três, *Geobatrachus walkeri*, *Holoaden bradei* e *Ischnocnema* sp., que são de gêneros diferentes.

Com base nos levantamentos de KING (1990), KURAMOTO (1990) e AMARO-GHILARDI (2005), atualizamos a relação de *Eleutherodactylus* até o momento cariotipados (Tabela 4), a qual totaliza mais de 110 espécies. Tal número, porém, deve ser maior e de acordo com M. SCHMID ultrapassa 160 (<http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/fileadmin/REPORT/HUMGE/humge000.htm>, acessado em janeiro de 2006). Esse pesquisador coordena uma extensa pesquisa que deverá resultar na monografia intitulada Cytogenetics and Evolution of the Genus *Eleutherodactylus*, a ser publicada em 2006/2007 na revista Cytogenetic and Genome Research.

Quanto ao gênero *Barycholos*, não há na literatura, até a presente data, dados citogenéticos para nenhum de seus dois únicos representantes. Os dados ora apresentados para *B. ternetzi* são, portanto, inéditos e aumentam a relação de gêneros de Eleutherodactylinae cariotipados, inclusive daqueles com dados baseados em coloração diferencial.

A grande maioria de *Eleutherodactylus* cariotipados é da América Central e do Norte da América do Sul. As poucas espécies brasileiras estudadas, *E. binotatus*, *E. guentheri*, *E. holti*, *E. lacteus* e *E. parvus*, são da região Sul e Sudeste (BEÇAK, 1968; BRUM-ZORRILLA e SAEZ, 1968; BEÇAK e BEÇAK, 1974; LUCCA e JIM, 1974; LUCCA *et al.*, 1974, SIQUEIRA Jr *et al.*, 2004). Há, contudo, um breve relato para *E. fenestratus* (SIQUEIRA Jr *et al.*, 2005) e *E. ramagii* (F. Ananias, dados não publicados) de localidades do Norte e Nordeste

do Brasil, respectivamente. É importante assinalar também as espécies *E. altamazonicus*, *E. conspicillatus*, *E. lacrimosus* e *E. sulcatus* (BOGART, 1970a *apud* KING, 1990, BOGART, 1973a; De WEESE, 1975) que, embora não tenham sido cariotipadas por pesquisadores brasileiros, sabe-se que são de ocorrência no Norte do Brasil, segundo levantamento de SOUZA (2003) realizado no estado do Acre.

Em contraste com um padrão cariotípico relativamente conservado observado na maioria dos anuros, o gênero *Eleutherodactylus* é caracterizado por uma extensa variação no número diplóide, que vai de $2n=18$ a $2n=36$ (Tabela 4). Com base nas informações levantadas na Tabela 4, construímos o gráfico da Fig. 1, na qual estão indicados os números diplóides observados em um total de 118 cariótipos de espécies de *Eleutherodactylus*. As variações cariotípicas no gênero não decorrem apenas das diferenças nos números diplóides. De fato, no levantamento realizado por De WEESE (1975), que incluiu também os números fundamentais de braços (NF) de cada espécie, observa-se uma extensa variação que vai de 32 a 58, ou seja, foram encontrados $NF=32, 36, 38, 40, 44, 46, 50, 52$ e 58.

De um modo geral, os cariótipos com números cromossômicos altos têm predominância de elementos de um só braço, dos tipos telocêntricos e subtelocêntricos, enquanto aqueles com números baixos são constituídos, majoritariamente, de elementos de dois braços, dos tipos metacêntricos e submetacêntricos. Tal fato é sugestivo de que a variação do número diplóide e, portanto, a evolução cariotípica no gênero *Eleutherodactylus* se deve basicamente a rearranjos do tipo fusão ou fissão cêntrica. Uma observação mais detalhada dos cariótipos mostra, muitas vezes, NF distintos embora mantendo o mesmo número de cromossomos, ou mesmo que não são incomuns os casos de diferenças marcantes na quantidade de heterocromatina. Desse modo outros tipos de eventos, como translocação recíproca, inversão, ganho ou perda de heterocromatina, devem ter, certamente, contribuído para produzir a excepcional diferenciação cariotípica observada em *Eleutherodactylus* (BOGART, 1981, 1991; KING, 1990; SCHMID *et al.*, 1992; SCHMID *et al.*, 2002a; SCHMID *et al.*, 2002c; SCHMID *et al.*, 2003; BOGART e HEDGES, 1995).

As extensas mudanças cromossômicas observadas em *Eleutherodactylus* poderiam, segundo SCHMID *et al.* (2003), ter se iniciado por processos de fissão em um cariótipo ancestral hipotético com $2n=26$ e $NF=52$, composto de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, tal como observado em muitas famílias da subordem Neobatrachia (KING, 1990); a partir daí, em um cariótipo com numerosos telocêntricos, reordenamentos estruturais subseqüentes teriam produzido a grande variedade de cariótipos observada atualmente nas espécies de *Eleutherodactylus*.

De WEESE (1975), baseando-se nos dados citogenéticos obtidos até então, preconizou dois conjuntos de espécies de *Eleutherodactylus*. O Caribenho corresponderia ao das espécies que apresentam valores altos de NF e número diplóide modal de 26, tendo as inversões como os principais mecanismos de reordenamento dos cariótipos. O conjunto Mesoamericano corresponderia ao das espécies cujos cariótipos, derivados basicamente de translocações robertsonianas, têm número diplóide modal de 22.

Além de grande variação interespecífica observada nos cariótipos dos *Eleutherodactylus* são relatados nesse gênero casos de variação intraespecífica e até mesmo intra-individual. Os números cromossômicos ímpares encontrados nas espécies *E. bakeri* ($2n=27$ e 28), *E. cundalli* ($2n=29$ e 30), *E. glaucoreius* ($2n=29$ e 30), *E. glandulifer* ($2n=31$) e *E. heminota* ($2n=27$ e 28) são, de acordo com BOGART (1991), resultantes muito provavelmente de fusão cêntrica, com redução do número cromossômico. Tal rearranjo foi sugerido também por SIQUEIRA Jr *et al.* (2005) para explicar a variação encontrada intra-individualmente em *E. fenestratus* ($2n=34$, 33 e 32).

Os números diplóides distintos mencionados para *E. biporcatus* (*E. maussi*) com $2n=20$ e $2n=35$ e 36 (De WEESE, 1975; SCHMID *et al.*, 1992; SCHMID *et al.*, 2002c; SAVAGE e MYERS, 2002 *apud* AMARO-GHILARDI, 2005), *E. brandisfordii* com $2n=20$ e $2n=18$ (BOGART, 1970a, 1970b; De WEESE, 1975), *E. diastemata* com $2n=18$ e $2n=20$ (BOGART, 1970a, 1970b; LEÓN, 1970) e *E. rugulosus* com $2n=20$ e $2n=22$ (BRUM-ZORRILLA e SAEZ, 1968; De WEESE, 1975; MIYAMOTO, 1983) poderiam indicar espécies distintas, porém, identificadas de forma incorreta, ou, então, variação cromossômica interpopulacional.

Dos diversos relatos citogenéticos em *Eleutherodactylus*, pode-se dizer que a grande maioria foi baseada quase que exclusivamente em análises com coloração convencional. O emprego de algum tipo de coloração diferencial é bastante raro e em alguns trabalhos se restringem ao uso do bandamento C, da marcação de Ag-RON ou de ambos (BOGART, 1981, 1991; BOGART e HEDGES, 1995; KAISER *et al.*, 1994; KAISER *et al.*, 1995).

É importante enfatizar que algumas poucas publicações em espécies de *Eleutherodactylus* basearam-se em estudos realizados não só com as técnicas citogenéticas básicas de banda C e Ag-RON, como também com aquelas mais resolutivas, por exemplo, as de coloração com fluorocromos base-específicos, FISH com sondas de telômeros, de DNAr 18S e 5S (SCHMID *et al.*, 1992; SCHMID *et al.* 2002a; SCHMID *et al.* 2002b; SCHMID *et al.*, 2003; SIQUEIRA Jr *et al.*, 2004). O uso de coloração diferencial tem mostrado inúmeros outros casos de variação cromossômica em *Eleutherodactylus*, principalmente no que se refere à quantidade de heterocromatina, à composição molecular dessas regiões repetitivas e também à ocorrência de rearranjos cromossômicos em determinados cariótipos.

Um achado inusitado no gênero *Eleutherodactylus* refere-se à presença de cromossomos sexuais diferenciados do ponto de vista citológico em quatro espécies, isto é, em *E. biporcatus* (*E. maussi*) (SCHMID *et al.*, 1992; SCHMID *et al.*, 2002c), *E. euphronides* e *E. shrevei* (SCHMID *et al.*, 2002a) e *E. riveroi* (SCHMID *et al.*, 2003), principalmente se levarmos em conta que os anuros mostram de um modo geral o par XY ou o ZW indistinguíveis citologicamente por coloração convencional e diferencial (SCHMID *et al.*, 1991). *E. biporcatus* (*E. maussi*) e *E. riveroi* constituem os primeiros casos de anfíbios com descrição de cromossomos sexuais múltiplos do tipo $X_1X_1X_2X_2$ (ou XXAA): X_1X_2Y (ou XAA^Y), resultante de fusão de Y com um autossomo, tendo sido observado que machos com X_1X_2Y coexistem com machos XY na mesma população de ambas as espécies. *Eleutherodactylus euphronides* e *E. shrevei* mostram sistema ZZ:ZW, no qual o cromossomo W tem a peculiaridade de ser de tamanho gigante, devido preponderantemente ao acúmulo de várias categorias de seqüências repetitivas de DNA.

Ainda no gênero *Eleutherodactylus*, é importante mencionar os dados relativos à quantidade de DNA obtidos em *E. binotatus*, *E. guentheri* e *E. shrevei*. BEÇAK e BEÇAK (1974) encontraram em *E. binotatus* uma quantidade de DNA nuclear cerca de quatro vezes maior do que em *E. guentheri*, embora ambas tenham o mesmo número cromossômico. Por outro lado, SCHMID *et al.* (2002a) observaram em *E. shrevei* uma quantidade de DNA extremamente pequena, indicando um dos menores genomas entre os anfíbios e, talvez, entre os vertebrados. Isso é ainda mais surpreendente se se levar em conta que no cariótipo da referida espécie os autores estimam que só a heterocromatina C-positiva totaliza 34,7% e 41,2% do genoma haplóide de macho e fêmea, respectivamente, o que significa uma redução bem maior das seqüências de DNA de cópia única e moderadamente repetitiva.

Poucas espécies brasileiras de *Eleutherodactylus* foram cariotipadas até o momento, mostrando $2n=20$, 22, 30 e 34 e a quase totalidade delas apenas com coloração convencional, com exceção do estudo feito por SIQUEIRA Jr *et al.* (2004). Tais fatos reforçam a importância de se estender as análises citogenéticas a um maior número possível de espécies de *Eleutherodactylus* com o uso de diferentes técnicas.

Tabela 4. Relação das espécies de *Eleutherodactylus* cariotipados até o momento, com o número diplóide e referências bibliográficas

Espécie	2n	Referência
<i>E. abbotti</i>	18	Bogart (não publicado) [▲]
<i>E. altae</i>	26	De Weese, 1975
<i>E. altamazonicus</i>	34	Bogart, 1970a* [*] ; De Weese, 1975
<i>E. alticola</i>	32	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. amplinympha</i>	28	Kaiser <i>et al.</i> , 1994
<i>E. andi</i>	22	De Weese, 1975
<i>E. andrewsi</i>	32	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. angelicus</i>	20	Miyamoto, 1983
<i>E. antillensis</i>	26	De Weese, 1975; Bogart, 1981
<i>E. atkinsi</i>	28	Bogart, 1981
<i>E. augusti</i>	22	Duellman, 1967 [#] ; Savage e de Weese, 1979
<i>E. auriculatus</i>	18	Bogart, 1981
<i>E. bakeri</i>	27, 28	Bogart, 1991
<i>E. berkenbuschii</i>	22	Savage e De Weese, 1979; Miyamoto, 1983
<i>E. binotatus</i>	22	Beçak e Beçak, 1974; Siqueira Jr <i>et al.</i> , 2004; Presente trabalho
<i>E. biporcatus (E. maussi)</i>	20	De Weese, 1975
	35, 36	Schmid <i>et al.</i> , 1992; Schmid <i>et al.</i> , 2002c; Savage e Myers, 2002 [▲]
<i>E. bogotensis</i>	34	De Weese, 1975; Bogart e Drewery (não publicado) [#]
<i>E. bransfordii</i>	20	Bogart, 1970a*, 1970b
	18	De Weese, 1975
<i>E. brittoni</i>	26	De Weese, 1975; Bogart, 1981
<i>E. bufoniformis</i>	22	Bogart, 1973a
<i>E. caryophyllaceus</i>	32	De Weese, 1975; Miyamoto, 1984
<i>E. cavernicola</i>	30	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. charlottevillensis</i>	36	Kaiser <i>et al.</i> , 1995
<i>E. conspicillatus</i>	34	Bogart, 1970a*, 1973a; De Weese, 1975
<i>E. cooki</i>	26	Bogart, 1981
<i>E. coqui</i>	26	Bogart, 1981; De Weese, 1975
<i>E. crassidigitus</i>	22	De Weese, 1975

<i>E. cruentus</i>	32	De Weese, 1975; Miyamoto, 1984
<i>E. cundalli</i>	29, 30	Bogart, 1991; Bogart e Hedges, 1995
<i>E. cuneatus</i>	32	Bogart, 1981
<i>E. decoratus</i>	22	Savage e De Weese, 1979, 1981 ⁺
<i>E. diastema</i>	18	Bogart, 1970a*, 1970b
	20	Léon, 1970
<i>E. dimidiatus</i>	30	Bogart, 1981
<i>E. discoidalis</i>	22	Brum-Zorrilla e Saez, 1968
<i>E. eneidae</i>	26	Bogart, 1981
<i>E. escocês</i>	20	Miyamoto, 1983
<i>E. euphronides</i>	32	Schmid <i>et al.</i> , 2002a
<i>E. fenestratus</i>	34 (33, 32)	Siqueira Jr <i>et al.</i> , 2005
<i>E. fitzingeri</i>	22	León, 1970; De Weese, 1975
<i>E. fleischmanni</i>	20	Bogart, 1970a*, 1973a; De Weese, 1975; Miyamoto, 1983
<i>E. fuscus</i>	28	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. gaigeae</i>	34	Bogart, 1973a
<i>E. glandulifer</i>	31	Bogart, 1991
<i>E. glaucoreius</i>	29, 30	Bogart, 1991; Bogart e Hedges, 1995
<i>E. goini</i> (<i>E. planirostris</i> <i>goini</i>)	32	Bogart, 1981
<i>E. gossei</i>	26	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. grabhami</i>	30	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. greggi</i>	22	De Weese, 1975
<i>E. griphus</i>	32	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. gryllus</i>	26	De Weese, 1975; Bogart, 1981
<i>E. guentheri</i>	22	Beçak, 1968; Brum- Zorrilla e Saez, 1968; Beçak e Beçak, 1974; Siqueira Jr <i>et al.</i> , 2004; Presente trabalho
<i>E. gulosus</i>	20	Savage e Myers, 2002 [▲]
<i>E. hedricki</i>	26	De Weese, 1975; Bogart, 1981
<i>E. heminota</i>	27, 28	Bogart, 1991
<i>E. holti</i> (<i>E. unistrigatus</i> <i>holtii</i>)	20	Lucca <i>et al.</i> , 1974
<i>E. jamaicensis</i>	30	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. jasperii</i>	26	Drewry e Jones, 1976
<i>E. johnstonei</i>	28	Kaiser <i>et al.</i> , 1994;

		Bogart e Hedges, 1995
<i>E. juipoca</i>	22	Presente trabalho
<i>E. junori</i>	24	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. karlschmidti</i>	30	De Weese, 1975; Bogart, 1981
<i>E. klinikowskii</i>	32	Green <i>et al.</i> , 1980; Bogart, 1981
<i>E. lacrimosus</i>	34	De Weese, 1975
<i>E. lacteus</i>	20	Lucca e Jim, 1974
<i>E. lanthanites</i>	36	Bogart, 1973b ⁺
<i>E. leprus (Syrrhophus)</i>	26	Bogart, 1973a
<i>E. limbatus (Sminthillus)</i>	32	Bogart, 1981
<i>E. locustus</i>	26	Bogart, 1981
<i>E. longirostris</i>	22	De Weese, 1975
<i>E. luteolus</i>	28	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. marnockii (Syrrhophus)</i>	30	Bogart, 1970a [▲] , 1973a
<i>E. martinicensis</i>	28	Kaiser <i>et al.</i> , 1994
<i>E. megacephalus</i>	20	Savage e Myers, 2002 [▲]
<i>E. melanostictus</i>	22	Bogart, 1970a*, 1973a; Savage e De Weese, 1981*
<i>E. milesi</i>	22	De Weese, 1975
<i>E. mimus</i>	20	De Weese, 1975
<i>E. nitidus (Tomodactylus nitidus nitidus)</i>	22	Duellman, 1967 [▲]
<i>E. nortoni</i>	30	Bogart, 1991
<i>E. nubicola</i>	32	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. orcutti</i>	32	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. opimus</i>	20	Savage e Myers, 2002 [▲]
<i>E. pantone</i>	26	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. parvus</i>	22	Beçak e Beçak, 1974, Siqueira Jr <i>et al.</i> , 2004; Presente trabalho
<i>E. patriciae</i>	22	Bogart (não publicado) [▲]
<i>E. pentasyringos</i>	28	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. planirostris planirostris (E. ricordii)</i>	32	Bogart, 1973a, 1981
<i>E. planirostris goinii</i>	32	Bogart, 1981
<i>E. podiciferus</i>	18	Bogart, 1970a*, 1973a; León, 1970
<i>E. portoricencis</i>	26	Bogart, 1973a
<i>E. punctariolus</i>	20	De Weese, 1975; Miyamoto, 1983
<i>E. ramagii</i>	30	F. Ananias (dados não publicados)
<i>E. ranoides</i>	22	Brum-Zorrilla e Saez, 1968

<i>E. rayo</i>	22	Savage e De Weese, 1979
<i>E. rhodopis</i>	18	De Weese, 1975
<i>E. richmondi</i>	30	De Weese, 1975; Bogart, 1981
<i>E. ridens</i>	34	De Weese, 1975; Miyamoto, 1984
<i>E. riveroi</i>	35, 36	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>E. rugosus</i>	20	Savage e Myers, 2002 [▲]
<i>E. rugulosus</i>	20	De Weese, 1975, Miyamoto, 1983
	22	Brum-Zorrilla e Saez, 1968; De Weese, 1975
<i>E. shrevei</i>	32	Schmid <i>et al.</i> , 2002a
<i>E. sisypodemus</i>	32	Bogart e Hedges, 1995
<i>E. sulcatus</i>	22	De Weese, 1975
<i>E. talamancae</i>	22	De Weese, 1975; Savage e De Weese, 1979
<i>E. taurus</i>	20	De Weese, 1975; Miyamoto, 1983
<i>E. terraeboliviaris</i>	36	Kaiser <i>et al.</i> , 1995
<i>E. unicolor</i>	30	De Weese, 1975; Bogart, 1981
<i>E. variabilis</i>	34	Bogart, 1970a*
<i>E. varians</i>	18, 34	Bogart, 1970a*, 1981
<i>E. ventrimarmoratus</i>	36	Bogart, 1970a*, 1973a
<i>E. vocalis</i>	22	Savage e De Weese, 1979
<i>E. wightmanae</i>	26	Bogart, 1981
<i>E. zugi</i>	32	Bogart, 1981
<i>Eleutherodactylus</i> sp. 1	26	Bogart, 1970a [▲]
<i>Eleutherodactylus</i> sp. 2	22	Presente trabalho

▲ segundo King (1990)

+ segundo Kuramoto (1990)

▲ segundo Amaro-Ghilardi (2005)

segundo King (1990) e Amaro-Ghilardi (2005)

• segundo Kuramoto (1990) e Amaro-Ghilardi (2005)

* segundo King (1990), Kuramoto (1990) e Amaro-Ghilardi (2005)

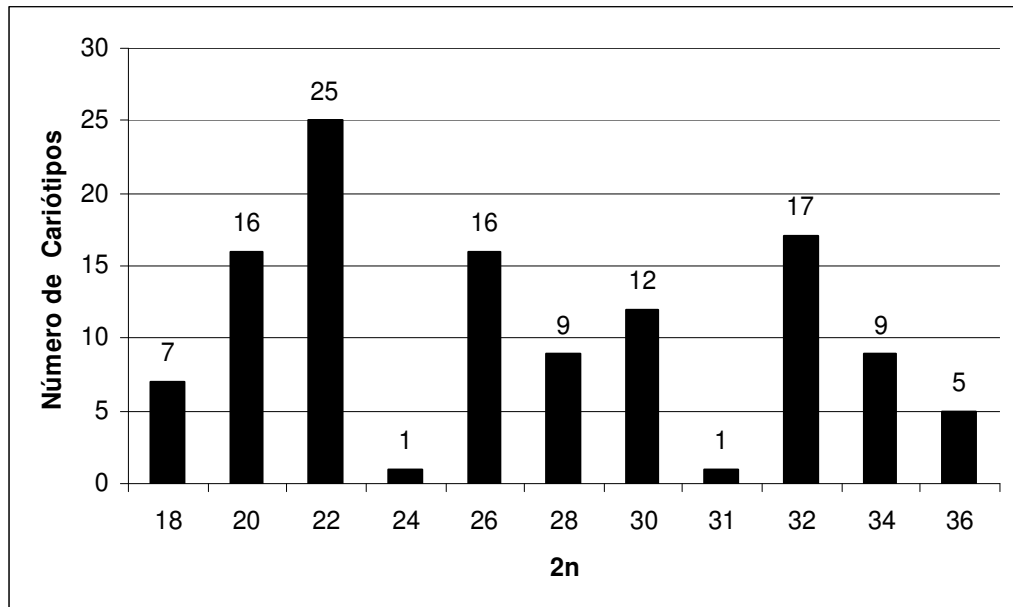


Fig. 1. Gráfico com indicação dos números diplóides observados em 118 cariótipos de espécies de *Eleutherodactylus*, levantados na Tabela 4

V. OBJETIVOS

Considerando a grande proximidade entre *Barycholos* e *Eleutherodactylus* em relação à anatomia e à biologia reprodutiva, bem como quanto à morfologia externa, principalmente de *B. ternetzi* e *E. binotatus*, realizamos um estudo citogenético com o uso de coloração convencional e diferencial dos cromossomos de *B. ternetzi*, *E. binotatus*, *E. juipoca*, *Eleutherodactylus* sp., *E. guentheri* e de *E. parvus*. Os dados obtidos poderão contribuir para o entendimento da evolução cariotípica, bem como para a taxonomia e sistemática de ambos os gêneros.

Os estudos citogenéticos consistiram em:

- _ descrever o cariótipo de cada espécie com o emprego de coloração convencional dos cromossomos mitóticos;
- _ identificar e determinar o número das regiões organizadoras de nucléolo com coloração pela prata (Ag-RONs) e com hibridação *in situ* de sonda fluorescente de DNAr (FISH);
- _ estabelecer o padrão de banda C das espécies, averiguando possíveis diferenças na distribuição da heterocromatina, principalmente entre aquelas que se mostraram similares no número e morfologia cromossômica;
- _ identificar a natureza molecular de regiões repetitivas com o uso de coloração por fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI;
- _ verificar a ocorrência de variações cromossômicas intrapopulacionais e variantes geográficas intraespecíficas;

_ observar fases meióticas com coloração convencional para averiguar possíveis particularidades no modo de emparelhamento e segregação dos cromossomos;

_ e, finalmente, comparar os cariótipos obtidos com diferentes técnicas de coloração.

VI. MATERIAL

Para a realização do presente trabalho, foram obtidas preparações citológicas de *Barycholos ternetzi* e de cinco espécies do gênero *Eleutherodactylus*, *E. binotatus*, *E. juipoca*, *Eleutherodactylus* sp., *E. guentheri* e *E. parvus*, correspondendo a um total de 46 animais analisados (Tabela 5).

Segundo FROST (2004), a posição taxonômica das espécies é a seguinte:

Classe Amphibia

Ordem Anura

Subordem Archaeobatrachia

Superfamília Bufonoidea

Família Leptodactylidae

Subfamília Eleutherodactylinae

Gênero *Barycholos*

Espécie *B. ternetzi*

Gênero *Eleutherodactylus*

Espécie *E. binotatus*

E. juipoca

Eleutherodactylus sp.

E. guentheri

E. parvus

Fotos de representantes de cinco das espécies analisadas, com exceção de *Eleutherodactylus* sp., podem ser observadas na Fig. 2, embora nem todas correspondam a exemplares que fazem parte da amostra.

As análises citogenéticas foram realizadas em 16 exemplares machos de *B. ternetzi* coletados em Gurinhatã, MG; 13 exemplares de *E. binotatus* coletados em Aracruz, ES (cinco machos e duas fêmeas), Mogi das Cruzes, SP (dois machos e uma fêmea) e Ubatuba, SP (dois machos e um jovem); oito exemplares de *E. juipoca* coletados em Santa Branca, SP (três machos, duas fêmeas e um jovem) e Itatiba, SP (um macho e uma fêmea); uma fêmea de *Eleutherodactylus* sp. coletada em Salesópolis, SP; cinco exemplares de *E. guentheri* coletados em Camanducaia, MG (um macho e um jovem), Salesópolis, SP (uma fêmea) e Jundiaí, SP (um macho e uma fêmea); e três exemplares de *E. parvus* coletados em Petrópolis, RJ (um macho e duas fêmeas). É importante ressaltar que todas as localidades são da região Sudeste do território brasileiro e estão indicadas na Fig. 3, com as respectivas coordenadas. Os animais foram identificados pelo Dr. Célio F. B. Haddad, Departamento de Zoologia, UNESP, Rio Claro, SP, e estão depositados na Coleção CFBH do referido departamento. Na Tabela 5, está a relação dos exemplares de cada espécie com o respectivo número de tombo. As coletas nas diversas localidades foram feitas sob licenças concedidas pelo IBAMA para o Dr. Fernando Ananias e o Dr. Célio F. B. Haddad.

As análises citogenéticas foram feitas em preparações citológicas obtidas não só durante o período de desenvolvimento do Mestrado, como, também, a partir de material processado há mais tempo, que se encontrava armazenado no *freezer*.

**A**

foto F. Ananias

**B**

foto F. Ananias

**C**

foto C. F. B. Haddad

**D**

foto C. F. B. Haddad

**E**

foto C. F. B. Haddad

Fig. 2. *Barycholos ternetzi* (A), *Eleutherodactylus binotatus* (B), *E. juipoca* (C), *E. guentheri* (D) e. *E. parvus* (E)

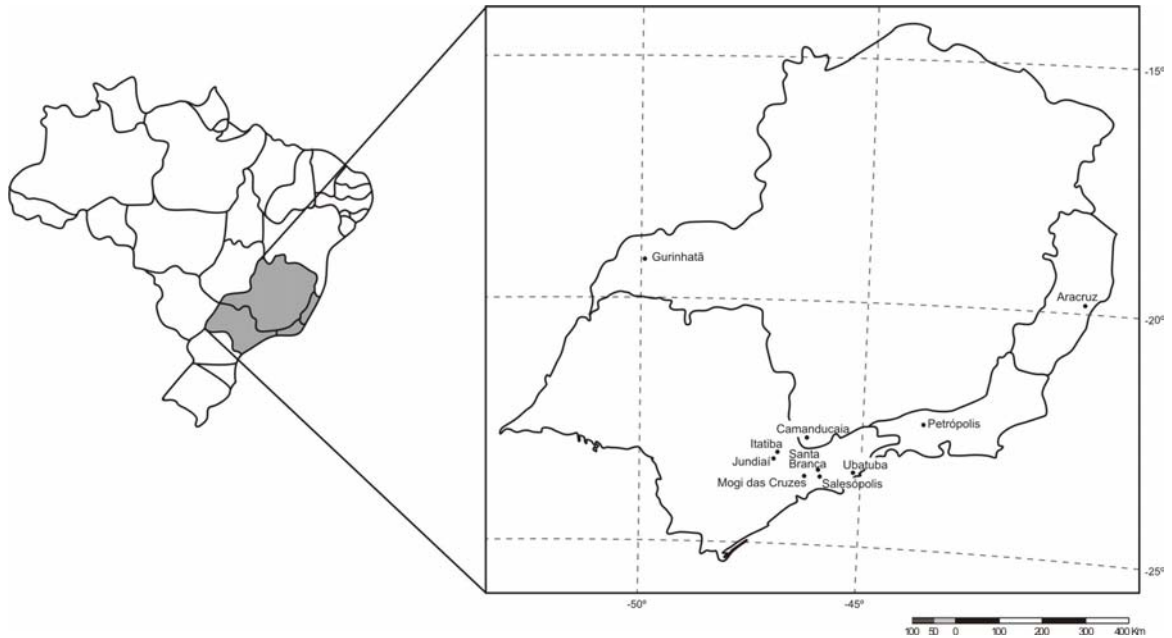


Fig. 3. Mapa com os locais de coleta dos exemplares de *Barycholos* e *Eleutherodactylus*: Aracruz, ES (19°49'S 40°16'W), Gurinhatã, MG (19°12'S 49°47'W), Camanducaia, MG (23°13'S 45°51'W), Petrópolis, RJ (29°22'S 51°11'W), Santa Branca, SP (23°23'S 45°53'W), Mogi das Cruzes, SP (23°41'S 46°21'W), Salesópolis, SP (23°33'S 45°50'W), Ubatuba, SP (23°26'S 45°04'W), Itatiba, SP (23°01'S 46°50'W) e Jundiaí, SP (23°10'S 53°29'W)

Tabela 5. Relação das espécies com o número de tombo (CFBH), sexo e local de coleta dos exemplares

Espécie	Número de Tombo	Sexo	Local de Coleta
<i>Barycholus ternetzi</i>	CFBH07735	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07736	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07737	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07738	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07739	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07740	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07741	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07742	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07743	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07744	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07745	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07746	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07747	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07748	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07749	♂	Gurinhatã, MG
	CFBH07750	♂	Gurinhatã, MG
<i>Eleutherodactylus binotatus</i>	CFBH10013	♂	Aracruz, ES
	CFBH10014	♂	Aracruz, ES
	CFBH10015	♂	Aracruz, ES
	CFBH10016	♂	Aracruz, ES
	CFBH10017	♀	Aracruz, ES
	CFBH10018	♂	Aracruz, ES
	CFBH10019	♀	Aracruz, ES
	CFBH07876	♀	Mogi das Cruzes, SP
	CFBH07877	♂	Mogi das Cruzes, SP
	CFBH07878	♂	Mogi das Cruzes, SP
	CFBH10012	♂	Ubatuba, SP
	CFBH10020	jovem	Ubatuba, SP
	CFBH10021	♂	Ubatuba, SP
<i>Eleutherodactylus juipoca</i>	CFBH10022	♀	Santa Branca, SP
	CFBH10023	♂	Santa Branca, SP
	CFBH10024	♀	Santa Branca, SP
	CFBH10025	♂	Santa Branca, SP
	CFBH10026	♂	Santa Branca, SP
	CFBH10027	jovem	Santa Branca, SP
	CFBH10028	♂	Itatiba, SP
	CFBH10029	♀	Itatiba SP
<i>Eleutherodactylus sp.</i>	CFBH09526	♀	Salesópolis, SP
<i>Eleutherodactylus guentheri</i>	CFBH07489	♂	Camanducaia, MG

	CFBH07490	jovem	Camanducaia, MG
	CFBH10031	♀	Jundiaí, SP
	CFBH10032	♂	Jundiaí, SP
	CFBH10030	♀	Salesópolis, SP
<i>Eleutherodactylus parvus</i>	CFBH10169	♀	Petrópolis, RJ
	CFBH10170	♀	Petrópolis, RJ
	CFBH10172	♂	Petrópolis, RJ

VII. MÉTODOS E TÉCNICAS

As preparações citológicas para o estudo de cromossomos mitóticos e meióticos dos anfíbios anuros foram obtidas com o uso de dois procedimentos distintos. Para a grande maioria dos exemplares, foram feitas preparações diretas a partir de medula óssea, fígado, baço e testículo (BALDISSERA Jr *et al.*, 1993, com modificações). Quando os animais eram de pequeno porte, o processamento foi feito, preferencialmente, a partir do intestino (SCHMID, 1978, com modificações), pois o uso dessa metodologia fornece, em geral, uma quantidade maior de material em suspensão e, não sendo necessária a aplicação de um agente estimulador de divisão celular antes da colchicina, cujo tempo de tratamento é, além disso, reduzido, a sobrevivência do animal fica sob menos risco, até o momento da obtenção das preparações citológicas.

A seguir, são apresentados de forma sumarizada todos os procedimentos empregados no presente trabalho. Uma descrição pormenorizada encontra-se em Técnicas de Citogenética: Anfíbios, Lagartos e Roedores (S. Kasahara, apostila não publicada, atualizada em 2005).

1. Obtenção das preparações cromossômicas a partir de medula óssea, fígado, baço e testículos, segundo BALDISSERA Jr *et al.* (1993), com modificações

Os animais são submetidos à injeção intraperitoneal de fitohemaglutinina, na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso para aumentar o índice mitótico,

e mantidos à temperatura ambiente, entre 25°C e 30°C. Injetar solução de colchicina a 0,01%, na mesma proporção da fitohemaglutinina, cerca de 12 horas antes do sacrifício.

Sacrificar os animais com clorofórmio e, em seguida, dissecar os fêmures e as tíbias, cortar as epífises e fazer lavagens do canal ósseo com solução de cloreto de potássio 0,075M para remover toda a medula. As células do fígado e do baço são liberadas com injeções sucessivas da solução hipotônica; os túbulos seminíferos são removidos na solução hipotônica, com auxílio de uma pinça, e pipetados para promover a sua dissociação. As suspensões celulares assim obtidas são, então, incubadas em estufa aquecida a 37°C, por 45 minutos. Decorrido esse tempo, retirar o material da estufa e fazer pré-fixação, adicionando seis gotas de fixador Carnoy recém-preparado (três partes de metanol: uma parte de ácido acético) e gelado. Homogeneizar levemente e após cinco minutos repetir o procedimento. Centrifugar a suspensão entre 900 e 1000 rpm durante cerca de sete minutos, descartar o sobrenadante, adicionar novo fixador, pipetar e repetir o processo por, pelo menos, mais uma vez. Após a última centrifugação, as suspensões são mantidas na geladeira por 24 horas para assegurar uma boa fixação das células, antes da confecção das lâminas, ou poderão ser armazenadas no *freezer*, se for preciso guardá-las por um período de tempo mais longo, para a preparação posterior das lâminas.

2. Obtenção das preparações cromossômicas a partir de intestino e testículos, segundo SCHMID (1978), com modificações

Os animais são submetidos à injeção intraperitoneal de colchicina a 0,5%, quando apresentam até cerca de 20mm de comprimento rostro/cloacal, ou a 1%, para os maiores. Após quatro horas, aproximadamente, sacrificar os animais com clorofórmio e retirar todo o intestino, o qual será cortado longitudinalmente para expor o epitélio. Deixar, então, o material em solução hipotônica de citrato de sódio a 0,09% à temperatura ambiente, por 25 minutos. Após decorrido esse tempo, transferi-lo para o fixador Carnoy recém-preparado e gelado e, em seguida, remover as células epiteliais, com a ajuda de uma espátula. Centrifugar a suspensão entre 900 e 1000 rpm durante cerca de sete minutos, repetindo esse

procedimento por, pelo menos, mais uma vez. Para a obtenção de células das gônadas, remover os testículos e incubá-los na solução hipotônica; separar os túbulos seminíferos com uma pinça e dissociá-los com auxílio de pipeta Pasteur. Esperar 25 minutos e fazer a pré-fixação, como descrito no item XXX-1. Centrifugar a suspensão entre 900 e 1000 rpm durante cerca de sete minutos, repetindo esse procedimento por, pelo menos, mais uma vez. Após a última centrifugação, as suspensões celulares, tanto de intestino como de testículo, são mantidas na geladeira por 24 horas para assegurar uma boa fixação das células, antes da confecção das lâminas, ou poderão ser armazenadas no *freezer*, se for preciso guardá-las por um período de tempo mais longo, para a preparação posterior das lâminas.

3. Preparação de lâminas

Inicialmente, centrifugar as suspensões celulares para descartar o fixador antigo. Em seguida, adicionar fixador recém-preparado, em quantidade suficiente para o preparo de lâminas com concentração adequada de células ou dar mais um ou dois banhos se a quantidade de sedimentos for grande. Sobre uma lâmina limpa e seca, mantida horizontalmente sobre um suporte mergulhado em banho-maria a 60°C, pingar uma ou duas gotas da suspensão. Para melhorar o espalhamento dos cromossomos, pingar sobre a lâmina, ainda mantida no banho-maria, algumas gotas de ácido acético glacial puro (HENEGARIU *et al.*, 2001). Esperar cerca de cinco segundos, movimentando a lâmina para que o ácido acético cubra toda a superfície do material gotejado e secá-la ao ar. As lâminas são mantidas à temperatura ambiente, por tempo variável de envelhecimento, de um ou vários dias, para aplicação das diferentes técnicas de coloração, ou armazenadas no *freezer*, se necessário guardá-las por um período de tempo mais longo.

4. Coloração convencional com Giemsa

As lâminas a serem submetidas à coloração convencional com Giemsa são hidrolisadas por cinco minutos em solução de ácido clorídrico 1N a 60°C. Para a preparação do corante, diluir 1mL da solução comercial em 14mL de solução

tampão de fosfato de sódio, pH6,8. Corar as lâminas por, aproximadamente, sete minutos, lavar com água destilada e secá-las.

5. Marcação de regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RONs), segundo HOWELL e BLACK (1980), com modificações

As lâminas são hidrolisadas em ácido clorídrico 1N a 60°C, por três minutos. Após a secagem, pingar em cada lâmina uma gota de solução coloidal reveladora, preparada com 1g de gelatina dissolvida em 50mL de água destilada e 0,25mL de ácido fórmico, e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%. Cobrir com lamínula e incubar a lâmina em câmara úmida a 60°C, durante dois a três minutos. Em seguida, lavar com água destilada e fazer uma coloração de cerca de 30 segundos, com solução de Giemsa. Lavar em água destilada e secar.

A técnica de marcação de Ag-RONs pode ser feita, também, após a análise dos cromossomos submetidos à coloração convencional ou a uma outra técnica de marcação, como a de bandamento C ou coloração com fluorocromos. Retirar a lamínula, se for o caso, e remover completamente o óleo de imersão da lâmina, gotejando álcool etílico absoluto. Proceder a hidratação, mergulhando a lâmina em água destilada por cerca de 10 minutos. Secar e seguir o procedimento padrão descrito para a marcação das Ag-RONs, porém, sem fazer a hidrólise em ácido clorídrico.

6. Coloração da heterocromatina (banda C), segundo SUMNER (1972), com modificações

As lâminas são envelhecidas hidrolisadas em ácido clorídrico 0,2N à temperatura ambiente, por 45 minutos. Em seguida, lavar em água destilada e incubá-las em solução de hidróxido de bário octahidratado a 5% aquecida a 60°C, durante 20 a 40 segundos. Após lavagem em água destilada, passar as lâminas rapidamente em solução 1N de ácido clorídrico 60°C, lavar novamente em água destilada e incubá-las em solução de 2xSSC a 60°C, durante 45 minutos. Decorrido esse tempo, lavar as lâminas em água destilada e corá-las com solução de Giemsa durante 15 a 20 minutos. Lavar em água destilada e secar.

7. Coloração por fluorocromos GC e AT específicos, segundo SCHWEIZER (1980) e CHRISTIAN *et al.* (1998), com modificações

Para a obtenção de bandas fluorescentes, dois tipos de fluorocromos foram empregados, a cromomicina A₃ (CMA₃) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que coram regiões repetitivas ricas em bases GC e AT, respectivamente. Foram seguidos dois protocolos distintos, um deles, segundo SCHWEIZER (1980), emprega o CMA₃ e o DAPI contracorados com distamicina A (DA). Nesse caso, colocar em cada lâmina 120µL de DA, cobrir com lamínula e deixar 15 minutos no escuro. Retirar a lamínula, lavando a lâmina com jatos fortes de água corrente durante um minuto. Em seguida, incubar em tampão McIlvaine por cinco minutos e sem deixar secar completamente a lâmina, espalhar sobre ela 120µL de CMA₃, cobrir com lamínula e deixar por 60 minutos no escuro. Retirar a lamínula lavando a lâmina com água corrente por um minuto e incubar em tampão McIlvaine por cinco minutos. Decorrido esse tempo e sem deixar a lâmina secar, incubá-la em solução DAPI, preparada com 100µL de solução estoque e 50mL de tampão McIlvaine, durante 15 minutos, no escuro. Retirar a lamínula, lavando a lâmina com jatos de água corrente por um minuto e incubá-la em tampão McIlvaine por cinco minutos. Secar a lâmina cuidadosamente com papel absorvente e fazer a montagem da lamínula com solução de sacarose a 50% ou glicerol. Guardar a lâmina no escuro por um tempo variável, de um a dois meses, antes da observação ao microscópio sob luz ultra-violeta e com emprego dos filtros adequados para cada fluorocromo.

De acordo com o protocolo modificado de CHRISTIAN *et al.* (1998), é dispensado o uso do contra-corante DA, mas, as lâminas são previamente tratadas com solução de formamida, antes da coloração pelos dois fluorocromos. Nesse caso, colocar as lâminas em formamida a 70% em solução 2xSSC, aquecida a 70°C, por dois minutos. Em seguida, dar dois banhos em 2xSSC à temperatura ambiente, por dois minutos cada. Passar as lâminas por uma bateria de álcool gelado a 70, 85 e 100% por dois minutos cada. Após o último banho, secá-las bem e colocar em cada lâmina 80µL de CMA₃ na concentração de 20µg/mL, cobrir com lamínula e manter por 30 minutos em câmara escura na geladeira. Após esse tempo, dar três banhos em PBS 1X à temperatura ambiente, por dois minutos cada. Sem deixar secar a lâmina, montar a lamínula com 80µL

de DAPI na concentração de 20µg/mL em *antifading*. Após 10 minutos, retirar o excesso com papel filtro e observar a lâmina ao microscópio de fluorescência, com emprego dos filtros correspondentes para cada fluorocromo.

8. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr, segundo GALETTI Jr e MARTINS (1999) com modificações

Sonda – foi utilizada a sonda HM123 contendo segmento do gene ribossômico do anuro *Xenopus laevis*, cedida pelo Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, UNICAMP.

Marcação da sonda – para cada lâmina, preparar um mix contendo 1µL 10x dNTP mix, 1µL do DNA sonda (200ng/µL), 1µL do mix de enzima e 6µL de água Milli Q. Misturar bem, centrifugar brevemente e incubar a 16°C por duas horas, no termociclador. Para a precipitação da sonda, adicionar 1µL de *stop buffer* e acetato de sódio 3M a 1/10 do volume da solução anterior (1µL) e 2 volumes de etanol absoluto gelado (22µL). Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no *freezer* -70°C por 1 hora. Centrifugar por 15 minutos a 15000rpm a 4°C, descartar o sobrenadante e adicionar 50µL de etanol 70% gelado. Centrifugar novamente por cinco minutos a 15000rpm a 4°C, descartar cuidadosamente o sobrenadante e esperar secar. Por fim, colocar 16µL de água Milli Q e ressuspender.

Tratamento das lâminas – sobre uma lamínula colocar 100µL de RNase 40µL/mL (0,4µL de RNase 100mg/L e 99,6µL de 2xSSC). Aderir, sobre essa lamínula, a lâmina, preparada no momento do uso ou anteriormente, e deixar em câmara úmida com 2xSSC a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Lavar a lâmina duas vezes com 2xSSC, durante 10 minutos, duas vezes e, em seguida, fazer a desidratação em série alcoólica 70%, 85% e 100% gelada durante 10 minutos cada. Mergulhar a lâmina em formamida 70% em 2xSSC por quatro minutos a 70°C e, rapidamente, desidratar novamente em série alcoólica 70%, 85% e 100% a -20°C por 5 minutos cada. Secar ao ar.

Solução de hibridação – no tubo Eppendorf contendo a sonda adicionar 40µL de formamida (concentração final 50%), 16µL de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 8µL de 20xSSC (concentração final de 2xSSC).

Colocar no termociclador a 95°C por 10 minutos e, em seguida, transferir o Eppendorf imediatamente para o gelo.

Hibridação – colocar 80µL de solução de hibridação em uma lamínula e inverter sobre ela a lâmina, e mantê-la com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37°C *overnight*.

Lavagens – lavar a lâmina em 2xSSC à temperatura ambiente para retirar a lamínula. Em seguida, fazer as lavagens em formamida 50% e em 2xSSC por 15 minutos a 37°C cada, em 2xSSC por 15 minutos à temperatura ambiente e, por fim, em 4xSSC à temperatura ambiente, somente para enxaguar.

Detecção – sobre uma lamínula colocar 0,1µL de avidina-FITC 0,07% em 70µL de tampão C (0,1M de bicarbonato de sódio, pH 8,5 e 0,15M de NaCl). Inverter a lâmina sobre a lamínula, deixando-a por 1 hora em câmara úmida com 2xSSC a 37°C. Retirar a lamínula e lavar três vezes em tampão de bloqueio (NaHCO₃ 1,26%/citrato de sódio 0,018%/Triton 0,0386% em água destilada pH 8,0 e leite em pó desnatado 1%) recém-preparado, a 42°C. Sobre uma lamínula, colocar 80µL de anti-avidina biotina-conjugada 2,5% (2µL de anti-avidina estoque em 78µL de tampão de bloqueio) e inverter a lâmina sobre ela. Deixar em câmara úmida com 2xSSC a 37°C por 30 minutos. Lavar três vezes em tampão de bloqueio por cinco minutos cada com agitação. Repetir todo o procedimento acima, excetuando as três últimas lavagens em tampão de bloqueio. Aplicar novamente o FITC, deixar em câmara úmida com 2xSSC a 37°C por uma hora e realizar as três primeiras lavagens (formamida 50%, 2xSSC e 2xSSC) descritas no tópico “Lavagens”. Proceder quatro lavagens de cinco minutos cada com agitação, sendo duas em 4xSSC/Triton 2% e duas em 4xSSC/Triton 0,2%. Finalmente, escorrer o líquido da lâmina e deixar secar ao ar.

Montagem – em uma lamínula, colocar a solução de montagem, preparada com 0,7µL de solução de iodeto de propídio a 50µL/mL e 20µL de *antifading* e, sobre a mesma, inverter a lâmina seca. Observar em microscópio de fluorescência e fotografar usando filme comercial colorido ISO400.

9. Análise cromossômica

As preparações cromossômicas submetidas às diferentes técnicas foram analisadas ao microscópio de luz e as melhores metáfases, assim como as fases

meióticas, fotografadas, posteriormente, ao fotomicroscópio Zeiss, sob um aumento de 1250x (objetiva 100 e optovar 1,25) com filme Image Link da Kodak, revelado com Dektol 1:4 a 18°C, por cinco minutos, ou Copex HDP 13, da Agfa, revelado com Dektol 1:4 a 25°C, por seis minutos. O processo de interrupção foi realizado com ácido acético a 28%, diluído na proporção de 1:19 em água destilada, e a fixação, com Fixador Endurecedor 1:1 durante 15 minutos. Quando coradas com fluorocromos, a análise das lâminas e a fotografia das metáfases foram feitas sob luz ultra-violeta em microscópio de fluorescência Leica DMLB, com filtros adequados, em um aumento de 1000x. Foi utilizado o filme preto-e-branco T-Max da Kodak, cuja revelação é feita com D76 ou Microdol puro, a 20°C, durante nove minutos, sob agitação constante, interrompido com ácido acético a 28%, diluído na proporção de 1:19 e fixado com Fixador Endurecedor a 20°C, durante 15 minutos. As ampliações do material fotografado foram feitas em papel Kodabrome II, RC, F-3, da Kodak. Algumas vezes, as cópias fotográficas foram obtidas após serem os negativos digitalizados para o computador, utilizando-se digitalizador de imagens hp scanjet 4670, e o material de interesse foi, então, impresso. No caso da técnica de FISH, empregou-se filme colorido ISO 400, revelado e ampliado em laboratórios comerciais.

Para a montagem dos cariogramas, os cromossomos foram emparelhados de acordo com a morfologia, em ordem decrescente de tamanho, com base em inspeção visual, e segundo o padrão previamente adotado para as espécies do gênero *Eleutherodactylus* (BEÇAK e BEÇAK, 1974). Para a classificação morfológica e o estabelecimento do número fundamental de braços cromossômicos (NF), seguiu-se a nomenclatura de GREEN e SESSIONS (1991), de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos para elementos com dois braços, e subtlocêntricos e telocêntricos para aqueles com apenas um braço cromossômico.

VIII. RESULTADOS

Descrição do cariótipo

O número diplóide de $2n=22$ foi encontrado em todos os 46 exemplares de *Barycholos ternetzi*, *Eleutherodactylus binotatus*, *E. juipoca*, *Eleutherodactylus* sp., *E. guentheri* e *E. parvus*. Algumas variações na morfologia dos cromossomos, principalmente daqueles pertencentes aos pares 8, 10 e 11, que podem ser telocêntricos ou submetacêntricos, fazem com que os números fundamentais de braços nem sempre sejam coincidentes, sendo NF=38 em *B. ternetzi* e *E. binotatus*, NF=40 em *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp. e NF=44 em *E. guentheri* e *E. parvus*.

O cariótipo de *B. ternetzi* (Fig. 4) é formado de seis pares de cromossomos grandes e médios e cinco pares de cromossomos pequenos, sendo os pares 1, 6 e 7 do tipo metacêntrico, os pares 2, 3, 4, 5, e 9 do tipo submetacêntrico e os pares 8, 10 e 11 do tipo telocêntrico.

Os exemplares de *E. binotatus* apresentaram cariótipo formado de sete pares de cromossomos grandes e médios e quatro pares de cromossomos pequenos, sendo os pares 1 e 7 do tipo metacêntrico, os pares 2, 3, 4, 5, 6, e 9 do tipo submetacêntrico e os pares 8, 10 e 11 do tipo telocêntrico (Fig. 5). Em um dos machos de Mogi das Cruzes, SP (CFBH07878), foi observada uma extensa variação na morfologia dos cromossomos principalmente dos pares 2 a 6, não sendo possível, no entanto, estabelecer um padrão cariotípico modal, já que praticamente cada uma das metáfases da amostra correspondia a um cariograma

particular (Fig. 6 e Fig. 13A). Embora todas tivessem $2n=22$, os homólogos nem sempre puderam ser emparelhados adequadamente, com exceção do par 1 e dos pares 7 ao 11.

Os exemplares de *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp. apresentaram cariótipos indistinguíveis (Fig. 7 e Fig. 8), incluindo seis pares de cromossomos grandes e médios e cinco pares de cromossomos pequenos, sendo os pares 1, 6 e 7 do tipo metacêntrico, os pares 2, 3, 4, 5, 9 e 10 do tipo submetacêntrico e apenas os pares 8 e 11 do tipo telocêntrico. Ambas as espécies tinham constrição secundária na região proximal dos telocêntricos 11.

Os exemplares de *E. guentheri* e *E. parvus* possuem, também, cariótipos idênticos (Fig. 9 e Fig 10), constituídos por seis pares de cromossomos grandes e médios e cinco pares de cromossomos pequenos, sendo os pares 1 e 6 do tipo metacêntrico e os pares 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11 do tipo submetacêntrico. Nenhum cromossomo telocêntrico ocorre no cariótipo de ambas as espécies. Uma grande constrição secundária na região proximal dos braços longos dos homólogos do par 6 é visualizada, ocasionalmente, em ambas espécies.

Os exemplares cariotipados de *B. ternetzi*, *E. juipoca*, *Eleutherodactylus* sp., *E. guentheri* e *E. parvus* não evidenciaram par heteromórfico, afastando a ocorrência de cromossomos sexuais diferenciados citologicamente. Muito provavelmente, isso também é verdadeiro para *E. binotatus*, apesar da observação do extenso heteromorfismo envolvendo vários pares de cromossomos no macho CFBH07878.

Análises de células em meiose

Células em meiose de exemplares machos de *Barycholos ternetzi*, *Eleutherodactylus binotatus*, *E. juipoca*, *E. guentheri* e *E. parvus* foram analisadas com coloração convencional (Fig. 11), tendo sido observados 11 bivalentes nas células em diplóteno e metáfase I e 11 cromossomos nas células em metáfase II. Nas células em diplóteno e metáfase I dos exemplares CFBH07878 e CFBH10021 de *E. binotatus*, no entanto, foram observados multivalentes com número variável de cromossomos, além de bivalentes individualizados (Fig. 11C).

Regiões organizadoras de nucléolo (RONs)

As regiões organizadoras de nucléolo de todas as espécies foram identificadas com a técnica de impregnação pelo nitrato de prata (Ag-RON) e com a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr, no caso das espécies *Barycholos ternetzi* e *Eleutherodactylus binotatus*.

Em *B. ternetzi*, marcações pela prata aparecem na região terminal de cromossomos pertencentes a cinco pares e uma alta variabilidade interindividual quanto à sua localização, embora o número total de sítios impregnados nas metáfases de cada exemplar estivesse entre um e três. Na Tabela 6 e na Fig. 12, estão indicados os oito diferentes padrões obtidos na totalidade da amostra analisada. Em *B. ternetzi*, regiões Ag-positivas estão presentes em apenas um dos homólogos dos pares 1, 4, 5, 9 e, na maioria dos indivíduos, aparecem em ambos os elementos do par 11. A impregnação ocorre nos braços curtos desses cromossomos, com exceção do 5, que é no braço longo. Somente quatro exemplares tinham marcação em apenas um dos cromossomos 11, sendo que em um único exemplar essa era a única Ag-RON em todas as metáfases analisadas. Além disso, foi observado em um exemplar que um dos homólogos 11 apresenta, simultaneamente, marcação nos braços curtos e também nos braços longos. A técnica de FISH feita em um exemplar, cujo padrão de coloração pela prata é 9p 11p11p (Fig. 14), confirmou serem esses os sítios de seqüências de DNAr, e que, nesse caso, a técnica de Ag-RON não está evidenciando marcações inespecíficas.

Em *E. binotatus*, os cromossomos portadores de Ag-RON pertencem ao par 1, com localização proximal nos braços curtos (Fig. 13A), e esse mesmo sítio apresentou-se marcado pela técnica de FISH (Fig. 15). Em *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp., as Ag-RONs estão localizadas nos braços longos dos telocêntricos do par 11 (Fig. 13B e 13C), na posição da constrição secundária proximal. Contudo, em uma fêmea de *E. juipoca*, coletada em Itatiba, SP, apenas um dos elementos do par 11 mostrou-se marcado pela prata. Os exemplares de *E. guentheri* e *E. parvus* apresentaram Ag-RONs na região proximal dos braços longos dos cromossomos do par 6, na mesma posição da constrição secundária (Fig. 13D e 13E).

Banda C

Em *B. ternetzi*, o bandamento C (Fig.16) mostrou marcação na região centromérica de todos os cromossomos; além disso, é possível observar que a região telomérica dos braços longos de alguns deles aparece às vezes um pouco mais corada.

Quanto a *E. binotatus*, as bandas C são também centroméricas, porém, vários cromossomos mostram marcações intersticiais, mais ou menos acentuadas (Fig.17A e 17B). É interessante ressaltar a ocorrência de algumas diferenças em relação ao padrão dessas bandas C intersticiais nos exemplares coletados em localidades distintas. As mais evidentes correspondem às fortes marcações na região distal dos telocêntricos 10 e 11 dos exemplares de Ubatuba, SP, e Aracruz, ES (Fig. 17A), não observadas nos animais coletados em Mogi das Cruzes, SP (Fig. 17B), nos quais a marcação é sutil, quase inexistente; além disso, os telocêntricos 8 das duas primeiras localidades mostram, ainda que discretas, bandas distais que não foram notadas nos animais de Mogi das Cruzes, SP. Por outro lado, os exemplares dessa última localidade exibem bandas C intersticiais marcantes em ambos os braços do par 7, enquanto aqueles procedentes de Ubatuba, SP, e Aracruz, ES, não mostram bandas tão evidentes.

Na espécie *E. juipoca*, a técnica de bandamento C (Fig. 18A e 18B) evidenciou heterocromatina centromérica nos exemplares das duas localidades, porém, em metáfases que apresentam os cromossomos mais distendidos, é possível notar que, principalmente nos metacêntricos e submetacêntricos, as bandas C estão presentes no centrômero propriamente dito, bem como nas regiões adjacentes, em ambos os braços. Em *Eleutherodactylus* sp., pode-se notar bandas C centroméricas em todos os cromossomos (Fig. 19), além de marcações intersticiais em alguns pares, sendo as mais evidentes aquelas localizadas nos braços curtos do par 1, nos braços curtos e longos do par 10 e nos braços longos do par 11.

Nos exemplares de *E. guentheri* e *E. parvus*, as bandas C são, também, centroméricas (Fig. 20 e Fig. 21), tendo sido observada marcação intersticial nos braços longos de um dos cromossomos 6 de *E. parvus*, coincidente com a posição da RON.

Coloração CMA₃ e DAPI

Para a maioria dos exemplares de cinco espécies, exceto *Eleutherodactylus* sp., foram obtidos resultados com a tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI; em um exemplar de *E. binotatus*, foi empregada a coloração CMA₃ e DAPI, sem contracoloração pelo DA, mas com tratamento prévio com formamida.

Em *B. ternetzi*, a coloração CMA₃/DA/DAPI (Fig. 22A e 22B) foi aplicada na preparação citológica dos exemplares CFBH07748, CFBH07749, CFBH07750 e CFBH07751, cujos padrões de Ag-RONs eram, respectivamente, 9p 11p, 11p11p, 11p e 9p 11p11p. Foi notada em todos eles uma marcação brilhante inequívoca com CMA₃ na região centromérica de um dos cromossomos do par 11, independentemente do padrão de Ag-RON por eles apresentado; em algumas poucas metáfases do exemplar CFBH07751 parece que ambos os homólogos tinham região CMA₃ brilhante. Com DAPI, nenhuma região particularmente fluorescente foi observada.

Quanto à coloração CMA₃/DA/DAPI em *E. binotatus* (Fig. 23A, 23B), observou-se que o exemplar CFBH07877 de Mogi das Cruzes, SP, mostrou com CMA₃ uma pequena marcação fluorescente proximal nos braços curtos dos cromossomos 1 e regiões negativas marcantes, tanto proximais quanto distais, nos telocêntricos 8, 10 e 11; com DAPI, enquanto os cromossomos 8 mostravam uma marcação brilhante na região centromérica, os telocêntricos 10 e 11 exibiam tal padrão apenas na região distal. É interessante assinalar que nas metáfases do exemplar CFBH10021 de Ubatuba, SP, não notamos nenhuma região particularmente brilhante com CMA₃ e, em DAPI, o par 8 exibiu, além da marcação centromérica uma banda fluorescente também na região distal, à semelhança dos telocêntricos 10 e 11. O exemplar CFBH07878, também de Mogi das Cruzes, SP, no qual não foi utilizada contracoloração pelo DA, mas tratamento prévio com formamida, mostrou um padrão de fluorescência pelo CMA₃ similar ao descrito para CFBH07877, mas as marcações fluorescentes com DAPI não são equivalentes (Fig. 23C). Todos os cromossomos têm fluorescência DAPI intensa na região centromérica, o par 7 exhibe também bandas levemente fluorescentes, em ambos os braços cromossômicos, porém, os pares telocêntricos não mostram nenhuma banda intersticial brilhante.

Em *E. juipoca*, a coloração CMA₃/DA/DAPI (Fig. 24A e 24B) foi aplicada nas preparações citológicas de exemplares das duas localidades, CFBH10029 de Itatiba, SP, e CFBH10026 de Santa Branca, SP. Marcações negativas bem evidentes podem ser observadas com CMA₃ nas regiões centroméricas de todos os cromossomos dos dois exemplares analisados. Com DAPI, o exemplar CFBH10026 exibiu marcações puntiformes muito brilhantes nas regiões proximal e centromérica de alguns cromossomos, embora esse padrão não tenha sido evidenciado em todas as metáfases analisadas.

As preparações citológicas dos exemplares CFBH10030 de *E. guentheri* de Salesópolis, SP, e do exemplar CFBH10170 de *E. parvus* submetidas à coloração CMA₃/DA/DAPI (Fig. 25A e 25B, Fig. 26^a e 26B) não revelou regiões particularmente brilhantes com nenhum dos fluorocromos; porém, aparecem marcações negativas com CMA₃ na região centromérica de todos os cromossomos de *E. guentheri*.

Tabela 6. Padrões de sítios Ag-positivos em *B. ternetzi*

Número de exemplares	Padrão de Marcação	Total de Marcação
1	1p 11p	2
2	9p 11p	2
2	5q 11p 11p	3
6	11p 11p	2
1	11p 11p11q	3
1	4p 11p 11p	3
2	9p 11p 11p	3
1	11p	1

q= braço longo p= braço curto

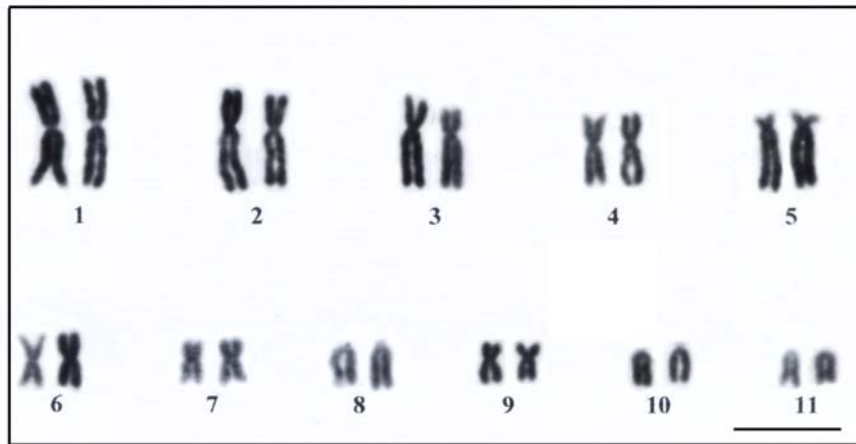


Fig. 4. Cariótipo de *Barycholos ternetzi* com coloração convencional, $2n=22$. Barra= $10\mu\text{m}$

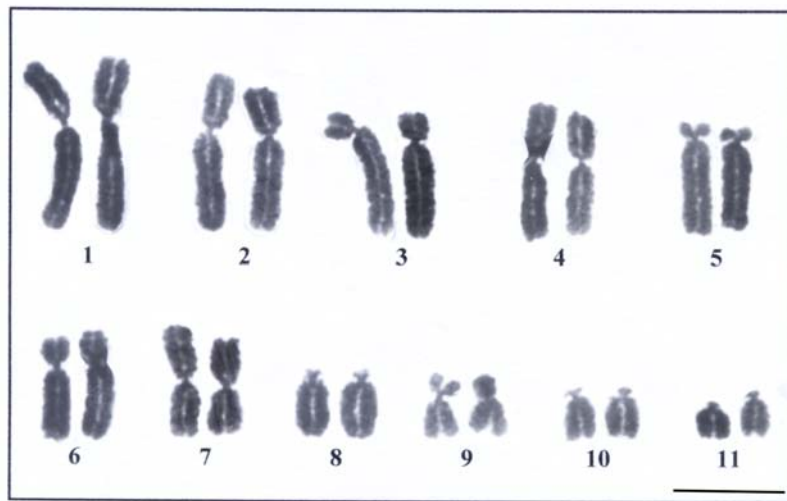


Fig. 5. Cariótipo de *Eleutherodactylus binotatus* com coloração convencional, $2n=22$. Barra= $10\mu\text{m}$

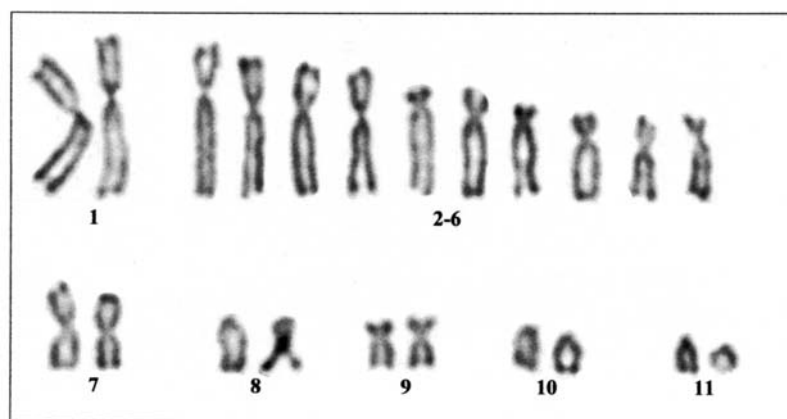


Fig. 6. Cariótipo do exemplar CFBH07878 de *Eleutherodactylus binotatus* com $2n=22$. Notar heteromorfismo nos pares 2 a 6

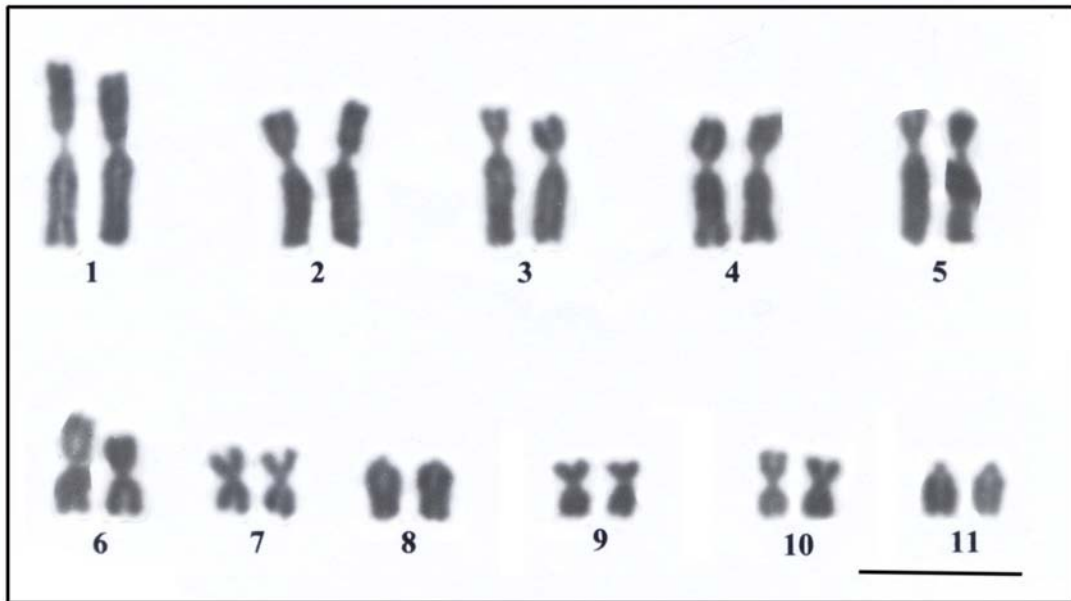


Fig. 7. Cariótipo de *Eleutherodactylus juipoca* com coloração convencional, $2n=22$. Barra= $10\mu\text{m}$

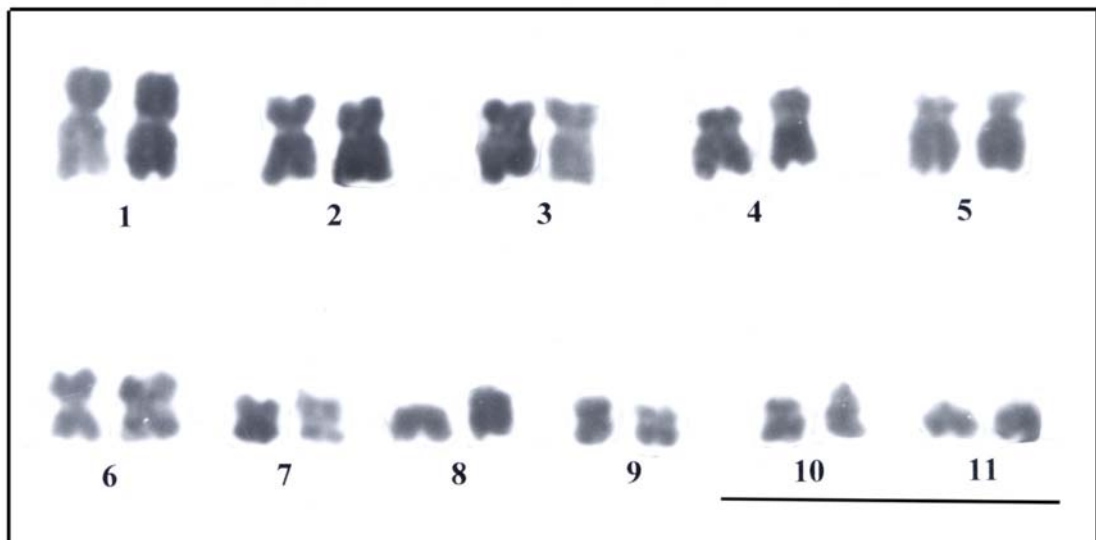


Fig. 8. Cariótipo de *Eleutherodactylus* sp. com coloração convencional, $2n=22$. Barra= $10\mu\text{m}$

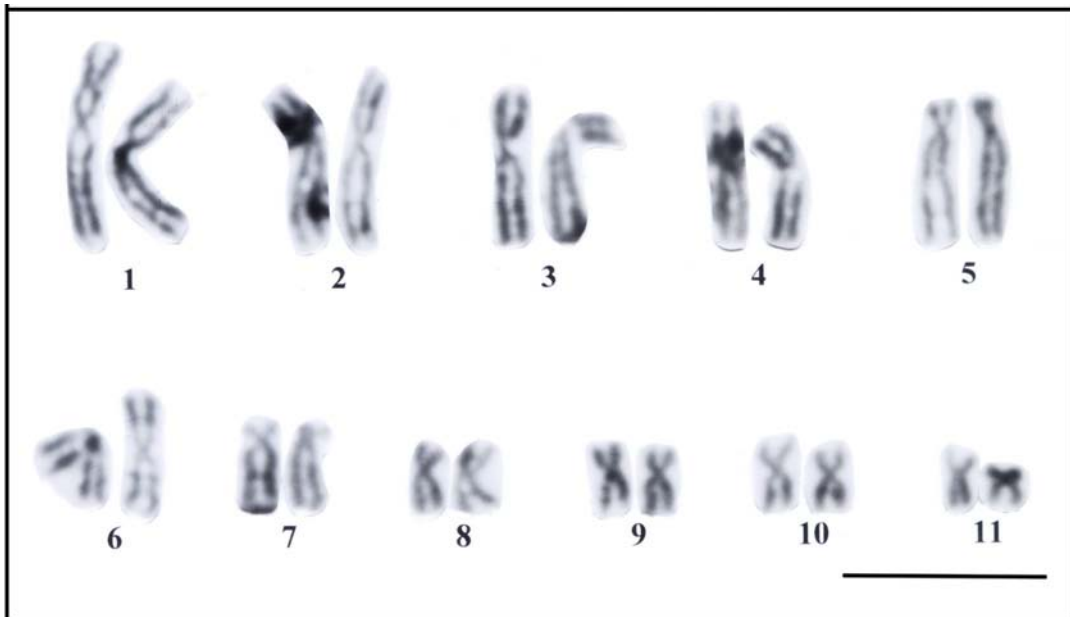


Fig. 9. Cariótipo de *Eleutherodactylus guentheri* com coloração convencional, $2n=22$. Barra= $10\mu\text{m}$

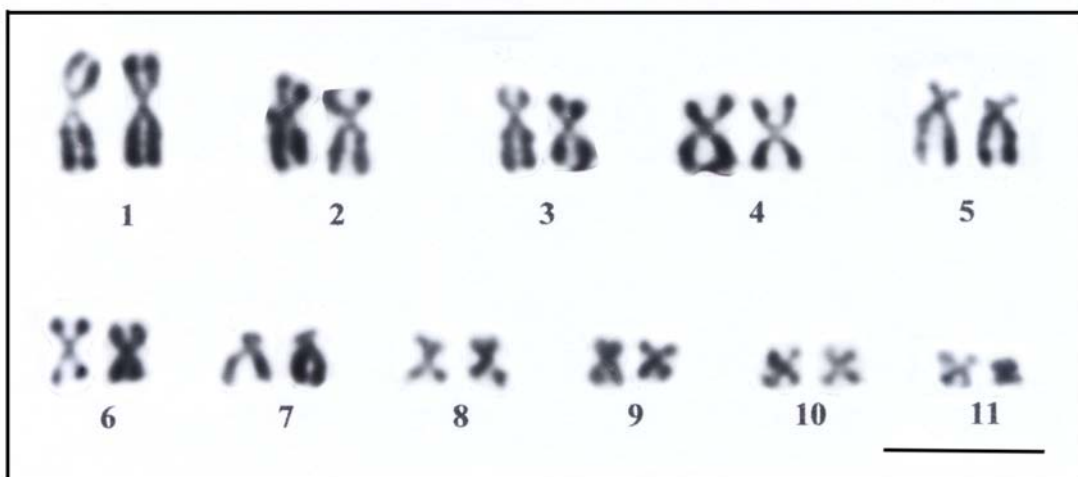


Fig. 10. Cariótipo de *Eleutherodactylus parvus* com coloração convencional, $2n=22$. Barra= $10\mu\text{m}$

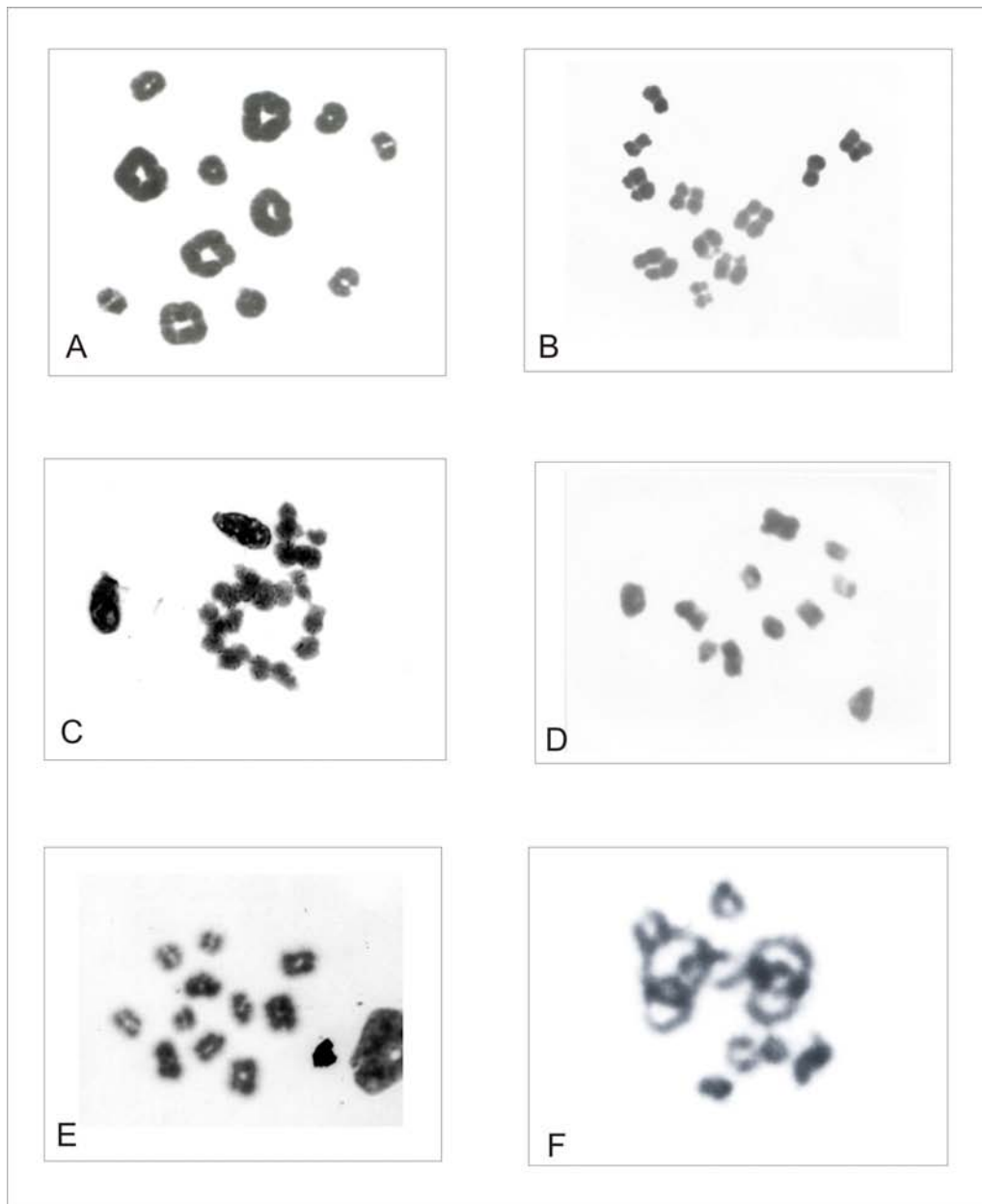


Fig. 11. Meiose I com 11 bivalentes em *Barycholos ternetzi* (A), *Eleutherodactylus binotatus* (B e C), *E. juipoca* (D), *E. guentheri* (E), *E. parvus* (F). Notar em C multivalente no exemplar CFBH07878 de *E. binotatus*

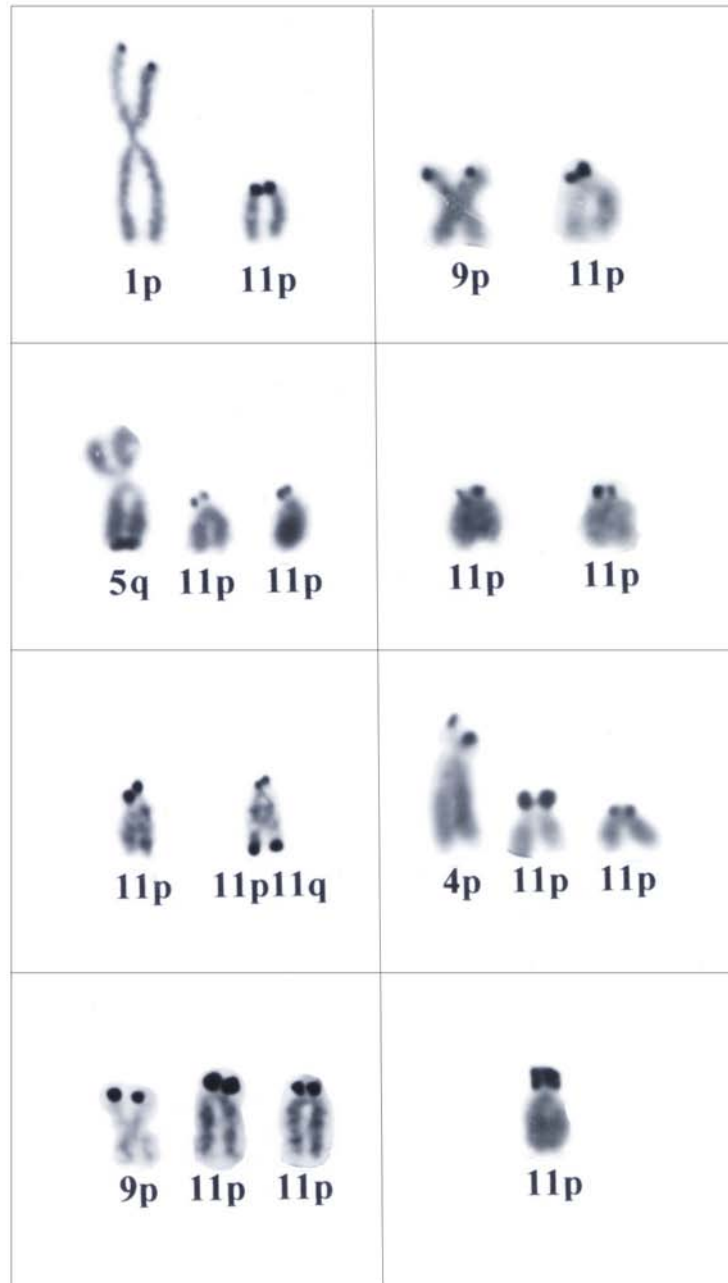


Fig. 12. Oito padrões de sítios Ag-positivos observados em *Barycholos ternetzi*

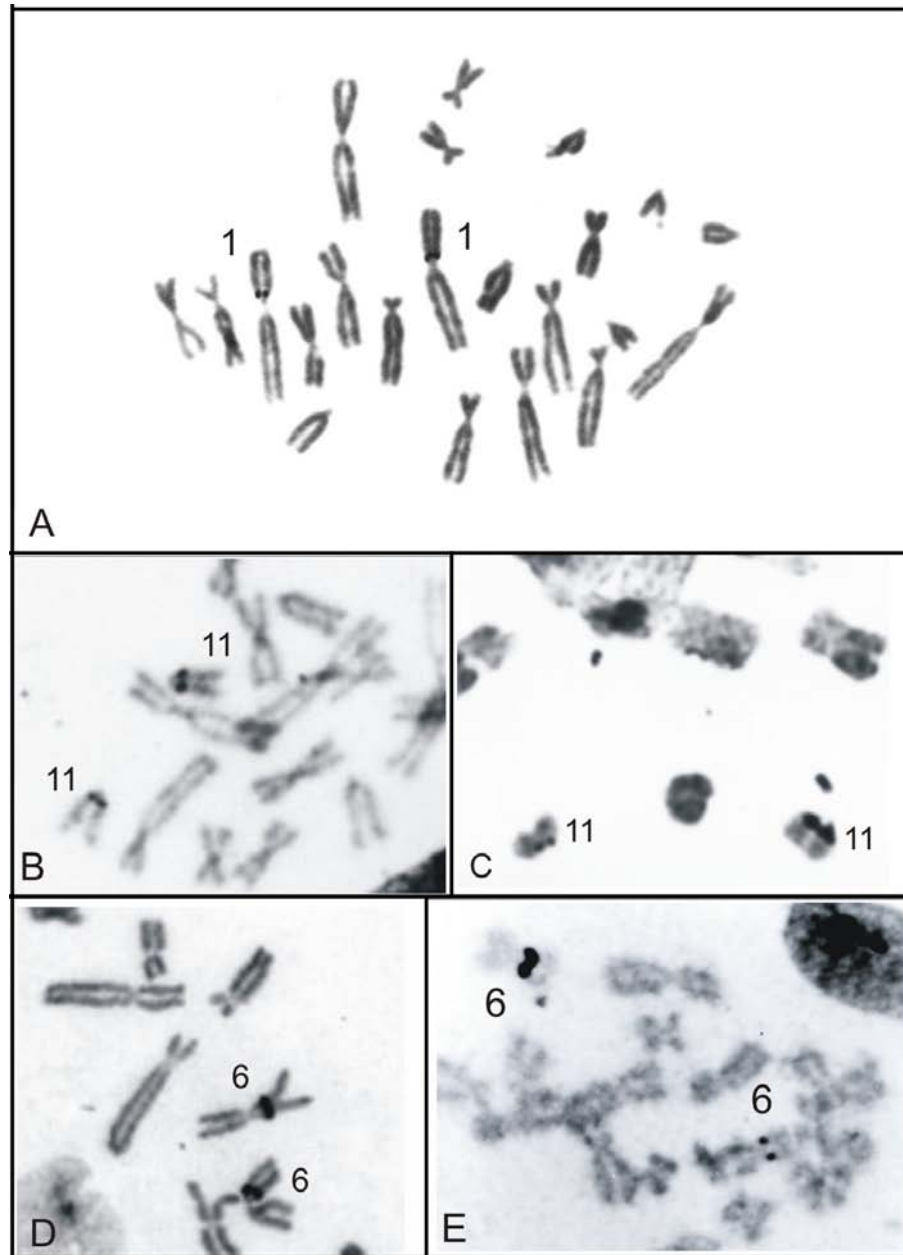


Fig. 13. Padrões de marcação de Ag-RONs no exemplar CFBH07878 de *Eleutherodactylus binotatus* (A), em *E. juipoca* (B), *Eleutherodactylus* sp. (C), *E. guentheri* (D) e *E. parvus* (E)

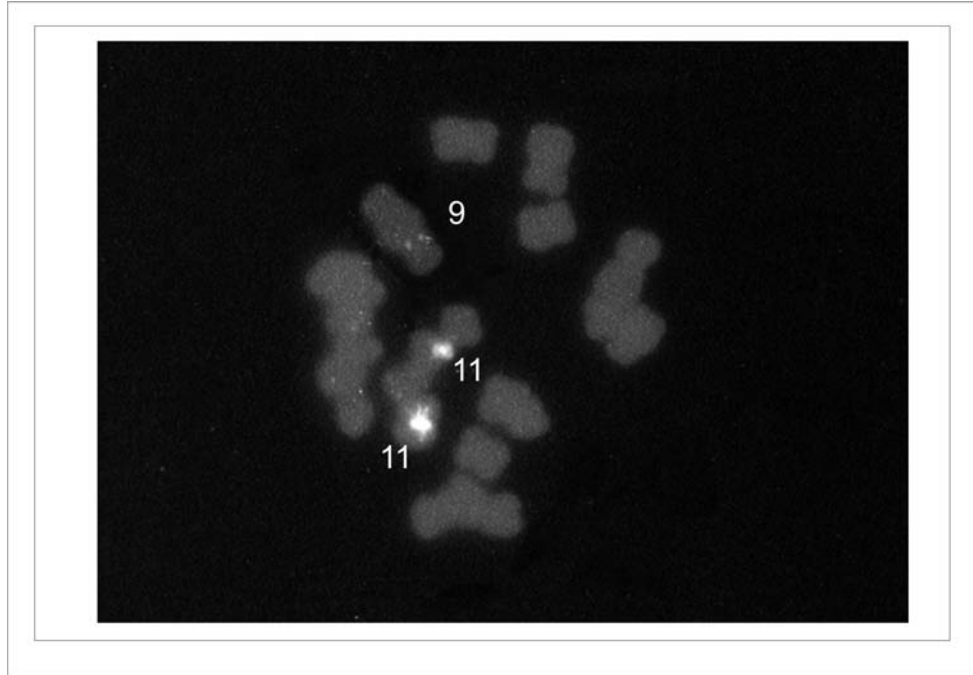


Fig. 14. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr em *Barycholos ternetzi*, com padrão 9p 11p11p de Ag-RON

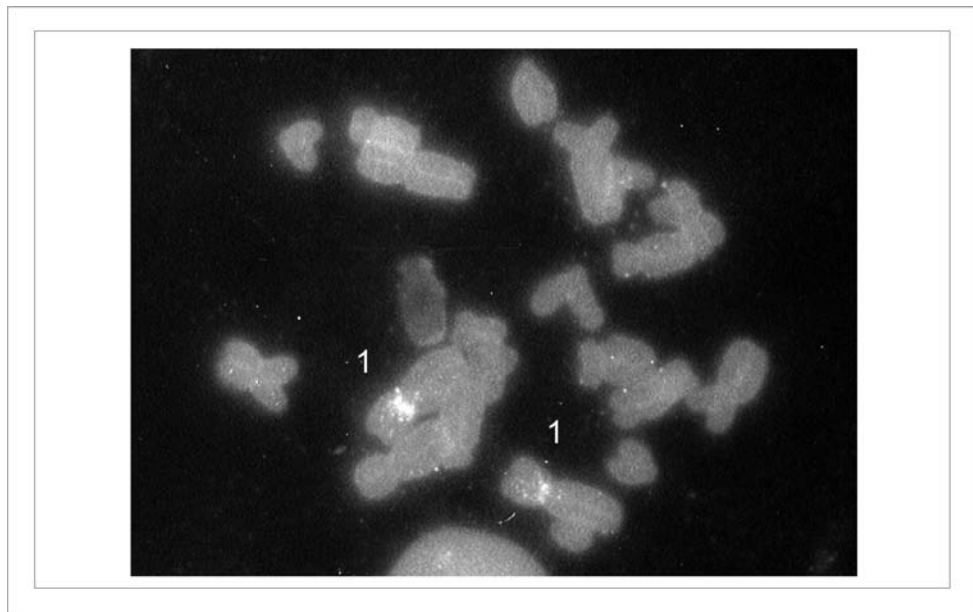


Fig. 15. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr em *Eleutherodactylus binotatus*, com padrão 1p1p de Ag-RON

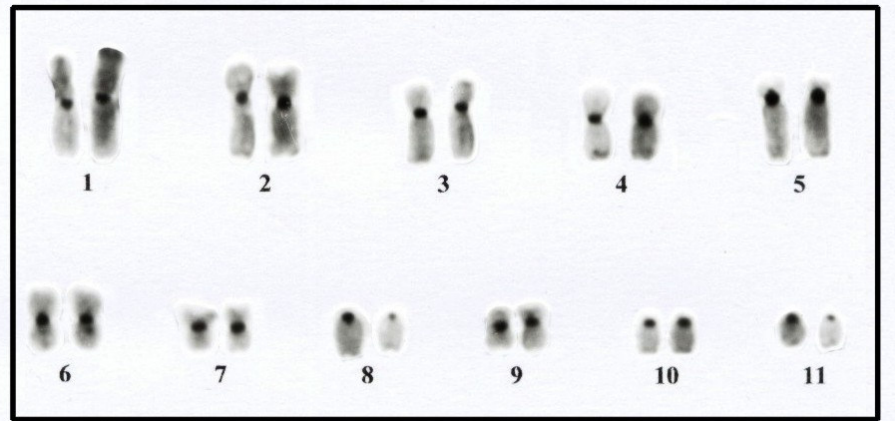


Fig. 16. Cariótipo com banda C de *Barycholos ternetzi*

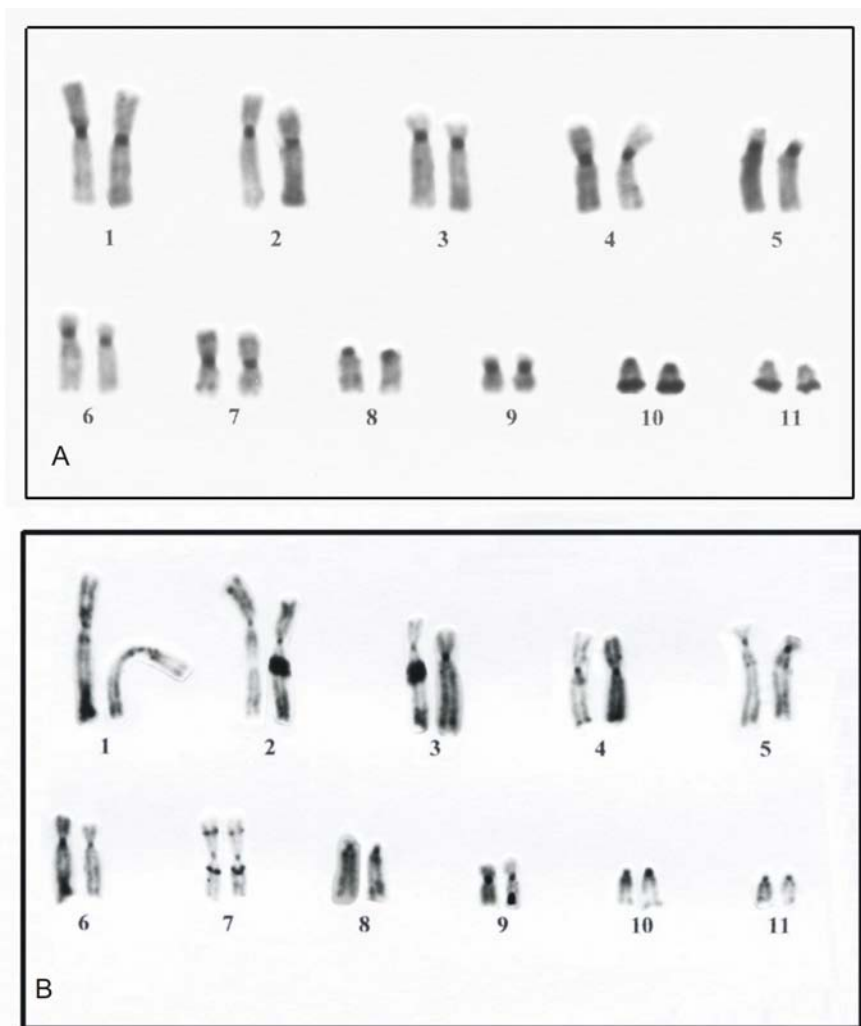


Fig. 17. Cariótipos de banda C de *Eleutherodactylus binotatus* de Aracruz, ES (A) e Mogi das Cruzes, SP (B)

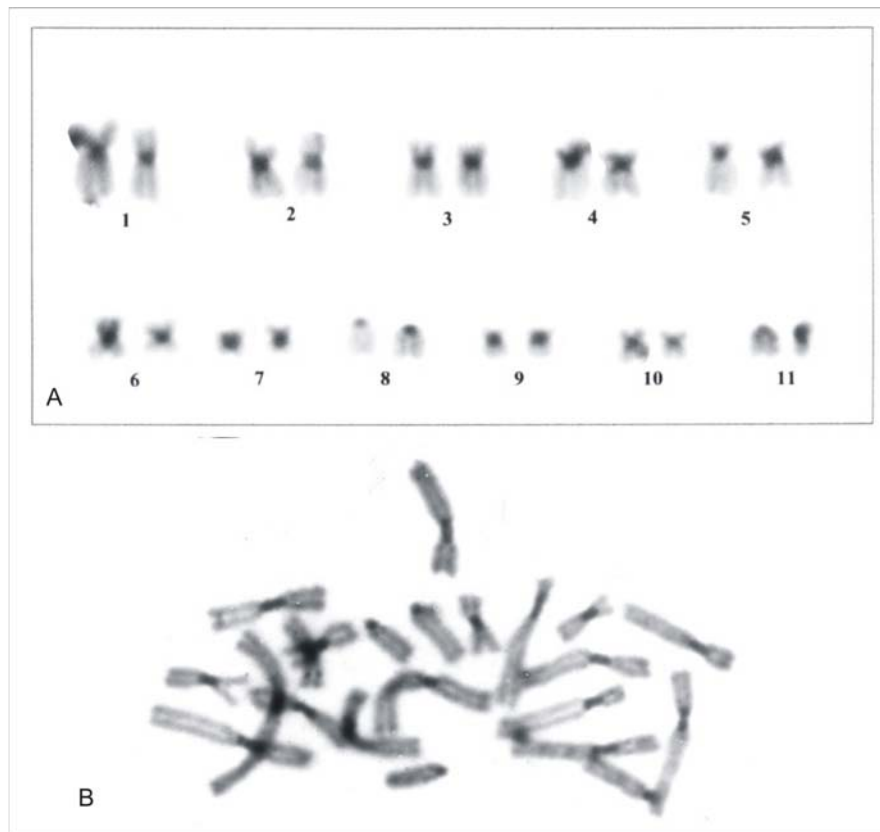


Fig. 18. Cariótipo (A) e metáfase (B) com banda C de *Eleutherodactylus juipoca*

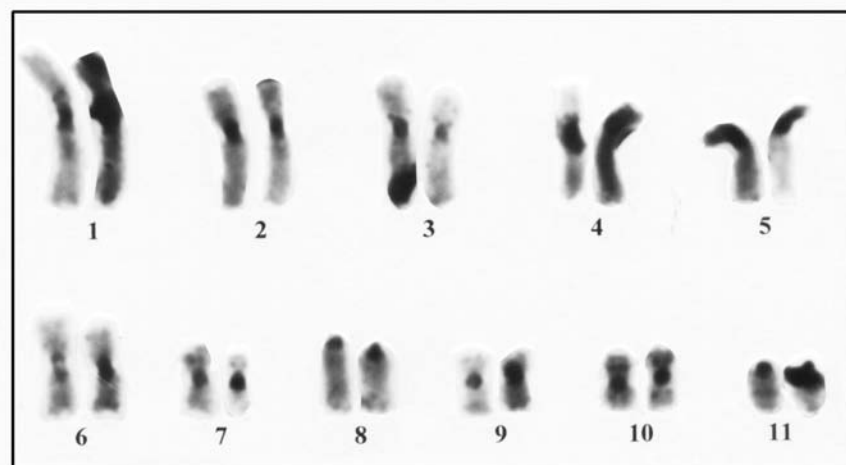


Fig. 19. Cariótipo com banda C de *Eleutherodactylus* sp.

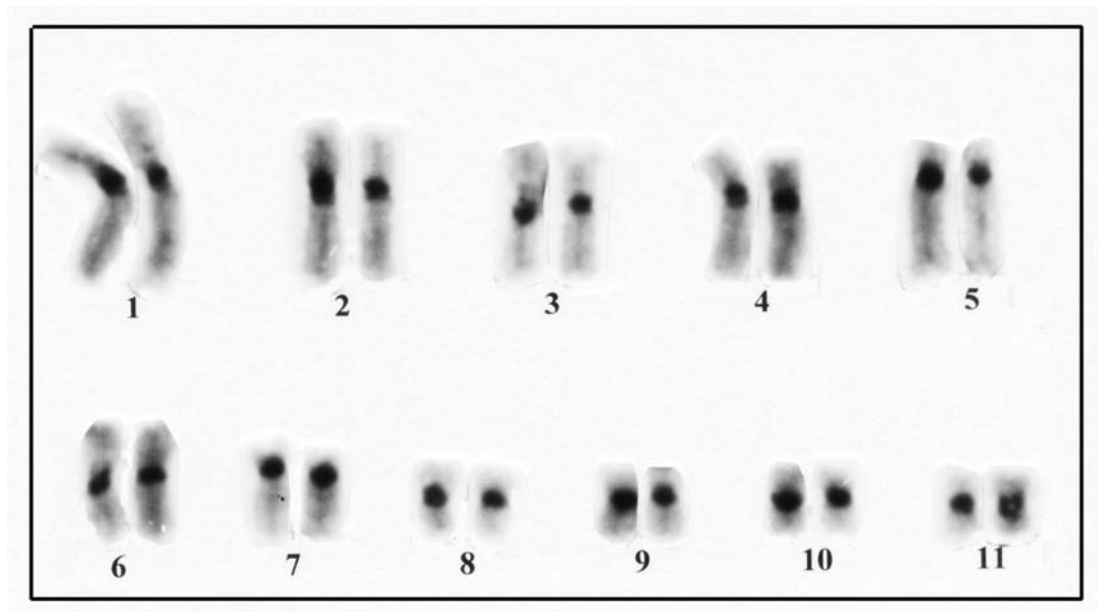


Fig. 20. Cariótipo com banda C de *Eleutherodactylus guentheri*

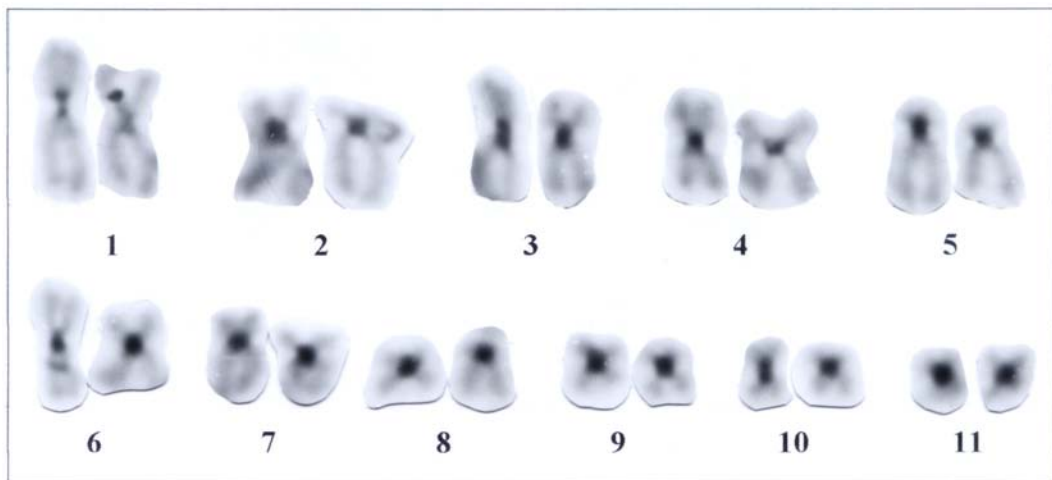


Fig. 21. Cariótipo com banda C de *Eleutherodactylus parvus*

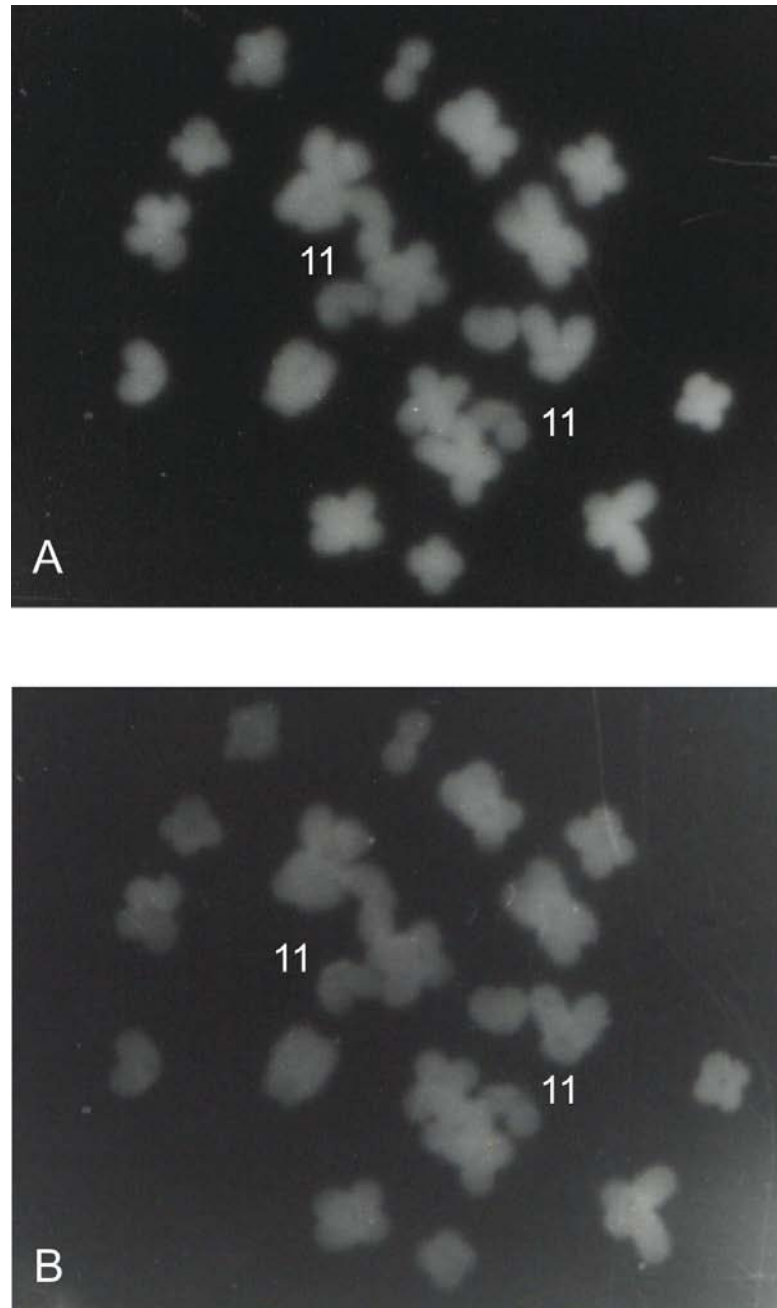


Fig. 22. Metáfases com coloração com coloração DAPI/DA (A) e CMA₃/DA (B) de *Barycholos ternetzi*. Notar em B marcação fluorescente em um dos cromossomos 11

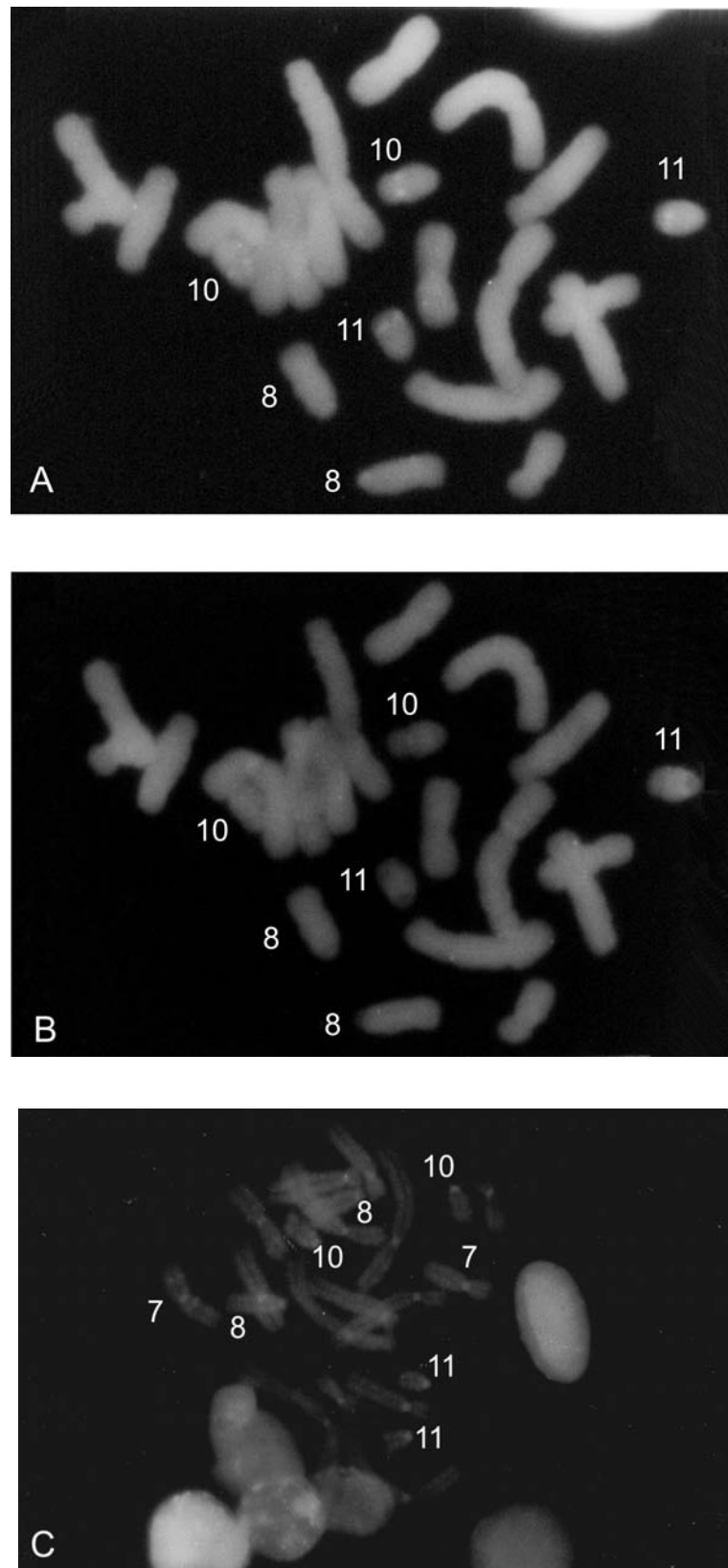


Fig. 23. Metáfases com coloração com coloração DAPI/DA (A), CMA₃/DA (B) e DAPI (C) de *Eleutherodactylus binotatus*. Notar em C marcação centromérica fluorescente em todos os cromossomos

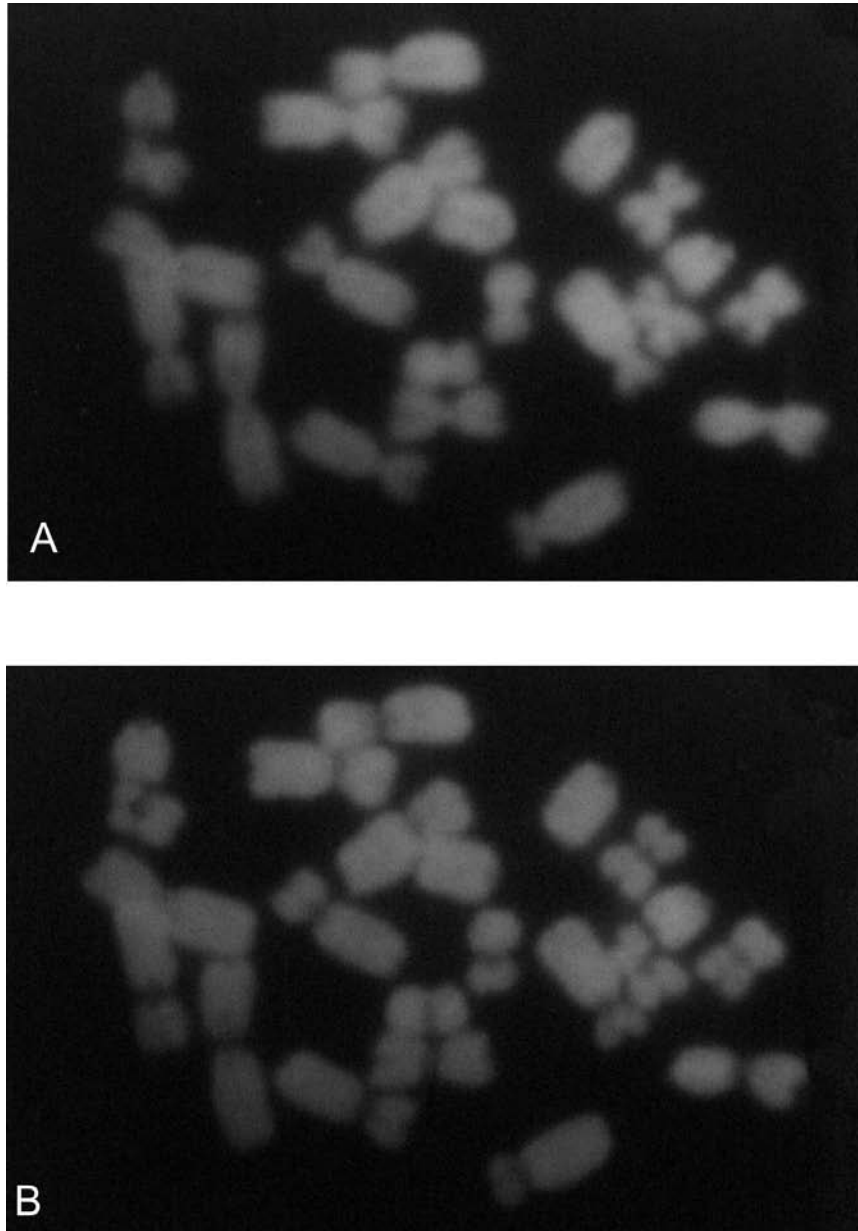


Fig. 24. Metáfases com coloração com coloração DAPI/DA (A) e CMA₃/DA (B) de *Eleutherodactylus juipoca*. Notar em B marcação centromérica negativa

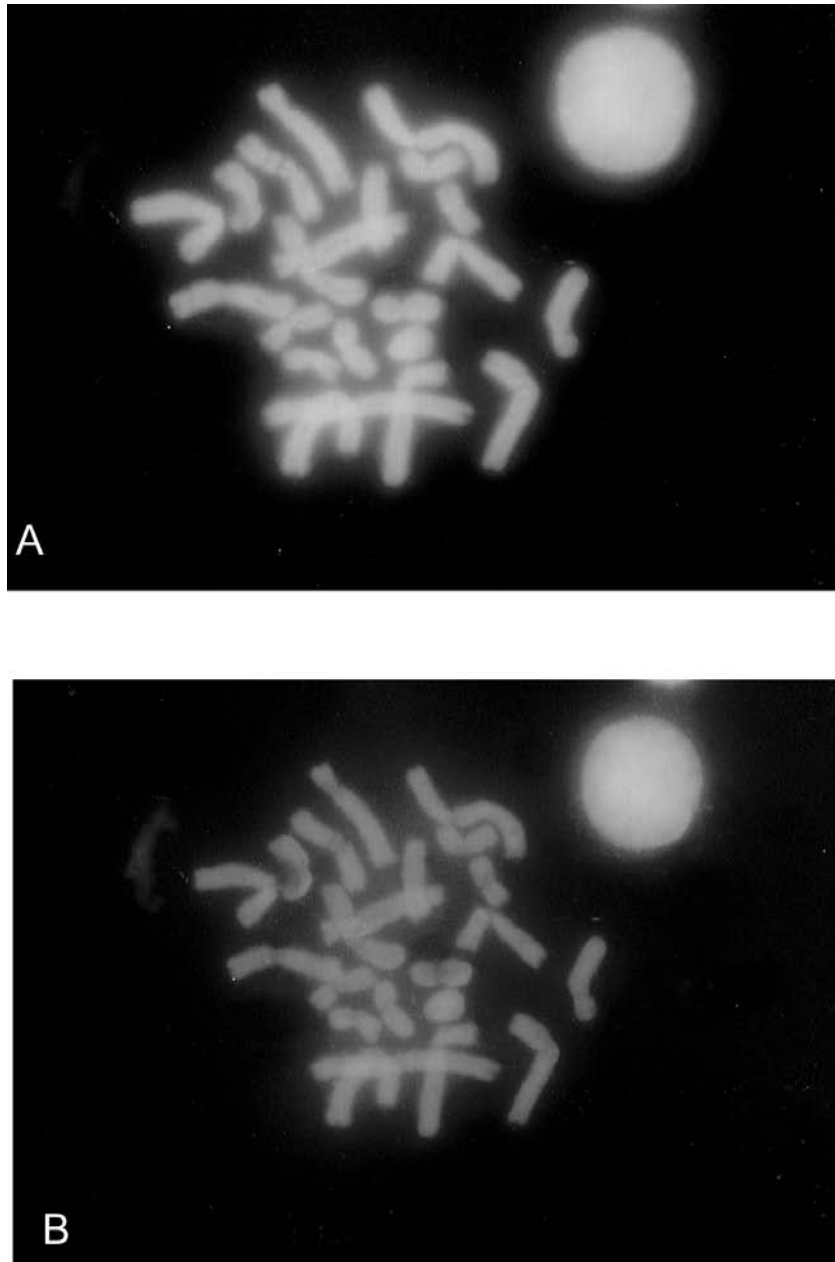


Fig. 25. Metáfases com coloração com coloração DAPI/DA (A) e CMA₃/DA (B) de *Eleutherodactylus guentheri*

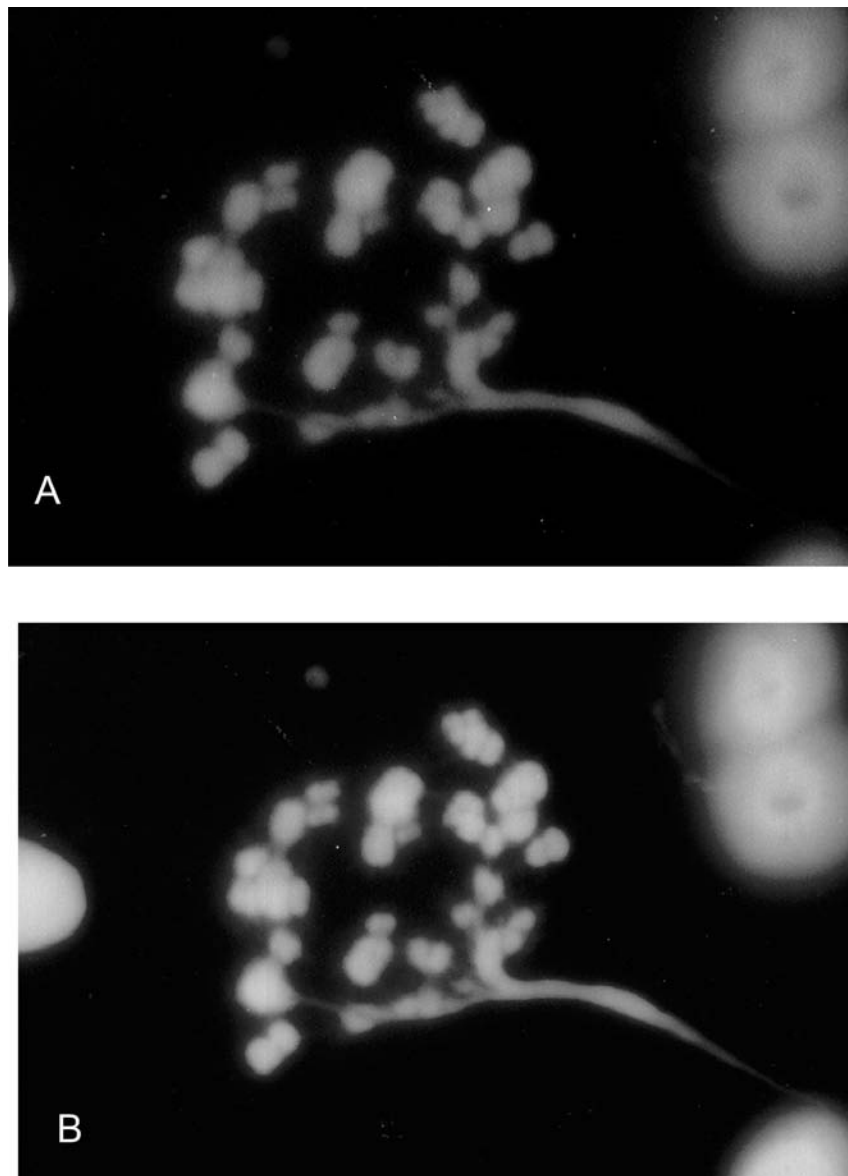


Fig. 26. Metáfases com coloração DAPI/DA (A) e CMA₃/DA (B) de *Eleutherodactylus parvus*

IX. DISCUSSÃO

Todas as espécies do presente trabalho têm $2n=22$, número diplóide comumente encontrado nos leptodactílídeos cariotipados até o momento. Uma característica que chama a atenção é a ocorrência de cromossomos do tipo telocêntrico em alguns cariótipos, o que resulta em diferentes números fundamentais, sendo $NF=38$ com três, $NF=40$ com dois ou $NF=44$ sem nenhum par com essa morfologia. Apesar das diferenças nos NF , é inquestionável que as seis espécies, ainda que uma delas pertencente a um gênero distinto, mostrem grande semelhança nos cariótipos, pois os telocêntricos em *B. ternetzi* e *E. binotatus* são concordantemente os dos pares 8, 10 e 11, em *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp., os dos pares 8 e 11, sendo o par 10 submetacêntrico, enquanto em *E. guentheri* e *E. parvus*, os correspondentes pares 8, 10 e 11 são todos do tipo submetacêntrico.

Presumindo uma homeologia dos pares 8, 10 e 11, pode-se supor que as diferenças morfológicas, muito provavelmente, se devem à inversão pericêntrica. Outros tipos de rearranjos, como por exemplo, a adição ou perda de braços heterocromáticos, como já descrita em alguns *Eleutherodactylus* que têm o mesmo $2n$ mas NF não coincidentes (BOGART, 1991; SCHMID *et al.*, 2002c; SCHMID *et al.*, 2003), foi afastada pela análise dos padrões de bandas C das espécies. A hipótese de inversão pericêntrica na diferenciação dos cariótipos da presente amostra poderá ser confirmada com o uso de metodologias que induzem o aparecimento de bandas de replicação ao longo dos cromossomos, como têm

sido utilizadas em anfíbios anuros para uma comparação mais efetiva dos cariótipos (MIURA, 1995; KASAHARA *et al.*, 2003). A técnica de incorporação de BrdU no DNA cromossômico, seguida de coloração FPG (DUTRILLAUX e COUTURIER, 1981) ou Giemsa diluído em EDTA tetrassódio (MIURA, 1995), foi aplicada repetidas vezes em preparações cromossômicas de exemplares de *B. ternetzi* e *E. binotatus*, sem produzir, no entanto, resultados satisfatórios. Sem dúvida, a comparação dos padrões de bandas de replicação aliados a dados obtidos com outras técnicas citogenéticas, como a de ZOO-FISH, não só entre as espécies de *Eleutherodactylus* do presente trabalho, mas também em outros representantes, cujos números diplóides são variáveis, poderá fornecer subsídios para se entender a extensa diversificação dos cariótipos no referido gênero, a partir de um cariótipo ancestral presumido com $2n=26$ e $NF=52$ como sugerido por KING (1990).

Enquanto as variações morfológicas nos pares 8, 10 e 11 são inquestionáveis, existem, também, pequenas discrepâncias envolvendo alguns dos demais cromossomos das espécies analisadas. Isso fica evidente quando se observa a distribuição dos cromossomos segundo o tamanho, nos cariogramas. Enquanto em cinco das espécies os seis primeiros pares são de tamanho grande e médio e os demais cinco pares, de tamanho pequeno, em *E. binotatus* a separação dos cromossomos grandes/médios e pequenos segue outro padrão, pois o par 7 é relativamente grande, sendo por isso incluído no primeiro grupo. O tamanho maior deve estar relacionado ao fato dos cromossomos de tal par apresentarem região heterocromática, visualizada pela banda C, tanto nos braços curtos como nos braços longos, o que não acontece no par 7 das demais espécies. Em alguns casos, as diferenças são sutis, como as observadas nos cromossomos do par 4, que teriam proporção de braços não coincidentes nas seis espécies, podendo ser, eventualmente, decorrentes de condensação diferencial. Em *E. juipoca* e em *Eleutherodactylus* sp., embora sejam também submetacêntricos, tendem a ter o centrômero mais distalmente localizado do que nos cromossomos 4 das demais espécies.

A diferença cariotípica mais marcante pode ser notada em *E. binotatus* com relação ao par 3, cujos cromossomos possuem braços curtos aparentemente menores do que o observado nas demais espécies, e ao par 6 que, ainda em *E.*

binotatus, é claramente do tipo submetacêntrico e não metacêntrico como na maioria. Com relação ao par 7, não há dúvida de que os cromossomos são submetacêntricos em *E. guentheri* e *E. parvus* e metacêntricos nas demais.

Enquanto os dados cariotípicos de *B. ternetzi*, *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp. são inéditos, as três outras espécies de *Eleutherodactylus* já tinham sido anteriormente estudadas por BEÇAK (1968), BEÇAK e BEÇAK (1974), SIQUEIRA Jr *et al.* (2004) e BRUM-ZORRILLA e SAEZ (1968), sendo que nesse último trabalho há apenas o registro do número diplóide $2n=22$ para *E. guentheri*. Pode-se dizer que *E. binotatus*, *E. guentheri* e *E. parvus* da nossa amostra apresentam cariogramas equivalentes aos já descritos para cada uma delas, ainda que o ordenamento e a nomenclatura dos cromossomos nem sempre fossem coincidentes. Contudo, diferenciação cromossômica geográfica intraespecífica não pode ser completamente afastada, pois as respectivas amostras são de localidades distintas.

No presente trabalho, não há indicação de cromossomos sexuais citologicamente diferenciados nos gêneros *Barycholos* e *Eleutherodactylus*, o que foi confirmado pela análise de cromossomos meióticos. A ocorrência de cromossomos sexuais diferenciados não seria surpreendente para as espécies de *Eleutherodactylus*, pois nesse gênero, um dos mais variáveis do ponto de vista citogenético, já foram descritas quatro espécies com sistemas cromossômicos simples e múltiplo de determinação do sexo (SCHMID *et al.*, 1992; SCHMID *et al.*, 2002a; SCHMID *et al.*, 2002c; SCHMID *et al.*, 2003).

Variação de tamanho e morfologia de alguns cromossomos em *E. binotatus* já havia sido relatada por SIQUEIRA Jr *et al.* (2004) para os elementos dos pares 2 e 3, porém, a novidade em nosso estudo é que o heteromorfismo no exemplar CFBH07878 de Mogi das Cruzes, SP, é mais extenso, pois envolve cromossomos de pelo menos cinco diferentes pares. Tal fato poderia ser conseqüência de múltiplas translocações recíprocas, já que existe uma diferença morfológica acentuada entre os homólogos pertencentes aos pares 2 a 6. Uma outra possível evidência de tais rearranjos foi a observação de que na meiose do referido exemplar formam-se multivalentes cromossômicos, o que é característico dos complexos de translocação, como presente em algumas plantas, por exemplo, dos gêneros *Oenothera* e *Rhoeo* (STRICKBERGER, 1976).

É interessante notar que cromossomos emparelhados sob a forma de multivalente foram também observados no macho de *E. binotatus* CFBH10021 de Ubatuba, SP, porém, nesse exemplar não foi constatado heteromorfismo cromossômico em nenhum par em particular. Tal fato não exclui completamente a possibilidade de que translocações recíprocas tenham ocorrido, pois os segmentos envolvidos podem ser pequenos a ponto de não alterarem a morfologia cromossômica. Nas preparações meióticas dos machos CFBH07878 e CFBH10021, não obtivemos células em metáfase II em quantidade suficiente para se avaliar o modo de segregação dos cromossomos que participam dos multivalentes. No entanto, em algumas poucas células observadas, há indicação de que o número cromossômico é igual a 11, assegurando, muito provavelmente, a formação de gametas equilibrados, como nos demais machos da amostra. Presença de multivalentes em *E. binotatus* já havia sido relatada por BEÇAK e BEÇAK (1974) e SIQUEIRA Jr *et al.* (2004), sendo que nesse último caso as cadeias meióticas estavam presentes em todos os machos por eles analisados.

Um dado interessante em relação a *E. binotatus* foi relatado por BEÇAK e BEÇAK (1974), que constataram uma diferença marcante na quantidade de DNA, de cerca de quatro vezes mais em relação a *E. guentheri*, apesar de ambas apresentarem o mesmo número diplóide e poucas diferenças na morfologia dos cromossomos. Um caso similar de variação significativa na quantidade de DNA em espécies de leptodactilídeos, com o mesmo $2n=22$ e morfologia cromossômica semelhante, foi relatado por SCHMID *et al.* (1993) em *Pleurodema brachiops* e *P. thaul*. Nesse trabalho, ficou evidenciado que a diferença de 3,4 vezes na quantidade de DNA pode ser atribuída não só à heterocromatina evidenciada pela banda C, que corresponde a cerca de seis vezes mais em *P. brachiops*, como também pelo aumento de outras classes de DNA.

Um marcador citológico relevante para a comparação cariotípica, principalmente entre os anuros, os quais se mostram bastante conservados do ponto de vista cariotípico, tem sido a localização das Ag-RONs, em geral, presentes em um único par de cromossomos, em sítios coincidentes ou não, ou em pares distintos e, até mesmo, podendo ocorrer marcação em cromossomos de diferentes pares (SCHMID *et al.*, 1990). Um único par de RON no genoma pode ser considerado uma condição mais basal e a presença de RONs múltiplas

representa uma apomorfia no cariótipo diplóide de espécies de anuros (KING *et al.*, 1990).

Enquanto as cinco espécies de *Eleutherodactylus* mostraram um único par de Ag-RONs, há em *B. ternetzi* cromossomos de mais de um par impregnados pela prata, com indicações de mais de RONS verdadeiras. Com base no padrão de coloração pelo nitrato de prata apresentado pelos exemplares da amostra, o par principal deve corresponder ao 11, pois seus cromossomos aparecem marcados em todos eles, ainda que menos frequentemente em apenas um dos homólogos.

Com relação às demais marcações Ag-positivas em *B. ternetzi*, aquela do cromossomo 9 deve corresponder também a uma RON, fato esse confirmado pela técnica de FISH no exemplar, cujo padrão de marcação pela prata era 9p 11p11p, embora o sinal de hibridação no referido cromossomo fosse muito menor do que o apresentado pelos homólogos do par 11. A hibridação com sondas fluorescentes de DNAr poderá confirmar se as demais marcações Ag-positivas, 1p, 4p, 5q e 11q, são, de fato, RONS verdadeiras. É importante ressaltar que a técnica de Ag-RON tem revelado, ocasionalmente, marcações em regiões repetitivas devidas a afinidade pelo nitrato de prata. Essas regiões marcadas, muitas vezes de heterocromatina, foram observadas em diferentes organismos, como em mamíferos (SANCHEZ *et al.*, 1995; DOBIGNY *et al.*, 2002), em peixes (GROMICHO *et al.*, 2005) e em anfíbios anuros, como *Bufo schneideri* (*Bufo paracnemis*), *Leptodactylus mystacinus* e *Eupemphix nattereri* (KASAHARA *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2005, no prelo; ANANIAS *et al.*, artigo em preparação).

Similarmente à *B. ternetzi*, Ag-RONs no par 11 foram também observadas em *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp., porém, na região proximal dos braços longos dos telocêntricos 11, em ambas as espécies. Tal fato indica uma grande proximidade cariotípica entre as três referidas espécies. A mudança na posição da Ag-RON em *B. ternetzi* poderia ser conseqüência de uma pequena inversão pericêntrica ou de um outro mecanismo não identificado. Tanto em *B. ternetzi* como em *E. juipoca* foi observado exemplar portador de Ag-RON em apenas um dos homólogos, podendo tal fato ser decorrente de deleção completa do sítio ribossomal ou mesmo da não atividade de transcricional dessa região, o que poderia ser confirmado pela técnica de FISH com sondas de DNAr. Exemplos de

uma única marcação pela prata já foram relatados em anfíbios anuros (SCHMID, 1982; KASAHARA *et al.*, 1996) e, mais recentemente, em *E. guentheri* e *E. parvus* (SIQUEIRA Jr *et al.*, 2004). Nessas duas espécies, porém, foi confirmada a presença de RONS nos dois homólogos com a técnica de FISH, ainda que uma delas fosse de tamanho muito pequeno.

Os cariótipos de *E. binotatus*, *E. guentheri* e *E. parvus* são diferenciados em relação aos das demais espécies quanto às Ag-RONS, pois estão localizadas no par 1 na primeira e no par 6 no caso das duas últimas, em sítios coincidentes com os previamente descritos por SIQUEIRA Jr *et al.* (2004). Em *E. binotatus* de nossa amostra, a sonda fluorescente de DNAr hibridou na mesma região corada pela prata, confirmando ser esse o sítio da RON. Dados semelhantes para a espécie foram apresentados por SIQUEIRA Jr *et al.* (2004), apesar desses autores terem observado somente pelo FISH uma marcação adicional em um dos homólogos do par 3, não revelada pela prata.

O bandamento C mostrou marcação na região dos centrômeros dos cromossomos das seis espécies ora estudadas, não havendo, aparentemente, uma diferença significativa em relação à quantidade dessa heterocromatina. Possíveis discrepâncias que parecem existir nos padrões centroméricos de bandas C são muito mais resultantes dos procedimentos técnicos e da condensação cromossômica diferencial do que indicações de diferenças interespecíficas ou interpopulacionais. Isso foi particularmente notável em exemplares de *E. juipoca*, nos quais diferentes padrões de banda C podem ser claramente atribuídos a metáfases com cromossomos mais ou menos distendidos.

Levando-se em conta a distribuição de bandas intersticiais em alguns cromossomos de *E. binotatus*, há indicações de que, nesse caso, o padrão de banda C é espécie-específico ou até população-específico. Embora bandas C intersticiais sejam muitas vezes de difícil caracterização, pois nem sempre são nitidamente visualizadas, parece não haver dúvidas de que possam ocorrer, de fato, diferenças populacionais nessa espécie. Os exemplares de Ubatuba, SP e de Aracruz, ES, apresentam bandas C distais fortemente coradas nos pares 10 e 11 e, tênue no par 8, assim como leves bandas intersticiais em ambos os braços dos cromossomos 7. Ao contrário, nos exemplares de Mogi das Cruzes, SP, há

apenas vestígios de marcação distal C positiva nos pares 10 e 11, ausentes no par 8, e bandas intersticiais bem evidentes nos braços longos e curtos dos cromossomos 7.

A técnica de banda C tem sido comumente aplicada nos estudos citogenéticos de anuros, mostrando muitas vezes diferenciações cariotípicas não notadas nem pela coloração convencional, nem pela marcação de Ag-RONs, como é o caso de *Leptodactylus ocellatus* (SILVA *et al.*, 2000). Esses autores observaram que exemplares de algumas populações diferem não só pela morfologia externa e padrão de vocalização, como também pela distribuição de heterocromatina, o que os levou à sugestão de que poderia haver mais de uma espécie sendo tratada sob o mesmo nome. Certamente, os diferentes padrões de bandas C encontrados em *E. binotatus* não constituem por si só parâmetros suficientes para se corroborar a existência de um complexo de espécies sob o nome de *E. binotatus*. No entanto, poderão vir a ser se associados a outros caracteres, como os de morfologia, bioacústica e, sobretudo, os obtidos em abordagens moleculares.

A coloração dos cromossomos das espécies *B. ternetzi*, *E. binotatus*, *E. juipoca*, *E. guentheri* e *E. parvus*, com exceção de *Eleutherodactylus* sp., com os fluorocromos CMA₃ e DAPI forneceu informações sobre a constituição molecular, se rica em GC ou AT, de algumas regiões repetitivas, as quais correspondiam, em geral, a sítios C positivos. As espécies *B. ternetzi* e *E. binotatus* foram as únicas a apresentarem fluorescência mais acentuada com CMA₃ na região das RONS, mas é muito provável que a marcação tenha sido decorrente mais da heterocromatina a elas associada do que do organizador nucleolar propriamente dito, ainda que esse seja rico em bases GC. Por essa razão, não é completamente seguro empregar a coloração CMA₃ para identificar regiões organizadoras de nucléolo independentemente de atividade genética prévia, como havia sido mostrado por AMEMIYA e GOLD (1986) em peixes. GROMICHO *et al.* (2005) e SILVA *et al.* (2005, no prelo) constataram também a falta de correspondência entre os sítios de RONS evidenciados pelo FISH e as marcações CMA₃ positivas, porém, em alguns casos, essa equivalência é verdadeira, como observado por KASAHARA *et al.* (2003) para algumas espécies de hilídeos.

A coloração com DAPI/DA mostrou que o cariótipo de *E. juipoca* se diferencia dos apresentados pelas demais espécies por apresentar, ainda que eventualmente, marcações brilhantes da heterocromatina centromérica e pericentromérica, que é, portanto, rica em bases AT. O padrão de fluorescência é equivalente ao do bandamento C evidenciado em algumas metáfases da referida espécie.

Em *E. binotatus*, a coloração com DAPI/DA mostrou também regiões fluorescentes de heterocromatina rica em bases AT, segundo um padrão que é exclusivo para essa espécie. É importante notar que a técnica foi particularmente útil para confirmar a possível diferença populacional no bandamento C da espécie, no que diz respeito à ocorrência ou não da heterocromatina distal nos braços longos dos cromossomos do par 8. De fato, existe nessa região uma heterocromatina tanto C-positiva como DAPI-positiva na amostra de Ubatuba, SP, não detectada na amostra de Mogi das Cruzes, SP, com nenhuma dessas técnicas. Contudo, heterocromatina igualmente DAPI fluorescente foi observada na região distal dos cromossomos 10 e 11 nos animais de ambas as localidades, embora correspondesse a bandas C com diferentes intensidades de coloração. Por outro lado, apenas a banda C centromérica dos cromossomos 8 em animais das duas localidades mostraram fluorescência pelo DAPI. Um resultado notavelmente diferente foi obtido com o uso de DAPI sem contracorante DA em um outro exemplar de *E. binotatus* de Mogi das Cruzes, SP, na medida que a heterocromatina centromérica de todos os cromossomos e não apenas a dos homólogos do par 8, bem como a heterocromatina das regiões intersticiais dos cromossomos 7, mostraram-se também fortemente fluorescentes. Essa técnica não evidenciou a heterocromatina distal rica em bases AT dos cromossomos 10 e 11, mas confirmaram a sua ausência nos cromossomos 8. Resultados nem sempre concordantes quando se utiliza o mesmo fluorocromos AT-específico, como o DAPI, sem ou com o uso de contracorantes GC ou AT específico como o DA, são de certa forma esperados (VERMA e BABU, 1995), tendo sido constatado por SCHMID *et al.*, 2002b) em espécies de anfíbios anuros.

As cinco espécies de *Eleutherodactylus* do presente trabalho são identificadas de modo inequívoco do ponto de vista da morfologia e da bioacústica, entre outros parâmetros, porém, *E. binotatus*, *E. juipoca* e *E.*

guentheri exibem caracteres comuns, que justificam a sua inclusão no grupo morfológico de *E. binotatus* (LYNCH, 1976; LYNCH e DUELLMAN, 1997). As propostas de agrupamentos feitas por esses autores para as espécies brasileiras de *Eleutherodactylus* apresentam ainda muitos questionamentos; além disso, várias espécies não foram incluídas em nenhum dos grupos previamente conhecidos, provavelmente devido à falta de estudos que auxiliem nessa questão.

Eleutherodactylus parvus pertence ao grupo morfológico de *E. parvus* (sensu LYNCH e DUELLMAN, 1997), porém, é sabido que a referida espécie tem uma morfologia externa muito semelhante a *E. binotatus*, e, como vimos, uma grande similaridade cariotípica com *E. guentheri*. Desse modo, não seria de se estranhar se *E. parvus* fosse igualmente alocado no grupo morfológico de *E. binotatus*, e não em um grupo à parte.

Quanto a *Eleutherodactylus* sp., a espécie mostra morfologia externa muito semelhante a *E. spanios*, que foi descrito por HEYER (1985) com base em exemplares coletados em Salesópolis, SP, mas que não foi alocado em nenhum grupo morfológico. Ainda nessa mesma localidade-tipo, HEYER (1990) coletou três outras espécies não identificadas de *Eleutherodactylus*, de modo que *Eleutherodactylus* sp. do presente estudo poderia corresponder a uma delas, ou ainda a uma quarta espécie, mostrando que a diversidade do gênero na região não é completamente conhecida. Os dados ora obtidos mostram que *Eleutherodactylus* sp. tem cariótipo praticamente idêntico ao de *E. juipoca*, o que não seria surpreendente, então, a sua inclusão no grupo de *E. binotatus*.

Todos esses fatos apontam para a necessidade de uma reavaliação nos grupos morfológicos das espécies de *Eleutherodactylus*, pelo menos das que ocorrem no Sudeste e Sul do Brasil, e para isso seria importante que dados citogenéticos fossem levados em consideração.

Apesar das diferenças cromossômicas individuais e independentemente da reunião em agrupamentos morfológicos, coincidentes ou não, não há dúvida de que as cinco espécies de *Eleutherodactylus* do presente trabalho compartilham um padrão cariotípico uniforme. Tal fato justificaria a constituição de um conjunto de espécies de *Eleutherodactylus* do Sudeste e Sul do Brasil do qual participariam, também, *E. holti* e *E. lacteus* apesar de ambos apresentarem 20 cromossomos (LUCCA e JIM, 1974; LUCCA *et al.*, 1974). Levando-se em conta,

então, a semelhança do padrão cariotípico de *B. ternetzi* com o dos cinco *Eleutherodactylus* ora estudados, a espécie poderia ser incluída nesse conjunto, enfatizando-se que, além disso, *B. ternetzi* compartilha alguns outros caracteres com as espécies de *Eleutherodactylus* como, por exemplo, a presença de esterno bífido, saco vocal subgular e, principalmente, o modo de reprodução com desenvolvimento direto, comum para os *Eleutherodactylus* (LYNCH, 1980; CARAMASCHI e POMBAL Jr, 2001; SOUZA, 2003). Diante disso, seria igualmente oportuna uma ampla revisão, em que se levasse em conta também os dados citogenéticos, para se averiguar entre outras questões a validade de um ou de outro gênero, principalmente, em relação às espécies de *Barycholos* e *Eleutherodactylus* do Sudeste e Sul do Brasil.

A idéia de dois conjuntos de espécies de *Eleutherodactylus* diferenciados por números diplóides relativamente baixos e números diplóides relativamente altos já havia sido levantada em 1975 por De Weese, com base nas informações citogenéticas obtidas até então. Levando-se em conta os dados citogenéticos das espécies que ocorrem no Brasil, parece que essa dicotomia existe de fato, pois a grande maioria dos representantes do Norte e Nordeste tende a apresentar números diplóides altos ($2n=30$ e 34) como registrados em *E. altamazonicus*, *E. conspicillatus*, *E. fenestratus*, *E. ramagii*, com exceção de *E. sulcatus* com $2n=22$ (BOGART, 1973; De WEESE, 1975; SIQUEIRA Jr *et al.*, 2005; F. Ananias, dados não publicados), em oposição às espécies do Sudeste e Sul com números diplóides baixos. Desse modo, seria interessante a obtenção de novos dados cariológicos em espécies de *Eleutherodactylus* que ocorrem no Brasil, para se testar a validade de dois conjuntos cariológicos em nosso território e, particularmente, de *E. nigrovittatus* e *B. pulcher*, ambos do Norte da América do Sul, o que auxiliaria na avaliação da proximidade dos dois gêneros de leptodactídeos.

X. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análise citogenética comparativa foi realizada em seis espécies de Eleutherodactylinae: *Barycholos ternetzi*, *Eleutherodactylus binotatus*, *E. juipoca*, *Eleutherodactylus* sp., *E. guentheri* e *E. parvus*. Para *B. ternetzi*, *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp. foram obtidos pela primeira vez dados com coloração convencional e diferencial, enquanto que para as três outras espécies, são inéditos somente aqueles obtidos com fluorocromos GC AT-específicos. Com base nos resultados obtidos podemos fazer as seguintes considerações:

_ todas as espécies analisadas apresentaram $2n=22$, com NF distintos devido à ocorrência dos pares telocêntricos 8, 10 e 11 em *Barycholos ternetzi* e *Eleutherodactylus binotatus* com NF=38, dos pares telocêntricos 8 e 11 em *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp. com NF=40, e nenhum par telocêntrico em *E. guentheri* e *E. parvus* com NF=44. A variação na morfologia desses pares se deve, provavelmente, a rearranjo do tipo inversão pericêntrica, o que poderá ser confirmado com o uso de metodologias que induzem a obtenção de bandas de replicação, além de outras técnicas mais resolutivas;

_ a distribuição dos cromossomos no cariograma segundo o tamanho é concordante em cinco espécies, as quais mostraram seis pares grandes e médios e cinco pares de tamanho pequeno. Em *E. binotatus*, ocorrem sete pares de tamanho grande e médio e quatro pares pequenos, porque o par 7 é relativamente maior do que o observado nas demais espécies, devido à presença de bandas C intersticiais, tanto nos braços curtos como nos longos dos cromossomos;

_ as diferenças mais marcantes observadas nos kariogramas são, sem dúvida, as relacionadas aos pares 8, 10 e 11, porém, existem pequenas discrepâncias nos pares 3 e 6 de *E. binotatus*, no par 4 de *E. juipoca* e *Eleutherodactylus* sp., e no par 7 de *E. guentheri* e *E. parvus*. No entanto, as variações interespecíficas encontradas na morfologia desses pares podem ser decorrentes mais de condensação diferencial dos cromossomos do que de alteração estrutural propriamente dita;

_ em um dos exemplares de *E. binotatus* de Mogi das Cruzes, SP, foi encontrado um extenso heteromorfismo envolvendo os cromossomos dos pares 2 a 6, provavelmente decorrente de translocações recíprocas, o que foi comprovado pela presença de multivalentes na meiose. Em um macho de Ubatuba, SP, foram também observados multivalentes meióticos, porém, sem heteromorfismo cromossômico. As análises meióticas de um maior número de machos poderão fornecer novos dados sobre essa questão, além de confirmar se ocorre ou não a correta segregação dos cromossomos na meiose II;

_ as Ag-RONs nas cinco espécies de *Eleutherodactylus* ocorrem em apenas um par de homólogo. Em *B. ternetzi*, os cromossomos dos pares 1, 4, 5, 9 e 11 aparecem corados pela prata, mas há indicações de que o par principal portador de RON seja o 11. A técnica de FISH confirmou a posição 1p em *E. binotatus* como RON, e 9p 11p11p em um dos exemplares de *B. ternetzi*, com igual padrão de Ag-RON. Estudos com as técnicas de Ag-RON e FISH em um maior número de exemplares de *B. ternetzi* poderão confirmar se todas as regiões marcadas pela prata são correspondentes a RONs verdadeiras, ou se são regiões repetitivas com afinidade pela prata, além de avaliar a extensão da variação encontrada;

_ todas as seis espécies analisadas apresentaram um padrão centromérico de banda C. Algumas poucas bandas intersticiais foram observadas, sendo as mais relevantes aquelas que aparecem em *E. binotatus*, sugerindo um padrão de banda C espécie-específico e até mesmo população-específico;

_ com CMA₃ somente a região centromérica de pelo menos um dos telocêntricos 11 em *B. ternetzi* e a região proximal dos cromossomos 1 de *E. binotatus* mostraram-se com fluorescência brilhante. Com DAPI, *E. juipoca* mostrou marcações brilhantes na região centromérica e pericentromérica dos

cromossomos. No caso de *E. binotatus*, o uso de DAPI, com ou sem DA, mostrou fluorescência brilhante centromérica e intersticiais em alguns cromossomos, nem sempre coincidentes com as duas técnicas,

_ apesar de vários agrupamentos terem sido propostos para as espécies brasileiras de *Eleutherodactylus*, especialmente para as do Sudeste e Sul do Brasil, ainda existem muitas dúvidas a esse respeito, de modo que será oportuna uma reavaliação dos grupos morfológicos, em que sejam também levados em consideração os dados citogenéticos;

_ os *Eleutherodactylus* brasileiros cariotipados até o momento parecem formar dois conjuntos distintos, ou seja, de um lado estão as espécies do Norte e Nordeste caracterizadas por um número alto de cromossomos com $2n=30$ e 34 , e de outro, as da região Sudeste e Sul com $2n=22$ e 20 . Sem dúvida, *B. ternetzi* pode fazer parte desse último conjunto de espécies, pois todas elas apresentam uma grande uniformidade no padrão cariotípico. Diante disso, seria igualmente oportuna uma ampla revisão com base nos dados citogenéticos, para se averiguar entre outras questões a validade de um ou de outro gênero, principalmente, em relação às espécies de *Barycholos* e *Eleutherodactylus* do Sudeste e Sul, e também a proximidade cariotípica dos representantes dos dois gêneros no Norte da América do Sul.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARO-GHILARDI, R.C. Estudos citogenéticos comparativos em 26 espécies da família Leptodactylidae (Amphibia, Anura). **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências, USP, São Paulo, 2005.

AMEMIYA, C.T., GOLD, J.R. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. **Copeia**, 1:226-231, 1986.

BALDISSERA Jr, F.A., OLIVEIRA, P.S.L., KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Brasil. Genet.**, 16:335-345, 1993.

BATISTIC, R.F. Citogenética e evolução em anfíbios anuros. **Ciência e Cultura**, 36:45-51, 1984.

BEÇAK, M.L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**, 21:191-208, 1968.

BEÇAK, M.L., BEÇAK, W. Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae-Amphibia). **Experientia**, 30:624-625, 1974.

BEÇAK, M.L. BEÇAK, W., RABELLO, M.N. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frogs *Odontophrynus americanus*. **Chromosoma**, 19:188-193, 1966.

BOGART, J.P. Los cromosomas de anfibios anuros del género *Eleutherodactylus*. **Act. IV Congr. Latin. Zool.**, 1:65-78, 1970a, *apud* KING, 1990.

BOGART, J.P. Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. **Cytogenetics**, 9:369-383, 1970b.

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

BOGART, J.P. 1973b *apud* KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. Educ.**, 39:83-127, 1990.

BOGART, J.P. Chromosomes studies in *Sminthillus* from Cuba and *Eleutherodactylus* from Cuba and Puerto Rico (Amphibia: Leptodactylidae). **Life Sci. Contr. R. Ontario Mus.**, 129:1-22, 1981.

BOGART, J.P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In: GREEN, D.M., SESSIONS, S.K. (Eds.) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. New York: **Academic Press**, p.233-258, 1991.

BOGART, J.P., HEDGES, S.B. Rapid chromosome evolution in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). **J. Zool.**, 235:9-31, 1995.

BRUM-ZORRILLA, N., SAEZ, F.A. Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia, Anura). **Experientia**, 24: 969, 1968.

CARAMASCHI, U., POMBAL JR, J.P. *Barycholos savagei*: a junior synonym of *Paludicola ternetzi*, with notes on development. **Journal of Herpetology**, 35:357-360, 2001.

CASTANHO, L.M., HADDAD, C.F.B. New species of *Eleutherodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae) from Guaraqueçaba, Atlantic Forest of Brazil. **Copeia**, 3:777-781, 2000.

CHRISTIAN, A., McNIEL, E., ROBINSON, J., DRABEK, J., LaRUE, C., WALDREN, C., BEDFORD, J. A versatile image analyses approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. **Cytogenet. Cell Genet.**, 82:172-179, 1998.

DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. **Journal of Herpetology**, 6:71-74, 1972.

DeWEESE, J.E. Chromosomes in *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae). **Mamm. Chrom. Newsl.**, 16:121-123, 1975.

DOBIGNY, G., OZOUF-COSTAZ, C., BONILLO, C. VOLOBOUEV, V. "Ag-NORs" are not always true NORs: new evidence in mammals. **Cytogenet. Genome Res.**, 98:75-77, 2002.

DREWRY, G.E. JONES, K.L. A new ovoviviparous frog, *Eleutherodactylus jasperi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), from Puerto Rico. **Journal of Herpetology**, 10:161-165, 1976.

DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill, 670p, 1994.

DUELLMAN, W.E. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. **Syst. Zool.**, 16:38-43, 1967, *apud* KING, 1970

DUTRILLAUX, B., COUTURIER, J. **La Pratique de l'Analyse Chromosomique**. Paris: Masson, 86p, 1981.

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

FAIVOVICH, J., GARCIA, P.C.A., ANANIAS, F. LANARI, L. BASSO, N.G. WHEELER W.C. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 32:938-950.

FAIVOVICH, J., HADDAD C.F.B., GARCIA, P.C.A., FROST, D.R., CAMPBELL, J.A., WHEELER W.C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 294, 240p, 2005.

FORESTI, F. Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura). **Dissertação de Mestrado**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós, USP, Piracicaba, 1972.

FROST, D.R. **Amphibians Species of the World. A Taxonomic and Geographical Reference**. Kansas: Allen Press, Inc., and The Association of Systematics Collection, 732p, 1985.

FROST, D.R. Amphibians Species of the World: an on Line Reference. **V2.2**
Eletronic database available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. 2002 Acesso em junho 2002.

FROST, D.R. Amphibians Species of the World: an on Line Reference. **V2.21**
Eletronic database available at
<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. 2004
Acesso em janeiro de 2006.

GALETTI Jr, P.M., MARTINS, C. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Res.** 7:363-367, 1999.

GARCIA, P.C.A. Nova espécie de *Eleutherodactylus* Duméril & Bibron, 1891, do estado de Santa Catarina, Brasil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Biociências**, 2:57-68, 1996.

GREEN, D.M., SESSIONS, S.K. Nomenclature for chromosomes. In: GREEN, D.M., SESSIONS, S.K. (Eds.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego: Academic Press, p.431-432, 1991.

GREEN, D.M., BOGART, J.P., ANTHONY, E.H. GENNER, D.L. An interactive, microcomputer-based karyotype analysis System for phylogenetic cytotaxonomy. **Comput. Biol. Med.**, 10:219-227, 1980.

GROMICHO, M., OZOUF-COSTAZ, C., COLLARES-PEREIRA, M.J. Lack of correspondence between CMA₃-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Telostei, Cyprinidae) evidence by sequential banding. **Cytogenet. Genome Res.** 109:507-511, 2005.

HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., WRIGHT, L.L., WARD, D.C.E., VANCE, G.H. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. **Cytometry**, 43:101-109, 2001.

HEYER, W.R. The adaptative ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, 23:421-428, 1969.

HEYER, W.R. Variation, systematics, and zoogeography of *Eleutherodactylus guentheri* and closely related species (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). **Smith. Contrib. Zool.**, 402:1-42, 1984.

HEYER, W.R. New species of frogs from Boracéia, São Paulo, Brazil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, 98:657-671, 1985.

HEYER, W.R., RAND, A.S., CRUZ, C.A.G., PEIXOTO, O.L., NELSON, C.E. Frogs of Boracéia. **Arq. Zool.**, 31:231-410, 1990.

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

KAISER, H., GREEN, D.M., SCHMID, M. Systematics and biogeography of Eastern Caribbean frogs (Leptodactylidae: *Eleutherodactylus*), with the description of a new species from Dominica. **Canadian Journal of Zoology**, 72:2217-2237, 1994.

KAISER, H., DWYER, C.M., FEITCHINGER, W., SCHMID, M. A new species of *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from Tobago, West Indies and its morphometric and cytogenetic characterization. **Herpetological Natural History**, 3:151-163, 1995.

KASAHARA, S., SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia- Bufonidae). **Brazil. J. Genet.**, 19:237-242, 1996.

KASAHARA, S., SILVA, A.P.Z., GRUBER, S.L., HADDAD, C.F.B. Comparative cytogenetics analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. **Cytogenet. Genome Res.**, 103:155-162, 2003.

KING, M. Amphibia. In: JOHN, B. (Ed.) **Animal Cytogenetics**. Amphibia, 4. Chordata 2. Berlin: Gebruder Borntraeger, 241p, 1990.

KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. Educ.**, 39:83-127, 1990.

LANGONE, J.A., SEGALLA, M.V. Una nueva especie de *Eleutherodactylus* del estado de Parana, Brasil. **Com. Zool. Mus. Hist. Nat.** 12:1-8, 1996.

LEÓN, P.E. Report of the chromosome numbers of some Costa Rica anurans. **Ver. Biol. Trop.**, 17:119-124, 1970.

LYNCH, J.D. The species groups of the South American frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). **Ocas. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kan.**, 61:1-24, 1976.

LYNCH, J.D. A new species of *Barycholos* from Estado Goiás, Brasil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) with remarks on related genera. **Bull. Hist. Nat.**, 1:289-302, 1980.

LYNCH, J.D., DUELLMAN, W.E. Frogs of the genus *Eleutherodactylus* in Western Ecuador: systematics, ecology, and biogeography. **Mus. Nat. Hist. Univ. Kans. Spec. Publ.**, 23:1-236, 1997.

LUCCA, E.J., JIM, J. Os cromossomos de alguns Leptodactylidae (Amphibia-Anura). **Rev. Brasil. Biol.**, 34:407-410, 1974.

LUCCA, E.J., JIM, J., FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia**, 27:183-192, 1974.

MIYAMOTO, M.M. Frogs of the *Eleutherodactylus rugulosus* group: a cladistic study of allozyme, morphological and karyological data. **Syst. Zool.**, 32:109-124, 1983.

MIYAMOTO, M.M. Central American frogs allied to *Eleutherodactylus cruentus*: allozyme and morphological data. **Journal of Herpetology**, 18:256-263, 1984.

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.

MORESCALCHI, A. Amphibia. In: CHIARELLI, A.B., CAPANNA, G. (Eds.) **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution**. London: Acad. Press, p.233-348, 1973.

MORESCALCHI, A. New developments in vertebrates cytotaxonomy. I. Cytotaxonomy of the Amphibians. **Genetica**, 50:179-193, 1979.

NASCIMENTO, L.B., CARAMASCHI, U. CRUZ, C.A.G. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro**, 63:297-320, 2005.

PADIAL, J.M., De La RIVA, I. Rediscovery, redescription, and advertisement call of *Eleutherodactylus heterodactylus* (Miranda-Ribeiro, 1937) (Anura: Leptodactylidae), and notes on other *Eleutherodactylus*. **Journal of Herpetology**, 39:372-379, 2005.

POUGH, F.H., HEISER, J.B., McFARLAND, W.N. Salamandras, Anuros e Cecílias. In: **A Vida dos Vertebrados**. 2ª ed, São Paulo, Atheneu Editora, 588p, 1999.

RABELLO, M.N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, 23:45-59, 1970.

SÁNCHEZ, A., JIMÉNEZ, R., BURGOS, M., STITOU, S., ZURITA, F., De La GUARDIA, R.D. Cytogenetics peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterocromatin blocks. **Heredity**, 75:10-16, 1995.

SAVAGE, J.M., MYERS, C.W. Frogs of the *Eleutherodactylus biporcatus* group (Leptodactylidae) of Central America and Northern South America, including rediscovered, resuscitated and new taxa. **Am. Mus. Novit.** 3357:1-48, 2002, *apud* KING, 1990.

SAVAGE, J.M., De WEESE, J.E. A new species of Leptodactylidae frog, genus *Eleutherodactylus*, from the Cordillera de Talamanca, Costa Rica. **Bull. Southern California Acad. Sci.**, 78:107-115, 1979.

SAVAGE, J.M., De WEESE, J.E. The status of the Central American leptodactylid frogs *Eleutherodactylus melanostictus* (Cope) and *Eleutherodactylus platyrhyncus* (Günther). **Proc. Biol. Soc. Wash.**, 93:928-942, *apud*, KING, 1990.

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

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87:327-44, 1982.

SCHMID, M., STEINLEIN, C., NANDA, I., EPPLEN, J.T. Chromosome banding in Amphibia. In: OLMO, E. (Ed.) **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**. Basel: Birkhauser Verlag, p.21-45, 1990.

SCHMID, M., STEINLEIN, C., KAUSCH, K., HAAF, T. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. In: GREEN, D.M., SESSIONS, S.K. (Eds.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego: Academic Press, p. 393-430, 1991.

SCHMID, M., STEINLEIN, C., FEICHTINGER, W. Chromosome banding in Amphibia XVII. First demonstration of multiple sex chromosome in amphibian: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma**, 1001:284-292, 1992.

SCHMID, M., STEINLEIN, C., FEICHTINGER, W., POOT, M. Chromosome banding in Amphibia XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet Cell Genet.**, 62:42-48, 1993.

SCHMID, M., FEICHTINGER, W., STEINLEIN, C., RUPPRECHT, A., HAAF, T., KAISER, H. Chromosome banding in Amphibia XXIII. Giant W sex chromosomes and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and

Eleutherodactylus shrevei (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Genome Res.**, 97:81-94, 2002a.

SCHMID, M., HAAF, T., STEINLEIN, C., NANDA, I., MAHONY, M. Chromosome banding in Amphibia XXV. Karyotype evolution and heterochromatin characterization in Australian *Mixophyes* (Anura, Myobatrachidae). **Cytogenet. Genome Res.**, 97:239-253, 2002b.

SCHMID, M., FEICHTINGER, W., STEINLEIN, C., HAAF, T., SCHARTL, M., VISBAL GARCÍA, R., MANZANILLA PUPO, J., FERNÁNDEZ BADILLO, A. Chromosome banding in Amphibia XXVI. Coexistence of homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Genome Res.**, 99:330-343, 2002c.

SCHMID, M., FEICHTINGER, W., STEINLEIN, C., VISBAL GARCIA, R., FERNÁNDEZ BADILLO, A. Chromosome banding in Amphibia XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Genome Res.**, 101:62-73, 2003.

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

SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B., KASAHARA, S. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. **Cytobios**, 103:25-38, 2000.

SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B., GALASSI, G.G., KASAHARA, S. Multiple 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 – The Netherlands**, no prelo, 2005.

SIQUEIRA JR, S., ANANIAS, F., RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. **Genetics and Molecular Biology**, 27:363-372, 2004.

SIQUEIRA Jr, S., AGUIAR Jr, O. SOUZA, M.B., RECCO-PIMENTEL, S.M. Variação cromossômica intra-individual em *Eleutherodactylus fenestratus* (Leptodactylidae, Eleutherodactylinae). **Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética**, 2005.

SOUZA, M.B. Diversidade de anfíbios nas unidades de conservação ambiental: Reserva Extrativista do Alto Juruá (REAJ) e Parque Nacional da Serra do Divisor (PNSD), Acre – Brasil. **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, 2003.

STRICKBERGER, M.W. **Genetics**. 2nd ed, New York: Macmillan Publishing, 914p, 1976.

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

VERMA, R.S., BABU, A. **Human Chromosomes: Principles and Techniques**. 2nd ed, New York: McGraw-Hill, p.72-133, 1995.