

MAURÍCIO PAPA DE ARRUDA

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM
ESPÉCIES DO GÊNERO LEPTODACTYLUS DE HÁBITAT
POLUÍDO E NÃO POLUÍDO
(ANURA - AMPHIBIA)



1910001357



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

MAURÍCIO PAPA DE ARRUDA
BIÓLOGO

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM
ESPÉCIES DO GÊNERO *LEPTODACTYLUS* DE HÁBITAT
POLUÍDO E NÃO POLUÍDO
(ANURA – AMPHIBIA)

ORIENTADOR: PROF^ª DR^ª ELIANA MORIELLE-VERSUTE



T. 1357/05

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas,
Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do título de mestre em
Biologia Animal

-2005-

597.8:575

A779a

04/03/2005

Doação

R\$ 27,00

Autor(a)

076/2005

71/05

Arruda, Maurício Papa.

Análise citogenética e molecular em espécies de anfíbios do gênero *Leptodactylus* de hábitat poluído e não poluído (Anura – Amphibia) / Maurício Papa de Arruda. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005
131 f. : il ; 30 cm

Orientador: Eliana Morielle Versute

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética. 2. RAPD 3. Anfíbio – Citogenética. 4. Anfíbio – RAPD. 5. *Leptodactylus*. 6. Leptodactylidae. 7. Poluição. I. Versute, Eliana Morielle. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título

CDU – 597.8:575



7 136/05

DATA DA DEFESA: 11/01/2005

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

PROF^a DR^a ELIANA MORIELLE-VERSUTE _____
ORIENTADORA - UNESP/SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

PROF^a DR^a SANAÉ KASAHARA _____
UNESP/RIO CLARO

PROF^a DR^a SHIRLEI MARIA RECCO-PIMENTEL _____
UNICAMP

SUPLENTE:

PROF^a DR^a LILIAN CASTIGLIONE _____
UNIRP

PROF^a DR^a MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO OLIVEIRA _____
UNESP/SÃO JOSÉ DO RIO PRETO



Aos meus pais, Nozor e Angela, e meus avós Amélia (in memoriam) e Gino, Lulza e Hermes (in memoriam)

Pela criação exemplar e, acima de tudo,

Pelo apoio incondicional a minha escolha de ser biólogo;

E a minha orientadora Eliana, pela oportunidade

De explorar a essência da biologia

*Se as portas parecem fechadas é porque seus
desejos são muitos. Se não tivesse nenhum
desejo, não notaria as portas fechadas.
(Autor desconhecido)*

*A adversidade desperta em nós capacidades que,
em circunstâncias favoráveis, teriam ficado
adormecidas.
(Horácio)*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Eliana Morielle-Versute, pelo seu esmero na correção desta dissertação e, principalmente, por ter acreditado no meu potencial, colaborando para o meu desenvolvimento como pesquisador.

A Profa. Dra. Denise de Cerqueira Rossa-Feres, pelas sugestões no projeto e o reconhecimento das espécies, obrigado.

A todos companheiros do Laboratório de Chiroptera: Mário, Matheus, Karina, Paula e Sandra. Obrigado pela oportunidade ímpar da convivência com vocês, nesses anos que se passaram tão rapidamente, momentos esses de aprendizado e amizade. Agradeço à Karina pela colaboração nas técnicas de FISH, e a Paula nas técnicas de RAPD, especialmente em relação ao $MgCl_2$.

A Profa. Dra. Sanae Kasahara pelo seu apoio imprescindível nas técnicas de citogenética.

A Profa. Dra. Sonia Maria Oliani e Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Confort, pela disponibilização dos microscópios.

Ao Prof. Dr. Francisco Langeani Neto pelo auxílio na análise filogenética.

A todos os funcionários do Departamento de Zoologia e Botânica, especialmente à Derci, ao Jorge e ao Sidnei.

À bibliotecária Elaine, pela correção das referências bibliográficas e a Profa. Marilene Gusson Pereira pela correção dos erros gramaticais.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação, Rosemar, Edson, Linda, Nanci, Rosana e Silvia pela atenção e rapidez nas pendências burocráticas da casa.

A todos os biólogos e amigos da primeira, segunda e terceira turmas do programa de pós-graduação em Biologia Animal.

A Prof^a. Dr^a. Maria Tercília V. de Azeredo Oliveira, pela oportunidade de estágio docência em sua disciplina.

A Prof^a. Dr^a. Lílían Castiglione e Prof^a. Dr^a. Valéria Stranghetti, da UNIRP, pelo apoio e incentivo na realização desse sonho.

A Prof^a. Dr^a. Shirlei Maria Recco-Pimentel e Prof^a. Dr^a. Sanae Kasahara, pela oportunidade de discussão do meu trabalho, aceitando participarem da minha defesa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal que contribuíram de forma efetiva na minha formação.

Aos meus pais e minhas irmãs Maricy e Milena, pela força durante estes dois anos inesquecíveis da minha vida. Obrigado pelo apoio.

ÍNDICE

Resumo.....	01
Abstract.....	03
I. Introdução.....	05
A. Evolução e classificação dos Amphibia.....	05
B. Aspectos genéticos em Amphibia.....	10
II. Objetivos.....	19
III. Material Estudado.....	20
A. Coletas.....	20
B. Espécies.....	25
IV. Resultados.....	28
V. Referências.....	29

Artigo 1. Estudo citogenético em espécies de *Leptodactylus* (Leptodactylidae, Anura) de habitat poluído e não poluído

I. Introdução.....	35
II. Material e Métodos.....	39
A. Espécimes e preparações cromossômicas.....	39
B. Técnicas de coloração e bandamento.....	41
C. Hibridação “ <i>in situ</i> ” fluorescente.....	42
D. Análise citogenética e fotodocumentação.....	45
E. Classificação cromossômica.....	46

III. Resultados.....	47
A. <i>Leptodactylus podicipinus</i>	47
B. <i>Leptodactylus ocellatus</i>	52
C. <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	58
D. <i>Leptodactylus fuscus</i>	63
IV. Discussão.....	68
A. <i>Leptodactylus podicipinus</i>	68
B. <i>Leptodactylus ocellatus</i>	72
C. <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	74
D. <i>Leptodactylus fuscus</i>	77
V. Considerações Finais.....	80
VI. Referências.....	82

Artigo 2. Análise de marcadores RAPD em espécies de *Leptodactylus*
 (Leptodactylidae, Anura) de hábitat poluído e não poluído

I. Introdução.....	88
II. Material e Métodos.....	92
A. Espécimes.....	92
B. Extração e Purificação do DNA genômico.....	92
C. Oligonucleotídeos.....	93
D. Amplificação do DNA.....	93
E. Detecção dos fragmentos.....	94
F. Análise e registro das bandas.....	94

III. Resultados.....97

 A. Padrão dos fragmentos RAPD e frequência de polimorfismos.....97

 B. Similaridade genética.....105

 C. Análise filogenética.....114

IV. Discussão.....118

V. Considerações Finais.....125

VI. Referências.....127

Resumo

Os anfíbios são vertebrados ectotérmicos e sensíveis a mudanças ambientais. Embora o número de espécies esteja diminuindo, algumas espécies estão se adaptando a alterações antrópicas, de áreas urbanas. No município de S. J. do Rio Preto-SP (Brasil), foram identificadas quatro espécies do gênero *Leptodactylus*: *L. podicipinus*, *L. ocellatus*, *L. labyrinthicus* e *L. fuscus*. A fim de se verificar como se encontram estruturadas geneticamente essas populações, em comparação com outras populações dessas espécies de ambiente natural, foram realizadas, no presente estudo, análises citogenéticas e moleculares com marcadores de RAPD. Os resultados obtidos mostraram que os cariótipos dos espécimes analisados variaram pouco quando comparados os indivíduos dos dois ambientes e as descrições da literatura. Todas as espécies apresentaram $2n=22$, e apenas três pequenas diferenças foram observadas entre indivíduos das duas populações das espécies *L. ocellatus*, *L. labyrinthicus* e *L. fuscus* (provavelmente três pequenas inversões pericêntricas nos cromossomos 4, 7 e 3, respectivamente). A localização das RONS e da heterocromatina foi similar às descrições da literatura e não variaram entre os indivíduos das duas populações. Pela primeira vez foi confirmada a localização das RONS pelo FISH, no cromossomo 8 das espécies. A análise de RAPD mostrou que as maiores freqüências de polimorfismos, assim como a maior diversidade gênica foram observadas nos indivíduos das populações de Nova Itapirema-SP (não poluída), à exceção para os indivíduos da espécie *L. podicipinus*. Três das quatro espécies das duas populações (ambiente urbano e rural) foram agrupadas em relação à distância



genética, apenas em *L. ocellatus* esse fato não foi observado, sendo que a população da espécie, proveniente de Nova Itapirema, relacionou-se mais proximamente à espécie de *L. fuscus* de Nova Itapirema. Uma maior similaridade genética foi observada entre os indivíduos das espécies *L. ocellatus* e *L. fuscus*, independente do ambiente.



Abstract

The amphibians are vertebrate ectotherms and sensible the ambient changes. Although the species number it is decline, some species are adapted the antropics alterations, of urban areas. In the city of S. J. Rio Preto-SP (Brazil), four species of the *Leptodactylus* sort had been identified: *L. podicipinus*, *L. ocellatus*, *L. labyrinthicus* and *L. fuscus*. With the objective to verify as they find structuralized genetics these populations, in comparison with other populations of these natural environment species, had been carried through, in the present study, techniques cytogenetics and molecular analyses with RAPD markers. The gotten results had shown that the karyotypes of analyzed specimens had little varied when comparated the individuals of two environments and the descriptions of literature. All the species had presented $2n=22$, and only three small differences had been observed between individuals of the two populations of species *L. ocellatus*, *L. labyrinthicus* and *L. fuscus* (probably three small pericentrics inversions in chromosomes 4, 7 and 3, respectively). The localization of the NORs and the heterochromatin was similar to the descriptions of literature and they had not varied between the individuals of the two populations. The localization of the NORs for the FISH was confirmed for the first time, in chromosome 8 of the species. The RAPD analysis showed that the biggest frequencies of polymorphisms, as well as the biggest genic diversity had been observed in the individuals of the populations of Nova Itapirema-SP (not pollution), to the exception for the individuals of species *L. podicipinus*. Three of the four species of the two populations (surrounding urban and agricultural) had been grouped in at a distance



genetic relation, only in *L. ocellatus* this fact were not observed, being that the population of the species, proceeding from Nova Itapirema, more became related the species of *L. fuscus* of Nova Itapirema. A bigger genetic similarity was observed enters the individuals of species *L. ocellatus* and *L. fuscus*, independent of the environment



I. Introdução

A. Evolução e Classificação dos Amphibia

Desde aproximadamente 350 milhões de anos, no Devoniano, época em que surgiram, alcançando o apogeu há cerca de 200 a 300 milhões de anos, os anfíbios constituem um dos grupos mais bem adaptados ao nosso planeta, apresentando características morfológicas, ecológicas e genéticas que promoveram sua dispersão por diferentes habitats.

Tradicionalmente, os anfíbios são agrupados na classe Amphibia, que é subdividida em três grandes grupos: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia. Os dois primeiros grupos representam espécies extintas, enquanto que as espécies atuais estão incluídas em Lissamphibia (Haeckel, 1866), dividida em três ordens: Anura (Salientia), Urodela (Caudata), e Apoda (Gymnophiona). A origem monofilética dos anfíbios recentes ainda não pôde ser confirmada, embora as evidências acumuladas pareçam suportar esta hipótese (Duellman & Trueb, 1994). O mais antigo fóssil de Amphibia, *Triadobatrachus*, que data do Triássico inferior, possui forma muito semelhante aos anuros atuais e o anuro mais antigo, proveniente do Jurássico inferior, *Vieraella*, exibe grande afinidade com duas famílias atuais, Ascaphidae e Discoglossidae (Pough *et al.*, 1999).

Os Amphibia (Linnaeus, 1758) são intermediários entre os peixes vertebrados e os amniotas terrestres, ocupando assim uma importante posição na escala evolutiva. O grupo exibe grande diversidade, se comparado com outros grupos de vertebrados, e

seu sucesso ultrapassa a independência da água ou a habitação da terra. Atualmente, essa classe conta com 5760 espécies descritas, distribuídas nas três ordens e, em consequência da descoberta de novas espécies, o número total de anfíbios excede o número de mamíferos (Amphibiaweb [online], Dezembro 2004).

Os representantes das três ordens viventes podem ser distinguidos por estruturas facilmente visíveis. Os Gymnophiona, conhecidos popularmente como “cobras-cegas”, são ápodos, apresentando corpo longo e cilíndrico. Os Urodela, ou “salamandras”, possuem corpo alongado, extremidades e cauda distinta. Os Anura, representando os “sapos”, “rãs” e “pererecas”, apresentam corpo mais curto, com extremidades posteriores mais longas, adaptadas para o salto, e presença de cauda apenas em sua fase larval. Em anuros, as diferenças morfológicas estão relacionadas principalmente ao seu modo de locomoção. Caracteristicamente, as rãs possuem pernas longas e movem-se por saltos, pele lisa e vivem preferencialmente na água; os sapos têm uma pele mais seca com verrugas, extremidades mais curtas e predileção por áreas mais secas, enquanto que as pererecas possuem discos digitais aumentados nas extremidades dos dedos. A atração capilar dos discos permite a aderência a superfícies lisas, o que lhes confere habilidade de locomoção em troncos de árvores e folhas, características que possibilitam o hábito de vida arborícola (Izecksohn & Potsch, 2001).

Os Anura (Rafinesque, 1815) são os mais abundantes em número de espécies, se cotejado com as outras ordens da classe Amphibia. Estima-se que exista em torno de 5000 espécies (Amphibia Web [on-line], Dezembro 2004), cosmopolitas, que ocupam praticamente todos os continentes, à exceção de altas latitudes como o Ártico



e Antártida, bem como alguns oceanos, ilhas isoladas e desertos extremamente secos, atingindo o ápice de sua diversidade nos trópicos (Zug *et al.*, 2001).

Presentemente são conhecidas 33 famílias de Anura: Allophrynidae, Arthroleptidae, Ascaphidae, Astylosternidae, Bombinatoridae, Brachycephalidae, Bufonidae, Centrolenidae, Dendrobatidae, Discoglossidae, Heleophrynidae, Hemisotidae, Hylidae, Hyperoliidae, Leiopelmatidae, Leptodactylidae, Limnodynastidae, Mantellidae, Megophryidae, Microhylidae, Myobatrachidae, Nasikabatrachidae, Pelobatidae, Pelodytidae, Petropedetidae, Pipidae, Ranidae, Rhacophoridae, Rheobatrachidae, Rhinodermatidae, Rhinophrynidae, Scaphiopodidae, e Sooglossidae (Frost, D. R [online], Dezembro 2004).

A distribuição das famílias de anuros esteve intimamente relacionada com a história da movimentação das massas terrestres durante o período Mesozóico e Cenozóico. O histórico biogeográfico em anfíbios anuros é associado principalmente com a Gondwana. Entretanto, a distribuição atual de algumas famílias indica a ocorrência de uma ruptura das espécies, já na fragmentação do grande continente Pangea, no período Jurássico (Pough *et al.*, 2001).

Conhecidos notoriamente pelos “dedos delgados” e com ampla variação em morfologia, habitats e história de vida, com exemplares de apenas 10 milímetros (*Eleutherodactylus ibéria*), até espécimes com 250 milímetros (*Telmatobius culeus*), algumas espécies exclusivamente aquáticas, enquanto outras independentes da água, espécies terrícolas semelhantes a sapos, bem como outras pequenas formas arborícolas, a família Leptodactylidae (Werner, 1896) é a mais diversificada dentre todas as famílias atuais de anfíbios anuros. Sua área de distribuição geográfica



compreende desde o sul da América do Norte até a região meridional do Chile, atravessando todo o continente sul-americano (Kwet & Di-Bernardo, 1999).

Os Leptodactilídeos são representados por 1136 espécies agrupadas em 49 gêneros, arranjados em cinco subfamílias: Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae. Dentro da subfamília Leptodactylinae, o gênero *Leptodactylus* (Fitzinger, 1826) possui 64 espécies e é considerado o gênero mais representativo da família Leptodactylidae (Frost, D. R [online], Dezembro 2004). Para Heyer (1969a), as características morfológicas que auxiliam a identificação das espécies pertencentes a esse gênero são: tímpano distinto; dedos sem membrana ou com membrana vestigial; dentes maxilares e vomerianos bem desenvolvidos; vômer sem projeção posterior e falanges terminais em forma de garra. Com base em variações nessas e em outras características comportamentais, o autor divide os Leptodactylidae em 4 grupos: *melanonotus*, *ocellatus*, *pentadactylus* e *fuscus*.

De acordo com Heyer (1969a), os grupos *melanonotus* e *ocellatus* representam os *Leptodactylus* com padrão primitivo, no qual os adultos possuem hábitos aquáticos, enquanto que, os representantes do grupo *pentadactylus*, se congregariam em corpos d'água apenas para propósitos reprodutivos e, no grupo *fuscus*, os ovos são incubados em ambiente terrestre.

Embora a reprodução dos anfíbios ocorra na água, estes vivem a maior parte de sua vida em habitat terrestre. Apesar do pouco conhecimento sobre a distribuição espacial dos habitats, ou mesmo sobre as distâncias e direções que eles se movem para alcançar os sítios de reprodução, sabe-se que eles não seguem uma orientação aleatória e também não utilizam corredores estreitos para a locomoção. Diferenças na

locomoção entre espécies parecem refletir diferenças nas preferências de habitats (Dood & Brian, 1997).

A descrição de novas espécies de anfíbios anuros tem proliferado, refletindo três fenômenos básicos: a exploração de novos habitats pelo homem; a recente aplicação de técnicas moleculares no estudo da sistemática e análises taxonômicas, sendo especialmente efetiva na comparação de espécies crípticas e, por fim, o que tem produzido variados debates entre especialistas taxonômicos, que é a diferença entre o conceito de espécie, gerando critérios discordantes (Hanken, 1999).

Atualmente, as populações de anfíbios anuros encontram-se em declínio por um conjunto de fatores que afetam suas comunidades naturais (Beebee, 1996): destruição dos habitats naturais, devido à exploração do homem; mudança climática que afeta especialmente os animais ectotérmicos terrestres (répteis e anfíbios) (Alexander & Eiseid, 2001); morte natural; destruição da camada de ozônio, que tem gerado um aumento da radiação ultravioleta (UV), o que afeta a formação dos girinos e ocasiona uma diminuição no valor adaptativo das espécies de anfíbios; poluição da água, além da introdução de predadores (Alford & Richards, 1999; Marsh, 2001). A redução das populações está correlacionada com a afinidade dos indivíduos ao habitat, e a magnitude da flutuação das populações de determinadas áreas indica a variabilidade e o risco de extinção das espécies presentes, bem como a dinâmica populacional (Williams & Hero, 1998).

No Brasil, são encontradas, aproximadamente, 600 espécies de anfíbios, sendo que 57% destas são endêmicas, qualificando-o como o segundo país em diversidade de espécies dessa classe. Contudo, o grande número de espécies descritas no Brasil entre 1978 e 1995 (115 sp.) tem reforçado a idéia de que há muitos táxons

desconhecidos, e com os recentes esforços de coleta da anurofauna, especialmente na Amazônia e no Pantanal, é provável que esse número aumente consideravelmente (Sabino & Prado, 2003). Em relação à região Noroeste do Estado de São Paulo, são relatadas espécies de quatro famílias (Hylidae, Leptodactylidae, Bufonidae e Microhylidae), com 13 espécies representantes da família Leptodactylidae (Rossa-Feres, 1997).

Diante da grande diversidade de habitats, grande número de espécies e conservação morfológica, o conhecimento de outras características que auxiliem a caracterização dos anfíbios, e assim, o reconhecimento das espécies é imprescindível.

B. Aspectos Genéticos em Amphibia

Na biologia evolutiva, a compreensão da maneira em que os genótipos e a variabilidade são mantidos dentro de populações é fundamental, assim como é de grande relevância a compreensão dos rearranjos cromossômicos que as espécies vêm sofrendo ao longo da evolução. Desde a década de 60, a citogenética vem tendo um grande impulso com a elaboração de novas técnicas, que têm propiciado a obtenção de resultados mais sofisticados e precisos sobre a evolução cromossômica e gênica.

Além da citogenética convencional, a utilização de técnicas de bandamentos cromossômicos tem sido extensamente empregada na caracterização dos cariótipos das diferentes espécies de vertebrados. Em anfíbios, as técnicas que se destacam são aquelas que identificam as regiões organizadoras de nucléolos, pela impregnação por prata (Ag-RON), e a localização de heterocromatina constitutiva (banda C). Nas décadas de 80 e 90, diversos trabalhos no exterior e no Brasil adicionaram à essas,

outras técnicas, como as que produzem bandas de replicação por incorporação de 5-bromodeoxiuridina (BrdU), o uso de fluorocromos base específicos para regiões ricas em A-T ou G-C, e, principalmente, a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), que localiza segmentos particulares do genoma. O conjunto dessas técnicas promoveu estudos mais precisos dos cariótipos de populações diferentes da mesma espécie, ou pertencentes a espécies diferentes.

Os anfíbios são modelos excelentes para o estudo do cariótipo, já que, em geral, as famílias são caracterizadas por um número diplóide reduzido, e os cromossomos são grandes e facilmente visualizados morfológicamente (posição centromérica, constrição secundária, razão dos braços). Citogeneticamente, a classe Amphibia pode ser diferenciada dos outros vertebrados pelas seguintes características: alto grau de espiralização do DNA; populações poliplóides, cromossomos sexuais indistinguíveis na maioria das espécies e grandes diferenças interespecíficas nas quantidades de DNA (Duellman & Trueb, 1994). Muitas são as espécies de animais ectotérmicos, proximamente relacionadas, que conservam o mesmo número diplóide de cromossomos e exatamente a mesma morfologia cromossômica; no entanto evidenciam diferenças consideráveis na quantidade de DNA nuclear (Beçak & Beçak, 1969; Schmid *et al.*, 1993; Macculloch *et al.*, 1996).

O número basal diplóide de cromossomos da ordem Anura é $2n = 26$, assim reconhecido, por ser encontrado em famílias de Arqueobatrâquios, considerados mais primitivos. Entretanto, algumas linhagens mais especializadas de anuros Neobatrâquios apresentam uma redução no número básico de cromossomos, peculiarmente evidente nas famílias Leptodactylidae, Hylidae, Ranidae e Bufonidae. Todavia, números diplóides maiores que o considerado basal para a ordem, são

encontrados em famílias de Neobatrâquios, e a ocorrência desses números são atribuídas a eventos de fissões cêntricas (Bogart, 1973). De forma geral os grupos primitivos de Anura apresentam cromossomos meta e submetacêntricos, pequenos cromossomos acrocêntricos e microcromossomos. Segundo Moresclachi (1973), durante o processo evolutivo, o número de cromossomos acrocêntricos e microcromossomos foi reduzido através de processos contínuos de fusão centromérica e translocações.

Os estudos citogenéticos comparativos são de grande utilidade na compreensão das relações filogenéticas entre diversos grupos de animais, esclarecendo problemas de ordem sistemática, além de auxiliar na identificação das alterações cromossômicas ocorridas ao longo da evolução. A associação entre os estudos taxonômicos e os citogenéticos evidencia que muitas espécies diferentes apresentam cariótipos similares, e que espécimes avaliados inicialmente como pertencentes a uma mesma espécie, após análise cariotípica, são reconhecidos como espécies distintas.

A classe Amphibia ainda é pouco explorada citogeneticamente. Ao levar-se em consideração a lista de espécies segundo Frost (2004), muitas das espécies jamais foram estudadas do ponto de vista citogenético, e, mesmo as espécies que tiveram seus cariótipos descritos, apresentam outros aspectos a serem abordados com a utilização de variadas técnicas.

Presentemente, vários estudos citogenéticos vêm sendo desenvolvidos em espécies brasileiras de anfíbios. A grande biodiversidade de anuros encontrados em nosso país fornece subsídios para novas propostas de estudos genéticos.



O Estado de São Paulo apresenta 35% da anurofauna brasileira, sendo que 17% das espécies são endêmicas. Apesar do alto grau de degradação ambiental, 28 espécies de anuros já foram registradas na região noroeste do Estado de São Paulo (Rossa-Feres, 1997). No entanto, muito pouco se conhece sobre a biologia, distribuição e aspectos genéticos das espécies da região, em especial da anurofauna urbana. Em áreas urbanas, o grau de interferência humana determina, em parte, a severidade na composição das comunidades.

Fatores ambientais externos como a temperatura, condições de água entre outros, são críticos para esses animais. Como animais ectotérmicos, eles dependem da temperatura do ambiente para a regulação da temperatura corporal. A disrupção dos habitats naturais, em especial pela atividade humana, altera a dinâmica dos ambientes e as variáveis microclimáticas como luz, umidade e temperatura acabam alterando a distribuição das plantas e animais. Alguns grupos de animais são mais tolerantes e negativamente afetados pelas alterações. Entre esses, pelas suas características morfofisiológicas particulares, estão os anfíbios.

Experimentalmente, a poliploidia pode ser induzida em anfíbios, sob determinadas circunstâncias físicas. Choques de temperatura e compressão hidrostática de ovos foram usados para testar essa hipótese em Anura e Urodela (Schmid *et al.*, 1985). Com base nos resultados, os autores concluíram que essa classe possui uma grande sensibilidade a fatores externos.

Diferenças cromossômicas intrapopulacionais e intra-específicas ocorrem com frequência em Amphibia, especialmente se compararmos com outros vertebrados, ressaltando o papel vital dos cromossomos no processo de especiação e evolução de anfíbios anuros (Schmid *et al.*, 1985; Victoriano *et al.*, 1995). Esse fato relaciona-se às

diferenças ambientais às quais essas populações estão expostas, que acabam por produzir modificações morfológicas, etológicas, reprodutivas e cariotípicas, podendo originar discordâncias nos estudos taxonômicos atuais.

O processo de especiação em muitos organismos pode ser explicado através de fatores seletivos como: isolamento geográfico (especiação alopátrica) e diferentes estratégias evolutivas como as alterações cromossômicas exemplificadas pelos heteromorfismos cromossômicos entre diferentes populações. A evolução cromossômica tem ocorrido paralelamente às mudanças morfológicas, todavia, mudanças silenciosas que surgem nos genomas dos organismos podem não aparecer imediatamente nas morfologias cariotípicas (Mahony & Robinson, 1980; Ruiz *et al.*, 1981; 1982). Essas modificações podem ser detectadas com a utilização de estudos moleculares.

Hitchings & Beebee (1998) compararam diversos aspectos biológicos, incluindo análises moleculares, de aloenzimas e microssatélites em espécimes de *Bufo bufo* (Bufonidae), de uma população urbana e uma população rural. Os resultados inéditos revelaram uma perda de diversidade genética nos espécimes de ambiente urbano. Os autores mencionam como principal fator dessa perda de diversidade, as barreiras urbanas que impedem o fluxo gênico entre diferentes populações. As reduções na diversidade genética, observadas nestes sapos urbanos ilustram um exemplo do efeito persistente que a fragmentação dos habitats ocasiona no genoma de indivíduos da classe Amphibia.

Como vimos, a análise dos cariótipos é uma evidência direta da variabilidade genética inter e intra-específica, e pode também ser indicativa do papel do ambiente

no genoma. Como a análise citogenética, as análises moleculares também fornecem uma estimativa direta da variabilidade gênica.

Os avanços tecnológicos recentes têm fornecido oportunidades de utilização de macromoléculas em estudos evolutivos. Entre as inovações podem ser destacados os métodos de eletroforese para o estudo de proteínas, DNA e RNA e a técnica de PCR. A utilização conjunta dos métodos é imprescindível na detecção de polimorfismos genéticos e de marcadores moleculares.

O desenvolvimento do processo de amplificação de DNA, utilizando uma DNA polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”), permitiu a descrição de diversas classes de marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares baseados em DNA permitem ampla cobertura genômica e tornam-se assim ferramentas poderosas para o estudo de genética de populações. Entre as técnicas para a detecção de marcadores moleculares que utilizam o princípio do PCR, podem ser destacadas as técnicas de RFLP, RAPD e microssatélites.

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utiliza um *primer* único de sequência arbitrária e, portanto, sua sequência alvo é desconhecida. Essa técnica foi desenvolvida por Williams *et al.* (1990), e cada *primer* dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando assim em várias bandas no gel. O polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. Em função das características dos fragmentos que são amplificados, pode-se assumir, por exemplo, que fragmentos de RAPD que migram para a mesma posição no gel, possuindo o mesmo tamanho em pares de bases,

sejam homólogos, correspondam ao mesmo loco e, portanto, são derivados de um ancestral comum. Em animais, marcadores RAPD têm sido utilizados em estudos populacionais e de filogenia em diversos grupos de vertebrados, incluindo a classe Amphibia (Rodrigues *et al.*, 1998).

Apesar de serem ainda poucos os trabalhos sobre evolução molecular em anfíbios, especialmente no que se refere à técnica de RAPD-PCR, Rodrigues *et al.* (2002), comparando 20 espécies de anuros do cerrado, com espécies representantes de três famílias (Bufonidae, Leptodactylidae e Hylidae), calcularam similaridade genética dos espécimes. Os resultados apontaram para divergências acentuadas nos marcadores de RAPD, provavelmente ocorridas devido ao grande tempo de divergência entre as famílias estudadas, e que implicou na perda de fragmentos comuns de RAPD. De acordo com os dados paleontológicos, duas dessas famílias divergiram a aproximadamente 50 milhões de anos (Hedges & Maxson, 1993; Hay *et al.* 1995).

Os cariótipos das espécies são diretamente afetados pelas condições ambientais, em especial aquelas que podem, de alguma forma, atuar diretamente sobre o genoma. As espécies de anuros, localizadas em regiões onde a poluição é grande, são extremamente raras e possuem abundância muito baixa. A distribuição da abundância das populações de anuros de regiões com degradação ambiental, comparada com regiões intocadas pelo homem, ou mesmo parcialmente degradadas, reflete uma redução nas comunidades afetadas pela exploração, portanto, servem como um bom indicador de qualidade ambiental (Zampella & Bunnell, 2000).

A cidade de São José do Rio Preto (Estado de São Paulo) é cortada pelo Rio Preto, que possui diversos afluentes: Córrego Canela, Borá, Piedade, Piedadinha, São

Pedro, Felicidade e Anta. A poluição é total nos afluentes desse rio, causada por deposição direta de esgoto, resíduos industriais, águas pluviais que levam detritos domésticos, industriais e agrícolas, há décadas. Existem também ligações clandestinas de esgotos, muitos estabelecimentos comerciais e de serviços que lançam poluentes na rede de esgoto (Costa, 2002).

A radiação ionizante induzida pode produzir mutações genéticas e cromossômicas. Todavia, o efeito da radiação natural no sistema biológico não é bem esclarecido. Com base nessa premissa, Feitosa *et al.* (1995), analisando espécies de hilídeos do Morro do Ferro (MG), encontraram quantidades significantes de alterações cromossômicas como quebras, deleções, condensações, descondensações e fragmentos acêntricos, o que fez propor que o alto nível de radiação gama, devido à presença de tório e traços de urânio no solo e rochas que ocorrem naquela região, possam ser os possíveis agentes de fatores mutacionais. Segundo Zampella & Bunnell (2000), águas com pH baixo reduzem a taxa de sobrevivência dos embriões e larvas. Os anfíbios, por possuírem grande permeabilidade da pele por água e gases, são altamente susceptíveis à entrada de substâncias tóxicas que podem ser encontradas em ambientes inóspitos. Com exceção do controle de sódio que é transportado ativamente da superfície externa para a superfície interna e a retenção da uréia pela pele, os Amphibia são demasiadamente vulneráveis a mudanças que ocorrem no meio ambiente.

Junto à Avenida José Munia, que corta a cidade de São José do Rio Preto no sentido centro-sul, está o córrego Canela, onde foram registradas quatro espécies da família Leptodactylidae: *Leptodactylus podicipinus*; *Leptodactylus ocellatus*; *Leptodactylus labyrinthicus* e *Leptodactylus fuscus*.



Duas dessas espécies têm um potencial considerável para serem exploradas comercialmente. *L. ocellatus* (rã-manteiga) e *L. labyrinthicus* (rã-pimenta), que são espécies de grande porte e, por isso, intensamente caçadas pelos apreciadores de carne de anfíbios (Agostinho, 1994). Essas espécies raramente são criadas em ranários comerciais, devido à escassez de informações biológicas e genéticas (Lima, 1979).

Até o presente momento, poucos trabalhos descrevem padrões citogenéticos e análises moleculares na anurofauna urbana. Mesmo os dados sobre ecologia de anfíbios urbanos são extremamente escassos. Com base nos resultados de estudos sobre modificações pontuais em populações de anfíbios anuros em diferentes localidades e as causas dessas modificações, supõe-se que provavelmente possam ocorrer diferenças entre os anfíbios localizados no perímetro urbano, associados à poluição, em comparação com os encontrados em habitats naturais, sem perturbações antrópicas. Assim como a poluição está cooperando para o declínio da anurofauna, ela pode também contribuir com os eventos mutacionais indutivos, em especial quando associada a outros fatores como o aumento da radiação ultravioleta (Middleton *et al.*, 2001) e perda de habitats naturais devido à interferência do homem.

Na tentativa de se analisar aspectos da variabilidade genética de espécies de anfíbios que ocorrem em habitats naturais, e habitats com grande ação antrópica, e correlacioná-los, propôs-se o presente trabalho.



II. Objetivos

Pelo exposto na Introdução, a presente proposta teve como principal objetivo, a comparação citogenética e molecular entre espécimes de anfíbios anuros presentes em ambiente urbano de São José do Rio Preto-SP, com alto índice de degradação ambiental, considerado poluído, e espécimes de anuros presentes em áreas rurais não poluídas, do distrito de Nova Itapirema (Nova Aliança-SP). A fim de alcançá-los procuramos:

- 1 - Analisar os cariótipos de espécimes pertencentes a quatro espécies coletadas em área urbana poluída e áreas rurais não poluídas: *Leptodactylus ocellatus*, *Leptodactylus podicipinus*, *Leptodactylus labyrinthicus* e *Leptodactylus fuscus* (Leptodactylidae).
- 2 - Identificar a localização da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras nucleolares, através do bandamento C, coloração Ag-NOR e hibridação *in situ* fluorescente (FISH), dos indivíduos das espécies nos diferentes ambientes.
- 3 - Delimitar o perfil dos marcadores moleculares de RAPD em espécimes provenientes dos habitats poluídos e não poluídos.
- 4 - Confrontar os perfis intra e interespecíficos das espécies de ambos ambientes, a fim de detectar e avaliar os polimorfismos observados, relacionando-os com a variabilidade genética das espécies e o ambiente.



III. Material Estudado

A. Coletas

Para a captura dos anuros, seguiu-se o método proposto por Scott Jr & Woodward (1994), de levantamento em sítios reprodutivos, ou "*survey at breeding sites*", nos quais os animais são coletados pela vocalização dos machos e encontro visual.

As coletas ocorreram em ambientes previamente selecionados na região Noroeste Paulista (Figura 1), em área urbana de S. J. do Rio Preto, considerada poluída (Córrego Canela), localizada na Avenida José Munia (Ambiente 1 – Figura 2), e áreas consideradas não poluídas do distrito de Nova Itapirema-SP (Nova Aliança-SP) (Ambiente 2 – Figura 3 e Ambiente 3 – Figura 4), localizadas em dois sítios: Sítio Santo Antônio e Sítio Colorado.

Até o processamento para os estudos, os animais capturados foram mantidos em terrários no Biotério (UNESP/IBILCE) do Departamento de Zoologia e Botânica. Os exemplares foram devidamente identificados pela Prof^a. Dr^a. Denise de C. Rossa-Feres.





FIGURA 2: Aspecto geral da área de coleta urbana, localizada no córrego Canela, ($20^{\circ}50'28''$ S $49^{\circ}23'28''$ W), caracterizado pela presença de água permanente, margens planas e em barranco ocupada majoritariamente por gramíneas (Poaceae). Note as ligações com a rede de esgoto.



FIGURA 3: Aspecto geral da área de coleta rural no Sítio Santo Antonio (21°04'40" S, 49°32'23" W), representada por corpo d'água permanente de médio porte, com 30% da margem formado por barranco inclinado, ocupado por vegetação de grande porte como taboa (*Thypha angustifolia*, Typhaceae), e algumas dicotiledôneas arbustivas (Melastomataceae e outras dicotiledôneas) no interior e nas margens do corpo d'água, além de Cyperaceae e Poaceae, que recobrem a área marginal. A vegetação da área onde se encontra o açude é constituída por área de pastagem.



FOTO: ARRUDA, M. P.

FIGURA 4: Aspecto geral da área de coleta rural no Sítio Colorado ($21^{\circ}04'52''$ S, $49^{\circ}31'09''$ W), representada por curva de nível com formato retangular e de médio porte, sendo metade de seu perímetro constituído de margem plana e o restante de barranco. No interior do corpo d'água a vegetação é composta por Cyperaceae esparsas.

B. Espécies

Foram coletados, em ambos os ambientes, 59 espécimes pertencentes a quatro espécies de leptodactilídeos e representantes dos quatro grupos reconhecidos por Heyer (1969b) para o gênero *Leptodactylus*: *Leptodactylus podicipinus* (grupo *melanonotus*), *Leptodactylus ocellatus* (grupo *ocellatus*), *Leptodactylus labyrinthicus* (grupo *pentadactylus*) e *Leptodactylus fuscus* (grupo *fuscus*) (Figura 5). Os exemplares analisados de cada espécie estão discriminados pela espécie, sexo, nº de registro (CA), natureza do estudo e procedência na Tabela 1.

TABELA 1: Discriminação dos exemplares analisados pela espécie, sexo, número de registro (CA) e procedência: 1 = Córrego Canela – S. J. do Rio Preto, ambiente poluído; 2 = Sítio Santo Antônio – Nova Itapirema, ambiente não poluído; 3 = Sítio Colorado – Nova Itapirema, ambiente não poluído.

Táxon	Nº Sexo	Número de Registro (CA)	Procedência
<i>L. podicipinus</i>	5♂/3♀	69, 70, 76, 77, 80, 81, 89, 93	1
	7♂	125, 126, 128, 129, 130, 131, 171	2
<i>L. ocellatus</i>	7♂/1♀	68, 87, 107, 108, 110, 118, 149, 150	1
	6♀	169, 175, 189, 190, 191, 192	2
<i>L. labyrinthicus</i>	1♂/6♀	50, 56, 66, 67, 85, 101, 104	1
	5♂/2♀	109, 112, 143, 144, 167, 168, 185	3
<i>L. fuscus</i>	7♂	100, 105, 156, 158, 164, 165, 166	1
	6♂/2♀	92, 98, 135, 145, 172, 173, 183, 184	3

A



B



C



D



FIGURA 4: Espécies de Leptodactylidae analisadas neste trabalho. A. *Leptodactylus podicipinus*; B. *Leptodactylus ocellatus*; C. *Leptodactylus labyrinthicus*; D. *Leptodactylus fuscus*. Todos exemplares provenientes da Avenida José Munia (S. J. do Rio Preto).

Todas as preparações citológicas, bem como os estudos moleculares, foram desenvolvidos no Laboratório de Chiroptera do Departamento de Zoologia e Botânica do IBILCE/UNESP. Uma vez extraídos os tecidos para análises citogenéticas e moleculares, todos os exemplares foram colocados em uma placa de cera e submersos em formol 70%, onde ficaram por um período de 12 a 36 horas, dependendo do porte do espécime. Posteriormente, o animal foi armazenado em frasco com álcool 70%, devidamente etiquetado e depositado na coleção de anfíbios do Departamento de Zoologia e Botânica (DZSJRP), UNESP/IBILCE.



IV.Resultados

Os resultados obtidos na presente pesquisa foram organizados em dois artigos assim apresentados:

Artigo 1: Estudo citogenético em espécies de Leptodactylidae de hábitat poluído e não poluído

Artigo 2: Análise de marcadores RAPD em espécies de Leptodactylidae de hábitat poluído e não poluído



V. Referências

- AGOSTINHO, C. A. **Caracterização de populações de rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* (SPIX, 1824) e avaliação de seu desempenho em cativeiro.** 141f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1994.
- ALEXANDER, M. A.; EISCHEID, J. K. Climate variability in regions of amphibian declines. **Conservation Biology**, v.15, n.4, p. 930-942, 2001.
- ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. **Annual Review Ecology and Systematics**, v.30, p. 133-165, 1999.
- AMPHIBIAWEB: **Information on amphibian biology and conservation.** [web application]. Acesso em: 23 dez. 2004. Disponível em <http://amphibiaweb.org/>.
- BEEBEE, T. J. C. **Ecology and conservation of amphibians.** London: Cahpman & Hall, 1996. 214p.
- BEÇAK, W.; BEÇAK, M. L. Cytotaxomy and chromosomal evolution in Serpentes. **Cytogenetics.**, v. 8, p. 247-262, 1969
- BEEBEE, T. J. C. **Ecology and conservation of amphibians.** London: Cahpman & Hall, 1996. 214p.
- BOGART, J. P. Evolution of anuram karyotypes. In: VIAL, J. L. (Ed.) **Evolutionary biology of the anurans.** Columbia: University of Missouri Press, p. 338-349, 1973.
- DOOD, C. K. Jr.; BRIAN, S. Movement patterns and the conservation of amphibians breeding in small, Temporary Watlands. **Conservation Biology**, Gainesville., v.12, n.2, p. 331-339, 1997.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians.** Baltimore: Johns Hopking University Press, 1994. 669p.

FEITOSA, V. L. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. Structural chromosomal alterations in *Hyla albopunctata* and *Aplastodiscus perviridis* (Anura, Hylidae) from the Morro do Ferro region of Minas Gerais. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, n.2, p. 191-197, 1995.

FROST, D. R. **Amphibian species of the world**. Laurence: Allen Press, 1985, 732 p.

FROST, D. R. 2004. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 3.0 (22 August, 2004). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

HAY, J. M.; RUVINSKY, H.; HEDGES, S. B.; MAXSON, L. R. Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, n.5, p. 928-937, 1995.

HANKEN, J. Why are there so many new amphibians species when amphibians are declining?. **Ecology and Evolution**, v.14, n.1, p. 7-8, 1999.

HEDGES, S. B.; MAXSON, L. R. A molecular perspective on lissamphibian phylogeny. **Herpetological Monographs**, v. 7, p. 42-45, 1993.

HEYER, W. R. Studies on the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae) III. A redefinition of the genus *Leptodactylus* and a description of a new genus of leptodactylid frogs. **Contributions in Science**, v.155, p. 1-14, 1969a.

HEYER, W. R. The adaptative ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v. 24, p. 421-428, 1969b.

HITCHINGS, S. P.; BEEBEE, T. J. C. Loss of genetic diversity and fitness in Common Toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 11, p. 269-283, 1998.

IZECKSOHN, E.; POTSCH, S. C. **Anfíbios do município do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Ed. Da UFRJ, 2001. 148p.

KWET, A.; Di-BERNARDO, M. **Pró-mata-anfíbios**. Porto Alegre: EDIPUC. 1999. 107p.

LIMA, S. L. **Crescimento, relações biométricas, reprodução e dinâmica populacional de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (AMPHIBIA, ANURA, Leptodactylidae) em Viçosa (MG) e Curitiba (PR), Brasil**. 112f. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1979.

MAcCULLOCH, R. D.; UPTON, D. E.; MURPHY, R. W. Trends in nuclear DNA content among amphibians and reptiles. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113, n.3, p. 601-605, 1996.

MAHONY, M. J.; ROBINSONS, E. S. Nucleolar organizer region (NOR) location in karyotypes of Australian ground frogs (family Myobatrachidae). **Genetica**, v.86, p. 119-127, 1986.

MARSH, D. M. Fluctuations in amphibian populations: a meta-analysis. **Biological Conservation**, v.101, p. 327-335, 2001.

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

MIDDLETON, E. M.; HERMAN, J. R.; CELARIER, E. A.; WILKINSON, J. W.; CAREY, C.; RUSIN, R. J. Evaluating ultraviolet radiation exposure with satellite data at sites of amphibian declines in Central and South America. **Conservation Biology**, v. 15, p. 914-928, 2001.

MORESCALCHI, A. Amphibia. In: CHIARELLI, A. B.; CAPANNA, E. (Ed.). **Cytotaxonomy and vertebrate evolution**. London: Academic Press, 1973. p. 233-248.



POUGH, F.; HEISER, J. B.; McFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 798 p.

POUG, F. H. ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M. L.; SAVITZKY, A. H.; WELLS, K. D. **Herpetology**. 2. Ed. Nre Jersey: Prentice Hall, 2001. 612f.

RODRIGUES, F. M. *et al.* Uso de marcadores RAPD no estudo da filogenia de anuros do cerrado. **Genetics Molecular Biology**, v.21, p. 86, 1998. Suplemento

RODRIGUES, F. M.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; BATAUS, L. A. M. Hypothesis testing of genetic similarity base on RAPD data using Mantel testes and model matrices. **Genetics and Molecular Biology**., v. 25, n.4, p. 435-439, 2002.

ROSSA-FERES, D. C. **Ecologia de uma comunidade de anfíbios anuros da região Noroeste do Estado de São Paulo: microhabitat, sazonalidade, dieta e nicho multidimensional**. 178f. Tese (Doutorado em Ecologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

RUIZ, I. R.; SOMA, M.; BEČAK, W. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). **Cytogenetic Cell Genetic**, v.29, p. 84-98, 1981.

RUIZ, I. R.; CEIS, J. M.; BEČAK, W. Chromosomal evolution in allopatric populations of the *Odontophrynus occidentalis* group (Amphibia, Anura) from western Argentina. **Cytogenetic Cell Genetic**, v.33, p. 303-311, 1982.

SABINO, J.; PRADO, I. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil: vertebrados**. Brasília: Ministério do meio ambiente. 2003. 131f.

SCHMID, M.; HAAF, T.; SCHEMPP, W. Chromosome banding in Amphibia. IX. The polyploidy karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma**, v. 91, p. 172-184, 1985.



SCHMID, M.; HAAF, T.; SCHEMPP, W. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenetic Cell Genetic**, v. 62, p. 42-48, 1993.

SCOTT, N. J. Jr.; WOODWAR, B. D. Surveys at breeding sites. In: HEYER, W. R. *et al.* **Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians**. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 118-124, 1994.

SPECIES link [web application]. Acesso em: 23 dez. 2004. Disponível em <<http://splink.cria.org.br/>>.

VICTORIANO, P.; ORTIZ, J. C.; TRONCOSO, L.; GALLEGUILLOS, R. Allozyme variation in population of *Pleurodeme thaul* (LESSON, 1826) (Anura: Leptodactylidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.12B, n.3, p. 487-492, 1995.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, S. E.; HERO J. M. Rainforest frogs of the Australian wet tropics: guild classification and the ecological similarity of declining species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences.**, v.265, p. 597-602, 1998.

ZAMPELLA, R. A.; BUNNELL, J. F. The distribution of anurans in two river system of a Coastal Plain watershed. **Journal of Herpetology.**, v.34, n.2, p. 210-221, 2000.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALWELL, J. P. **Herpetology** : an introductory biology of amphibians and reptiles. San Diego: Academic Press, 2001. 527f.



Artigo 1

Estudo citogenético em espécies de *Leptodactylus* (Leptodactylidae, Anura) de hábitat poluído e não poluído

I. Introdução

Os estudos citogenéticos em Leptodactylidae têm apontado que entre as variações cromossômicas mais freqüentemente observadas, estão a variação na heterocromatina constitutiva, o número e a localização das RONS, poliploidias e, mais recentemente observada, a presença de cromossomos supranumerários (Ruiz *et al.*, 1981; Rosa *et al.*, 2003).

Dentro da família Leptodactylidae, o gênero *Leptodactylus* é o que apresenta o maior número de trabalhos citogenéticos publicados, com resultados para 27 espécies, o que representa cerca de 30% do grupo (King, 1990a; Kuramoto, 1990). O primeiro trabalho referido sobre citogenética do gênero *Leptodactylus* foi reportado por Barbieri (1950), que descreveu um número diplóide $2n = 22$ para *L. ocellatus*, *L. chaquensis*, *L. bufonius* e *L. prognathus* (= *L. latinasus*), com base na análise de preparações obtidas por técnica de esmagamento, metodologia utilizada na citogenética vegetal. Posteriormente, outros trabalhos vieram confirmar o número de cromossomos destas espécies, com técnicas mais robustas (SILVA *et al.* 2000; BALDO, 2002).

Bogart (1974) descreveu e comparou os cromossomos de 16 espécies do gênero *Leptodactylus* e três do gênero *Adenomera*, os dois representantes da família Leptodactylidae. Seus resultados demonstraram que todas as espécies analisadas de *Leptodactylus* possuíam $2n=22$, enquanto que os exemplares do gênero *Adenomera*



exibiram cariótipos com 24 cromossomos. Baseado nas similaridades cromossômicas e história de vida de vários gêneros de Leptodactylidae, o autor propôs uma hipótese evolutiva alternativa, contrária da proposta de Heyer (1969) e Lynch (1971), pressupondo que a direção etológica evolutiva do gênero *Leptodactylus* seria a de hábitos terrestres para aquáticos.

Heyer e Diment (1974) descreveram e compararam os cariótipos de *Vanzolinius discodactylus* e de nove espécies do gênero *Leptodactylus*. Os resultados diferiram consideravelmente dos apresentados por Bogart (1974) quanto à classificação dos cromossomos. As diferenças notadas foram atribuídas pelos autores a três causas: diferenças nas técnicas empregadas, interpretações diferentes da morfologia dos cromossomos e as variações geográficas.

Mais recentemente, Kasahara *et al.* (1998), trabalhando com as espécies *Leptodactylus labyrinthicus*, *L. ocellatus* e *Bufo paracnemis* entre outras, alcançaram sucesso na incorporação de BrdU aos cromossomos, com produção e visualização de bandas de replicação. Os resultados deste trabalho abriram a perspectiva de se conseguir informações adicionais sobre a evolução cromossômica em anfíbios, em especial dos leptodactilídeos.

Silva *et al.* (2000) caracterizaram citogeneticamente cinco espécies do gênero *Leptodactylus*, através de técnicas de coloração convencional e diferencial. Este estudo detectou diferenças cromossômicas importantes entre diversas populações de *L. ocellatus* e *L. fuscus*, ressaltando a importância do bandamento C, como ferramenta para o estudo de diferentes populações.

Embora a classe Amphibia e, particularmente, a ordem Anura, ofereça condições ideais para a análise da evolução dos mecanismos de determinação sexual,

bem como da estrutura dos cromossomos sexuais, há muito pouca informação sobre os cromossomos sexuais em leptodactídeos.

Basicamente os estudos têm mostrado que os representantes desse gênero possuem uma constituição cariotípica de $2n=22$, com números fundamentais variando entre 36, 38, 40 e 44 (Barale *et al.* 1990; Kasahara *et al.* 1998; Silva *et al.* 2000; Baldo, 2003; Cuevas & Formas, 2003; Siqueira *et al.* 2004). Constrições secundárias são evidentes em diversas posições do par 8, salvo algumas espécies em que são referidas constrições no par 11 e 10 (Bogart, 1974; Agostinho, 1994). As RONS, em geral, estão localizadas em região coincidente com as constrições secundárias (Barale *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2000), e os padrões de bandamento C, conhecidos para poucas espécies, mostram importante variação inter e intra-específica (Barale *et al.*, 1990).

A maioria dos experimentos de FISH já determinaram a correspondência entre as RONS detectadas pela prata e as seqüências de DNAr (King *et al.*, 1990b). Além disso, a utilização de hibridação *in situ* permitiu também a detecção de sítios cromossômicos adicionais que não apareceram corados pela prata (Wiley *et al.* 1989; Medeiros *et al.* 2003).

Tanto a família Leptodactylidae como o gênero *Leptodactylus*, apresentam um número grande de representantes, sendo que grande parte dessas espécies foi descrita do ponto de vista taxonômico, com base na morfologia e comportamento. Apesar dos poucos estudos citogenéticos realizados, é possível evidenciar o grande potencial dessas análises no reconhecimento de novas espécies, assim como, na detecção das variações intra-específicas populacionais, que muitas vezes, ocorrem devido a variantes externas, em que as populações estão localizadas. A utilização da

citogenética, tanto convencional, diferencial ou molecular, é extremamente relevante no estudo da biologia dos leptodactilídeos.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar citogeneticamente, através de técnicas de coloração convencional, bandamento C, coloração Ag-NOR e hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr, espécimes de leptodactilídeos que ocorrem em ambientes considerados poluídos e ambientes não poluídos, a fim de verificar a influência do ambiente nos cariótipos.



II. Material e Métodos

A. Espécimes e Preparações Cromossômicas

No presente estudo, foram analisadas preparações cromossômicas de dois representantes das espécies *Leptodactylus podicipinus*, *Leptodactylus ocellatus*, *Leptodactylus labyrinthicus* e *Leptodactylus fuscus*, coletados em área urbana de São José do Rio Preto, SP, considerada poluída, e área rural, considerada não poluída, no Distrito de Nova Itapirema, SP.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de medula óssea e fígado.

Em todos os animais, aplicou-se uma injeção intraperitoneal de colchicina 0,1% Merck (0,1 mL/10g peso corporal). Animais, com peso superior a 30 g, foram inicialmente tratados com fitohemaglutinina Cultilab (0,1 mL/10g peso corporal), injetada intraperitonealmente nas 48 horas iniciais ao tratamento com colchicina, para induzir a ocorrência de mitoses. Após 12 horas da injeção de colchicina, os animais foram mortos com clorofórmio e, com auxílio de bisturi e tesoura, a musculatura dos ossos longos das extremidades posteriores foi retirada, os ossos removidos e as epífises cortadas para expor a medula, que foi recolhida em tubos de centrifuga, através de lavagens com solução hipotônica KCl 0,075M, com auxílio de uma seringa. Após sucessivas aspirações para desfazer as massas celulares, a suspensão foi incubada a 37°C por 50 minutos para hipotonização das células.



O fígado, retirado logo após a medula, foi colocado em placa de Petri com solução hipotônica KCl 0,075 M, desagregado com o auxílio de uma seringa e a suspensão transferida para um tubo de centrifuga que foi incubado a 37°C por 50'.

Decorrido o tempo de hipotonização, as suspensões celulares de medula óssea e fígado foram fixadas. Inicialmente foi feito o processo de pré-fixação, onde foram adicionadas 6 gotas de fixador Carnoy (3 partes de álcool metílico/1 parte de ácido acético glacial) gelado. Após 5 minutos, adicionou-se mais 6 gotas, e aguardou-se o tempo de mais 5 minutos. A suspensão foi centrifugada a 900 rpm, durante 10 minutos. Logo o sobrenadante foi descartado, o material ressuspendido com uma pipeta Pasteur e um novo fixador foi acrescentado cuidadosamente. A suspensão foi pipetada repetidas vezes para a obtenção de boa limpeza e fixação das células. Realizou-se então, mais duas lavagens com fixador, até a obtenção de uma solução de coloração esbranquiçada. Por fim, o sobrenadante foi descartado e acrescentado fixador em quantidade suficiente para o preparo das lâminas.

Com o emprego de uma pipeta Pasteur, pingou-se duas a três gotas de suspensão em uma lâmina limpa e seca, mantida horizontalmente, sobre um suporte de arame em banho-maria a 60° C, recolhendo-se a lâmina em seguida.

As lâminas obtidas foram submetidas a processos de colorações, bandamentos e hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr.



B. Técnicas de Coloração e Bandamento Cromossômico

1. Coloração (Convencional) com Giemsa

Lâminas com material celular foram incubadas em solução de HCl 1N a 60°C durante cinco minutos, lavadas em água e, em seguida, coradas com solução de Giemsa 5% em água, por sete minutos. As lâminas foram lavadas abundantemente em água destilada, e secas à temperatura ambiente. Esta coloração foi aplicada para a identificação e caracterização morfológica dos cromossomos.

2. Bandamento C

Para o bandamento C, foi seguido o protocolo proposto por Sumner (1972), com modificações. Lâminas, após sete dias de fixação, foram submetidas à hidrólise em HCl 0,2N, por cerca de 15 a 20 minutos. Em seguida, foram incubadas em solução de Hidróxido de Bário $[Ba(OH)_2]$ 5% durante um período variável de 1 a 2 minutos, a 60°C. Após uma lavagem rápida em HCl 0,2 N e enxágüe em água corrente, as lâminas foram imediatamente incubadas em solução salina de citrato (2XSSC) a 60°C por uma hora. Decorrido este tempo, as lâminas foram secas e logo expostas à solução de Giemsa 7% por 15 minutos.



3. Coloração Ag-NOR

Para a coloração das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), foi utilizado o protocolo por Howell & Black (1980). As lâminas com as preparações foram incubadas em solução de HCl 1N, a 60°C, por um período de 3 minutos, e lavadas em água corrente. Em seguida, foram adicionadas duas gotas de solução reveladora de gelatina formolizada a 1%, e duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% (AgNO_3) em cada lâmina. Ambas foram gotejadas nas extremidades da lâmina. Sobre as gotas misturadas, acomodou-se uma lamínula e a lâmina foi submetida a uma temperatura de 50-60°C, por cerca de sete minutos, até que a mistura das soluções apresentasse coloração castanho-dourada. A seguir, a lamínula foi removida, a lâmina lavada em água destilada, seca, e exposta à solução Giemsa 2% por cinco minutos, lavada novamente e seca à temperatura ambiente.

C. Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com sonda DNAr

No procedimento de hibridação *in situ* fluorescente, foi utilizada sonda de DNA ribossômico (DNAr), do anfíbio *Xenopus laevis*, para a identificação molecular das seqüências de DNA ribossomal. Essas sondas foram previamente preparadas (transformação e clonagem) e cedidas pela Prof^a. Dr^a. Shirlei M. Recco-Pimentel (Unicamp). No laboratório de Chiroptera (Unesp/Ibilce), as culturas de bactérias foram mantidas até a utilização da sonda. O protocolo utilizado para o preparo da sonda e hibridação é descrito a seguir:

As lâminas selecionadas foram desidratadas em uma série de álcoois 70%,

80% e 95% durante 2 minutos cada, à temperatura ambiente. Após secas, as lâminas foram transferidas para uma solução de ácido acético glacial 70%, onde permaneceram por um minuto e, imediatamente, enxaguadas em dois banhos de PBS (1x) 4 minutos cada. Após nova desidratação em série de álcoois, as lâminas foram limpas em solução de RNase (1 µl da solução mãe (10mg/ml) para 99 µl de 2xSSC) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Em seguida, foram lavadas em 3 banhos de 2xSSC pH 7,0 por 5 minutos cada, novamente desidratadas e passadas em solução de pepsina (50 ml água, 42 µl de HCl 12N e 50 µl de pepsina solução estoque a 8%). Seguiu-se a desnaturação em solução de formamida 70% pH 7,0 a 70°C por 2,5 minutos, interrompida pela lavagem das lâminas em uma série de álcoois gelados.

1. Preparação da Sonda

Após a transformação (plasmídeo + seqüência DNAr de *Xenopus laevis*) realizada na UNICAMP, algumas colônias foram selecionadas e colocadas para crescimento em meio LB líquido "overnight", à 37°C. Posteriormente foi feita a extração plasmidial com o emprego do S.N.A.P. Mini prep Kit da Invitrogen (nº Cat. K1900-01).

A seqüência isolada foi marcada com biotina, através do emprego do Kit de marcação BioNick labelling system (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante. Após a marcação, foram associados à seqüência, Cot-1 DNA humano e DNA de esperma de salmão. A cada 1 µg de DNA marcado foram adicionados 3 µg de DNA de esperma de salmão, e 10 µg de Cot-1 DNA humano. Em seguida, o DNA foi purificado com 1/10 volumes de acetato de sódio 3M e 3 volumes de etanol absoluto gelado. O material foi congelado a -70°C por 1 hora, após o que foi centrifugado por 30 minutos a 12.000

rpm, o sobrenadante descartado e o precipitado de DNA foi seco a 37°C e dissolvido em mistura de hibridação (50% formamida, 10% w/v dextran sulfato, 1% v/v tween 20 em 2xSSC). Posteriormente a sonda foi incubada a 37°C por 5 minutos e, após uma rápida centrifugação (2 segundos), ela foi congelada a -20°C até o momento do uso.

2. Hibridação e Detecção

Antes de sua aplicação sobre as lâminas, a sonda foi desnaturada em banho a 75°C por 10 minutos, transferida para o gelo por 5 minutos e centrifugada por 5 segundos. Em seguida, foi colocada em banho a 37°C por 30 – 45 minutos para o pré-anelamento das seqüências repetitivas, novamente incubada em gelo por 5 minutos, centrifugada por 5 segundos e mantida no gelo até o uso. As hibridações foram realizadas nos cromossomos após cerca de 14 dias da preparação das lâminas. Para uma área de 26 x 72 mm foram aplicados sobre a lâmina 14 µl de sonda (cerca de 150 ng de sonda), sobre a qual foi colocada uma lamínula. A lâmina foi acondicionada em câmara umedecida com formamida e conduzida à estufa a 37°C por 48 horas.

Após a hibridação, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de formamida 50% em 2xSSC a 45°C por 6 minutos cada, e em 1 banho de 2xSSC a 45°C por 10 minutos. Logo após, foram colocadas em solução bloqueadora I (5% w/v leite em pó desnatado em washing buffer I) à TA por 20 minutos, e enxaguadas em washing buffer I (4xSSC e 0,05% v/v tween 20) à TA por 5 minutos. Após o bloqueio, as lâminas hibridadas foram incubadas em FITC-avidina (Vector), diluído em bloqueador I na concentração 2 µl : 1000 µl a 37°C, por 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em washing buffer I e washing buffer II (tampão TNE e



0,05% v/v tween 20). Posteriormente, seguiu-se a adição do segundo anticorpo anti-avidina (Vector) em bloqueador II (5% w/v de leite em pó desnatado em washing buffer II) na concentração 2 μ l: 200 μ l, e incubação a 37°C, por 20 minutos. As lâminas foram lavadas em 3 banhos de washing buffer II a 37°C, 5 minutos cada e incubadas novamente em FITC-avidina (Vector) em bloqueador II (2 μ l/1000 μ l) a 37°C, por 20 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas em 3 banhos de washing buffer II a 37°C, 5 minutos cada, seguido de um banho de PBS (1x) à temperatura ambiente, desidratadas na série de álcoois, secas e coradas com iodeto do propídeo (IP) 0,3 μ g/ml e diamidino-fenilindole 0,5 μ g/ml (DAPI).

D. Análise Citogenética e Fotodocumentação

As lâminas com as diferentes colorações foram analisadas em microscópio de luz provido de analisador de imagens, Axioskop 2 – Zeiss. As melhores metáfases foram selecionadas e fotografadas para documentação, utilizando-se o programa Axio Vision. As imagens digitalizadas foram posteriormente reveladas em papel fotográfico Kodak Royal. Após a revelação do filme, os cromossomos foram recortados para a montagem e ilustração do cariótipo.

As lâminas com hibridação foram analisadas sob microscópio de fluorescência, e as melhores imagens foram fotografadas em filme Kodak Ultra 400 ASA e as imagens convertidas em fotografias.



E. Classificação Cromossômica

De cada população, ou seja, oito no total, foram selecionadas as cinco melhores metáfases, recortados os cromossomos e montados os cariótipos. Utilizando-se uma régua de precisão, vários parâmetros foram analisados: comprimento do braço curto (p), comprimento do braço longo (q), comprimento relativo do cromossomo (CR), e a razão dos braços, entre os braços curtos e longos do cromossomo (RB).

Os cromossomos foram agrupados em ordem decrescente de tamanho e a classificação de cada cromossomo seguiu o sistema de nomenclatura proposto por Green & Sessions (1991).

Para abranger a variação na condensação dos cromossomos entre as diferentes metáfases, o comprimento médio de cada par de cromossomos foi expresso como uma percentagem do comprimento total do complemento haplóide.

Os cromossomos foram definidos como grande, médio e pequeno, de acordo com as porcentagens relativas: valores $\geq 10\%$, valores $\geq 8\%$ e $< 10\%$ e valores $< 8\%$, respectivamente.



III. Resultados

A. *Leptodactylus podicipinus*

Os cariótipos dos indivíduos das duas populações examinadas, ou seja, de S. J. Rio Preto e Nova Itapirema, não exibiram diferenças no padrão morfológico dos cromossomos. Em ambas eles apareceram constituídos por 22 cromossomos ($2n=22$), representados por três pares de cromossomos metacêntricos de tamanhos grande e mediano (1, 5 e 6), dois pares de submetacêntricos, sendo um de tamanho grande (2) e um pequeno (8), dois pares de subtelocêntricos grandes (3 e 4), e quatro pares de cromossomos telocêntricos, sendo um de tamanho médio (7) e três de tamanho pequeno (9, 10 e 11). O número fundamental foi 36 ($NF=36$). Uma constrição secundária foi visualizada no braço longo do cromossomo oito, em região proximal ao centrômero (Figura 1A).

Em relação à percentagem do comprimento cromossômico no complemento haplóide, também não foi notada diferença significativa entre as duas populações, que pudesse ser associada à variação nos cariótipos e o ambiente (Tabela 1).

TABELA 1: Porcentagem do comprimento dos pares cromossômicos em relação ao comprimento total do conjunto haplóide. Par. Crom. = Par Cromossômico; C = Comprimento do Cromossomo; RB = Relação entre os braços; RCH = Relação do cromossomo ao conjunto total haplóide.

<i>Leptodactylus podicipinus</i>							
Nova Itapirema-SP				São José do Rio Preto-SP			
Par. Crom	C	RB	RCH	Par. Crom	C	RB	RCH
1	0,89	1,52	16,18%	1	1,11	1,36	17,20%
2	0,74	1,97	13,45%	2	0,84	1,70	13,02%
3	0,65	3,51	11,81%	3	0,73	3,60	11,31%
4	0,60	3,15	10,90%	4	0,70	3,11	10,85%
5	0,56	1,34	10,18%	5	0,66	1,42	10,23%
6	0,51	1,11	9,27%	6	0,56	1,21	8,68%
7	0,47	∞	8,54%	7	0,54	∞	8,37%
8	0,42	2,31	7,63%	8	0,48	2,60	7,44%
9	0,24	∞	4,36%	9	0,31	∞	4,80%
10	0,23	∞	4,18%	10	0,28	∞	4,38%
11	0,19	∞	3,50%	11	0,24	∞	3,72%

A coloração pelo nitrato de prata evidenciou que as regiões organizadoras nucleolares (RONS) estão localizadas na constrição secundária do par cromossômico 8 (Figura 1C). Interessante foi o fato que em um espécime das duas populações (Nova Itapirema/SP e S. J. Rio Preto/SP) foram observados heteromorfismos entre os homólogos com relação à constrição secundária e também ao tamanho das RONS (Figura 1B e 1D). Em um espécime de Nova Itapirema (área rural) foram visualizadas duas marcações seqüenciais de RONS, enquanto que em um espécime de S. J. Rio Preto (área urbana poluída), foram visualizadas três marcações (Figura 1D).

Em relação à localização da heterocromatina constitutiva, evidenciada pelo bandamento C, o padrão observado nos espécimes das duas populações foi semelhante. A heterocromatina constitutiva está localizada nas regiões centroméricas

dos cromossomos e nas regiões teloméricas dos cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, com exceção do cromossomo subtelocêntrico 3, onde nenhuma marcação foi observada no telômero do braço curto. Entre os telocêntricos, apenas o cromossomo 7 apresentou heterocromatina na porção terminal do braço longo e um grande bloco heterocromático foi observado na região proximal da constrição secundária do cromossomo 8 (Figura 1E).

A utilização da sonda de DNAr nos experimentos de hibridação *in situ* fluorescente confirmou a localização das RONS na região proximal do braço longo do cromossomo 8, no local da constrição. Nenhum sítio adicional de DNA ribossômico foi observado nas metáfases analisadas (Figura 2A).

A contra-coloração dos cromossomos no experimento com FISH, o DAPI, um fluorocromo específico de regiões cromossômicas (DNA) ricas em A-T, mostrou uma fluorescência aumentada (DAPI⁺) em algumas regiões centroméricas dos cromossomos e, muito evidentemente, na região proximal da constrição secundária do par cromossômico 8 (Figura 2B).

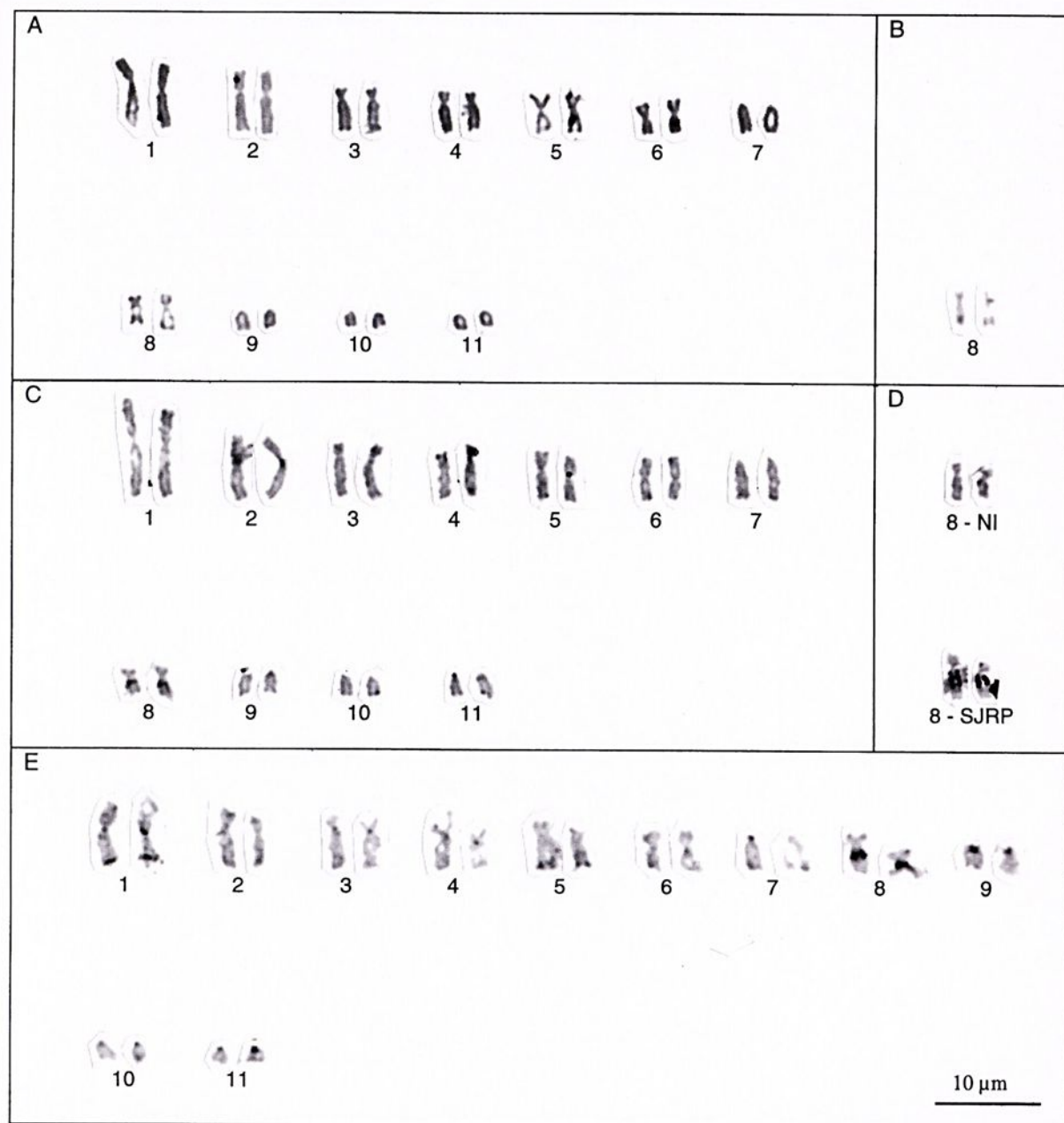


FIGURA 1: A. Cariótipo da espécie *Leptodactylus podicipinus*; B. Heteromorfismo do par cromossômico 8; C. Coloração Ag-NOR com marcação no cromossomo 8; D. Heteromorfismo entre os homólogos com marcações sequenciais pelo nitrato de prata em indivíduos das duas populações, NI = Nova Itapirema, SJRP = S. J. Rio Preto; E. Bandamento C. Todas as metáfases com a mesma ampliação.

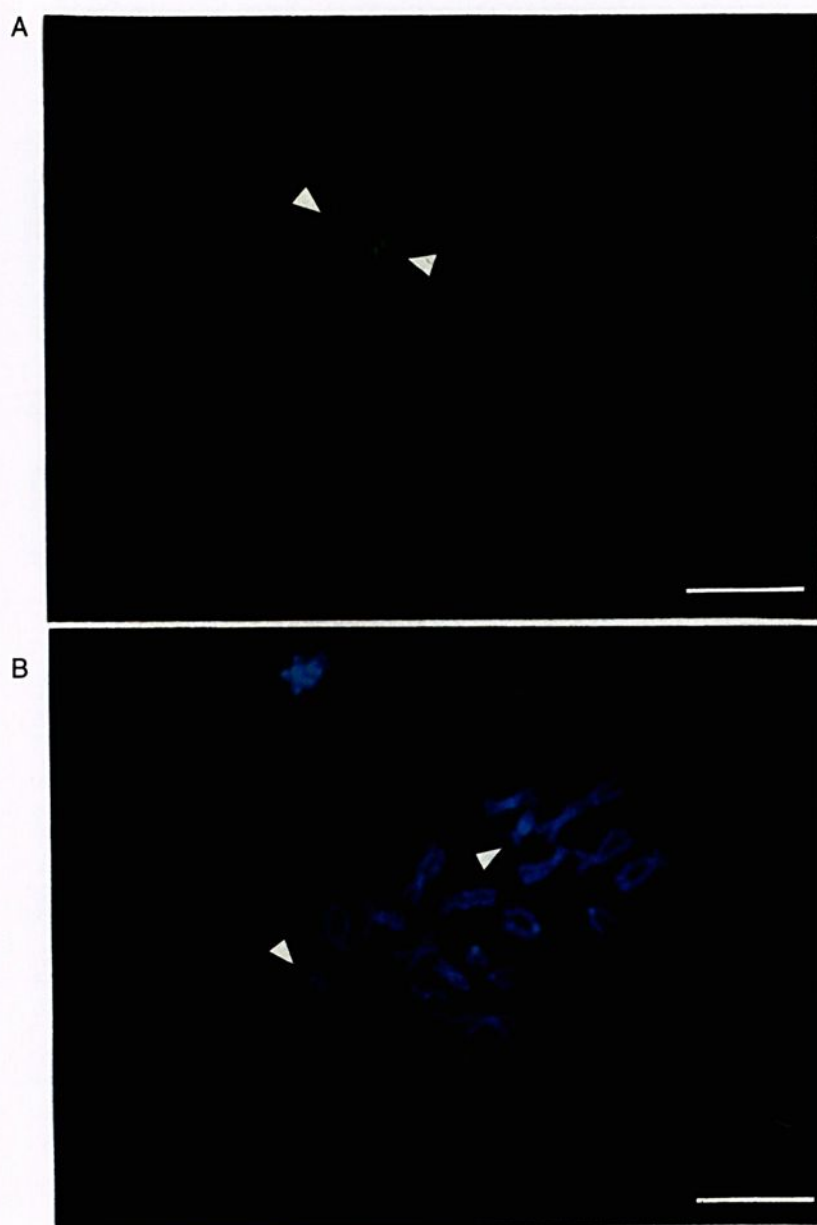


FIGURA 2: A. Hibridação "in situ" fluorescente (FISH) com sonda de DNA ribossômico em preparações cromossômicas da espécie *Leptodactylus podicipinus*, onde se observa a marcação no cromossomo oito, em região proximal do braço longo (setas); B. Metáfase de *L. podicipinus* corada com DAPI evidenciando marcações DAPI⁺ centroméricas e em região proximal as RONS (setas). Barra = 10 μm.

B. Leptodactylus ocellatus

As análises citogenéticas dos espécimes de *L. ocellatus* revelaram um número diplóide de $2n=22$ e $NF=44$, sendo esses constituídos especialmente por cromossomos meta e sub-metacêntricos. Foram identificados sete pares de cromossomos metacêntricos sendo dois grandes (1 e 5), um médio (6) e quatro pequenos (8, 9, 10 e 11), três pares de cromossomos submetacêntricos grandes (2 e 3) e médio (7), e um par de subtelocêntricos grandes (4) (Figura 3A).

Em nenhum dos indivíduos da espécie, verificou-se a presença de constrições secundárias no conjunto diplóide.

Os exemplares de Nova Itapirema e S. J. do Rio Preto mostraram equivalência na classificação cromossômica e na porcentagem de 10 pares cromossômicos relativo ao conjunto total haplóide. Diferentemente do observado em *L. podicipinus*, em *L. ocellatus* foi observada diferença na razão dos braços do cromossomo 4 dos indivíduos dos dois ambientes (Tabela 2). O valor da razão dos braços para esse cromossomo, nitidamente, classificou-o como subtelocêntrico, no cariótipo dos indivíduos da área rural, enquanto que o valor nos indivíduos de área urbana o aproxima para a condição telocêntrica (Figura 3B).

TABELA 2: Porcentagem do comprimento dos pares cromossômicos em relação ao comprimento total do conjunto haplóide. Par. Crom. = Par Cromossômico; C = Comprimento do Cromossomo; RB = Relação entre os braços; RCH = Relação do cromossomo ao conjunto total haplóide.

<i>Leptodactylus ocellatus</i>							
Nova Itapirema-SP				São José do Rio Preto-SP			
Par. Crom	C	RB	RCH	Par. Crom	C	RB	RCH
1	0,94	1,17	16,63%	1	0,80	1,24	17,39%
2	0,73	2,04	12,92%	2	0,61	1,75	13,26%
3	0,67	2,49	11,85%	3	0,55	2,76	11,95%
4	0,65	3,42	11,46%	4	0,52	6,75	11,30%
5	0,57	1,30	10,05%	5	0,46	1,26	10,00%
6	0,51	1,46	9,02%	6	0,41	1,30	8,91%
7	0,47	2,29	8,31%	7	0,37	2,65	8,04%
8	0,30	1,12	5,30%	8	0,26	1,20	5,65%
9	0,29	1,55	5,13%	9	0,23	1,14	5,00%
10	0,27	1,20	4,78%	10	0,20	1,07	4,34%
11	0,25	1,57	4,55%	11	0,19	1,45	4,16%

A coloração pelo nitrato de prata evidenciou a posição das regiões organizadoras de nucléolos (RONS), presentes na porção terminal do braço curto do cromossomo 8 (Figura 3C).

A heterocromatina constitutiva, evidenciada pelo bandamento C, está localizada nos centrômeros de todos os cromossomos dos indivíduos dos dois ambientes, e não muito nitidamente nos telômeros dos braços curtos de vários cromossomos, em região intersticial do braço longo dos cromossomos 1 a 4 e 6, e braço curto do cromossomo 5. Os braços curtos dos pares cromossômicos 4, 7 e 8 foram totalmente heterocromáticos (Figura 4A e 4B).

A sonda de DNA ribossômico hibridou com a porção terminal do braço curto do cromossomo 8, confirmando a localização das RONS pela prata (Figura 5A e 5B). Não

houve diferença significativa na intensidade do sinal dessas regiões nos indivíduos das populações diferentes.

Regiões ricas em A-T foram observadas nos cromossomos contra corados pela DAPI, que marcaram fortemente as regiões centroméricas e alguns telômeros de cromossomos médios e pequenos e, muito intensamente, o braço curto dos cromossomos 7 e 8 (Figura 5C).



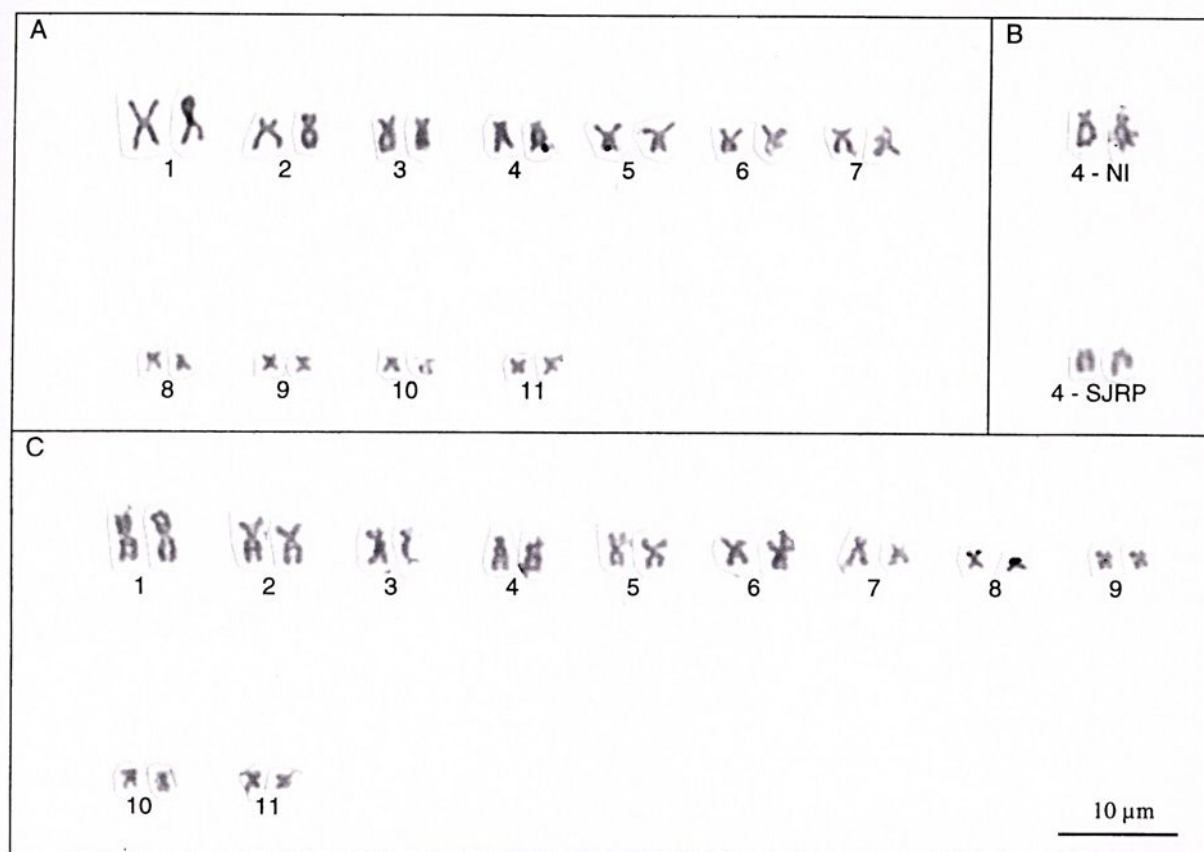


FIGURA 3: A. Cariótipo da espécie *Leptodactylus ocellatus*; B. Cromossomo 4 das duas populações, NI = Nova Itapirema, SJRP = S. J. Rio Preto; C. Coloração Ag-NOR com marcação pelo nitrato de prata em região terminal no braço curto do cromossomo 8. Todas as metáfases com a mesma ampliação.

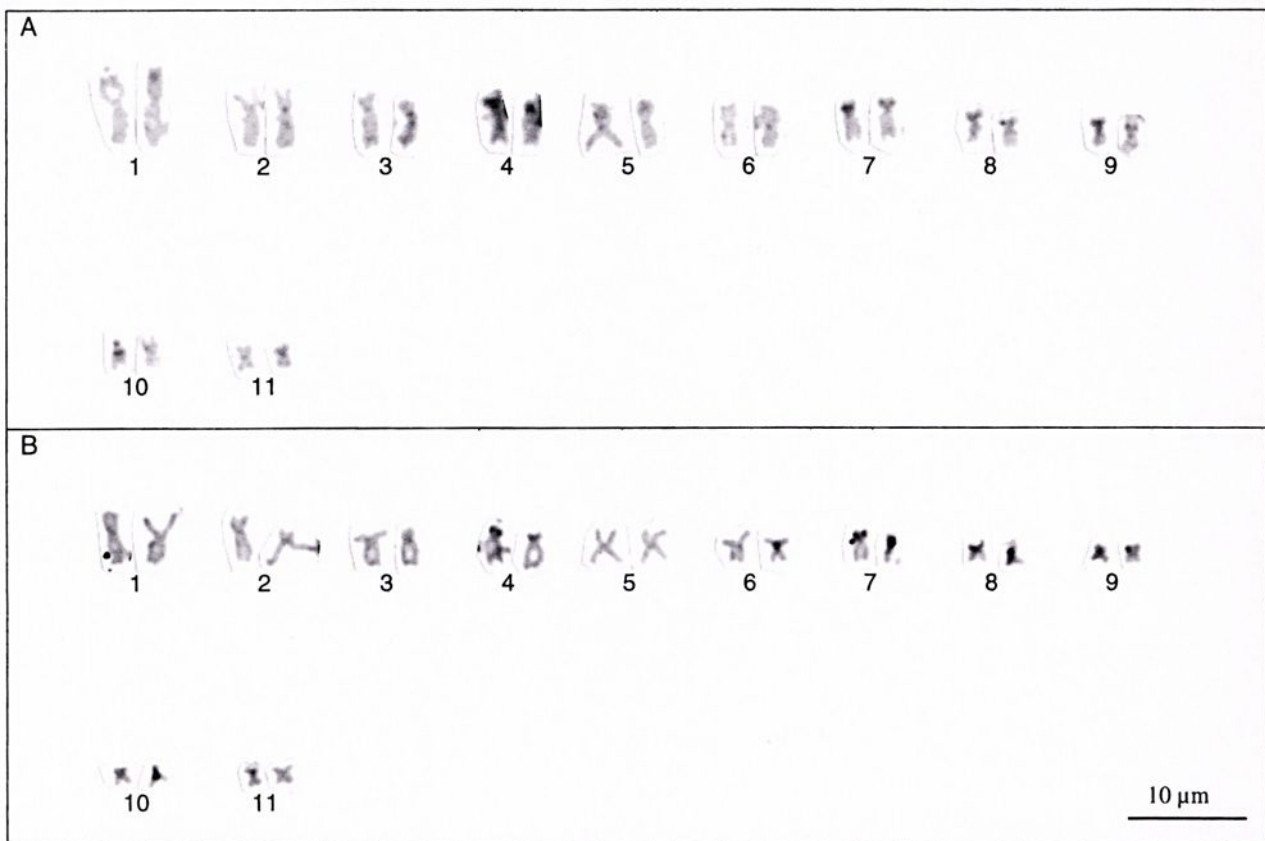
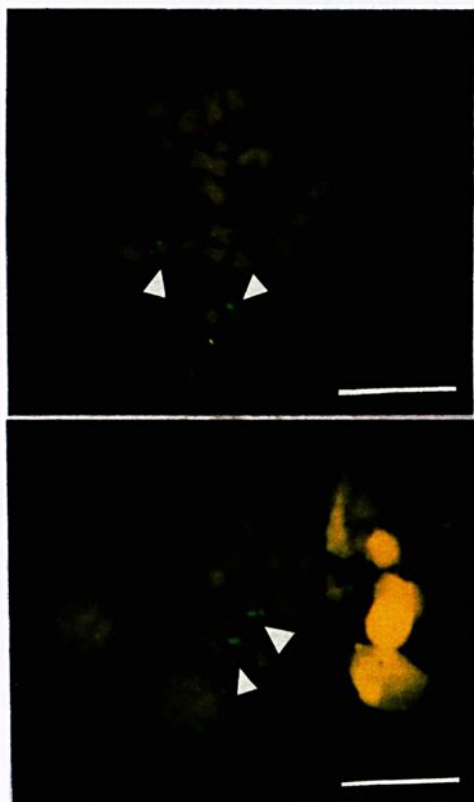
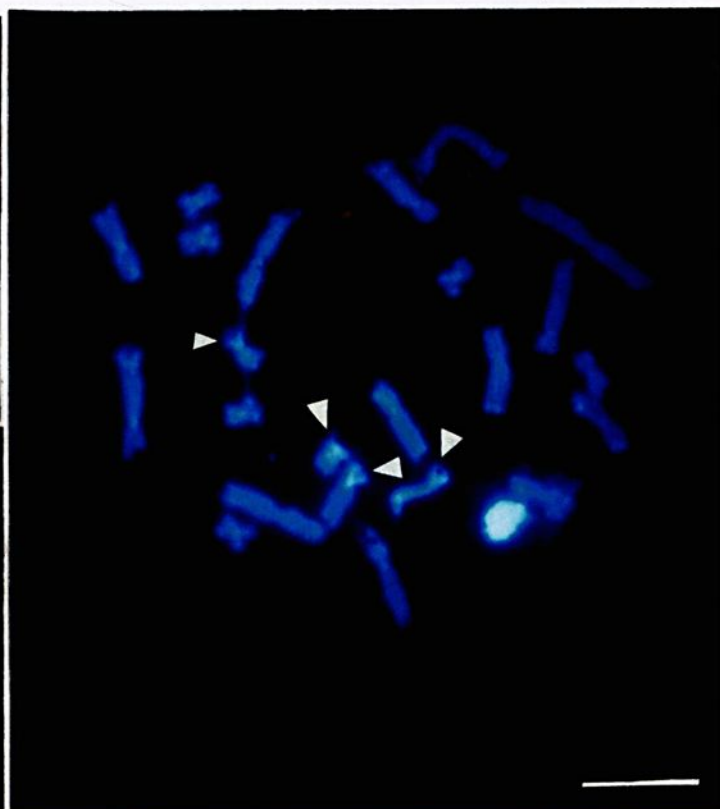


FIGURA 4: A e B. Bandamento C em espécimes de *L. ocellatus*, com o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva. Todas as metáfases com a mesma ampliação.

A



C



B

FIGURA 5: A e B. Hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH) com sonda de DNA ribossômico em preparações cromossômicas da espécie *Leptodactylus ocellatus*, onde se observa a marcação na porção terminal do braço curto do cromossomo 8 (setas); C. Metáfase de *L. ocellatus* corada com DAPI, evidenciando fluorescência aumentada nas regiões centroméricas e nos braços curtos dos cromossomos 7 e 8 (setas). Barra = 10 μ m.

B. Leptodactylus labyrinthicus

O cariótipo de *L. labyrinthicus* foi caracterizado por 11 cromossomos ($2n=22$), e por um $NF=44$ e. A análise evidenciou uma prevalência de cromossomos metacêntricos grandes (1), médios (5 e 6) e pequenos (8, 9, 10 e 11), seguida de cromossomos submetacêntricos, representados por um par de cromossomos grandes (2) e de dois pares de cromossomos subtelocêntricos grandes (3 e 4). Não foi detectada a presença de constrições secundárias nos cariótipos analisados (Figura 6A).

Uma única e pequena diferença em relação à medida da razão braquial, modificando a classificação cromossômica, foi observada no par cromossômico 7 dos indivíduos das duas populações (Tabela 3). Nos indivíduos de Nova Itapirema, ele foi classificado como submetacêntrico ($RB = 2,03$), enquanto que nos indivíduos da população de S. J. Rio Preto (poluída), ele foi classificado como subtelocêntrico ($RB = 3,25$) (Figura 6B).

TABELA 3: Porcentagem do comprimento dos pares cromossômicos em relação ao comprimento total do conjunto haplóide. Par. Crom. = Par Cromossômico; C = Comprimento do Cromossomo; RB = Relação entre os braços; RCH = Relação do cromossomo ao conjunto total haplóide.

<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>							
Nova Itapirema-SP				São José do Rio Preto-SP			
Par. Crom	C	RB	RCH	Par. Crom	C	RB	RCH
1	1,07	1,18	16,90%	1	1,38	1,15	18,72%
2	0,90	2,22	14,26%	2	1,06	1,88	14,38%
3	0,73	3,00	11,56%	3	0,87	3,24	11,80%
4	0,70	3,21	11,09%	4	0,76	4,18	10,31%
5	0,63	1,50	9,98%	5	0,72	1,48	9,76%
6	0,55	1,35	8,71%	6	0,67	1,28	9,09%
7	0,46	2,03	7,29%	7	0,55	3,25	7,46%
8	0,36	1,40	5,70%	8	0,39	1,18	5,29%
9	0,35	1,06	5,54%	9	0,36	1,12	4,88%
10	0,31	1,33	4,92%	10	0,32	1,14	4,34%
11	0,25	1,28	4,05%	11	0,29	1,42	3,97%

As RONS em *Leptodactylus labyrinthicus* foram visualizadas, após a marcação pela prata, na região terminal do braço curto do cromossomo 8. Nenhuma alteração ou variação quanto à posição das RONS foi observada entre as duas populações analisadas (Figura 6C).

A localização da heterocromatina constitutiva que apareceu nas regiões centroméricas de todos os cromossomos e também em regiões pericentroméricas, mais evidentes em alguns cromossomos, como os cromossomos 7, 8, 9 e 10 (Figura 6D), foi a mesma nos indivíduos das duas populações analisadas.

A análise com sonda ribossômica mostrou que as RONS estão localizadas exclusivamente na região terminal do braço curto dos homólogos do par 8 (Figura 7A), coincidindo com as RONS impregnadas por prata.

Os cromossomos contra corados com DAPI exibiram um padrão de marcação muito similar ao obtido para a heterocromatina, no bandamento C. Uma marcação em região intersticial do braço longo do cromossomo 2 pôde ser notada, não sendo esta observada pelo bandamento C (Figura 7B).



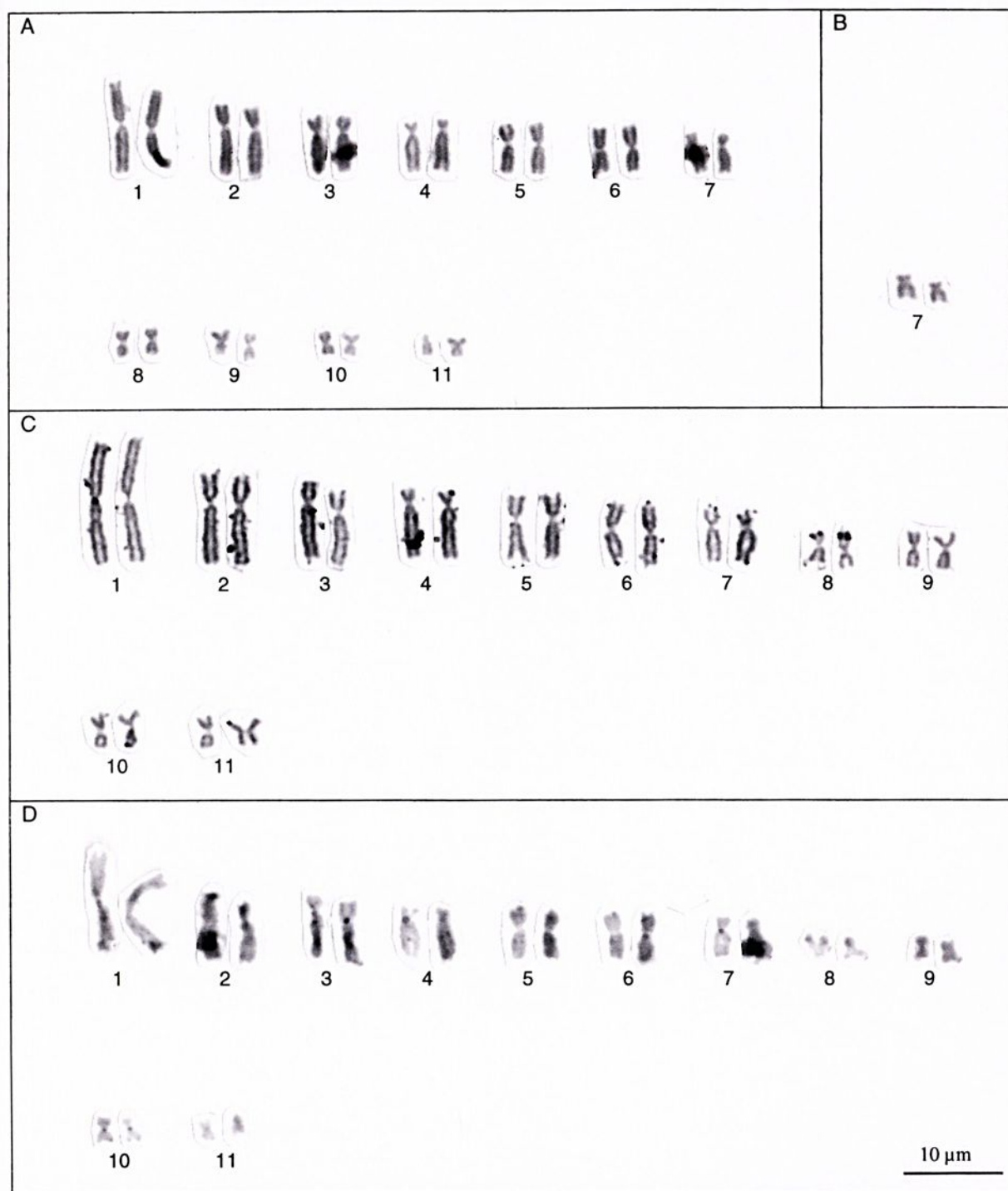


FIGURA 6: A. Cariótipo da espécie *Leptodactylus labyrinthicus* (S. J. Rio Preto) B. Cromossomo 7 de espécime de Nova Itapirema C. Coloração Ag-NOR com marcação terminal no braço curto do cromossomo 8; D. Bandamento C. Todas as metáfases com a mesma ampliação.

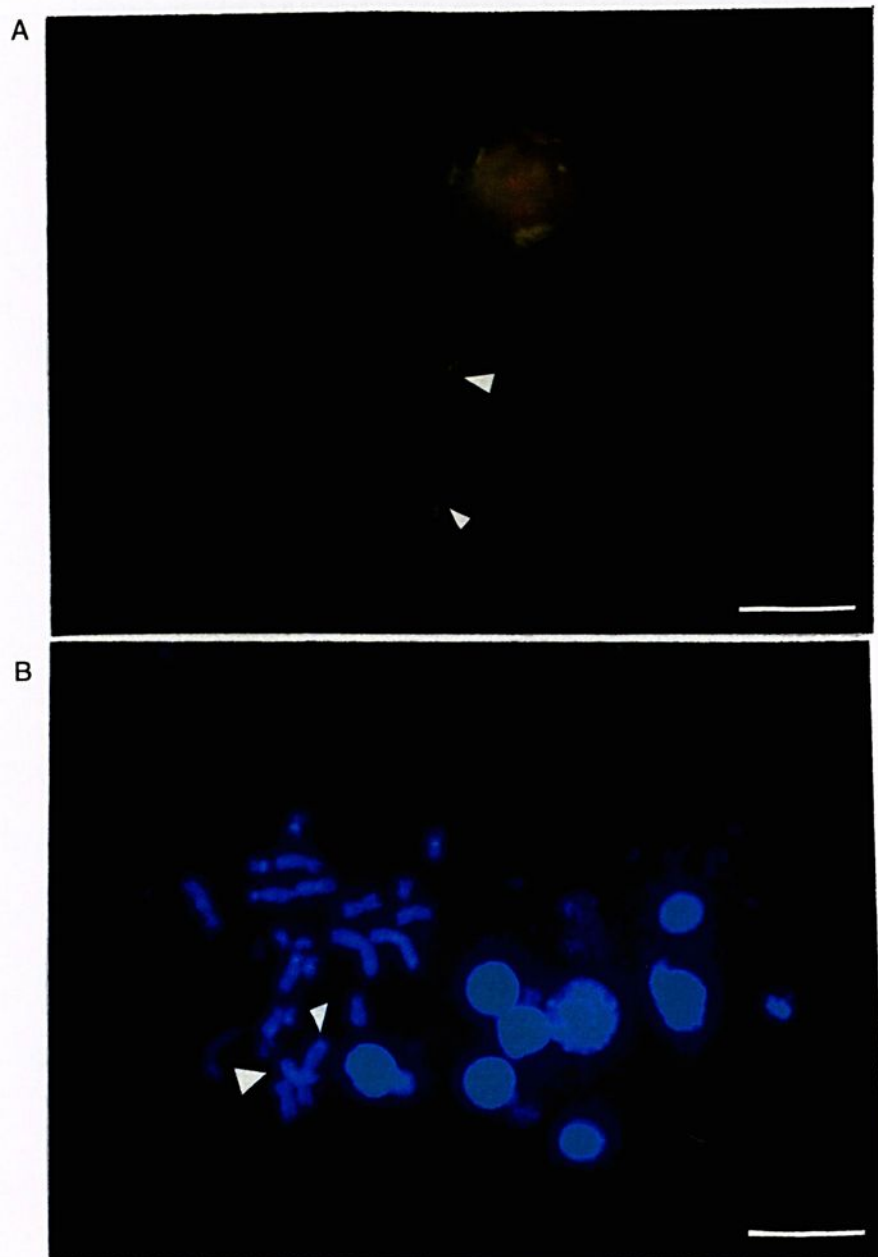


FIGURA 7: A. Hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH) com sonda de DNA ribossômico em preparações cromossômicas da espécie *Leptodactylus labyrinthicus*, na porção terminal do braço curto do par cromossômico oito (setas); B. Metáfase de *L. labyrinthicus* contra-corada com DAPI evidenciando fluorescências aumentadas nas regiões centroméricas e intersticial no cromossomo 2 (setas). Barra = 10 μ m.

D. Leptodactylus fuscus

As preparações cromossômicas dos indivíduos da espécie *L. fuscus* evidenciaram a presença majoritária de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos de tamanhos variados, com $2n=22$ e $NF=44$. Nos espécimes analisados de hábitat urbano, o cariótipo é constituído de cinco cromossomos grandes (1, 2, 3, 4 e 5), dois médios (6 e 7) e quatro pequenos (8, 9, 10 e 11) (Figura 8A), enquanto nos indivíduos coletados em hábitat rural, o cromossomo 5, pela proporção no lote haplóide, foi classificado como cromossomo de tamanho médio.

Em relação à proporção dos braços, os cromossomos 1, 5, 6, 8, 9, 10 e 11 foram classificados como metacêntricos; os cromossomos 2 e 7 submetacêntricos e o par cromossômico 4 como subtelocêntrico. Uma outra variação detectada pelos valores da razão de braços foi em relação ao cromossomo 3 (Tabela 4), classificado como submetacêntrico nos indivíduos de área rural e subtelocêntrico de área urbana (Figura 8B).

Uma constrição secundária foi observada em região intersticial do braço longo do cromossomo 8, em espécimes de ambos ambientes. Em algumas metáfases de preparações cromossômicas de *L. fuscus* proveniente de ambiente poluído urbano, notou-se um heteromorfismo no tamanho da constrição, que apareceu aumentada em alguns indivíduos.



TABELA 4: Porcentagem do comprimento dos pares cromossômicos em relação ao comprimento total do conjunto haplóide. Par. Crom. = Par Cromossômico; C = Comprimento do Cromossomo; RB = Relação entre os braços; RCH = Relação do cromossomo ao conjunto total haplóide.

<i>Leptodactylus fuscus</i>							
Nova Itapirema-SP				São José do Rio Preto-SP			
Par. Crom	C	RB	RCH	Par. Crom	C	RB	RCH
1	1,25	1,30	16,84%	1	1,21	1,28	16,85%
2	0,98	1,71	13,21%	2	0,89	2,05	12,39%
3	0,83	2,18	11,18%	3	0,80	3,35	11,14%
4	0,79	3,79	10,64%	4	0,80	3,17	11,14%
5	0,72	1,12	9,70%	5	0,73	1,25	10,16%
6	0,68	1,19	9,17%	6	0,66	1,26	9,19%
7	0,61	2,14	8,22%	7	0,59	2,29	8,21%
8	0,54	1,60	7,28%	8	0,56	1,30	7,80%
9	0,41	1,59	5,53%	9	0,43	1,61	5,99%
10	0,33	1,23	4,45%	10	0,29	1,14	4,03%
11	0,28	1,18	3,78%	11	0,27	1,16	3,10%

As RONS, detectadas nas marcações por prata, foram observadas na região mediana-distal do braço curto do cromossomo 8 (Figura 8C). Em algumas metáfases, essa marcação foi nitidamente visualizada na porção intersticial do braço curto, coincidente com a região de constrição secundária (Figura 8D).

A heterocromatina constitutiva foi observada em todos os centrômeros; marcações teloméricas foram observadas nos braços curtos dos cromossomos 5 e 6, além de uma marcação tênue no braço curto do cromossomo 9 (Figura 8E). Também foi observada a presença de heterocromatina constitutiva associada à região proximal da constrição secundária e RONS. Não houve diferença na localização de heterocromatina entre os exemplares dos dois ambientes estudados.

A análise de FISH mostrou hibridação nas regiões intersticiais do braço longo do cromossomo oito (Figura 9A), confirmando que as RONS estão localizadas na

constricção secundária intersticial do braço longo, sendo notada uma diferença no tamanho do sinal, em um dos homólogos do cromossomo 8.

A análise dos cromossomos contra corados com o DAPI foi interessante, porque, além de marcações centroméricas DAPI⁺, várias regiões pericentroméricas e teloméricas apareceram marcadas pelo DAPI. A região de constricção secundária e regiões próximas a ela não apareceram coradas pelo DAPI (Figura 9B).



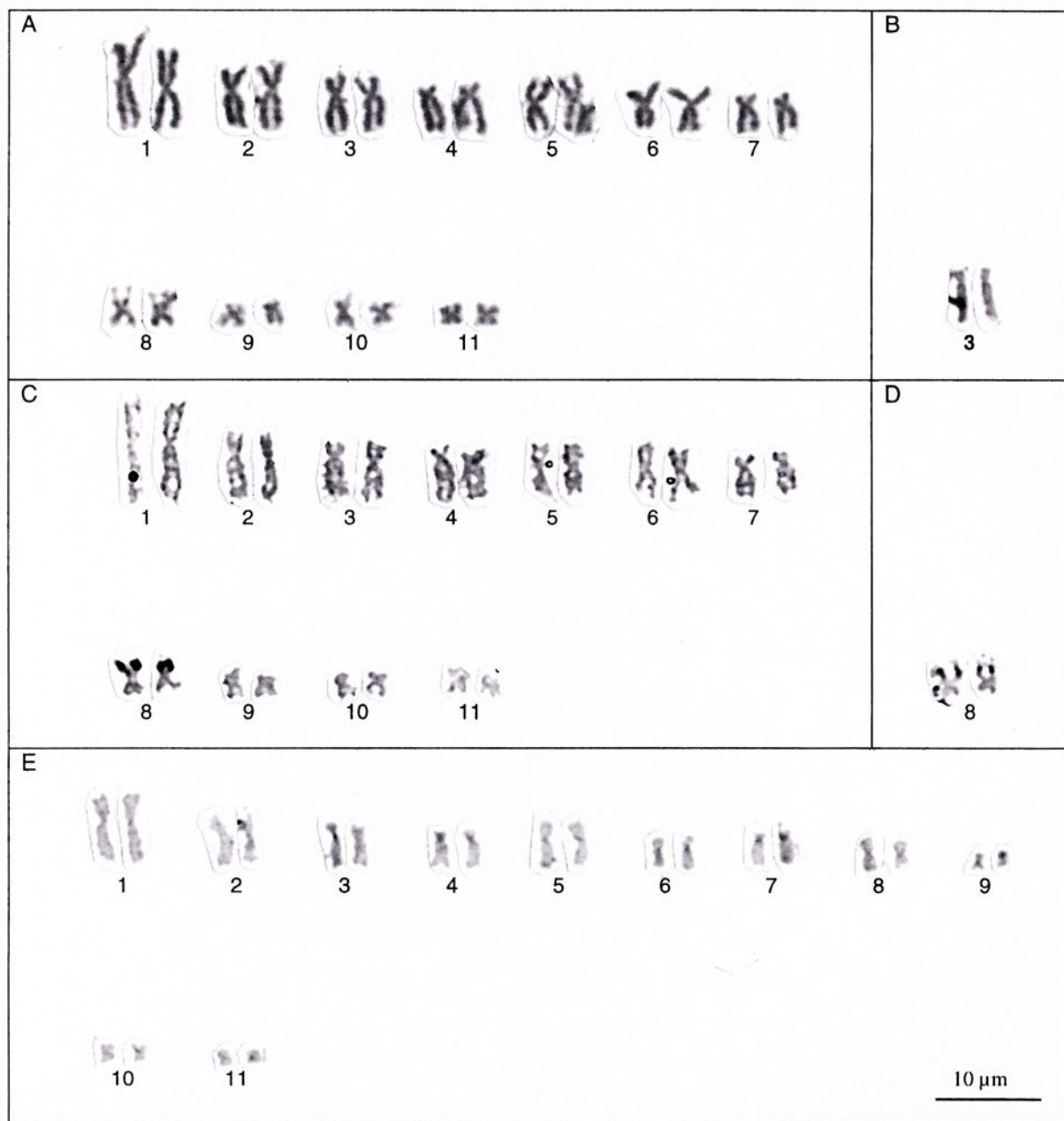


FIGURA 8: A. Cariótipo da espécie *Leptodactylus fuscus* (Nova Itapirema); B. Cromossomo 3 de espécime proveniente de S. J. Rio Preto; Coloração Ag-NOR com marcação mediana-distal no braço curto do cromossomo 8; D. Coloração Ag-NOR com marcação intersticial no braço curto do cromossomo 8; E. Bandamento C. Todas as metáfases com a mesma ampliação.

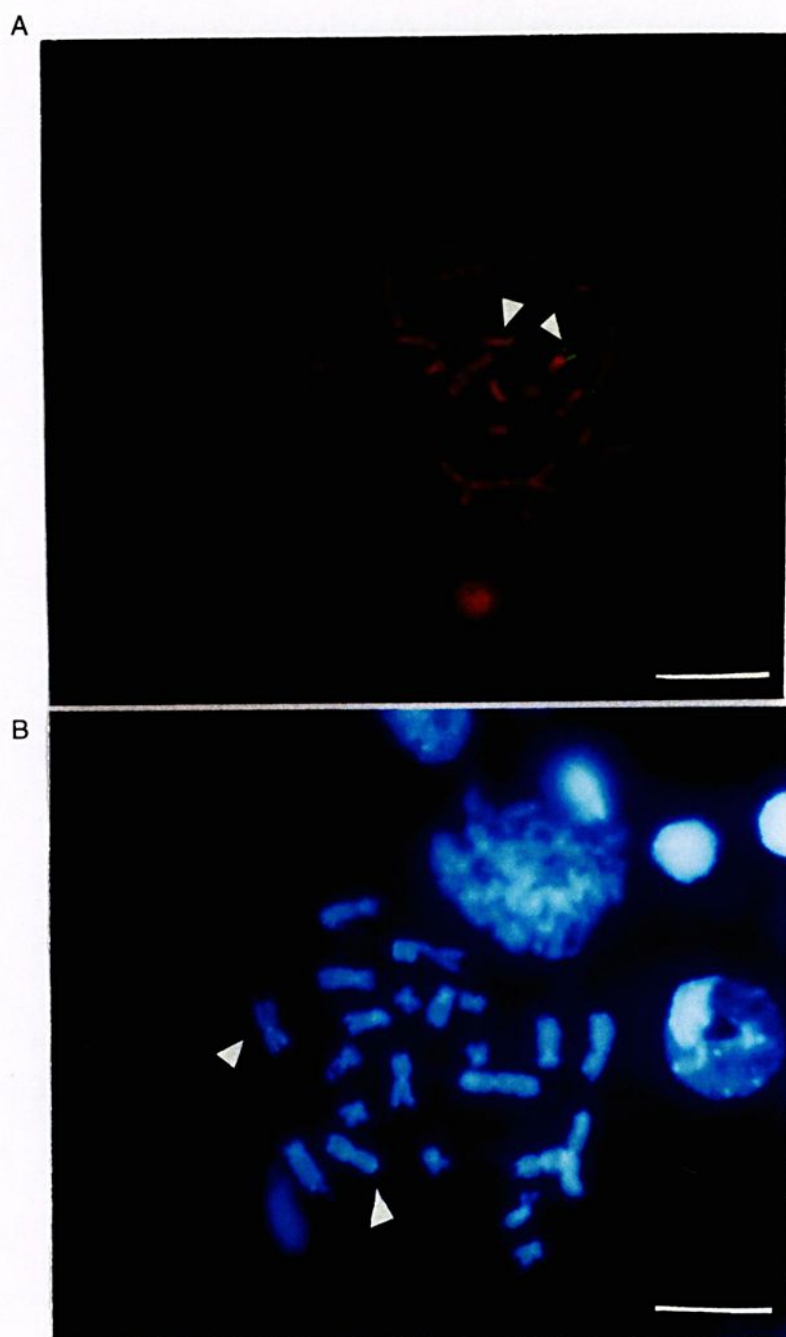


FIGURA 9: A. Hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH) com sonda de DNA ribossômico em preparações cromossômicas da espécie *Leptodactylus fuscus*, evidenciando a posição das RONS e a duplicação em um dos homólogos (setas); B. Metáfase de *L. fuscus* corada com DAPI evidenciando fluorescências aumentadas nas regiões centroméricas e teloméricas (setas). Barra = 10 µm.

IV. Discussão

A. *Leptodactylus podicipinus*

Os trabalhos citogenéticos em representantes da espécie *L. podicipinus* são escassos. Em geral os estudos envolveram, principalmente, a análise de cromossomos por coloração usual e, raramente, estudos utilizando bandamentos cromossômicos diferenciais. Isso parece ter ocorrido com as espécies do grupo *melanonotus*; todavia, esse grupo tem notável importância dentro do gênero, pois muitos autores consideram as espécies incluídas nesse grupo como sendo basais em relação aos três outros grupos de batráquios, justificando, portanto, um estudo mais aprofundado.

Os espécimes de *L. podicipinus* analisados apresentaram um conjunto diplóide com $2n=22$ e $NF=36$, caracterizado pela presença de quatro pares de cromossomos telocêntricos. A presença de cromossomos telocêntricos, não muito comum nas outras espécies do gênero *Leptodactylus*, tem sido interpretada como sendo decorrente de inversões pericêntricas que modificaram a posição centromérica de alguns pares cromossômicos meta e submetacêntricos, alterando o número fundamental (Denaro, 1972).

Bogart (1974) já havia caracterizado citogeneticamente exemplares de *L. podicipinus*, coletados no município de S. J. do Rio Preto. Apesar do autor ter utilizado a nomenclatura cromossômica proposta por Levan *et al.* (1964), para a classificação cromossômica, não houveram diferenças significativas entre as duas descrições, e o

autor não descreveu com precisão o ponto de coleta, para se fazer uma relação entre os ambientes amostrados.

Quando comparados os resultados obtidos por Denaro (1972) e Silva *et al.* (2000), as diferenças observadas na classificação cromossômica podem ser atribuídas à ausência de classificação cromossômica pelos autores, pois os cariótipos são morfológicamente muito semelhantes as do presente estudo. Baldo (2002), que utilizou um sistema de classificação cromossômica, ao analisar exemplares de *L. podicipinus* de Misiones (Província Argentina), verificou que os espécimes possuíam um cariótipo diplóide composto por 22 cromossomos, sendo os pares 1, 5 e 6 metacêntricos, o par 2 submetacêntrico, os pares 3, 4 e 8 subtelocêntricos e os pares 7, 9, 10 e 11 telocêntricos e, o NF= 36. Ainda segundo o autor, as constrições secundárias dessa espécie são muito evidentes e localizadas em região intersticial do braço longo do cromossomo oito e, muitas vezes, demonstraram heteromorfismos em relação ao tamanho.

Os resultados obtidos por Baldo (2002) foram muito semelhantes aos observados no presente trabalho, com exceção do cromossomo 8, descrito como subtelocêntrico por Baldo e submetacêntrico em nosso trabalho. Em *Amphibia*, alterações na morfologia cromossômica dentro da espécie podem ocorrer com certa frequência, especialmente quando comparadas populações de localidades distantes.

Segundo King (1980), as diferenças observadas nas constrições secundárias heteromórficas são, principalmente, devido à variação na quantidade de heterocromatina constitutiva, em geral, presente nessas regiões, mas também destaca outros fatores, como rearranjos cromossômicos (pequenas inversões) e amplificações das regiões de DNAr.

À semelhança dos resultados de Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002), as RONS em *Leptodactylus podicipinus* foram observadas nas contrações secundárias do braço longo do cromossomo 8, e também apresentaram heteromorfismo de tamanho, evidenciado pelas marcações adicionais. Contudo, nenhuma outra marcação adicional pela prata foi observada, diferente do referido Baldo (2002), que apontou marcações adicionais nos centrômeros dos cromossomos telocêntricos.

O experimento de FISH com a sonda DNAr mostrou que a região organizadora de nucléolos está limitada ao par cromossômico 8, e que o heteromorfismo observado entre os homólogos na coloração com a prata pode ser atribuído principalmente à atividade gênica diferencial de segmentos de DNAr, uma vez que não foi observada variação na intensidade do sinal de hibridação que pudesse indicar a ocorrência de duplicação em "tandem".

Os cistrons ribossômicos são compostos, de DNAs repetitivos, e é bem confirmada a associação dos sítios ribossômicos com a heterocromatina constitutiva.

O DAPI, utilizado no experimento de FISH, é um fluorocromo com afinidade química às ligações nucleotídicas ricas em A-T. Tendo em vista a localização da heterocromatina constitutiva e o fato de que nem todas as regiões heterocromáticas apareceram com fluorescência aumentada pelo DAPI, pode-se concluir que as frações heterocromáticas apresentam diferenças no conteúdo dos pares de bases. A marcação DAPI positiva, observada na região das RONS, contraria os estudos de Schweizer (1976), Schmid *et al.* (1985) e Sumner, (1990), que relataram uma riqueza relativa em pares de bases G-C nos cistrons ribossômicos, pois as RONS foram, em geral, positivas para fluorocromos específicos para bases G-C. Schmid (1980), ao analisar espécies de diferentes famílias de Anura, concluiu que as RONS demonstram

grande fluorescência com mitramicina (MM) e cromomicina (CMA3), que são também fluorocromos base-específicos para G-C, obtendo-se em geral com esses fluorocromos o padrão oposto ao da quinacrina (específico para A-T, assim como o DAPI) para as regiões heterocromáticas.

O índice de G-C em DNA ribossômico em *Anura* gira em torno de 64%, valor considerado elevado, se comparado com outros grupos de vertebrados (Sinclair & Borwin, 1971). Com base nesta informação, nos estudos citados e nos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que a fluorescência observada próxima às RONS no DAPI, é devida mais à proximidade de heterocromatina rica em A-T, que está intimamente associada às RONS.

As análises citogenéticas em *Amphibia* têm mostrado que tanto as RONS quanto a heterocromatina constitutiva têm papel relevante na evolução das espécies.

Em relação à localização da heterocromatina constitutiva, nenhuma diferença foi observada entre os indivíduos das duas populações, e os resultados observados foram similares aos descritos na literatura. Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002) relataram a presença de marcações C+ nos telômeros dos cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, sendo que Baldo (2002) referiu também a presença de banda intersticial no par 1. Foi também comum, neste trabalho, a descrição da banda heterocromática coincidente com as RONS.

O aumento ou amplificação de heterocromatina nos cromossomos tem sido considerado uma tendência evolucionária nos *Amphibia*, muito embora alguns autores considerem que a redução da heterocromatina também possa ocorrer (Busin *et al.* 2001). King (1991) atribuiu as variações observadas na heterocromatina a três principais fatores: adição de heterocromatina em sítios particulares nos cromossomos,

transformação de eucromatina em heterocromatina constitutiva e evolução conjunta de múltiplas regiões heterocromáticas. No primeiro caso, essa adição resultaria em ampliações de seqüências repetitivas do DNA, com modificações graduais e lentas nos cromossomos. A modificação de eucromatina em heterocromatina não alteraria o comprimento dos cromossomos, enquanto que a evolução de locais múltiplos envolve a modificação conjunta de uma família de seqüências repetitivas do DNA, levando a um comportamento mais homogêneo e que, segundo o autor, é mais comum intra-especificamente.

No presente estudo, a banda heterocromática visualizada no cromossomo 7 pode ser devida à transformação da eucromatina em heterocromatina ou "heterocromatinização", ou a variação no procedimento técnico, que não detectou essa banda nos cromossomos analisados pelos outros autores.

B. *Leptodactylus ocellatus*

O cariótipo de espécimes de *L. ocellatus* provenientes da Argentina foi descrito por Bianchi *et al* (1973). Sua descrição é o que mais se assemelha com a apresentada no presente estudo, se comparada às outras análises realizadas por Bogart (1974), Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002). A única diferença observada entre as duas descrições refere-se à condição do par cromossômico 11, classificado respectivamente como submetacêntrico por Bianchi *et al.* (1973), e como metacêntrico no presente trabalho. Provavelmente, essa diferença possa ser atribuída a variações no grau de condensação dos cromossomos analisados e ao tamanho reduzido do cromossomo 11, o que dificulta uma visualização morfológica adequada.



Os autores anteriormente citados referem, também, a presença de uma constrição secundária na porção terminal do braço curto do cromossomo 8. No material analisado, não foi evidenciada nenhuma constrição; contudo, as RONS detectadas pela prata e pelo FISH foram observadas em posição terminal, provavelmente no local da constrição relatada pelos outros autores. A associação entre RONS e constrições secundárias é bem estabelecida e a localização das RONS foi coincidente com a observada por Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002).

A diferença observada na razão dos braços do cromossomo 4 das duas populações analisadas, talvez, possa ser atribuída a diferenças no grau de condensação cromossômica das metáfases analisadas, uma vez que nenhuma outra diferença foi observada para este cromossomo, todavia, mudanças na posição centromérica podem ter ocasionado uma mudança na relação dos braços.

Baldo (2002) detectou bandas heterocromáticas em todos os centrômeros e em alguns telômeros, bandas intersticiais nos braços longos dos pares 1 e 6, e braços curtos dos pares 3 e 5, os braços p dos pares 4 e 7 mostram-se completamente marcados, além dos grandes blocos heterocromáticos nos cromossomos 11 e 8, esses resultados corroboram os obtidos por Bianchi *et al.* (1973), sem variações de grande importância.

Em relação à distribuição da heterocromatina constitutiva, diferente do observado por Silva *et al.* (2000), que encontraram três tipos distintos de distribuição da heterocromatina, em quatro localidades diferentes (Rio Claro-SP e Santa Maria-SP; Anaurilândia-MS; Guaratuba-PR); nenhuma diferença foi observada nos indivíduos das duas populações analisadas, e os padrões obtidos no presente estudo mostram certa semelhança com a população proveniente de Anaurilândia-MS, que apresentaram

bandas intersticiais nos braços curtos dos cromossomos 5, 9 e 10, além de diversas bandas teloméricas.

Na comparação entre as duas populações, não foi observada nenhuma variação na composição de bases A-T e estas parecem ser predominantemente nas regiões heterocromáticas evidenciadas.

C. Leptodactylus labyrinthicus

Uma pequena diferença foi encontrada nos cariótipos de *L. labyrinthicus* de Nova Itapirema-SP e São José do Rio Preto-SP. Trata-se do cromossomo 7, que foi classificado como submetacêntrico e subtelocêntrico nas populações rural e urbana, respectivamente. Tendo em vista que não foi encontrada diferença significativa entre os cromossomos das duas populações, quando considerada a proporção dos pares cromossômicos em relação ao conjunto de cromossomos, supõe-se que a diferença não seja derivada de rearranjos do tipo deleções e translocações simples.

A diferença na classificação pode ter sido decorrente da ocorrência de um pequeno rearranjo do tipo inversão pericêntrica, que mudaria a morfologia cromossômica.

Os dados da literatura para a espécie *L. labyrinthicus* são variáveis. Agostinho (1994), analisando espécimes de quatro populações, verificou que o cariótipo de *L. labyrinthicus* é composto por sete pares de cromossomos metacêntricos (1, 5, 6, 8, 9, 10 e 11), três pares de submetacêntricos (2, 3 e 7) e um par de subtelocêntricos (4). Esses resultados são diferentes dos observados por Denaro (1972), que havia considerado os pares 4 e 5 como submetacêntricos, e possivelmente, essa diferença

deve-se ao fato de que apenas o primeiro autor utilizou-se de um sistema de classificação cromossômica.

Posteriormente Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002), ao analisarem os cariótipos de espécimes de diferentes localidades, descreveram o cromossomo 7 como sendo submetacêntrico, sendo que, no primeiro trabalho, os espécimes eram de Rio Claro e Botucatu – Estado de São Paulo, e no trabalho de Baldo os espécimes eram da Argentina. Se comparados aos dados da literatura, o cariótipo dos indivíduos provenientes de Nova Itapirema-SP, não expostos à poluição, é mais semelhante ao da literatura do que ao cariótipo observado nos espécimes de S. J. do Rio Preto-SP. A diferença observada relativa à morfologia do par 7 pode estar indicando que a poluição tem interferido no genoma dessa espécie.

Uma outra característica a ser referida é a de que Agostinho (1994), Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002) descreveram a presença de uma constrição secundária na porção terminal do braço curto do oitavo par cromossômico. No presente estudo, a constrição secundária não foi visualizada, fato que pode estar relacionado ao grau de condensação cromossômica das preparações.

Embora não tenham sido observadas as contrições secundárias, as RONS foram detectadas pelas duas técnicas utilizadas (Ag-NOR e FISH) em posição terminal no par cromossômico 8 e não variou nas duas populações. Esses resultados estão de acordo com os observados por Silva *et al.* (2000) e Baldo, (2002), e diferentes dos observados por Agostinho (1994), que reconheceu o cromossomo 11 como o portador das RONS. Morfologicamente, os cromossomos 8 e 11 são muito semelhantes, e a diferença na descrição pode estar diretamente relacionada à posição do cromossomo na montagem do cariógrama. Esse fato ressalta a importância de uma classificação

cromossômica que considere o comprimento total do cromossomo na padronização das descrições.

Em relação à heterocromatina constitutiva, algumas pequenas variações foram observadas em relação às descrições da literatura. Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002) já haviam descrito os padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva em *L. labyrinthicus*, que apresentou marcações em todos os centrômeros e algumas marcações teloméricas. Os primeiros autores referiram também uma banda intersticial no braço longo do cromossomo 2.

À semelhança desses, a heterocromatina constitutiva de *L. labyrinthicus* foi observada nos centrômeros e também em regiões pericentroméricas de vários cromossomos. Embora a marcação intersticial no braço longo do cromossomo 2 não tenha sido detectada pelo bandamento C, uma banda DAPI⁺ foi observada nesta região do cromossomo 2, nas metáfases contra-coradas com DAPI, no experimento de FISH. O DAPI evidenciou também que as regiões heterocromáticas centroméricas e pericentroméricas observadas são ricas em A-T.

Segundo Schmid (1978), pequenas variações no tratamento com bário, utilizado no bandamento C, podem evidenciar ou ocultar regiões de heterocromatina constitutiva e, além disso, heteromorfismos dessas regiões entre homólogos não são infreqüentes.

Diferenças no padrão de distribuição da heterocromatina podem ocorrer entre populações de uma mesma espécie. No entanto, isso parece ser mais comum quando as populações estão geograficamente separadas. Padrões de distribuição desigual de heterocromatina, aliados a outros fatores, já forneceram subsídios para a descrição de novas espécies (Busin *et al.*, 2001).



D. Leptodactylus fuscus

Bogart (1974) analisou o cariótipo de espécimes de *L. fuscus* de S. J. do Rio Preto-SP, caracterizando-o como constituído por sete pares de cromossomos metacêntricos (1, 5, 6, 8, 9, 10 e 11), três pares de submetacêntricos (2, 3 e 7) e um par de cromossomos subtelocêntricos (4). Essa foi também a constituição cariotípica observada nos espécimes de Nova Itapirema-SP. O par cromossômico 3, que diferiu quanto à morfologia nas duas populações analisadas, foi classificado como submetacêntrico também por Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002). Nos indivíduos de S. J. do Rio Preto, ele mostrou-se subtelocêntrico.

Nesse contexto, a condição observada nos espécimes de S. J. do Rio Preto é derivada para espécie. A ocorrência dessa modificação pode estar relacionada às diferenças ambientais nas duas populações e, como não houve diferença na quantidade de heterocromatina constitutiva, a variação morfológica observada entre os pares cromossômicos nos diferentes ambientes pode ser devida a uma pequena inversão envolvendo o centrômero, ou a diferenças na compactação do DNA nos cromossomos.

Como nos trabalhos da literatura, as constrições secundárias presentes no par cromossômico 8 são portadoras das RONS. Nenhum outro sítio de DNAr foi observado pela hibridação *in situ* fluorescente.

Uma duplicação em *tandem* dos sítios de DNAr foi observada em um dos homólogos do par 8, nos indivíduos das duas populações. King *et al.* (1990b) e Lourenço *et al.* (2000) discutirem a origem das múltiplas regiões organizadoras



nucleolares em anfíbios e atribuírem a sua presença à transposição de elementos genéticos móveis, ampliações “órfãs” de cistrons ribossômicos, erros de inserção durante a amplificação extra de cistrons ribossomais, translocações e inversões que ocorrem nos cromossomos.

Os resultados obtidos pelo bandamento C foram semelhantes aos observados por Silva *et al.* (2000) e Baldo (2002). Entretanto, o primeiro trabalho refere à ocorrência de diferenças inter-populacionais para os padrões de banda C, observadas entre exemplares dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Os exemplares ora analisados assemelham-se com os espécimes coletados em Rio Claro-SP, pois não apresentaram as marcações teloméricas presentes nos cromossomos dos exemplares do Rio Grande do Sul-RS.

As marcações evidenciadas pelo DAPI, à semelhança das outras espécies, sugerem que as regiões heterocromáticas observadas são regiões ricas em A-T. Esses resultados são diferentes dos observados por Schmid *et al.* (1993), em espécies do gênero *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae) que, ao utilizarem fluorocromos específicos, descreveram uma fluorescência aumentada nas regiões centroméricas, para fluorocromos específicos para G-C. Na verdade, mais uma vez, é demonstrada a heterogeneidade na composição de bases das regiões cromossômicas ricas em DNA satélite.

V. Considerações finais

As análises efetuadas nos indivíduos das quatro espécies analisadas, permitiu verificar que:

- A. a espécie *Leptodactylus podicipinus* apresentou heteromorfismos entre os homólogos em relação ao tamanho da constrição secundária e das RONS, e uma banda heterocromática adicional no cromossomo 7, não observada por outros autores;
- B. nas espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *L. fuscus* verificou-se uma diferença na classificação dos pares cromossômicos 7 e 3, respectivamente entre as populações de habitat poluído e não poluído, atribuídas possivelmente à uma pequena inversão pericêntrica; embora a classificação cromossômica do par 4 em *L. ocellatus* não tenha sido alterada, foi observada uma diferença considerável na relação dos braços entre as duas populações;
- C. o fluorocromo DAPI evidenciou que grande parte da heterocromatina detectada pelo bandamento C é rica em seqüências A-T;
- D. a hibridação *in situ* fluorescente com sonda ribossômica, apresentada pela primeira vez para essas espécies, confirmou a posição das RONS e indicou com precisão essas regiões nos cromossomos de *L. fuscus*, pois elas foram visualizadas em posição intersticial do braço curto do cromossomo 8; uma duplicação de seqüências ribossômicas (duplicação em *tandem*), foi observada em um dos homólogos do par cromossômico 8;

E. além das pequenas diferenças observadas nos cariótipos dos indivíduos de *L. ocellatus*, *L. labyrinthicus* e *L. fuscus*, nenhuma outra característica citogenética foi observada, que pudesse ser atribuída à diferenças no ambiente.



VII. Referências

- AGOSTINHO, C. A. **Caracterização de populações de rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* (SPIX, 1824) e avaliação de seu desempenho em cativeiro.** 141f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 1994.
- BALDO, J. D. **Estudos Cromosômicos de lãs Espécies Argentinas del Gênero *Leptodactylus* FITZINGER 1826 (Amphibia: Anura).** 85f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Nacional de Misiones. Província Misiones, Argentina, 2003.
- BARALE, G. D.; ORTIZ, M. I.; LISANTI, J. A. Cariotipo y organizador nucleolar de *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). **Revista UNRC**, v.8, p. 83-88, 1989.
- BARALE, G. D.; PINNA-SENN, E.; LISANTI, J. A. Polimorfismo de banda C ligado al sexo em *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). **Revista UNRC**, v. 10, n.1, p. 51-53, 1990.
- BARBIERI, F. Observaciones sobre los cromosomas y espermatozoides em algunos batracios del gênero *Leptodactylus*. **Acta Zoologica Lilloana**, v.9, p. 455-463, 1950.
- BIANCHI, N. O.; BIANCHI, M.; VIDAL-RIOJA, L. Heterochromatin late replication and secondary constrictions in the chromosome complement of *Leptodactylus ocellatus*. **Caryologia**, v.26, n.3, p. 397-403, 1973.
- BOGART, J. P. A Karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). **Copeia**, v.3, p. 728-737, 1974.
- BUSIN, C. S.; VINCIPROVA, G.; RECOO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica.**, v. 110, p. 131-141, 2001.



CUEVAS, C. C.; FORMAS, J. R. Cytogenetic analysis of four species of the genus *Alsodes* (Anura: Leptodactylidae) with comments about the karyological evolution of the genus. **Hereditas**, v.138, p. 138-147, 2003.

DENARO, L.. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. **Journal of Herpetology**, v.6, n.1, p. 71-74, 1972.

GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. Nomenclature for chromosomes. In: GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. **Amphibian cytogenetics and evolution**. San Diego: Academic Press, 1991, p. 431-432..

HEYER, W. R.; DIMENT, M. J. The karyotype of *Vanzolinius discodactylus* and comments on usefulness of karyotypes in determining relationships in the *Leptodactylus*-complex (Amphibia, Leptodactylidae). **Biological Society of Washington.**, v.87, n. 29, p. 327-336, 1974.

HEYER, W. R. The adaptative ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v.24, p. 421-428, 1969.

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

KASAHARA, S.; SILVA, A. P. Z.; GRUBER, S. L. Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p. 471-476, 1998.

KING, M. C-Banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma**, v.80, p. 191-217, 1980.

KING, M. Amphibia. In: JOHN B. **Animal cytogenetics**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1990a, p. 2.



KING, M.; CONTRERAS, N.; HONEUCUTT, R. L. Variation within and between nucleolar regions in Australian hyloid frogs (Anura) shown by 18S and 28S *in situ* hybridization. **Genetica**, v.80, p. 17-29, 1990b.

KING, M. Evolution of heterochromatin in the Amphibian genome. In: GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. **Amphibian cytogenetic and evolution**. San Diego: Academic Press, 1991, p. 431-432..

KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. **Fukuoka Univ. Educ. Part. III**, v.39, p. 83-127, 1990.

LEVAN, A.; FREDGA, K., SANDBERG. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p. 201-220, 1964.

LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO A. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosome Research**, v.6, p. 621-628, 1998.

LOURENÇO, L. B.; GARCIA, P. C. A.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. **Hereditas**, v.133, p. 201-209, 2000.

LOURENÇO, L. B.; GARCIA, P. C. A.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetics of *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae), with the description of an apparent case of pericentric inversion. **Amphibia-Reptilia**, v.24, p. 47-55, 2003.

LYNCH, M. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. **University Kansas Museum of Natural History**, v.1, p. 238, 1971.

ROSA, C.; AGUIAR, O. Jr.; GIARETTA, A. A.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in a leptodactylid frog. **Copeia**, v.1, p. 166-174, 2003.



RUIZ, I. R.; SOMA, M.; BEÇAK, W. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). **Cytogenetic and Cell Genetics**, v.29, p. 84-98, 1981.

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

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT- rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, v. 77, p. 83-103, 1980.

SCHMID, M.; HAAF, T.; SCHEMPP, W. Chromosome banding in Amphibia. IX. the polyploidy karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma**, v.91, p. 172-184, 1985.

SCHMID, M.; HAAF, T.; SCHEMPP, W. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenetic and Cell Genetic**, v. 62, p. 42-48, 1993.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v. 58, p. 307-324, 1976.

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

SIQUEIRA-Jr, S.; ANANIAS, F.; RECCO-PIMENTEL, 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**, v.27, n.3, p. 363-372, 2004.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyma, 1990.

SINCLAIR, J. H.; BROWN, D. D. Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics. **Biochemistry**, v.10, p. 2761-2769, 1971.

WILEY, J. E.; LITTLE, M. L.; ROMANO, M. A.; BLOUNT, D. A.; CLINE, G. R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. **Chromosoma**, v. 97, p. 481-487, 1989.



Artigo 2

Análise de Marcadores RAPD em espécies de *Leptodactylus* (Leptodactylidae, Anura) de habitat poluído e não poluído

I. Introdução

A variação genômica em Amphibia é impressionante, desde 5 pg de DNA por núcleo diplóide em *Xenopus laevis* até 165 pg de DNA no núcleo diplóide da salamandra *Necturus maculosus*. O tamanho modal em Anura oscila de 9 a 10 pg de DNA. Valores elevados de DNA fornecem um importante reservatório para a produção de novos genes.

Os fatores evolucionários que determinam as mudanças nos números diplóides de espécies relacionadas são, provavelmente, diferentes daqueles que determinam a variabilidade no tamanho do genoma.

Juntamente com os estudos citogenéticos, as análises moleculares têm sido importantes para o esclarecimento de aspectos genético-evolutivos. Avise (1975) e Buth (1984) enfatizaram a importância da técnica de eletroforese (estudo molecular) nas pesquisas. O benefício prático desta técnica é que uma quantidade pequena de amostras rende dados taxonômicos consideráveis.

Vários trabalhos em Amphibia têm combinado análises citogéticas com estudos moleculares, uma tendência cada vez mais imponente na sistemática moderna, pois oferece visões mais generalistas sobre os organismos alvos de estudo (Green, 1993; Odierna *et al.*, 2000).



As relações evolucionárias das três ordens viventes de anfíbios (Lissamphibia) são de difícil resolução, particularmente devido às especializações morfológicas exclusivas. Tradicionalmente, anuros e salamandras são considerados proximamente relacionados. Evidências utilizando seqüências de DNA de genes mitocôndriais contestam essa hipótese e suportam relações mais estreitas entre salamandras e cecílias. Esses dados, confrontados com registros fósseis e a distribuição das famílias, sugerem uma origem recente (Mesozóica) para as salamandras e cecílias, diretamente ligada ao início do desmantelamento do supercontinente Pangea. Este evento geológico isolou as salamandras e os archaeobatráquios ao norte (Laurásia), e as cecílias e os neobatráquios ao sul (Gondwana). Nos anuros neobatráquios, evidências moleculares suportam clados sul-americanos e africanos (Feller & Hedges, 1998).

Em estudo recente, utilizando seqüências parciais de genes das proteínas nucleares Rag-1, Rag-2 e rodopsina, compreendendo 2616 nucleotídeos, complementado por seqüências dos genes RNAr 12S e 16S, de 26 espécies de 18 famílias, Hoegg *et al.* (2004) suportaram a monofília das rãs modernas (Neobatrachia). Os neobatráquios contêm dois clados bem robustos que correspondem às subfamílias Ranoidea (Hyperoliidae, Mantellidae, Microhylidae, Ranidae, e Rhacophoridae) e Hyloidea (Bufonidae, Hylidae, Leptodactylidae, Pseudidae). Outras duas famílias (Heleophrynidae e Sooglossidae) ocuparam posições basais e representam provavelmente antigas relíquias dentro do Neobatrachia.

Atualmente, muitos métodos estão disponíveis para analisar a diversidade molecular, em espécies de animais e vegetais. Em geral, as diferenças nos métodos, e nas técnicas está na capacidade das mesmas em revelar a variabilidade do DNA, e

assim, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, populações e espécies, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade (Milach, 1998).

Os marcadores moleculares baseados em DNA permitem ampla cobertura genômica e tornam-se assim ferramentas poderosas para o estudo de genética de populações. Entre as técnicas para a detecção de marcadores moleculares que utilizam o princípio do PCR, podem ser destacadas as técnicas de RFLP, RAPD e microssatélites.

A técnica de RAPD, utilizando uma seqüência de *primer* curto promove uma varredura no genoma dos organismos. A análise do genoma sem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência, o custo relativamente baixo e a exigência de poucos nanogramas de DNA genômico representam as principais vantagens do uso desta técnica no estudo de populações. Assim, o método RAPD-PCR tem sido utilizado com sucesso para a detecção de variações intra e interespecíficas (Foo *et al.*, 1995; Sultmann *et al.*, 1995; Callejas & Ochando, 1998).

A grande inconveniência dos marcadores de RAPD é de serem de natureza dominante, pois este modelo de herança não permite a identificação dos produtos de diferentes *loci*. Ao se observar uma banda no gel, não é possível inferir se aquele segmento originou-se a partir de uma ou de duas cópias de seqüência amplificada.

Apesar disto, esta técnica tem sido utilizada na sistemática moderna, caracterizando novos agrupamentos de táxons (Comincini *et al.*, 1996). Mamuris *et al.* (1999) ao compararem diferentes técnicas de biologia molecular em espécies de peixes: aloenzimas, mtDNA e RAPD, concluíram que, embora o RAPD não tenha suplementado nenhuma informação taxonômica, provou ser uma técnica de rápida discriminação e extremamente confiável. Espinosa & Borowsky (1998) ressaltaram a

importância da escolha dos táxons em ensaios de RAPD-PCR, pois as taxas de polimorfismos variam enormemente entre grupos de animais muito divergentes (primatas, antílopes, *Drosophila*), porém, dentro de táxons mais basais, o RAPD torna-se extremamente útil.

Echeverrigary *et al.* (2001) testaram a aplicabilidade da análise de RAPD na identificação de indivíduos pertencentes a duas subespécies de cascavéis sul-americanas. Os resultados revelaram várias bandas espécie-específicas, e o dendrograma gerado mostrou três grupos, que correspondem às duas subespécies de *Crotalus* e o espécime de *Bothrops jararaca*, foi utilizado para comparação dos padrões de variação interespecífica. Esse trabalho corroborou a idéia mais ou menos generalizada do potencial dos marcadores de RAPD no reconhecimento de novas espécies.

Almeida *et al.* (2001), ao correlacionarem os resultados da variabilidade genética detectada por marcadores RAPD em três espécies de peixe-gato, com aspectos ecológicos das espécies, observaram uma grande estruturação genética entre as populações de espécies sedentárias. Em geral, esse padrão ocorre em espécies sedentárias, enquanto que, nas espécies migratórias, a estruturação genética é baixa, no entanto apresenta uma maior variabilidade genética.

A observação final que pode ser apontada é a de que a análise e caracterização da variabilidade genética nas diferentes espécies animais é importante, pois o conhecimento prévio da estrutura de populações nos permite o manejo das mesmas, com fins conservacionistas, e que a técnica de RAPD tem sido utilizada com sucesso nas análises de estrutura populacional, podendo fornecer informações adicionais a estudos sistemáticos e filogenéticos.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os marcadores RAPD em espécimes de quatro espécies de *Leptodactylus* (Leptodactylidae) de duas populações diferentes, a fim de obter informações sobre a estrutura genética das espécies.



II. Material e Métodos

A. Espécimes

Foram avaliados pela técnica de RAPD, 48 espécimes representativos de quatro espécies: *Leptodactylus podicipinus*, *L. ocellatus*, *L. labyrinthicus* e *L. fuscus*. De cada espécie foram analisados doze indivíduos, sendo seis de ambiente poluído (S. J. Rio Preto-SP) e seis de ambiente não poluído (Nova Itapirema-SP).

B. Extração e Purificação do DNA Genômico

Na extração de DNA dos 48 espécimes para o preparo do DNA "template", foram utilizados fragmentos de músculo, conservados a -20°C. Um pedaço de tecido foi recortado repetidas vezes em uma placa de Petri com 1 mL de solução salina de Hanks e os fragmentos transferidos para eppendorf. Após centrifugação a 5.000 rpm (10'), o sobrenadante foi retirado e, para a extração do DNA, foi feita a lise das células com a adição de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, SDS 20%, 10 ug/mL RNase), seguida da digestão enzimática com proteinase K (200 ug/mL). A solução foi mantida a 37°C, *overnight*, após o que foi centrifugada, as proteínas precipitadas com 0,5 volume de acetato de potássio (5M), e o DNA precipitado pela adição de 2,5 V de etanol absoluto gelado. O DNA foi recolhido e diluído em tampão TE (10mM Tris/1 mM EDTA).

A fim de se obter uma melhor qualidade do DNA para os ensaios de RAPD, foi realizada uma limpeza com fenol e clorofórmio. Para isso foi adicionado 0,5 V de fenol no DNA previamente extraído e, após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, ao qual foi adicionado 0,5 V de clorofórmio e o material levado à nova centrifugação. O sobrenadante foi recolhido em eppendorf limpo e o DNA precipitado com etanol gelado.

C. Oligonucleotídeos

Para a amplificação do DNA e verificação dos polimorfismos RAPD, foi utilizada uma série de sete *primers* aleatórios sintetizados artificialmente pela Life Technologies do Brasil Ltda, discriminados abaixo com os códigos de referência e segundo o seu conteúdo de G-C (em %)

Primer 01: GGAACG GGG T (60%)

Primer 02: CAG CAC CCA C (70%)

Primer 03: GTT GCG ATC C (60%)

Primer 04: ACA CCG GAA C (60%)

Primer 05: GAC TGC CTC T (60%)

Primer 06: AGC AGC GCA C (70%)

Primer 07: AGA CGA TGG G (60%)

D. Amplificação do DNA

O DNA genômico extraído foi seletivamente amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo protocolo descrito por Williams *et al.* (1990), com modificações. As amostras foram preparadas em volumes de 15 µl contendo a



seguinte mistura de reagentes e concentração: MgCl_2 (5,0 mM), dNTPs (200 μM), *primer* (50 pmol), BSA (0,5 $\mu\text{g/mL}$), DNA (25 ng) e Taq polimerase (1U), além de tampão de reação e água milli-Q em volume variável.

Os ciclos de amplificação consistiram em uma etapa inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 43 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 35°C (anelamento), 2 minutos a 72°C (extensão), finalizando com 5 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram mantidos a -4°C até a sua utilização.

E. Detecção dos Fragmentos

Para a distinção e identificação dos fragmentos amplificados, uma amostra de 8 μl de cada produto de amplificação por PCR foi aplicada em gel de poliacrilamida 8% (Bis-Acrilamida 30%, TBE 10X, Glicerol, APS 10% e TEMED). Em cuba de eletroforese vertical, na presença de tampão TBE 1X (Trizma Base, Ácido Bórico e EDTA 0,5 M, pH 8,0) o gel foi exposto a um campo elétrico de 120 volts por 5 horas à temperatura de 25°C. Os fragmentos gerados por amplificação foram visualizados após fixação (Etanol 10%, ácido Acético Glacial 0,75%) e coloração do gel com nitrato de prata, seguido de revelação (Hidróxido de sódio, Formaldeído). Os géis foram secos e preservados envoltos em película de celofane com glicerol 10%.

F. Análise e Registro das Bandas

Os fragmentos produzidos de cada amplificação foram analisados diretamente no gel, considerando-se a presença ou ausência das bandas, bem como a intensidade



e o tamanho, este último comparado através de tamanho molecular padrão (100 pb DNA ladder – Biolabs). O tamanho de cada banda amplificada no gel foi estimado em pares de bases, através do software LabImage 2.7.1 a partir da posição do marcador de peso molecular com tamanho pré-estabelecido. As bandas com uma variação de até 5 pb foram consideradas de mesmo tamanho.

Para a padronização da análise foram utilizadas as seguintes premissas:

1-) a interpretação das bandas nos géis é inambígua, ou seja, “alelos” de *loci* diferentes não migram na mesma posição em um gel, portanto, o analisador é capaz de fazer a correspondência entre bandas de diferentes espécimes, mesmo em géis diferentes;

2-) cada locus pode ser tratado como um sistema de dois alelos, com um dos alelos sendo amplificado pela PCR. O alelo “nulo” tem a sua amplificação impedida devido à perda ou ao não reconhecimento de um sítio prévio de iniciação.

Todas as bandas nítidas, fortemente coradas pela prata, foram consideradas. As bandas que foram amplificadas apenas nos doze indivíduos de uma espécie, independente do ambiente, foram consideradas espécie-específica.

As bandas detectadas foram identificadas por números e registradas para cada indivíduo. Com os dados de presença (1) ou ausência (0) das bandas, foi construída uma matriz binária, que foi utilizada na análise numérica e filogenética.

Para as análises numéricas foi utilizado o software Popgene versão 1.31, que estimou o número de bandas polimórficas, a diversidade gênica detectada por cada *primer* e no conjunto de *primers*, para as espécies separadamente e em cada ambiente, e para o conjunto de espécies nos dois ambientes.

O índice de diversidade gênica foi calculado segundo Nei (1978), e segundo Shannon-Weaner (Lewontin, 1972). A identidade genética e as distâncias genéticas entre os espécimes seguiram Nei (1973). Os dados também foram usados para uma análise de cluster através de UPGMA (incluído no software Pop Gene).

Uma filogenia sem polarização de caracteres (grupo externo) foi obtida a partir do software PAUP, versão 4.0b/0, utilizando-se os algoritmos UPGMA e Neighbor Joining e, como medida de apoio estatístico, foi feito o teste de bootstrap com 100 réplicas.



III. Resultados

A. Padrão dos Fragmentos RAPD e Frequências de Polimorfismos

Apesar da simplicidade da técnica de RAPD, algumas etapas do método são críticas para o sucesso dos experimentos. Durante as amplificações no processo de RAPD, no presente trabalho, a adequação da concentração de cloreto de magnésio na reação foi crítica. Inicialmente, as reações de amplificações foram realizadas segundo o protocolo proposto por Ferreira & Gattapaglia (1996), que prevê uma mistura e concentração de: $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTPs (200 μM), *primer* (50 pmol), BSA (0,5 $\mu g/mL$), DNA genômico (25 ng), Taq DNA polimerase (1U) e tampão de reação e água milli-Q em volume variável. Com estas concentrações, os experimentos de amplificação não produziram fragmentos, no entanto, ao alterar-se a concentração de $MgCl_2$ de 1,5 mM para 5 mM, o número de bandas geradas aumentou significativamente.

Os fragmentos gerados na amplificação por PCR com a utilização dos *primers* decaméricos aleatórios foram selecionados seguindo os padrões pré-estabelecidos: intensidade suficiente, visualização nítida das bandas adjacentes e presença em, no mínimo, um espécime, portanto com uma frequência de pelo menos 2,08%.

As figuras 1, 2 e 3 ilustram os aspectos gerais das bandas geradas pela amplificação do DNA genômico com os *primers* 1, 3 e 6, para as quatro espécies, subdivididas em oito populações, cada uma representada por seis indivíduos. As imagens foram escolhidas para ilustrar os aspectos gerais das bandas produzidas. Nas amplificações que esses géis representam, assim como nas demais (não

ilustradas), foram observadas variações na intensidade das bandas, refletindo diferenças na quantidade dos produtos de amplificação dos fragmentos e variações no tamanho dos fragmentos produzidos, que variaram de 700 a 100 pares de bases (pb).



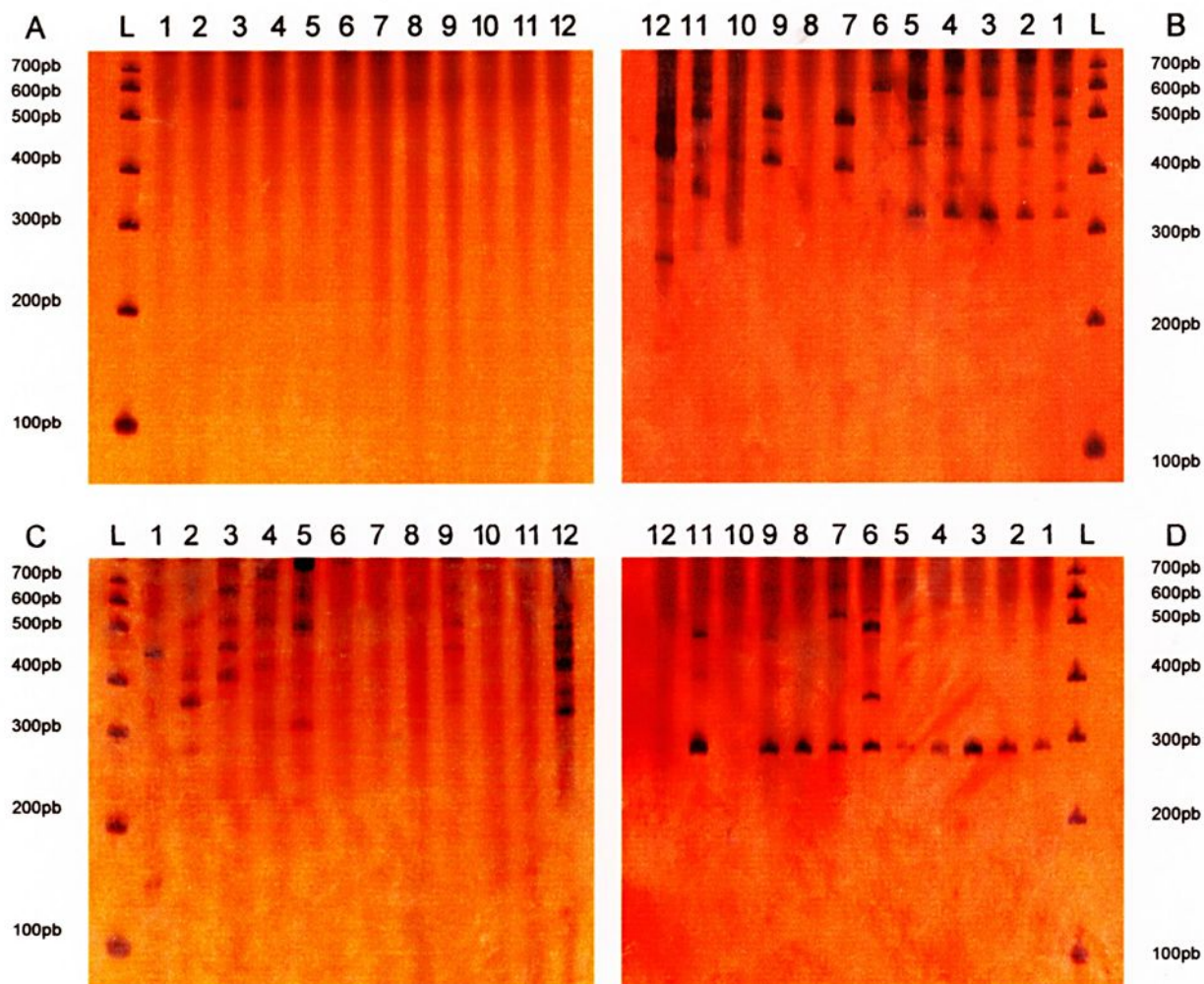


FIGURA 1: Perfil do gel de RAPD para o *primer* 1 nas quatro espécies. A. *L. podicipinus*, B. *L. ocellatus*, C. *L. labyrinthicus* e D. *L. fuscus*. As colunas 1 a 6 representam os espécimes de S. J. Rio Preto e as colunas 7 a 12 os espécimes de N. Itapirema. L = padrão de peso molecular (100 pb).

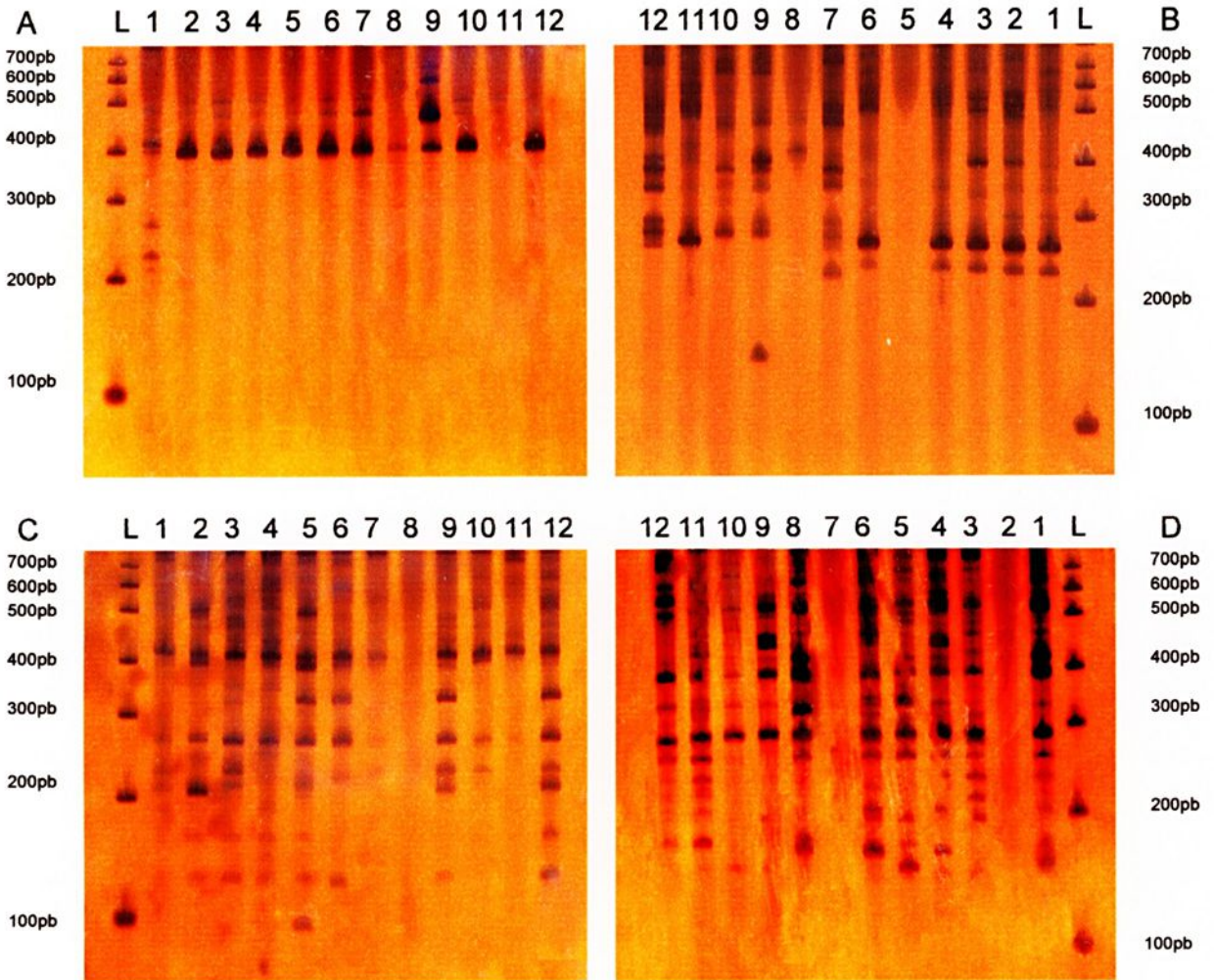


FIGURA 1: Perfil do gel de RAPD para o *primer 3* nas quatro espécies. A. *L. podicipinus*, B. *L. ocellatus*, C. *L. labyrinthicus* e D. *L. fuscus*. As colunas 1 a 6 representam os espécimes de S. J. Rio Preto e as colunas 7 a 12 os espécimes de N. Itapirema. L = padrão de peso molecular (100 pb).



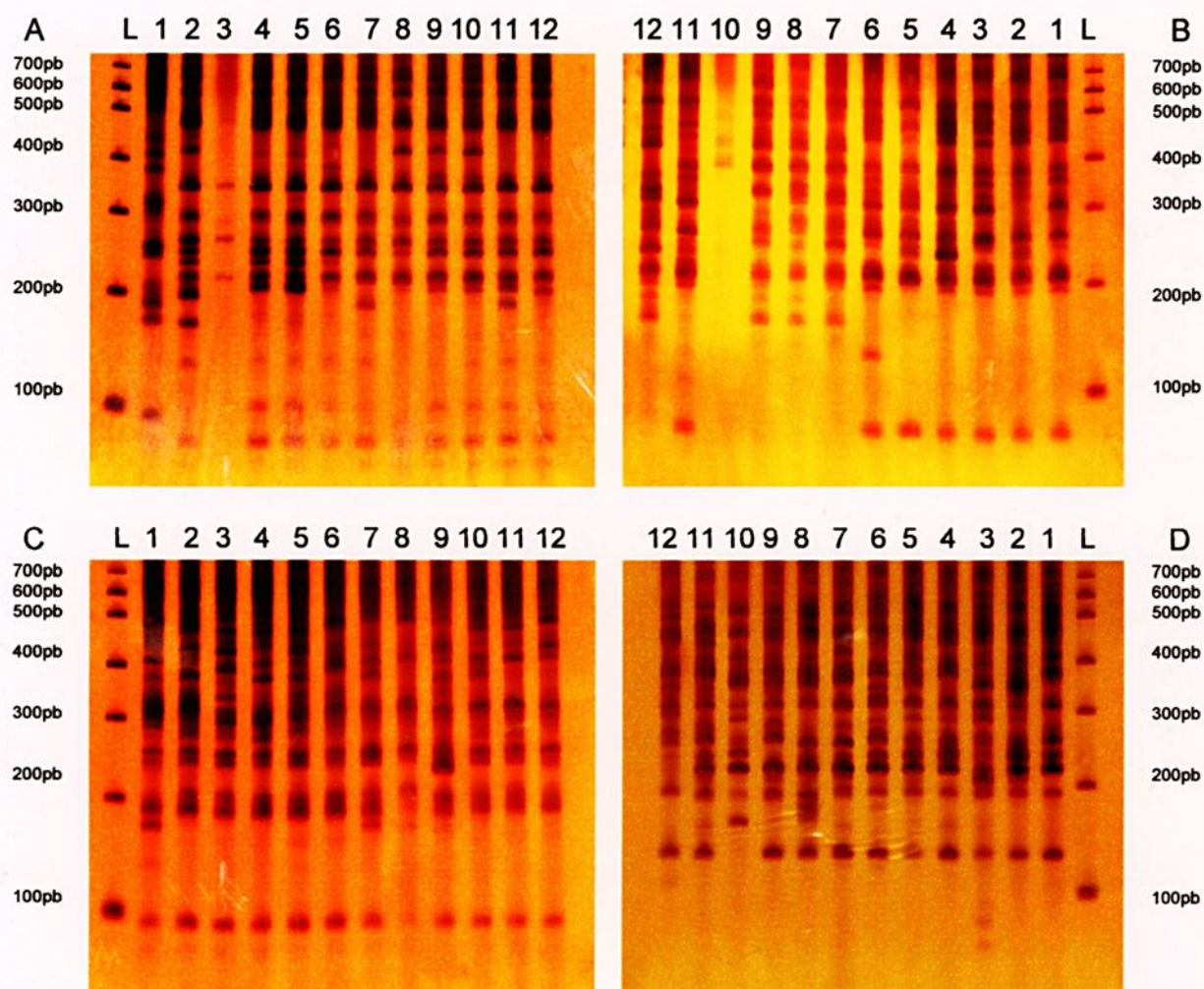


FIGURA 1: Perfil do gel de RAPD para o *primer* 6 nas quatro espécies. A. *L. podicipinus*, B. *L. ocellatus*, C. *L. labyrinthicus* e D. *L. fuscus*. As colunas 1 a 6 representam os espécimes de S. J. Rio Preto e as colunas 7 a 12 os espécimes de N. Itapirema. L = padrão de peso molecular (100 pb).

A análise dos géis e das bandas produzidas por RAPD permitiu verificar que os setes *primers* foram hábeis para produzir um número satisfatório de bandas para as análises propostas.

O número de bandas produzidas pelos diferentes oligonucleotídeos nos indivíduos das quatro espécies e nos dois ambientes está apresentada na Tabela 1. O total de bandas produzidas no conjunto de *primers* e indivíduos foi de 267, e os melhores oligonucleotídeos, ou seja, aqueles que individualmente produziram o maior número de bandas foram os *primers* 2, 6 e 7, com 45, 47 e 55 fragmentos produzidos respectivamente. Diferentes destes, os *primers* 1 e 4 foram os que produziram o menor número de fragmentos (23 e 17).

Ao observarmos os *primers* e as espécies individualmente, podemos notar que o número total de bandas produzidas variou dentro das espécies, quando considerados os dois ambientes, e entre as espécies (Tabela 1).

TABELA 1. *Primers* e número de bandas produzidas em cada espécie de acordo com a localidade. SJRP = S. J. do Rio Preto (poluído); NI = Nova Itapirema (não poluído).

Espécie/Localidade									
Primer	<i>L. podicipinus</i>		<i>L. ocellatus</i>		<i>L. labyrinthicus</i>		<i>L. fuscus</i>		
	SJRP	NI	SJRP	NI	SJRP	NI	SJRP	NI	Total
1	2	0	12	12	13	11	6	7	23
2	20	21	18	18	24	16	25	23	45
3	11	3	14	18	26	16	18	23	39
4	0	0	2	3	6	9	2	5	17
5	17	17	22	26	16	12	23	22	41
6	30	24	21	23	27	26	24	26	47
7	34	23	19	23	19	20	23	25	55
Total	114	88	107	123	131	110	131	131	267

Além da variação no número total de bandas, o número de bandas polimórficas, ou seja, aquelas que não estão presentes em todos os indivíduos de uma espécie, também apresentou variação, conforme pode ser observado na Tabela 2. As maiores frequências de polimorfismos foram detectadas pelos *primers* 3 (96,2%), 1 (82,2%) e 5 (77,0%). No entanto, algumas populações foram mais polimórficas com a utilização de outros *primers*, como por exemplo, a população de *L. fuscus* de N. Itapirema-SP, que apresentou 100% para o *primer* 7, indicando que há diferenças na detecção de polimorfismos pelos diferentes *primers*.



TABELA 2. Número de bandas totais (T) e polimórficas (P) e frequências relativas (Fr) e médias (Fm) das bandas polimórficas produzidas pelos *primers* nas quatro espécies nos dois ambientes analisados. * = três maiores frequências; SJRP = S. J. Rio Preto (ambiente urbano poluído), NI = Nova Itapirema (ambiente rural)

Primer	<i>L. podicipinus</i>					<i>L. ocellatus</i>				<i>L. labyrinthicus</i>				<i>L. fuscus</i>				Fm
	SJRP		NI			SJRP		NI		SJRP		NI		SJRP		NI		
	T	P	Fr	P	Fr	P	Fr	P	Fr	P	Fr	P	Fr	P	Fr	P	Fr	Fm
1	23	2	100%	0	0,00%	9	75,0%	12	100,0%	13	100%	11	100%	5	83,3%	7	100%	82,2% *
2	45	9	45,0%	12	66,6%	12	66,6%	13	72,2%	14	58,3%	4	25,0%	22	88,0%	21	95,2%	64,6%
3	39	10	90,9%	3	100%	14	100%	16	94,4%	22	84,6%	16	100%	18	100%	23	100%	96,2% *
4	17	0	0,00%	0	0,00%	2	100%	3	100%	5	83,3%	9	100%	2	100%	5	100%	72,9%
5	41	17	100%	14	82,3%	10	45,4%	23	88,4%	7	43,7%	10	83,3%	19	82,6%	20	90,9%	77,0% *
6	47	29	96,6%	11	45,8%	5	23,8%	23	100,0%	13	48,1%	13	50,0%	15	62,5%	19	73,0%	62,4%
7	55	31	88,2%	13	56,5%	9	47,3%	19	82,6%	12	63,1%	15	75,0%	20	86,9%	15	100%	74,9%
Total	267	97		55		61		109		86		78		101		110		
Fm			74,4%		50,2%		64,4%		91,0%		68,7%		76,1%		86,1%		94,1%	

Ao observarmos os valores médios de polimorfismos nas diferentes populações, é possível notar que as maiores frequências ocorreram nas populações de Nova Itapirema, para três das quatro espécies (*L. ocellatus*, *L. labyrinthicus* e *L. fuscus*). Nos indivíduos da espécie *L. podicipinus*, o padrão obtido foi o inverso ao observado nas outras espécies.

As espécies com as maiores diferenças na variação polimórfica, quando comparados os dois ambientes, foram *L. podicipinus* e *L. ocellatus*.

Na média, as frequências de bandas polimórficas de cada espécie, considerados os dois ambientes e no conjunto dos sete *primers*, foram: *L. podicipinus* (62,3%); *L. ocellatus* (77,7%); *L. labyrinthicus* (72,4%) e *L. fuscus* (90,1%). Apesar de não ter havido grande diferença na frequência de polimorfismos, detectada entre os indivíduos de *L. fuscus* das duas populações, essa espécie foi a mais polimórfica.

Apesar de raras, foram identificadas algumas bandas monomórficas, ou seja, aquelas presentes em todos indivíduos das duas populações de uma só espécie. Em *L. labyrinthicus* foram identificadas 27 bandas, representando 11,2% do total, e em *L. ocellatus* apenas duas bandas monomórficas foram identificadas (0,86%).



B. Similaridade Genética

No presente trabalho, foram avaliadas três diferentes situações: 1) a diversidade de oito populações representadas pelos seis indivíduos de cada uma das quatro espécies, nos dois ambientes, para cada *primer* separadamente; 2) para o conjunto de sete *primers* e 3-) a análise de quatro populações, representadas pelos doze indivíduos de cada espécie, independente do ambiente.

A análise de identidade genética foi efetuada considerando-se somente os resultados do conjunto de *primers*.

Os resultados das análises da variação genética efetuadas pelos cálculos dos índices de diversidade gênica segundo Nei (1973), diversidade de Shannon-Weaner (Lewontin, 1972) para cada uma das três situações, e ainda, de identidade genética segundo Nei (1978) estão apresentadas nas Tabelas 3 a 6.



TABELA 3. Valores médios da variação gênica (h) e do Índice de Shannon-Weaner (I) com base na análise dos 267 *loci* produzidos em cada *primer* pelos indivíduos das quatro espécies nos diferentes ambientes. SJRP = S. J. Rio Preto (ambiente urbano poluído), NI = Nova Itapirema (ambiente rural).

Primer	<i>L. podicipinus</i>				<i>L. ocellatus</i>				<i>L. labyrinthicus</i>				<i>L. fuscus</i>			
	SJRP		NI		SJRP		NI		SJRP		NI		SJRP		NI	
	h	I	h	I	h	I	h	I	h	I	h	I	h	I	h	I
1	0,01	0,05	0,01	0,02	0,12	0,19	0,18	0,27	0,20	0,30	0,15	0,23	0,06	0,10	0,10	0,16
2	0,06	0,10	0,09	0,14	0,09	0,13	0,09	0,15	0,13	0,19	0,03	0,04	0,19	0,28	0,19	0,28
3	0,07	0,12	0,03	0,04	0,13	0,19	0,17	0,25	0,23	0,33	0,17	0,24	0,25	0,37	0,21	0,32
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,05	0,08	0,11	0,11	0,17	0,17	0,26	0,03	0,05	0,10	0,15
5	0,16	0,24	0,15	0,22	0,09	0,13	0,20	0,30	0,05	0,08	0,10	0,15	0,19	0,28	0,19	0,28
6	0,21	0,32	0,08	0,13	0,04	0,06	0,17	0,26	0,10	0,15	0,11	0,16	0,12	0,18	0,14	0,22
7	0,17	0,27	0,08	0,13	0,06	0,10	0,13	0,19	0,07	0,10	0,10	0,14	0,15	0,22	0,09	0,14

TABELA 4. Valores médios da variação gênica (h) e do índice de Shannon-Weaner (I) gerados pela análise dos 267 fragmentos nas diferentes espécies e populações.

Populações	h	I
<i>L. podicipinus</i> (S. J. Rio Preto)	0,11	0,19
<i>L. podicipinus</i> (N. Itapirema)	0,08	0,11
<i>L. ocellatus</i> (S. J. Rio Preto)	0,08	0,12
<i>L. ocellatus</i> (N. Itapirema)	0,15	0,22
<i>L. labyrinthicus</i> (S. J. Rio Preto)	0,12	0,18
<i>L. labyrinthicus</i> (N. Itapirema)	0,11	0,16
<i>L. fuscus</i> (S. J. Rio Preto)	0,16	0,23
<i>L. fuscus</i> (N. Itapirema)	0,17	0,25

TABELA 5. Identidade genética (valores exibidos acima da diagonal) e distancia genética (valores representados abaixo da diagonal) segundo NEI (1978) entre as oito populações, após a avaliação dos 267 *loci*. SJRP = S. J. do Rio Preto, NI = Nova Itapirema.

Espécimes	<i>L. podicipinus</i> SJRP	<i>L. podicipinus</i> NI	<i>L. ocellatus</i> SJRP	<i>L. ocellatus</i> NI	<i>L. labyrinthicus</i> SJRP	<i>L. labyrinthicus</i> NI	<i>L. fuscus</i> SJRP	<i>L. fuscus</i> NI
<i>L. podicipinus</i> SJRP	****	0,96	0,771	0,83	0,78	0,83	0,84	0,86
<i>L. podicipinus</i> NI	0,04	****	0,75	0,81	0,74	0,79	0,81	0,82
<i>L. ocellatus</i> SJRP	0,26	0,29	****	0,81	0,73	0,74	0,79	0,80
<i>L. ocellatus</i> NI	0,18	0,21	0,21	****	0,79	0,81	0,84	0,87
<i>L. labyrinthicus</i> SJRP	0,25	0,30	0,31	0,23	****	0,95	0,78	0,79
<i>L. labyrinthicus</i> NI	0,20	0,24	0,31	0,21	0,06	****	0,83	0,84
<i>L. fuscus</i> SJRP	0,17	0,21	0,24	0,18	0,24	0,19	****	0,96
<i>L. fuscus</i> NI	0,15	0,19	0,22	0,14	0,23	0,17	0,04	****

TABELA 6 Identidade genética (valores exibidos acima da diagonal) e distancia genética (valores representados abaixo da diagonal) segundo NEI (1978) gerados pela análise dos 267 fragmentos nas 4 espécies. (independente do ambiente).

Espécie	<i>L. podicipinus</i>	<i>L. ocellatus</i>	<i>L. labyrinthicus</i>	<i>L. fuscus</i>
<i>L. podicipinus</i>	****	0,88	0,83	0,87
<i>L. ocellatus</i>	0,13	****	0,85	0,91
<i>L. labyrinthicus</i>	0,19	0,16	****	0,85
<i>L. fuscus</i>	0,13	0,10	0,16	****

Os valores médios da diversidade gênica (h) segundo Nei (1973) e Shannon-Weaner (h') obtidos na análise das oito populações estão apresentados na Tabela 3. Os dois índices mostraram equivalência nos valores obtidos para as populações.

Ao observarmos as tabelas 3 e 4, podemos notar que os valores de h correlacionaram-se positivamente com os valores observados para as frequências relativas das bandas polimórficas, ou seja, quanto maior o número de polimorfismos, maior a divergência genética. Todavia, não necessariamente, os *primers* com as maiores frequências polimórficas foram os que exibiram maior diversidade gênica.

No conjunto dos sete *primers*, as duas populações de *L. fuscus* apresentaram a maior variabilidade gênica, com valores de diversidade (h) igual a 0,16 e 0,17 nas populações de hábitat poluído e não poluído, respectivamente. As menores variações gênicas foram observadas em *L. podicipinus* (N. Itapirema) e *L. ocellatus* (S. J. Rio Preto), com 0,08.

As diferenças entre os valores de diversidade gênica da espécie nos dois ambientes variaram nas quatro espécies. Em duas delas, *L. podicipinus* e *L. labyrinthicus*, o menor valor de diversidade foi detectado para os indivíduos do hábitat não poluído (Nova Itapirema), enquanto que para *L. ocellatus* e *L. fuscus*, foram detectadas neste hábitat os maiores valores de diversidade. Notem que na verdade para *L. labyrinthicus* e *L. fuscus* praticamente não houveram diferenças entre o h dos 2 ambientes.



Nas tabelas 5 e 6 podem ser observados os valores de distância genética e identidade gênica, entre as populações e as espécies, respectivamente. Os maiores valores de identidade genética foram observados entre os indivíduos das duas populações de mesma espécie, especialmente entre os indivíduos das espécies *L. podicipinus* e *L. fuscus*, com valores de identidade igual a 0,96. O menor valor de identidade entre indivíduos da mesma espécie de diferentes populações foi observado em *L. ocellatus* (0,81).

Entre as espécies, os valores de identidade genética variaram de 82 a 90% (Tabela 6). O maior valor de identidade foi observado entre *L. ocellatus* e *L. fuscus* e o menor entre *L. podicipinus* e *L. labyrinthicus*.

Os agrupamentos determinados com base nas distâncias genéticas estão apresentados nas Figuras 4 e 5, que também ilustram as similaridades verificadas.

Somente os indivíduos de *L. ocellatus* não foram agrupados no dendrograma da Figura 4, que considerou as distâncias genéticas entre os indivíduos das duas populações. Geneticamente a população de *L. ocellatus* de Nova Itapirema está mais proximamente relacionada à população de *L. fuscus*, também de Nova Itapirema.

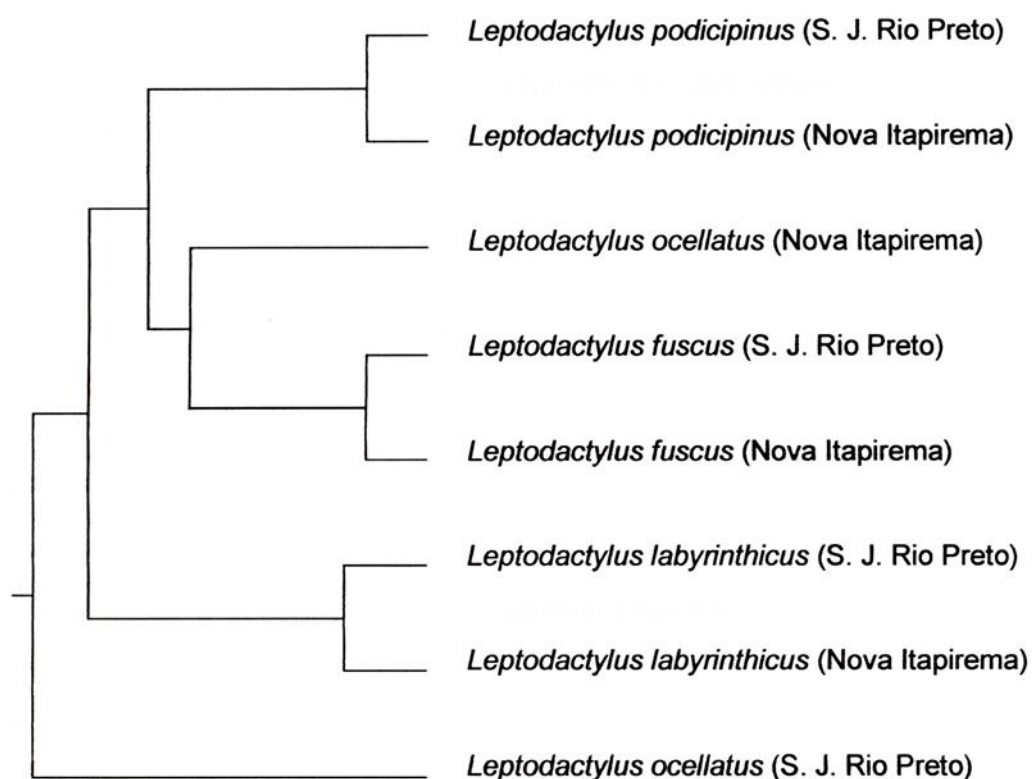


FIGURA 4: Dendrograma gerado para as populações de ambos ambientes pelo método UPGMA com base na distância genética de Nei (1978), calculada pela análise do total de bandas produzidas pelo conjunto de *primers*.

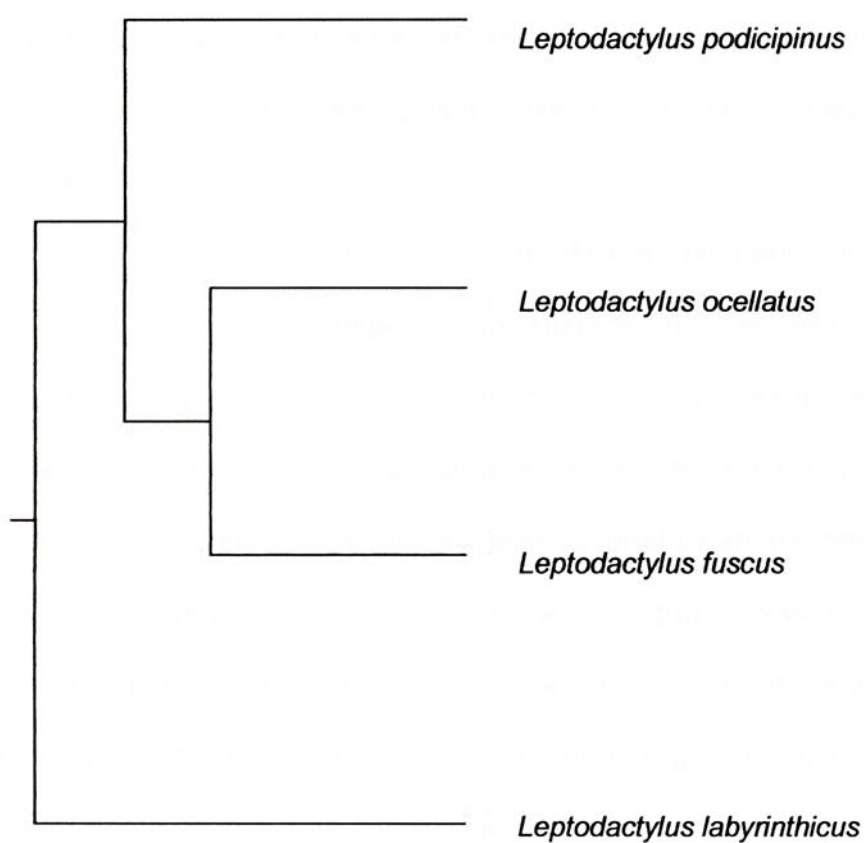


FIGURA 5: Dendrograma gerado para as espécies pelo método UPGMA com base na distância genética de Nei (1978), calculada pela análise do total de bandas produzidas pelo conjunto de primers.

C. Análise Filogenética

Na análise filogenética com base nos dados obtidos foram utilizados os algoritmos UPGMA e Neighbor-joining e aplicado o método de Bootstrap (com 100 réplicas) no software PAUP 4.0b. As análises foram baseadas no conjunto dos *primers*, e os resultados produziram duas árvores filogenéticas exibidas nas figuras 6 e 7.

Os dois métodos empregados (UPGMA e Neighbor-Joining) mostraram grande equivalência nos resultados, sem alteração na posição dos táxons dentro das árvores. Os dados foram semelhantes aos obtidos pela análise do programa Popgene. No caso do UPGMA, a utilização do mesmo algoritmo, e o fato do tipo de análise ser baseada nas distâncias gênicas, produziram os mesmos resultados no PAUP e no Popgene. Esse tipo de algoritmo agrupa as menores distâncias e recalcula novas distâncias através de médias aritméticas para novo agrupamento, enquanto que o Neighbor-Joining basicamente corrige o método UPGMA, com o seu pressuposto de que uma mesma taxa de evolução se aplica a todos ramos de uma filogenia. A matriz de distância é ajustada para diferenças nas taxas de evolução de cada táxon (ramo). O Neighbor-joining apresenta os melhores resultados em simulações e é computacionalmente o mais eficiente algoritmo de distância (Saitou & Imanishi, 1989).

A consistência da árvore foi efetuada pelo PAUP, utilizando o Bootstrap que testa o grau de confiabilidade da filogenia, os valores percentuais de cada nó interno estão demonstrados nas Figuras 6 e 7, e eles foram superiores a 65%.



Nota-se nas árvores que a espécie *L. labyrinthicus* apresenta-se em um ramo mais periférico, considerada a mais diferenciada das quatro espécies; por outro lado, as outras três espécies apresentam-se agrupadas em um ramo. Apesar de *L. podicipinus* estar presente no nó, as espécies *L. ocellatus* e *L. fuscus* aparecem mais proximamente relacionadas, pois compartilham o mesmo nó de dicotomia.



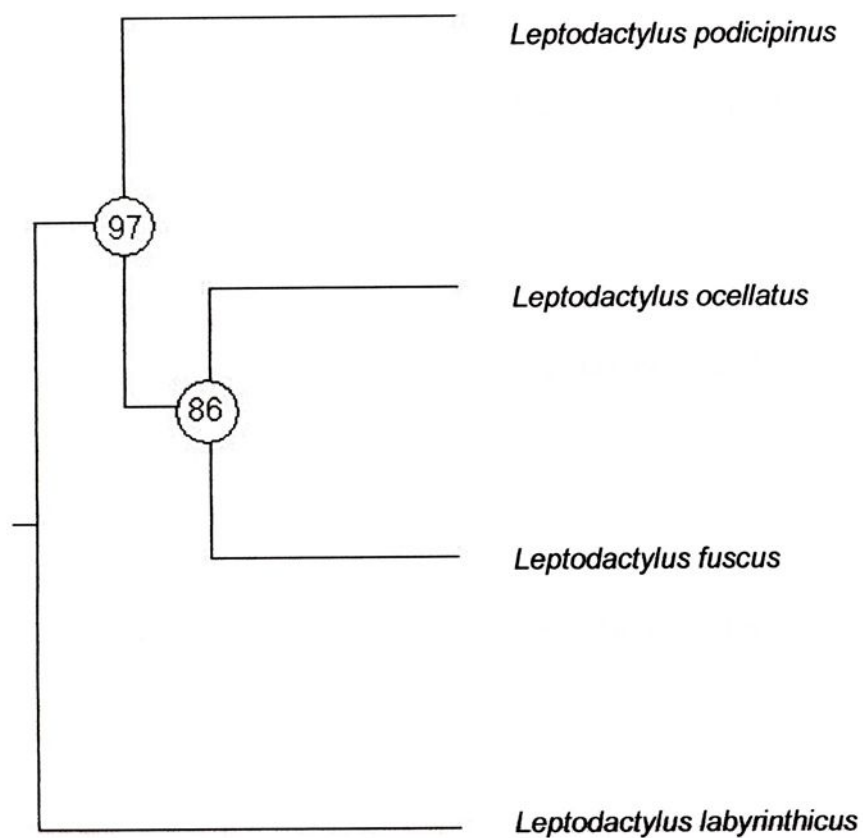


FIGURA 6: Dendrograma produzido pelo software PAUP, através na análise UPGMA para a filogenia das espécies do gênero *Leptodactylus*

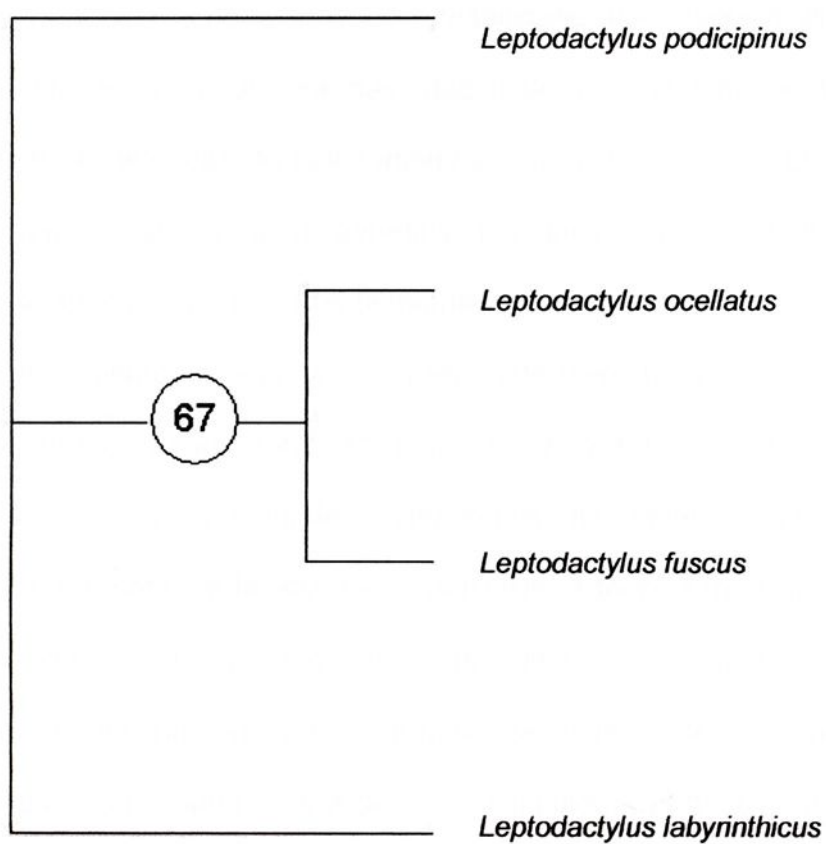


FIGURA 7: Dendograma produzido pelo software PAUP, através na análise Neighbor-Joining, apresentando equivalência com as outras análises.

IV. Discussão

As diferenças evolutivas das espécies podem ser mais bem compreendidas quando comparamos as variações dentro e entre as populações.

Em anfíbios, a persistência e a viabilidade das espécies estão diretamente relacionadas às variantes externas, que podem resultar na perda ou ganho de diversidade. A detecção de polimorfismos tem contribuído, em grande parte, para a compreensão das diferenças genéticas populacionais, pois ela fornece subsídios sobre a dinâmica de populações (Kreitman & Akashi, 1995).

Polimorfismos cromossômicos têm sido descritos para muitas espécies de *Anura* (Lourenço *et al.*, 1998; Medeiros *et al.*, 2003), e estes, em geral, estão relacionados com quantidades diferenciais de heterocromatina constitutiva, posição centromérica e localização das RONS. A técnica molecular de RAPD tem sido utilizada com sucesso em estudos populacionais em muitos organismos, pois ela detecta um número muito grande de polimorfismos genéticos, quando comparada com outras análises, constituindo, portanto, uma ferramenta importante na diferenciação das populações (Dergan *et al.*, 2002; Prioli *et al.*, 2002).

A técnica de RAPD tem sido amplamente empregada em estudos genéticos de populações, entretanto, devido às interações entre os componentes da reação de PCR é improvável que uma única condição de amplificação possa ser



adequada para todas as situações e organismos, havendo, portanto, a necessidade de se estabelecer *a priori* as condições ótimas da reação.

Considera-se que a eficiência da atividade da Taq polimerase e o anelamento dos *primers* dependem da concentração de $MgCl_2$, portanto, concentrações incorretas podem resultar em ausência ou baixa eficiência de amplificações e na produção de produtos não específicos (Carvalho & Vieira, 2001). Devido a sua importância para a reação de PCR-RAPD, o $MgCl_2$ segundo Yang & Quiros (1993), deveria ser otimizado para cada combinação espécie-*primer*, separadamente. Na prática, essa otimização nem sempre é viável, especialmente quando se considera um grande número de *primers* e espécies.

Após a adequação da técnica, pudemos obter, então, para o total de 48 espécimes, representando quatro espécies com doze indivíduos cada uma, e seis de cada ambiente (6 Nova Itapirema/ 6 S. J. Rio Preto), um total de 267 bandas, com os sete *primers* utilizados.

O número relativamente elevado de bandas deveu-se, principalmente, à utilização de gel de poliacrilamida para a separação dos fragmentos. Embora a maioria dos estudos com RAPD utilizem o gel de agarose em concentração variável de 1,0 a 2,0%, pela sua facilidade na confecção e na visualização das bandas, no presente trabalho a sua utilização não foi satisfatória. Ela apresentou significativa redução no número de bandas, quando comparada às bandas de um mesmo amplificado observado em gel de poliacrilamida. A diferença no número de bandas observadas está relacionada à composição dos dois polímeros, que apresentam diferenças nas malhas produzidas durante o processo de

polimerização. O número de bandas foi de fundamental importância nas análises, facilitando a detecção dos polimorfismos.

Em geral, os estudos de RAPD realizam uma seleção dos *primers* mais polimórficos para as análises estatísticas. No presente estudo, observou-se que mesmo os *primers* com baixa taxa de polimorfismos, no geral, apresentaram diferenças na comparação intra-específica. Megnegneau *et al.* (1993) discutiram a importância da combinação de diferentes *primers* nas análises moleculares, ressaltando que as bandas similares em diferentes indivíduos podem ser causadas por fragmentos diferentes de DNA de mesmo tamanho, uma vez que a técnica não diferencia seqüências. Portanto, a utilização de um grande número de bandas pode diluir os erros ocasionais de interpretação não afetando as conclusões gerais.

O menor número de bandas foi observado nos indivíduos de *Leptodactylus podicipinus*, fato provavelmente relacionado à utilização dos *primers* 1 e 4, que praticamente não amplificaram seqüências nesta espécie.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1996), diferenças nas bandas polimórficas devem-se, principalmente, a diferenças nas seqüências dos *primers*, no DNA da amostra e a especificidade do *primer* pelas seqüências a serem amplificadas (homologias).

Em *L. podicipinus*, as seqüências produzidas pelos *primers* 1 e 4 nas outras espécies, podem estar ausentes no genoma.

As maiores freqüências de polimorfismos foram encontradas nos exemplares de Nova Itapirema para três das quatro espécies. Somente para



indivíduos da espécie *L. podicipinus* que não foi alta, fato que pode ser responsabilizado pelos *primers* pouco polimórficos 1 e 4, que podem ter gerado esses resultados para a espécie. Não se deve deixar de mencionar aqui, o fato de que *L. podicipinus* é a espécie mais dependente da água, portanto, sujeita à poluição com maior intensidade, o que poderia provocar mutações no genoma dessa população e as variações detectadas como polimorfismo. Em *L. ocellatus*, a redução no número de bandas polimórficas na população de S. J. do Rio Preto é sugestiva de que esta população está mais bem adaptada às variações deste ambiente.

A redução na taxa de polimorfismos nos exemplares de S. J. do Rio Preto, também pode ser associada à forma de estruturação genética da população, decorrente de diferentes estratégias de dispersão dos indivíduos da espécie em diferentes ambientes. Shaffer *et al.* (2000), ao analisarem a seqüência do gene mitocondrial do citocromo b, de duas populações de *Bufo canorus* (Bufonidae), encontraram, em uma das populações (Yosemite), subestruturas genéticas variadas. Os autores sugeriram que o movimento de dispersão desses sapos provavelmente seja diferente entre as duas localidades.

Em geral, quanto maior o polimorfismo, maior a variabilidade genética, mas não necessariamente, é maior a diversidade gênica da população. Nas populações analisadas, os valores de polimorfismos e variabilidade gênica correlacionaram-se positivamente em três das quatro espécies. Apenas para *L. labyrinthicus* o valor da diversidade foi ligeiramente maior na população de S. J.



Rio Preto, onde a frequência de polimorfismo foi menor, embora a diferença não tenha sido significativa.

A presença de variabilidade dentro da espécie é de fundamental importância para a sobrevivência e o sucesso frente às mudanças ambientais.

Pelos valores de diversidade, à exceção de *L. podicipinus*, os maiores valores foram também observados nas populações de Nova Itapirema. Interessante é o fato de que a espécie *L. ocellatus*, pela descrição de Heyer (1969), também é uma espécie, juntamente com *L. podicipinus*, muito dependente de corpos d'água, porém diferente desta, o padrão de variação foi oposto, ou seja, um valor menor de diversidade nos indivíduos de S. J. Rio Preto.

É de se destacar, também, o padrão de variação de *L. labyrinthicus*, que não acompanhou o padrão de *L. fuscus*, espécies que, segundo Heyer (1969), são dependentes em menor grau da água que as outras espécies aqui estudadas. Em *L. labyrinthicus* os polimorfismos e a variação gênica (diversidade) correlacionaram-se inversamente.

Esses resultados sugerem que as populações de anfíbios estão respondendo às variantes ambientais de forma distinta. As duas populações das espécies, por estarem sob diferentes condições adaptativas, utilizam as "reservas de polimorfismos" no genoma diferentemente, sugerindo estratégias adaptativas diferentes (plasticidade). Esses fatos são corroborados pelos dados de similaridade genética observada entre as diferentes populações, especialmente em *L. ocellatus*.

Hitchings & Beebee (1998) compararam diversos aspectos biológicos de duas populações de *Bufo bufo* (Bufonidae), sendo uma urbana e outra rural. Os resultados revelaram uma perda de diversidade genética nos espécimes de ambiente urbano. Os autores mencionam como principal fator dessa perda de diversidade, as barreiras urbanas que impedem o fluxo gênico entre diferentes populações.

Embora o nosso estudo tenha levado em conta representantes das espécies consideradas como pertencentes às duas populações distintas (urbana, poluída e rural, não-poluída), o número de indivíduos analisados de cada uma foi o mesmo. A interpretação de variações na diversidade está sendo considerada apenas, levando-se em conta o aspecto variável, que é a diferença na natureza dos ambientes. Não é possível correlacionar os dados com padrões de dispersão e fluxo gênico da população, pois não se conhece o tamanho da população dessas espécies, e nem a sua área de distribuição completa (principalmente no ambiente urbano).

Os valores de identidade genética entre as quatro espécies mostraram que há uma maior similaridade genética entre *L. ocellatus* e *L. fuscus* (90%), e a menor similaridade foi observada entre as espécies *L. podicipinus* e *L. labyrinthicus*. Esses resultados foram observados também na análise filogenética.

A filogenia traçada para as quatro espécies do grupo *Leptodactylus*, através da técnica de RAPD, divergiu dos trabalhos publicados (Heyer, 1969; Larson & Sá, 1998), que utilizaram basicamente técnicas taxonômicas. A utilização de novos estudos, com o uso de técnicas recentes pode contribuir para a elaboração de

uma filogenia mais robusta e ainda, ajudar a esclarecer a natureza complexa da estruturação genética em populações de anfíbios.

V. Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo são interessantes, pois evidenciam que, apesar da persistência e variabilidade das diferentes espécies de anfíbios estar diretamente relacionada às variantes externas, cada espécie pode responder diferentemente a uma mesma condição ambiental. Esse fato pode ser observado nos resultados que mostraram:

- A. freqüências diferentes de polimorfismos entre indivíduos de espécies diferentes, em um mesmo ambiente e em ambientes diferentes;
- B. freqüências diferentes de polimorfismos, entre espécies diferentes em um mesmo ambiente e em ambientes diferentes;
- C. freqüências semelhantes de polimorfismos entre indivíduos de uma mesma espécie em ambientes diferentes;
- D. que as maiores freqüências de polimorfismos foram observadas entre os indivíduos de Nova Itapirema, área rural não poluída, à exceção para os indivíduos da espécie *L. podicipinus*, onde a maior freqüência foi observada na população de S. J. Rio Preto, considerada poluída;
- E. que de forma geral, a diversidade genética seguiu o padrão observado de polimorfismo, ou seja, os maiores valores de diversidade gênica foram



- observados nas populações de Nova Itapirema, à exceção do observado para *L. labyrinthicus*;
- F. que há independente do ambiente, uma maior similaridade genética entre *L. ocellatus* e *L. fuscus*, espécies para os quais o grau de dependência da água é diferente;
- G. A população de *L. ocellatus* proveniente de S. J. Rio Preto, apresentou a maior distância genética quando comparada a população da mesma espécie de área rural.

VI. Referências

ALMEIDA, F. S., FUNGARO M. H. P., SODRÉ L. M. K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. **Journal of Zoology**, London v.253, p. 113-120, 2001.

AVISE, J. C. Systematic value of the electrophoretic data. **Systematic Zoology**, v.23, p. 465-485, 1975.

BUTH, D. G. The application of the electrophoretic data in systematic studies. **Annual Review Ecology Systematics**, v.15, p. 501-522, 1984.

CALLEJAS, C.; OCHANDO D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. **Journal of Fish Biology**., v. 53, p. 208-215, 1998.

CARVALHO, A.O.C.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel. (Hymenoptera: Formicidae) **Neotropical Entomology**, v.30, p. 593-600, 2001.

COMINCINI, S.; SIRONI, M.; BANDI, C.; GIUNTA, C.; RUBINI, M.; FONTANA, F. RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. **Heredity**, v.76, p. 215-221, 1996.

DERGAN, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. L; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p. 379-387, 2002.

ECHEVERRIGARY, S.; GRAZZIOTIN, G.; GRAZZIOTIN, F.; AGOSTINI, G. Random Amplified Polymorphism between two South American subspecies of

Rattlesnakes (*Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*). **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.44, n.3, p. 1-8, 2001.

ESPINOSA, L.; BOROWSKY, R. Evolutionary divergence of AP-PCR (RAPD) patterns. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p. 408-14, 1998.

FELLER, A. E.; HEDGES S. B. Molecular evidence for the early history of living amphibians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.9, n.3, p. 509-516, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. Ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN. 1996. 220f.

FOO, C. L.; DINESH, K. R.; LIM, T. M.; CHAN, W. K.; ENGPAN, V. P. Inheritance of RAPD markers in the guppy fish. *Poecilia reticulata* **Zoological Science**, v. 12, p. 535-541, 1995.

GREEN, D. M. Evolutionary relationships of Eastern Palearctic Brown Frogs, genus *Rana*: paraphyly of the 24-chromosome species group and the significance of chromosome number change. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.109, p. 1-25, 1993.

HEYER, W. R. The adaptative ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v.24, p. 421-428, 1969.

HITCHINGS, S. P.; BEEBEE, T. J. C. Loss of genetic diversity and fitness in Common Toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. **Journal of Evolutionary Biology**, v.11, p. 269-283, 1998.

HOEGG, S.; VENCES, M.; BRINKMANN, H.; MEYER, A. Phylogeny and comparative substitution rates of frogs inferred from sequences of three nuclear genes. **Molecular Biology Evolutionary**, v.21, n.7, p. 1188-1200, 2004.



KREITMAN, M.; AKASHI, H. Molecular evidence for natural selection. **Annual review of Ecology Systematic**, v.26, p. 403-422, 1995.

LEWONTIN R. C. Apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, v.6, p. 381-398, 1972.

LARSON, P. M.; SÁ, R. O. Chondrocranial morphology of *Leptodactylus* larvae (Leptodactylidae: Leptodactylinae): its utility in phylogenetic reconstruction. **Journal of Morphology**, v.238, p. 287-305, 1998.

MAMURIS, Z.; STAMATIS, C.; BANI, M.; TRIANTAPHYLLIDIS, C. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA. **Journal of Fish Biology**, v.55, p. 572-587, 1999.

MAMURIS, Z.; STAMATIS, C.; BANI, M.; TRIANTAPHYLLIDIS, C. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA. **Journal of Fish Biology**., v. 55, p. 572-587, 1999.

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

MEGNEGNEAU, B.; DEBETS, F.; HOEKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergilli based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, v.23, p. 323-329, 1993.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S. C. K. Milach, 1998, v.1, p. 17-28.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p. 583-590, 1978.

ODIERNA, G.; ANDREONE, F.; APREA, G.; ARRIBAS, O.; CAPRIGLION, T.; VENCES, M. Cytological and molecular analysis in the rare discoglossid species, *Alytes muletensis* (SANCHIZ & ADROVER 1977) and its bearing on archeobatrachian phylogeny. **Chromosome Research**, v.8, p. 435-442, 2000.

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; Jr, H. F. J.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, M.; PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu river, Brazil based on mitochondrial DNA and RAPD Markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p. 421-430, 2002.

SAITOU N.; IMANISHI T. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. **Molecular Biology and Evolution**, v.6, n.5, p. 514-525, 1989.

SHAFFER, H. B.; FELLERS, G. M.; MAGGE, A.; VOSS, R. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) DNA mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Ecology**, v.8, p. 245-257, 2000.

SULTMANN, H.; MAYER, W. E.; FIGUEROA, F.; TICHY, H.; KLEIN, J. Phylogenetic analysis of cichlid fishes using nuclear DNA markers. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p. 1033-1047, 1995.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

YANG, X.; QUIROS, C. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p. 1033-1037, 1993.



