



LUCIANA BOLSONI LOURENÇO

ESTUDO CITOGENÉTICO COMPARATIVO DE
Edalorhina perezii* E *Physalaemus petersi
(AMPHIBIA, ANURA, LEPTODACTYLIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Luciana Bolsoni Lourenço e aprovada pela Comissão Julgadora 21/09/96 S. Recco-Pimentel

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular.

Orientadora
Prof. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

Campinas
1996



DATA	80
CHAMADA:	T/UNICAMP
	L934e
E.	
ABO BU/	29279
OC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
ECO	R\$ 11,00
PA	07/12/96
CPD	20009569-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

L934e

Lourenço, Luciana Bolsoni

Estudo citogenético comparativo de *Edalorhina perezi* e *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) / Luciana Bolsoni Lourenço. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Shirlei Maria Recco-Pimentel.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. Anfíbio. 3. Herpetologia. 4. Anuro. 5. Cromossomos - Polimorfismo. 6. Polimorfismo (Zoologia) 7. Heterocromatina. 8. Nucleolo. I. Recco-Pimentel, Shirley Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.



LOCAL E DATA: Campinas, 02 de setembro de 1996

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa.Dra. SHIRLEI MARIA RECCO-PIMENTEL
(Orientadora)

Prof. Dr. FAUSTO FORESTI

Prof.Dr. PEDRO MANOEL GALETTI JÚNIOR

SUPLENTE:

Profa.Dra. VERA NISAKA SOLFERINI

A handwritten signature in black ink, appearing to read "SM Recco-Pimentel", written over a horizontal line.

Assinatura

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Fausto Foresti", written over a horizontal line.

Assinatura

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pedro Manoel Galetti Júnior", written over a horizontal line.

Assinatura

Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Ana Maria e Marcos, às minhas tias, Maria Aparecida e Maria Henriqueta, e ao Marcelo.

Errata

1 - Na página 9, linha 20, onde se lê "Z", leia-se "W".

2 - Na página 25, linhas 12, 13 e 14, onde se lê "Outros dezesseis exemplares, duas fêmeas (ZUEC 96.20 e 96.24) e catorze machos (ZUEC 96.21, 96.25, 96.26, 96.39-96.49) foram coletados nas proximidades da foz do Tejo, nessa mesma reserva, em 27 de janeiro de 1996", leia-se "Outros **treze** exemplares, duas fêmeas (ZUEC 96.20 e 96.24) e **onze** machos (ZUEC 96.21, ~~96.25~~, 96.26, 96.39-**96.42**, **96.46**-96.49) foram coletados nas proximidades da foz do Tejo, ~~nessa~~ mesma reserva, em 27 de janeiro de 1996".

3 - Na página 28, linha 3, onde se lê "BEÇAK & BECAK (1968)", leia-se "STEPHENSON et al., 1972)".

4 - Na página 41, linha 20, onde se lê "Figura 15D", leia-se "Figura 15E";
linha 21, onde se lê "Figura 15E", leia-se "Figura 15D";
linha 26, onde se lê "Figura 15E", leia-se "Figura 15D".

5 - Introduzir no item "Referências bibliográficas": STEPHENSON, E.M., ROBINSON, E.S., STEPHENSON, N.S. Karyotype variation within the genus *Leiopelma* (Amphibia: Anura). *Can. J. Genet. Genet. Cytol.* 14: 691-702, 1972.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
I - INTRODUÇÃO	1
1. A posição taxonômica de Anura.....	1
2. A citogenética de Anura.....	1
2.1. Evolução cariotípica e estratégia de vida.....	6
2.2. Os cromossomos sexuais.....	7
3. As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) e a heterocromatina constitutiva como caracteres citogenéticos.....	12
3.1. As NORs.....	12
3.2. Heterocromatina constitutiva.....	17
4. As espécies <i>Edalorhina perezii</i> e <i>Physalaemus petersi</i>	22
5. Objetivos.....	24
II - MATERIAS E MÉTODOS	25
1. Os espécimes coletados.....	25
2. Obtenção das preparações cromossômicas.....	28
3. Métodos citoquímicos.....	28
4. Análise das preparações cromossômicas.....	29
III - RESULTADOS	30
1. <i>Edalorhina perezii</i>	30
1.1. Descrição morfológica dos cromossomos mitóticos.....	30
1.2. As regiões impregnadas por prata.....	30
1.3. O padrão de bandamento C.....	30
1.4. Os cromossomos meióticos.....	31
2. <i>Physalaemus petersi</i>	38

2.1. O cariótipo mais comum.....	38
2.1.1. Descrição morfológica dos cromossomos mitóticos.....	38
2.1.2. As regiões impregnadas por prata.....	39
2.1.3. Os padrões de bandamento C.....	41
2.1.4. Comparações estatísticas entre os diferentes morfos dos cromossomos 6, 8 e 9.....	42
2.1.5. Os cromossomos meióticos.....	43
2.2. O segundo cariótipo.....	58
2.2.1. Descrição morfológica dos cromossomos mitóticos.....	58
2.2.2. As regiões impregnadas por prata.....	58
2.2.3. O padrão de bandamento C.....	59
2.2.4. Os cromossomos meióticos.....	59
IV - DISCUSSÃO.....	66
1. Considerações gerais.....	66
2. NORs.....	66
3. Nucléolos.....	70
4. Heterocromatina constitutiva.....	71
5. A variabilidade cariotípica em <i>Physalaemus petersi</i> e <i>Edalorhina perezi</i>	74
6. Os cromossomos sexuais heteromórficos de <i>Physalaemus petersi</i>	78
7. A proposição de um novo táxon.....	80
8. Inferências filogenéticas.....	81
V - CONCLUSÕES.....	85
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel pela orientação indispensável à realização deste trabalho, pelo incentivo sempre oferecido e pelo exemplo de honestidade e dedicação profissional, que muito contribui para minha formação.

Ao Prof. Dr. Adão José Cardoso pelas sugestões na definição do grupo zoológico estudado, pela coleta dos espécimes analisados e pelas várias informações concedidas, imprescindíveis para o desenvolvimento do presente estudo.

Ao Moisés, aluno de doutorado do Departamento de Zoologia da UNICAMP, pela coleta de alguns espécimes utilizados neste trabalho.

Aos Profs. Drs. Fausto Foresti e Pedro Manoel Galetti Júnior e à Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini pela análise prévia deste trabalho e pelas importantes sugestões e discussões realizadas.

À Profa. Dra. Rita Avancini, do curso de pós-graduação do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, pelas sugestões feitas na análise do relatório parcial deste trabalho.

À Prof. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela revisão do texto em inglês.

À técnica do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, Klélia A. Carvalho, pela atenção, auxílio e amizade concedidos durante a realização deste estudo.

Aos colegas desse mesmo laboratório, Patrícia, Odair, Maurício, Márcio, Marta, Jairo, Guido, Josiane, Nádia, Flávia e, principalmente, ao Fernando, pelos auxílios prestados, pelas valiosas discussões realizadas e pela amizade conquistada. À Cinthia, aluna de mestrado do Departamento de Zoologia da UNICAMP pelas discussões bastante informativas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Departamento de Histologia da UNICAMP pela concessão do Laboratório Fotográfico para a confecção de algumas fotografias.

Aos professores do curso de pós-graduação em Biologia Celular da UNICAMP, que muito contribuíram para esta etapa de minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, Sidney, Líliam, Irma e, especialmente, à Cidinha, pelo eficiente auxílio prestado.

Ao Aparecido, funcionário do Departamento de Zoologia da UNICAMP, por toda a ajuda oferecida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos colegas de pós-graduação desse mesmo departamento pela amizade, companheirismo e pela descontração do dia-a-dia.

Aos professores e colegas do Curso de Graduação em Biologia do IBILCE-UNESP-São José do Rio Preto, que muito incentivaram o investimento na carreira científica, mostrando, com muita competência, a relevância e a beleza dessa área.

Aos amigos Daniela, Silvy, Patrícia, Adriana, Márcio e Juca pelo agradável convívio e pela oportunidade de relevantes descobertas.

À minha família, Marcos, Ana Maria, Maria Henriqueta, Maria Aparecida, Cleber e Lucimara, e ao Marcelo, pelo incentivo e compreensão sempre carinhosamente oferecidos. Ao Sr. Arcênio e Sra. Ivete pelo carinho e apoio sempre dispensados.

RESUMO

Foram analisados citogeneticamente sessenta e um espécimes de *Physalaemus petersi* e sete de *Edalorhina perezi* (Leptodactylidae, Anura), provenientes do Estado do Acre, Brasil, com o intuito de contribuir para as investigações sobre possíveis relações filogenéticas entre esses dois gêneros neotropicais. As preparações cromossômicas foram obtidas de suspensões de células intestinais e de testículo e foram coradas convencionalmente com Giemsa ou submetidas aos métodos Ag-NOR e de bandamento C.

A análise morfométrica dos cromossomos de vinte e nove metáfases mitóticas, obtidas dos sete espécimes de *Edalorhina perezi* coletados (duas fêmeas e cinco machos), mostrou que todos esses indivíduos apresentam $2n=22$. Os onze pares cromossômicos são homomórficos, sendo seis metacêntricos (pares 1, 5, 6, 9, 10 e 11), quatro submetacêntricos (pares 2, 4, 7 e 8) e um subacrocentrico (par 3). Foi detectado apenas um par de NOR por genoma diplóide, localizado no braço longo dos cromossomos do par 8, nas preparações cromossômicas de seis indivíduos, tratadas pelo método Ag-NOR. A técnica de bandamento C, aplicada ao material referente a dois desses indivíduos, evidenciou que essa NOR é circundada por blocos de heterocromatina constitutiva, também presentes no centrômero de todos os cromossomos. Bandas heterocromáticas menos nítidas foram detectadas no braço curto dos cromossomos do par 1 e no braço longo dos cromossomos do par 2. A análise da meiose de dois machos detectou cadeias de bivalentes interligados em espermatócitos I, aparentemente formadas por três grandes pares cromossômicos, sugerindo a presença de translocações heterozigotas múltiplas.

Embora todos os espécimes de *Physalaemus petersi* estudados apresentem $2n=22$, dois cariótipos distintos foram encontrados dentre eles, o que sugere uma reavaliação desse táxon. O cariótipo mais comum é formado por quatro pares cromossômicos metacêntricos (1, 5, 6 e 10), quatro submetacêntricos (2, 4, 7 e 9), dois subacrocentricos (3 e 8) e um par de cromossomos sexuais XX/XY, como mostrou a análise morfométrica de vinte e seis metáfases de dez indivíduos. Dentre o grupo de indivíduos portadores desse cariótipo foi observada grande variabilidade interindividual no padrão de distribuição de NOR e de segmentos heterocromáticos. A análise de bivalentes de espermatócitos na primeira divisão da meiose mostrou que pares cromossômicos heterozigotos para segmentos heterocromáticos não-centroméricos não apresentam quiasma nessas regiões cromossômicas.

O outro cariótipo foi observado em apenas 3 machos da Reserva Extrativista do Alto Juruá, cujo canto também difere daquele apresentado pelos demais exemplares de

Physalaemus petersi. Esse cariótipo é composto por seis pares cromossômicos metacêntricos (2, 3, 4, 7, 8 e 10), dois submetacêntricos (5 e 9), dois subacrocentricos (1 e 6) e um par heteromórfico, formado por um cromossomo submetacêntrico e um metacêntrico. A relação desse par heteromórfico com a determinação do sexo não pode ser elucidado, visto que nenhuma fêmea com esse cariótipo foi analisada. O método Ag-NOR permitiu observar dois padrões de distribuição de NOR, que envolvem dois pares cromossômicos (8 e 9). O bandamento C realizado no material obtido de um desses espécimes evidenciou a presença de heterocromatina constitutiva em todos os centrômeros desse cariótipo e nos telômeros dos cromossomos dos pares 4 e 8 e em um dos telômeros de um cromossomo 9.

Configurações meióticas multivalentes foram observadas em exemplares de *P. petersi* dos dois grupos cariotípicos encontrados, sugerindo a participação de translocações na evolução desses cariótipos. Esse tipo de rearranjo pode estar envolvido, inclusive, na formação dos diferentes padrões de distribuição de NORs e bandas heterocromáticas.

ABSTRACT

Sixty one specimens of *Physalaemus petersi* and seven of *Edalorhina perezi* (Leptodactylidae, Anura) from Acre State, Brazil, were studied, to contribute to phylogenetic relationship studies between these two neotropical genera. Chromosome preparations were obtained from cellular suspensions of testis and intestinal epithelium. These cytological preparations were conventionally stained by Giemsa or submitted to Ag-NOR and C-banding techniques.

Morphometric analyses of twenty nine mitotic metaphases chromosomes from the specimens of *E. perezi* (two females and five males), showed that all these individuals present $2n=22$. The eleven chromosome pairs of this karyotype are homomorphic, being six metacentric (pairs 1, 5, 6, 9, 10 and 11), four submetacentric (pairs 2, 4, 7 and 8) and one subacrocentric (pair 3). Only one pair of NOR per diploid genome of chromosome preparations obtained from six specimens was detected and this was located interstitially in the long arm of pair 8. The C-banding techniques, applied to cells from two of these specimens, showed that this NOR is surrounded by constitutive heterochromatin blocks, also present at the centromere of all the chromosomes. Gray heterochromatic bands were detected in the short arm of chromosome pair 1 and in the long arm of pair 2. Analyses of meiotic chromosomes of two males detected multivalent chains in spermatocytes I, apparently formed by three long chromosome pairs, indicating the occurrence of heterozygous translocations in this karyotype.

All the specimens of *P. petersi* studied present $2n=22$, but two distinct karyotypes were detected among them. These findings suggest a re-evaluation of the taxon *P. petersi*. The most common karyotype presents four metacentric (1, 5, 6 and 10), four submetacentric (2, 4, 7 and 9), two subacrocentric chromosome pair (3 and 8) and one pair of sex chromosomes XX/XY. Among the groups of specimens with this kind of karyotype, a big interindividual variability of NOR and heterochromatic band patterns was observed. The analysis of spermatocytes I bivalents showed that chromosome pairs which are heterozygous to non-centromeric heterochromatic bands do not present chiasma at these chromosome regions.

The other karyotype was observed in only three males, whose call also differs from that of most common specimens of *P. petersi*. This karyotype is formed by six metacentric (2, 3, 4, 7, 8 and 10), two submetacentric (5 and 9), two subacrocentric (1 and 6) and one heteromorphic chromosome pair. The relation of this pair with sex determination could not be

elucidated, because no female with this karyotype was found. The Ag-NOR method showed two patterns of NOR distribution, which involve two chromosome pairs (8 and 9). The C-banding technique applied to material obtained from one of these specimens showed the presence of constitutive heterochromatin at all the centromeres of this karyotype, in the telomeres of the chromosomes of the pairs 4 and 8 and at one of the telomeres of one pair 9 chromosomes.

Multivalent configurations were observed in meiotic prophase I of both karyological groups of *P. petersi*, suggesting the involvement of translocations in the evolution of these karyotypes. This kind of rearrangement can be involved in the origin of different NOR patterns and heterochromatic band distribution.

I - INTRODUÇÃO

1. A posição taxonômica de Anura

A ordem Anura, junto com as ordens Caudata e Gymnophiona, compõe o grupo Lissamphibia, que representa os Amphibia atuais. Segundo FORD & CANNATELLA (1993), o ancestral comum dos anuros hilóides e ranóides, e todos os seus descendentes constituem a subclasse Neobatrachia. Esses autores também agrupam os anuros Pelobatoidea e os Pipoidea em Mesobatrachia. Os anuros que não fazem parte dos Neobatrachia e dos Mesobatrachia formam um grupo parafilético denominado de Archaeobatrachia, que engloba os gêneros *Ascaphus*, *Leiopelma*, *Discoglossus* e *Bombina*, por exemplo (FORD & CANNATELLA, 1993).

Dentre os Neobatrachia encontram-se as famílias Bufonidae, Hylidae, Pseudidae, Centrolenidae, Dendrobatidae, Hyperoliidae, Rhacophoridae, Ranidae e Leptodactylidae, sendo essas duas últimas taxa parafiléticos. As relações filogenéticas dentro de Neobatrachia ainda permanecem confusas (FORD & CANNATELLA, 1993).

2. A citogenética de Anura

O estudo citogenético tem contribuído bastante para as investigações em sistemática de vários grupos de organismos. A análise das variações cromossômicas permite a formulação de hipóteses sobre a relação filogenética entre diferentes grupos taxonômicos e sobre os rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução desses grupos, possibilitando, inclusive, inferências sobre eventos populacionais, tais como formação de demes e migração. Embora muitas vezes a filogenia sugerida pelos dados citogenéticos coincida com a proposta baseada em análises morfo-anatômicas, moleculares e bioquímicas, existem casos de controvérsia entre as relações filogenéticas apontadas por esses tipos de análise. Isso pode ser resultado da superficialidade de alguma das análises feitas, o que leva a interpretações incorretas, da ocorrência de convergência durante a evolução de algum desses grupos de caracteres ou de diferenças de taxas evolutivas nos diferentes conjuntos de caracteres (FUTUYMA, 1992). Essa variação nas taxas evolutivas é também responsável pela

observação de que a análise isolada de um caráter sistemático não é capaz de fornecer informações filogenéticas em todos os níveis taxonômicos. Algumas técnicas de estudo geralmente permitem relacionar filogeneticamente espécies próximas, enquanto outras geralmente elucidam as relações entre taxa mais elevados (HILLIS, 1987). Essa observação também justifica a análise conjunta de dados de diferentes naturezas para maximizar o entendimento correto da filogenia do grupo de interesse. Dessa forma, os estudos citogenéticos fornecem novos dados que devem ser analisados conjuntamente com os anatômicos, moleculares e bioquímicos para a escolha da árvore filogenética mais provável.

As investigações filogenéticas em Anura com base apenas em dados morfo-anatômicos são de difícil interpretação, uma vez que, apesar do grande número de espécies e da diversidade de habitats, os Anura são pouco variados morfologicamente. Exceto pelas relações entre as famílias basais (CANNATELLA, 1985; HILLIS, 1991), muito pouco é conhecido sobre a filogenia dos Anura. A pequena divergência morfológica entre os Neobatrachia pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato de a maioria das famílias desse grupo ter derivado do ancestral há pouco tempo na escala evolutiva (HILLIS, 1991). No entanto, isso não impede que caracteres citogenéticos e moleculares tenham sofrido maior divergência do que os morfológicos (a taxa evolutiva entre diferentes caracteres pode variar, como já mencionado), o que justifica uma maior investigação dos Neobatrachia nesses níveis.

Até a década de 80, os estudos citogenéticos em Anura eram desenvolvidos com técnicas simples e a maior preocupação dessas investigações era a caracterização do número cromossômico de cada espécie. Esses estudos iniciais permitiram detectar a ocorrência de certa variabilidade entre os anuros, que se mostrou grande em determinados gêneros, como *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) e pequena em outros, como *Bufo* (Bufonidae) (BOGART, 1973), embora WILSON et al. (1974) e BUSCH et al. (1977) tenham defendido a ocorrência de pequena taxa de evolução citogenética em Anura, observação que provavelmente resultou da análise relativamente limitada desses pesquisadores.

Embora muitos mecanismos de evolução cariotípica em Anura tenham sido propostos com base na análise de cariótipos corados convencionalmente com Giemsa (por exemplo, MORESCALCHI, 1967; e BOGART, 1973), melhor compreensão das relações filogenéticas entre os anuros e dos mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica desses animais passou a ocorrer após o uso de técnicas citogenéticas mais avançadas. Dentre essas, encontram-se o bandamento C, o bandamento de replicação tardia, os bandamentos obtidos com enzimas de restrição, o método de Ag-NOR, a coloração com fluorocromos e hibridação

"in situ", que possibilitam a melhor caracterização dos cromossomos. Bandamentos G, Q e R ainda estão sendo testados em Amphibia, embora resultados satisfatórios não tenham sido obtidos. Segundo SUMNER (1994), uma adequação nas técnicas pode acabar resultando na detecção dessas bandas, embora ele não descarte a possibilidade de que a não-visualização de bandas seja devida a uma forte espiralização dos cromossomos de anfíbios (como sugerido por SCHMID, 1978a,b). Por outro lado, BERNARDI *et al.* (1985) sugeriram que essas bandas eucromáticas realmente não existem em Amphibia, ou seja, não existem "isocoros". A suposição da extrema espiralização cromossômica ou da ausência de regiões homogêneas na composição de bases no DNA também pode explicar a não-obtenção de padrão de bandas de restrição semelhante ao apresentado por mamíferos (SCHMID & ALMEIDA, 1988). No caso do uso da técnica de bandamento G ou de replicação tardia, são obtidas bandas transversais ao longo de todo o comprimento dos cromossomos, o que possibilita a comparação de diferentes cariótipos, cromossomo a cromossomo e, conseqüentemente, a identificação de possíveis rearranjos que tenham ocorrido no processo de diferenciação dos cariótipos em análise.

Analisando as primeiras descrições cariotípicas de anuros, que consistiam na determinação do número cromossômico, identificação de constrições secundárias, posições centroméricas e comprimento relativo dos cromossomos (para referências, ver lista de KURAMOTO, 1990), MORESCALCHI (1968, 1973) e LYNCH (1971) sugeriram que anuros com caracteres morfológicos primitivos tenham cariótipos com alto número cromossômico e, conseqüentemente, que os cariótipos com poucos cromossomos das espécies mais derivadas sejam resultantes de um longo processo evolutivo. Ainda com base em dados dessa natureza, BOGART (1973) especulou que cariótipos de anuros pertencentes a famílias consideradas mais derivadas (como Dendrobatidae, Hylidae, Leptodactylidae, Microhylidae e Ranidae) possam ter derivado de um cariótipo com 26 cromossomos do tipo de pelobatídeo. Segundo Bogart, cariótipo desse tipo é encontrado, por exemplo, em gêneros considerados primitivos dentro de Leptodactylidae, como *Telmatobius* e *Calyptocephala*. Provavelmente, nessa família o cariótipo ancestral com $2n=26$ sofreu redução cromossômica, originando cariótipos com 24 e 22 cromossomos.

A análise comparativa do padrão de bandas de replicação tardia apresentado por três espécies de *Rana* (Ranidae) com $2n=26$ e outras três espécies desse mesmo gênero e com cariótipo com $2n=24$, feita por MIURA *et al.* (1995), corrobora as especulações de MORESCALCHI (1968, 1973) e BOGART (1973) em relação à possibilidade de um cariótipo com $2n=26$ originar outro com $2n=24$. Nesse estudo, MIURA *et al.* (1995) sugerem que um

único evento de fusão “in tandem” entre dois cromossomos presentes no cariótipo com $2n=26$ esteja envolvido na origem do cariótipo com $2n=24$, ao contrário do que haviam suposto MORESCALCHI (1981, apud MIURA *et al.*, 1995) e GREEN (1983), que admitiam a participação de inversões pericêntricas, além de um evento de fusão “in tandem”, nesse processo de redução cromossômica. A homologia entre os padrões de bandas de replicação tardia de seis espécies e uma subespécie de *Rana* (Ranidae), uma espécie de *Hyla* (Hylidae) e uma de *Bufo* (Bufonidae) levou MIURA (1995) a sugerir que o baixo número cromossômico ($2n=22-26$) e a similaridade dos cariótipos dos três gêneros (representantes de diferentes famílias) provavelmente não sejam resultantes de convergência, mas sim características presentes em um cariótipo ancestral comum, conservados até então. Essa conclusão de Miura também reforça a hipótese de BOGART (1973) da origem comum dos cariótipos de anuros de famílias mais derivadas. MIURA (1995) compara, ainda, os padrões de bandas de replicação tardia de *Rana*, *Hyla* e *Bufo* com o de *Xenopus laevis* ($2n=36$), descrito por SCHMID & STEINLEIN (1991), espécie pertencente à família Pipidae, considerada primitiva em Anura. O autor conclui que grandes cromossomos de *Rana*, *Hyla*, *Bufo* e *Xenopus laevis* apresentam certa homologia entre si, sugerindo que o cariótipo ancestral desses taxa inclui aqueles cromossomos, e suspeita que outros gêneros também primitivos e com número cromossômico maior do que 26, como *Ascaphus* e *Alytes*, apresentem homologia com os grandes cromossomos dos quatro gêneros mencionados anteriormente. Portanto, segundo Miura, os rearranjos cromossômicos ocorridos durante a divergência dos Anura envolveram, principalmente, os cromossomos menores.

As reduções no número cromossômico observadas ao longo do processo evolutivo em Anura parecem resultar de fusão cêntrica (como sugerido por BOGART, 1973, 1991; BEÇAK *et al.*, 1970; e MORESCALCHI, 1973, que especulou que os cariótipos tenham evoluído de assimétricos para simétricos) ou de fusão “in tandem” (como observado por MIURA *et al.*, 1995). Por outro lado, existem casos em que não existem dados suficientes para apontar a polaridade da transformação cariotípica em análise, sendo impossível a eleição da redução ou do aumento de número cromossômico como evento que resultou na situação atual. Exemplo disso é o que ocorre com *Eleutherodactylus glandulifer* (Leptodactylidae) (BOGART, 1991).

A explicação para o aumento do número cromossômico é dada por fissão cêntrica, rearranjo considerado por BOGART (1973, 1991) e MIURA (1995) como fenômeno que contribuiu para as alterações no número cromossômico em Anura. Translocações, inversões, adições, deleções e ampliações, apesar de não estarem envolvidas na mudança do número

cromossômico, são também rearranjos que devem ter importante participação na evolução cariotípica. Vários estudos supõem que eventos como esses estão envolvidos na diferenciação de cromossomos sexuais, tendo, muitos deles, papel crucial no início desse processo (como discutido adiante no item 2.2). A detecção desses tipos de rearranjos cromossômicos entre autossomos é mais rara em Anura, tendo sido descritos, por exemplo, anéis meióticos multivalentes, resultantes da presença de translocações cromossômicas múltiplas, apenas em *Eleutherodactylus maussi* (Leptodactylidae) (BEÇAK & BEÇAK, 1974) e inversão pericentromérica apenas no par 9 de *Agalychnis callidryas* (Hylidae) (SCHMID *et al.*, 1995).

Além de todos os rearranjos mencionados, os eventos de não-disjunção meiótica também parecem exercer papel importante na evolução dos Anura. Alguns desses eventos podem ser, inclusive, decorrentes de pareamento anormal de homólogos heterozigotos para determinado rearranjo cromossômico. Um experimento realizado com camundongo (EICHENLAUB-RITTER & WINKING, 1990), por exemplo, sugere a existência de relação entre anéis meióticos multivalentes, distúrbios na estrutura dos fusos de divisão e a ocorrência de anormalidades na segregação cromossômica na anáfase I da meiose.

Eventos de não-disjunção meiótica são responsáveis por vários casos de poliploidização, observados em diferentes famílias de Anura. Dentre os leptodactídeos, por exemplo, são encontradas espécies poliplóides nos gêneros *Odontophrynus* (4n), *Ceratophrys* (8n), *Pleurodema* (4n), *Eleutherodactylus* (8n) e *Neobatrachus* (4n). Exemplos de poliploidização são encontrados também em Bufonidae (*Bufo*, 4n), em Ranidae (*Pyxicephalus*, 4n, e *Discoglossus*, 4n), em Hylidae (*Phyllomedusa*, 4n) e em Pipidae (*Xenopus*, 4n), segundo revisão apresentada por TYMOWSKA (1991). A autopoliploidização, segundo TYMOWSKA (1991), é o mecanismo mais comum de poliploidização em Anura, embora em *Xenopus* e *Pleurodema* sejam observados exemplos de alopolidização, que envolve o fenômeno de hibridação além dos eventos de não-disjunção cromossômica. A poliploidização é considerada um importante mecanismo de especiação em Anura, como proposto por BOGART & WASSERMAN (1972), que discutem a existência de duas espécies de *Hyla* (*H. chrysoceles* e *H. versicolor*) morfologicamente idênticas que apresentam, respectivamente, cariótipo diplóide e poliplóide.

2.1. Evolução cariotípica e estratégia de vida

Ao contrário do observado em nível morfológico, os estudos citogenéticos têm mostrado grande variabilidade em *Anura*. Em alguns grupos, a variabilidade de cariótipos encontrados é grande, enquanto outros são compostos por espécies cariotipicamente similares. Segundo BOGART (1991), a taxa evolutiva cariotípica é lenta em anuros de regiões temperadas, que vivem em grandes agregados panmíticos, e rápida em anuros tropicais, que apresentam populações estruturadas em demes. Espécies com tais estruturas populacionais são caracterizadas pela produção de ovos grandes, prole pequena, investimento parental, desenvolvimento terrestre e/ou direto. A estrutura populacional em demes favorece a ocorrência de deriva genética, processo evolutivo que propicia a fixação de mutações cromossômicas, mesmo que desfavoráveis, como sugere o modelo teórico de evolução cromossômica proposto por LANDE (1979), conhecido como modelo do deme.

A relação que BOGART (1991) traça entre a variabilidade cromossômica e deme, de certa forma, dá sustentação à teoria de MAYR (1969) de que mecanismos de isolamento cromossômico devem ocorrer especialmente em animais que tendem a formar populações pequenas. Segundo Mayr, mecanismos de isolamento dessa natureza podem exercer importante papel no processo de especiação e a região ideal para esse tipo de especiação é a periferia da distribuição de uma espécie, onde as populações dessa espécie geralmente são pequenas, isoladas e com alta frequência de endocruzamento.

O modelo de BOGART (1991) difere do modelo de canalização proposto por BICKHAM & BAKER (1979) para explicar a evolução cromossômica. Segundo o modelo de canalização, sugerido com base em dados relativos a tartarugas e morcegos, um cariótipo sofre modificações significativas quando uma linhagem invade uma nova zona adaptativa, onde novos rearranjos cromossômicos são vantajosos. KING (1985) criticou o modelo de BICKHAM & BAKER (1979), discordando da premissa de que apenas alterações cromossômicas não-robertsonianas ocorrem durante rápida diversificação de uma população; e de que todas as mutações cromossômicas fixadas são benéficas. King considerou, ainda, que Bickham e Baker não levaram em conta todas as possíveis situações quando propuseram a fixação de rearranjos adaptativos, não considerando, por exemplo, a possibilidade de existirem alterações cromossômicas neutras e a de polimorfismos balanceados serem mantidos ao invés da fixação de um caráter.

Os autores do modelo de canalização consideraram os anuros um bom exemplo de um grupo antigo em que um cariótipo foi canalizado, acreditando que a evolução em Anura tivesse sido mais lenta do que em outros vertebrados. Ao contrário, segundo BOGART (1991), os anuros podem ser o melhor grupo para demonstrar o modelo do deme, ao contrário do que Bickham e Baker supunham. A teoria de BOGART (1991) foi comprovada por TESSIER *et al.* (1991) em *Leptodactylus hochstetteri* (Leptodactylidae), que apresenta grande variação cromossômica e ocorre em pequenas populações, e é também aceita por ZEYL & GREEN (1992), que propuseram que essa teoria seja estendida para a análise evolutiva de famílias de DNA satélite.

Com base nessas considerações, é possível supor a importância dos estudos citogenéticos em Anura também no esclarecimento dos processos que resultam na especiação, podendo fornecer exemplos em que os rearranjos cromossômicos tenham sido fundamentais para a especiação (como defende a teoria proposta por WHITE, 1978) ou em que essas alterações tenham ocorrido independentemente ou subsequentemente à especiação (como sugerido por IMAI, 1983 e COYNE, 1984).

2.2. Os cromossomos sexuais

Segundo levantamento feito por KING *et al.* (1990), apenas 833 espécies de Anura foram estudadas citogeneticamente dentre as 3521 espécies existentes nessa ordem. As revisões feitas por SCHMID *et al.* (1991) e NISHIOKA *et al.* (1993) e os estudos desenvolvidos por MIURA (1994a,b) e SCHMID *et al.* (1992), com *Rana japonica* (Ranidae) e *Eleutherodactylus maussi* (Leptodactylidae), respectivamente, permitem notar que apenas 19 anuros das cerca de 833 espécies já analisadas cromossomicamente apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, ficando evidente a raridade desses cromossomos em Anura. No entanto, a análise da progênie de cruzamentos realizados com animais cujo sexo foi experimentalmente trocado, do padrão de herança e expressão de isozimas sexo-específicas e estudos imunocitoquímicos com anticorpo anti H-Y podem detectar a existência de mecanismos XX/XY e ZZ/ZW em espécies que não apresentam heteromorfismo sexual cromossômico. Alguns exemplos disso podem ser vistos em SCHMID *et al.* (1991). Essas observações somadas às de que, na maioria dos casos em que existe heteromorfismo sexual cromossômico, esse é muito pequeno, sugerem a possibilidade de que os cromossomos

sexuais em Anura estejam em estágio primitivo de diferenciação morfológica, hipótese já mencionada por SCHMID *et al.* (1991). Métodos de estudo citogenético mais avançados, que permitem a melhor caracterização de diferentes regiões dos cromossomos foram necessários para a detecção de heteromorfismo sexual em vários casos.

Dentre as espécies que apresentaram cromossomos sexuais, foram observados os mecanismos XX^0/XY^0 , ZZ^0/ZW^0 , $XXAA^0/XXA^Y0$, OO^0/WO^0 de determinação do sexo, além de um caso de determinação do tipo XX^0/XY^0 em que foram observados dois morfos de Y em uma mesma população, sendo um deles ainda homomórfico ao X (ver revisões de SCHMID *et al.*, 1991 e NISHIOKA *et al.*, 1993, para referências, e os estudos de MIURA, 1994a,b, e SCHMID *et al.*, 1992). Diferentes mecanismos de determinação sexual coexistem tanto em famílias mais primitivas como em famílias mais derivadas, o que permite sugerir que o tipo de determinação sexual foi estabelecido após a divergência evolutiva de vários ancestrais dos gêneros recentes (SCHMID *et al.*, 1991). A observação de MAHONY (1991) de que dentre dez espécies do gênero *Crinia* (Myobatrachidae) apenas uma apresenta cromossomos sexuais heteromórficos mostra que a diferenciação cromossômica sexual é um evento recente, que ocorre, nesse caso, em nível de espécie. A análise de NISHIOKA *et al.* (1993), que sugere que duas populações de *Rana rugosa* (Ranidae) apresentam mecanismos diferentes de determinação sexual (XX/XY e ZZ/ZW), pode sugerir que, nesse grupo, o estabelecimento de mecanismo de determinação sexual também ocorre em nível de populações consideradas da mesma espécie. Essa proposta da existência de várias origens para os cromossomos sexuais de diferentes anfíbios está de acordo com as observações feitas em estudos enzimáticos de várias espécies de *Rana*, por exemplo. Esses estudos também concluem que não há um grupo de genes ligados ao sexo que seja conservado e ancestral comum dos "linkages" observados atualmente nesses anúrios (ver SCHMID *et al.*, 1991).

Segundo JOHN (1988), é uma convenção assumir que os cromossomos sexuais heteromórficos foram originados a partir de cromossomos homomórficos, o que é corroborado por várias observações feitas inclusive em Amphibia, que representa um importante grupo para estudos evolutivos, uma vez que apresenta cromossomos sexuais com diferentes graus de diferenciação e, portanto, diversos exemplos de possíveis processos de evolução cromossômica. A evolução dos cromossomos sexuais deve envolver uma série de passos (OHNO, 1967) que possibilitam o acúmulo de diferenças entre os homólogos do par em relação aos genes envolvidos na determinação sexual. Segundo DARLINGTON (1958),

existe uma tendência de os cromossomos sexuais W e Y tornarem-se heterocromáticos, perderem função gênica e, então, terem seus tamanhos reduzidos.

Vários estudos têm sido feitos em diferentes grupos no intuito de se determinar o passo inicial desse processo evolutivo, que deve ocasionar a redução de crossing-over entre cromossomos homomórficos ancestrais, evento essencial para o início da diferenciação cromossômica (OHNO, 1967). Estudos sobre heterocromatina constitutiva e um DNA satélite associado aos cromossomos W de cobras, incluindo experimentos de hibridação em filtro e "in situ", indicaram que o primeiro passo para a diferenciação do cromossomo W em Ophidia foi o desenvolvimento de sequências específicas de DNA repetitivo, ou seja, a heterocromatinização desse cromossomo (SINGH *et al.*, 1976; JONES & SINGH, 1981; JONES, 1983, 1984). SINGH *et al.* (1976) propuseram, ainda, que o DNA satélite associado a um dos cromossomos do primitivo par homomórfico acarretou uma assincronia no padrão de replicação do DNA dos dois homólogos, implicando uma redução na frequência de recombinação entre esses. BULL (1983), analisando várias espécies de diferentes grupos animais, concluiu que, em muitas delas, os cromossomos W ou Y apresentam proporcionalmente mais heterocromatina do que os cromossomos Z ou W, o que está de acordo com a proposta de Singh, Jones e seus colaboradores. Dentre as dezenove espécies de Anura que apresentam cromossomos sexuais diferenciados, apenas os cromossomos de *Pyxicephalus adspersus* (Ranidae) (SCHMID, 1980a) e *Gastrotheca riobambae* (Hylidae) se adequam à hipótese de ter sido a heterocromatinização do Z e do Y, respectivamente, o passo inicial da diferenciação sexual cromossômica. KING (1991), analisando os dados de GREEN (1988b) sobre *Leiopelma hochstetteri* (Leiopelmatidae), sugere que as variações na quantidade de heterocromatina dos diferentes W encontrados constituem um exemplo inequívoco de transformação da eucromatina, embora Green não interprete dessa maneira, se referindo apenas a uma variação geográfica.

No caso de *Eupsophus roseus* e *Eupsophus migueli* (Leptodactylidae), cujos cromossomos Y não apresentam heterocromatina banda C-positiva, a heterocromatinização diferencial poderia ser sugerida como fenômeno inicial da diferenciação dos cromossomos X e Y, se o cromossomo X for considerado o derivado de um cromossomo ancestral que não apresentasse nenhuma região banda C-positiva (ITURRA & VELOSO, 1989). Nesse caso, a heterocromatinização teria originado o cromossomo X. No entanto, nenhuma comprovação a essa hipótese foi encontrada, tornando-a pouco provável. Em 1981, SCHEMPP & SCHMID observaram que o cromossomo Y apresenta uma banda de replicação tardia não observada

no cromossomo X e que esses cromossomos sexuais não diferem no padrão de banda C, ao contrário do que era esperado segundo a teoria de SINGH *et al.* (1976). No entanto, Schempp e Schmid argumentaram que é possível que uma região de replicação tardia seja heterocromática mesmo que não seja banda C-positiva, uma vez que a heterocromatina constitutiva consiste de material muito heterogêneo. Sugeriram, também, que a região de replicação tardia encontrada no cromossomo Y de *Rana esculenta* pode conter sequências de DNA satélite sexo-específicas do tipo das mencionadas por SINGH *et al.* (1976), que aparecem conservadas em regiões de replicação tardia da maioria dos eucariotos, incluindo insetos, aves e mamíferos (SINGH *et al.*, 1979). Essa discussão de SCHEMPP & SCHMID (1981) mostra que os autores não consideraram que cromossomos sexuais heteromórficos em relação ao padrão de bandas de replicação e homomórficos em relação ao padrão de banda C são necessariamente originados a partir de mecanismos evolutivos diferentes daqueles que levam à existência de cromossomos sexuais que apresentam heteromorfismo tanto de bandas de replicação como de bandas C. Seguindo essa linha de raciocínio, SCHMID *et al.* (1988) sugerem a possibilidade da existência dessas sequências de DNA repetitivo sexo-específicas nos cromossomos Y de *Gastrotheca walkeri* e *G. ovifera*, apesar desses apresentarem menor quantidade de heterocromatina banda C-positiva do que os cromossomos X. Esse mesmo tipo de explicação talvez possa se aplicar a *Eupsophus roseus* e *E. migueli*.

Ao contrário dos casos citados anteriormente, nos anuros *Leiopelma hamiltoni* (GREEN, 1988a), *Crinia bilingua* (MAHONY, 1991) e *Gastrotheca pseutes* (SCHMID *et al.*, 1990) provavelmente o que se observa é a adição de heterocromatina constitutiva banda C-positiva no cromossomo W, nos dois primeiros casos, e no cromossomo Y, no último. Esses casos também não se encaixam na teoria da heterocromatinização diferencial como a primeira etapa da diferenciação cromossômica sexual, o que fez GREEN (1988a) e GREEN & SHARBEL (1988) sugerirem que a perda de função gênica (que resulta do processo de heterocromatinização diferencial) e a diferenciação cromossômica são independentes. A análise da meiose de machos de *Gastrotheca pseutes*, que apresentam um cromossomo Y^B, portador de um segmento banda C-positivo adicional na região telomérica do braço longo, mostrou não haver crossing-over entre os braços longos dos cromossomos X e Y^B (SCHMID *et al.*, 1990). Ainda nesse trabalho, Schmid e colaboradores sugerem que a heterocromatina adicional do Y^B não tenha sido originada de amplificação simples de uma sequência já existente e ainda presente em X, pois nenhuma banda heterocromática dos autossomos interferiu na formação de quiasmas. Provavelmente essa heterocromatina consiste na

incorporação de uma sequência de DNA nova, não existente em X. Essas observações levaram SCHMID *et al.* (1990) a suspeitarem de que a heterocromatina telomérica do Y^B exerce efeito inibitório na sinapse e/ou crossing-over no braço longo do bivalente XY^B. Isso sugere a capacidade de um bloco de heterocromatina adicional de um dos cromossomos de um par de homólogos iniciar a diferenciação nesse par, embora SCHMID *et al.* (1990) não descarte a possibilidade de que diferenças estruturais não detectáveis pelos métodos citológicos convencionais estejam auxiliando essa diferenciação. Um heteromorfismo entre os cromossomos do par sexual pode também ter exercido importante papel na redução da recombinação entre eles em *Buergeria buergeria* (Rhacophoridae), uma vez que nessa espécie o cromossomo W parece ter perdido a região heterocromática e o rDNA existente em Z (SCHMID *et al.*, 1993a).

Apesar da grande aceitação da importância da heterocromatina nos processos de diferenciação sexual, seja envolvendo a transformação de eucromatina, a adição ou a perda de segmentos heterocromáticos, teoricamente existem outros dois mecanismos que, segundo JOHN (1988), podem levar à redução de recombinação entre cromossomos homomórficos ancestrais dos cromossomos sexuais: a localização de quiasma determinada genotipicamente e rearranjos estruturais, especialmente inversão pericêntrica. Em Anura, esses mecanismos ainda não foram sugeridos como eventos iniciais na evolução de cromossomos sexuais. Apenas no caso de *Eupsophus migueli* foi detectada uma inversão no cromossomo X, embora esse evento pareça ser posterior à perda de uma região banda C-positiva (ITURRA & VELOSO, 1989).

Em relação à ancestralidade dos diferentes mecanismos de determinação sexual encontrados em Anura, GREEN (1988a), com base na observação de que as fêmeas de *Leiopelma hamiltoni* são heterogaméticas e sabendo que essa espécie é uma das mais primitivas de Anura, propôs que o sistema de determinação sexual ZZ/ZW seja o estado primitivo nesse grupo. Propôs também que o sistema XX/XY encontrado em diferentes famílias teve diferentes origens e lembrou a possibilidade da existência de um mecanismo evolutivo de conversão do sistema XX/XY de determinação do sexo para o sistema ZZ/ZW, discutido por BULL (1983). Esse mecanismo envolveria o surgimento, em um outro cromossomo, de um locus regulatório da expressão de genes primários de determinação do sexo e pressupõe a existência de uma fase em que os novos cromossomos sexuais devem ser pouco diferenciados entre si, como observado na maioria dos anuros (GREEN, 1988a).

Em nenhum anfíbio que apresenta cromossomos sexuais heteromórficos estudado até então foi observada qualquer indicação da ocorrência de mecanismos de compensação de dose no sexo homogamético. Desde as espécies com cromossomos sexuais pouco diferenciados entre si, que apresentam pareamento praticamente completo na meiose, como, por exemplo, *Centrolenella antisthenesi* (Centrolendae) (SCHMID *et al.*, 1989) até aquelas cujos cromossomos sexuais são bastante diferenciados, como *Gastrotheca riobambae* (SCHMID *et al.*, 1986), por exemplo, não foi observada a existência de corpúsculos de cromatina sexual em núcleos interfásicos, nem diferenças no padrão de replicação entre os cromossomos sexuais encontrados no sexo homogamético. Segundo SCHMID *et al.* (1991), provavelmente em Amphibia, assim como nas fêmeas das aves, a compensação de dose dos genes ligados ao sexo não é acompanhada pela inativação casual de um dos cromossomos sexuais no sexo homogamético.

3. As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e a heterocromatina constitutiva como caracteres citogenéticos

3.1. As NORs

As regiões organizadoras de nucléolos são sítios cromossômicos formados por numerosas cópias de genes que codificam rRNA 18S, 5.8S e 28S, arranjadas "in tandem" e separadas por sequências espaçadoras (LONG & DAWID, 1980; MILLER, 1981). Além dessas sequências, cada unidade repetitiva dos "clusters" de rDNA apresenta um espaçador transcrito externo, localizado a 5' do rDNA que codifica o rRNA 18S e dois espaçadores internos, posicionados entre os rDNAs que codificam rRNA 18S e 5.8S e entre esse e o que transcreve rRNA 28S. Esses espaçadores são removidos do transcrito primário (que é um RNA 40S no caso dos anfíbios) durante o processo de maturação desse tipo de RNA. O tamanho da região transcrita varia entre diferentes espécies, principalmente devido a variações no tamanho dos espaçadores (LONG & DAWID, 1980).

Os espaçadores intergênicos também variam consideravelmente em tamanho entre diferentes organismos e também no mesmo indivíduo (MILLER, 1981). Esses espaçadores, ao contrário do que LONG & DAVID (1980) e MILLER (1981) acreditavam, podem transcrever, embora o transcrito formado seja rapidamente desorganizado. Nessas regiões podem existir

“enhancers”, que provavelmente por atraírem os fatores de transcrição envolvidos na síntese de rRNA, otimizam a transcrição dos genes de rDNA. Dessa forma, a antiga nomenclatura espaçadores não-transcritos (NTS) é incorreta, devendo-se adotar espaçadores intergênicos (IGS). A grande variabilidade observada nessa região de rDNA provavelmente ocorre graças à menor pressão seletiva sofrida em relação àqueles segmentos codificadores de rRNA e também em relação aos espaçadores transcritos, embora nesses últimos a pressão seletiva deva ser bem menor do que nos rDNA codificadores dos rRNA (ver LEWIN, 1994, para referências).

O tamanho das diferentes NORs (mesmo que sejam homólogas) também podem variar bastante entre diferentes indivíduos da mesma espécie, devido ao diferente número de cópias do gene ribossomal apresentado por cada NOR (SCHMID, 1982). KING *et al.* (1990) relataram variação desse tipo entre diferentes células de um mesmo indivíduo em espécies de *Litoria* e em *Cyclorana novaehollandiae* (Hylidae, Anura). No entanto, o número e a localização das NORs tendem a ser característicos de cada população ou espécie (por exemplo, SCHMID, 1978a,b), embora variações dessas naturezas já tenham sido relatados em quatro espécies de Anura, *Hyla chrysocelis* e *Hyla versicolor* (Hylidae), por WILLEY *et al.* (1989), *Bufo terrestris* (Bufonidae), por FOOTE *et al.* (1991) e *Agalychnis callidryas* (Hylidae), por SCHMID *et al.* (1995). Variação da localização de NORs também já foi encontrada em *Litoria raniformis*, por KING *et al.* (1990), que observaram NORs em dois pares cromossômicos, embora variação interindividual de número de NORs não tenha sido detectada, talvez em virtude do pequeno número da amostra analisada, que se restringiu a dois espécimes.

As NORs são ricas em GC, principalmente nas regiões que codificam os RNAs 18S, 5.8S e 28S (SUMNER, 1990) e geralmente são regiões de constrições secundárias, como observado por HENDERSON *et al.* (1972) e HSU *et al.* (1975). No entanto, algumas evidências mostram que nem todas as NORs aparecem como constrições secundárias e que em alguns casos elas contêm heterocromatina (GOESSENS, 1984). Algumas observações sugerem, ainda, a localização adjacente de determinado tipo de heterocromatina em relação a algumas NORs. Em anfíbios, particularmente em anuros, as NORs tendem a coincidir com bandas C-positivas e podem ou não ter blocos grandes banda C-positivos associados a elas (KING, 1980, 1988; KING *et al.*, 1990). As regiões espaçadoras entre os cístrons 18S+28S são provavelmente compostas parcialmente ou inteiramente de sequências repetitivas de DNA, o que justifica a evidenciação dessa região pela técnica de bandamento C. Provavelmente essa heterocromatina existente nas NORs impede a formação de quiasmas

nessas regiões, acarretando a flexibilidade evolutiva observada em relação às NORs de anfíbios, uma vez que o crossing-over é um mecanismo de homogeneização das famílias multigênicas (ver LI & GRAUR, 1991). Por outro lado, De LUCCHINI *et al.* (1988), em estudo com um urodelo do gênero *Triturus*, propuseram que a ocorrência de sequências repetitivas nos IGS do rDNA desses anfíbios provoque um aumento na frequência de recombinação e/ou amplificação dessas regiões, acarretando a grande variabilidade de número e tamanho apresentada por “sítios adicionais” de rDNA. Essa proposta está de acordo com as observações de que o pareamento de alguns blocos heterocromáticos são essenciais para o pareamento de cromossomos, feita por exemplo por HAWLEY *et al.* (1993), em *Drosophila* (ver também revisões de JOHN, 1988 e IRICK, 1994).

Nem todas as NORs de uma célula transcrevem na intérfase, mas as ativas originam nucléolos. Tais estruturas são constituídas por proteínas relacionadas ao processo de transcrição e proteínas ribossomais (que representam cerca de 85% dessa estrutura), além de DNA e RNA ribossomais (que podem representar até 17 e 10% do nucléolo, respectivamente). Nos nucléolos ocorre não só a síntese do transcrito primário, mas também o seu processamento para a produção do rRNA 18S, 5.8S e 28S e a associação desses rRNA com proteínas ribossomais e rRNA 5S, sintetizado fora do nucléolo e então transportado para esse, resultando na formação das subunidades ribossomais 40S e 60S. Os três passos da biogênese ribossomal que ocorrem no nucléolo possibilitam a distinção de três domínios nucleolares: os centros fibrilares (FCs), o componente fibrilar denso (DFC) e o componente granular (GC), nomenclatura seguida após os estudos de BUSCH & SMETANA (1970) e JORDAN (1979). Os dois primeiros domínios correspondem a etapas de transcrição e o terceiro à maturação e ao armazenamento das subunidades ribossomais. Essas características estruturais dos nucléolos podem mostrar-se muito variáveis em diferentes tipos celulares e dependem largamente do estado funcional da célula em análise, sendo, às vezes, indistinguíveis. O tipo, o tamanho e o número de nucléolos existentes na célula também variam conforme o tipo celular estudado, o estado fisiológico da célula e o número de NORs existentes na célula. Nucléolos em forma de anéis, por exemplo, são encontrados em células com pequena síntese ribossomal, como linfócitos pequenos e monócitos do sangue periférico. Nucléolos grandes e compactos ou reticulados são observados em células muito ativas em relação à biogênese ribossomal, como células com alta velocidade de duplicação e células secretoras. Provavelmente, a diferença entre os tipos compacto e reticulado representa pouca diferença na atividade nucleolar. As diferenças morfológicas nucleolares que oferecem

maiores informações sobre as características relativas às NORs e às suas atividades são tamanho e número. Um aumento na síntese de ribossomos, resultante da ativação de mais NORs, acarreta uma fusão entre elas e, conseqüentemente, entre os nucléolos. Quando a célula entra em divisão, ocorre a dispersão do nucléolo, originando vários pequenos nucléolos (revisão de SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993). Esses autores concluíram também que geralmente células que se dividem raramente ou não se dividem têm um ou poucos nucléolos.

Embora vários estudos já tenham mostrado que algumas NORs podem permanecer inativas (ver revisão de SCHWARZAKER & WACHTLER, 1993, para referências), os mecanismos de interação entre as diferentes NORs e aqueles de interação entre as NORs e outras regiões do genoma, que interferem na regulação da atividade dos cístrons de rDNA são pouco conhecidos. Estudos realizados em espécies de gafanhoto evidenciaram que regiões de heterocromatina supernumerária podem acarretar a inativação de genes supressores de genes ribossomais (CABRERO *et al.*, 1986; LÓPEZ-LEÓN *et al.*, 1995), relacionando polimorfismo de bandas heterocromáticas com variação no padrão de NOR apresentado. SALCEDO *et al.* (1988), também em estudos com gafanhotos, relacionaram a ocorrência de cromossomos B com o aumento da dependência entre NORs, acarretando o aumento da atividade de algumas NORs e diminuição de outras. O estágio do desenvolvimento fisiológico também já foi relacionado com a regulação da atividade de NORs em ervilhas (WATERHOUSE *et al.*, 1986; WATSON *et al.*, 1987) e em gafanhoto (LÓPEZ & LEÓN *et al.*, 1995). Vários trabalhos têm mostrado, ainda, a interação entre NORs em híbridos interespecíficos, evidenciando um fenômeno de competição entre as NORs provenientes de diferentes espécies, conhecido por anfiplastia, que resulta na dominância de algumas NORs, determinada em função da combinação de NORs encontrada (BICUDO, 1981). Em nível inter- e intrapopulacional, o fenômeno de competição e dominância entre NORs também já foi observado (FLAVELL & O'DELL, 1988; SANTOS *et al.*, 1990). Os estudos de Santos e colaboradores, realizados em uma população de trigo, mostraram que as NORs ativas dominantes são mais metiladas do que as demais e que, na ausência das NORs dominantes, as outras NORs têm sua atividade aumentada.

Conhecendo-se essas características das NORs e dos nucléolos, a análise cuidadosa do número, da localização cromossômica e das características moleculares das NORs em diferentes indivíduos pode permitir a identificação de homologias entre diferentes populações e espécies, possibilitando, em alguns casos, o reconhecimento de alguns rearranjos cromossômicos que possivelmente diferenciaram cariotipicamente diversos grupos. Além

disso, a análise das NORs e dos nucléolos permite o estudo da atividade da célula durante o seu desenvolvimento, como no caso da gametogênese. Esse tipo de análise também pode auxiliar os estudos filogenéticos.

A análise molecular dos "clusters" de rDNA das NORs é feita através da investigação de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). A detecção das NORs para a análise do número e da localização cromossômica dessas regiões pode ser feita através de hibridização "in situ" ou através de técnicas citoquímicas, como coloração com mitramicina ou cromomicina, bandamento N e impregnação pelo íon prata. Dentre esses métodos, a hibridização "in situ" é o mais específico e evidencia todas as NORs, inclusive as inativas. A mitramicina e a cromomicina coram regiões genômicas ricas em GC, podendo evidenciar, portanto, não apenas as NORs, mas também muitos outros segmentos ricos em GC, como certas regiões heterocromáticas. Essa técnica foi descrita para evidenciação de NOR por SCHWEIZER (1976) e já foi utilizada em anuros (SCHMID, 1980b). O bandamento N (proposto por MATSUI & SASAKI, 1973) envolve a extração de ácidos nucleicos e histonas dos cromossomos, seguida pela coloração com Giemsa e evidencia NORs. Embora FAUST & VOGEL (1974) tenham sugerido que esse bandamento evidencie heterocromatinas específicas adjacentes às NORs e não o rDNA dessas regiões, a técnica proposta em 1973 após algumas modificações mostrou-se capaz de detectar NORs em muitas espécies, como mencionado por SUMNER (1990). A impregnação pelo íon prata é o método mais usado para a identificação de NORs, embora detecte apenas as NORs que estiveram ativas na intérfase. Essa técnica foi proposta inicialmente por HOWELL *et al.* (1975) e sofreu várias modificações, sendo o procedimento sugerido por HOWELL & BLACK (1980) o mais seguido para a evidenciação de NORs e nucléolos.

O método de impregnação por prata (método Ag-NOR) baseia-se na afinidade de proteínas ácidas associadas às NORs ativas na intérfase pelo íon prata. Essas proteínas argirófilas, também conhecidas por proteínas Ag-NOR, permanecem associadas às NORs mesmo durante a mitose e até o paquíteno da meiose. Vários estudos estão sendo feitos na tentativa de descrever quais são as proteínas Ag-NOR e algumas delas já foram identificadas, como RNA polimerase I (SCHEER & ROSE, 1984), nucleolina (OCHS *et al.*, 1983), DNA topoisomerase I (GULDNER *et al.*, 1986), p135 (PFEIFLE *et al.*, 1986) e UBF (CHAN *et al.*, 1991; HERNANDEZ-VERDUN *et al.*, 1993). TRERÈ *et al.* (1989), analisando o aumento da área nucleolar em células tumorais, sugerem que proteínas envolvidas no preparo dos genes ribossomais para duplicação também sejam argirófilas. O domínio proteico responsável pela

impregnação da prata também está sendo investigado. Alguns pesquisadores acreditam que a afinidade da prata se dá pelo grupo fosfato (SATOH & BUSCH, 1981; HUBBELL, 1985). Outros acreditam que os responsáveis sejam grupos carboxilas (OLERT *et al.*, 1979; BUYS & OSINGA, 1984). Uma outra possibilidade é que o grupo argirófilo seja o sulfidril (De CAPOA *et al.*, 1982), embora os resultados de OLERT *et al.* (1979), BUYS & OSINGA (1984) e HUBBELL (1985) não suportem essa hipótese. HERNANDEZ-VERDUN *et al.* (1993) propõem que a afinidade pela prata seja promovida pelo domínio ácido amino-terminal das proteínas Ag-NOR e que seja independente de fosforilação. No entanto, vários estudos ainda devem ser feitos para elucidar essa questão.

Embora seja um método largamente utilizado, a impregnação pela prata metálica não é específico para NORs, pois outras estruturas como heterocromatina, cinetocoro e "cores" cromossômicos também podem ser marcadas. No entanto, essas estruturas quando marcadas são facilmente distinguíveis das NORs pelas suas formas e colorações, pois geralmente as NORs aparecem mais escuras e são puntiformes (SUMNER, 1990).

O emprego do método Ag-NOR possibilitou observar que a maioria dos anuros, tanto de famílias primitivas como de derivadas, apresenta um par de NORs por genoma diplóide (ver KING *et al.*, 1990, para referências), o que levou KING *et al.* (1990) a sugerir que essa seja uma condição primitiva em Anura. Segundo SCHMID (1982), estudos em Anura sugerem também que heteromorfismos de tamanho de NORs sejam bastante comuns nesse grupo e que NORs duplicadas ou triplicadas não ocorram em homozigose em populações selvagens, estando sempre associadas a NORs de tamanho "normal". A hipótese levantada por SCHMID (1982) para explicar a não-ocorrência de homozigose de NORs com ampliações desse tipo é a de que a homozigose de sequências duplicadas juntamente com as NORs tenha efeito deletério, visto que o excesso de rDNA parece não ser prejudicial ao organismo.

3.2. Heterocromatina constitutiva

O termo heterocromatina foi atribuído a segmentos cromossômicos que permanecem no estado condensado durante toda a intérfase por HEITZ (1928), com base em observações morfológicas. Estudos autorradiográficos mostraram que a cromatina encontrada no estado condensado é transcricionalmente inativa (RIS & KORENBERG, 1979). Dependendo do tipo de condensação envolvido, é possível distinguir três classes de cromatina condensada no

núcleo interfásico: eucromatina condensada; heterocromatina facultativa; e heterocromatina constitutiva. No caso da condensação da eucromatina, a inativação é reversível e ocorre em determinada geração celular. A heterocromatina facultativa é uma forma de eucromatina que sofreu inativação e condensação no início do desenvolvimento do organismo e permanece nesse estado por muitas gerações celulares em todos os tecidos somáticos. A heterocromatina constitutiva é aquela localizada em posições idênticas de cromossomos homólogos, em todas as células, como uma entidade permanente. Foram segmentos de heterocromatina constitutiva que HEITZ (1928) descreveu e denominou de heterocromatina. Em nível de microscópio óptico, essas classes podem ser diferenciadas, no entanto, tais cromatinas apresentam a mesma densidade ao microscópio eletrônico (ver revisão de JOHN, 1988).

A heterocromatina constitutiva de diversos organismos já estudados é composta predominantemente por sequências de DNA curtas, altamente repetitivas e não codificadoras, como confirmam as revisões de JOHN (1988) e SUMNER (1994). A inexistência de genes na heterocromatina constitutiva e a observação de que essa cromatina pode ser deliberadamente eliminada ou não amplificada enquanto o restante do DNA sofre politenização em células somáticas levou alguns pesquisadores a considerarem a heterocromatina um “lixo” do núcleo. No entanto, como lembra SUMNER (1994), a ausência de genes não exclui a possibilidade dessa cromatina exercer outras funções. PARDUE & HENNING (1990) discutem que a heterocromatina não deve ser um “lixo” e sim exercer funções ainda não definidas, fazendo uma analogia de heterocromatina com “artigo de colecionadores” (collections item), cuja importância é reconhecida apenas por quem entende. Esses autores mencionam, ainda, alguns fenômenos relacionados à heterocromatina, como variação, associação desse tipo de cromatina com cromossomos Y de insetos, e outros.

Para KING (1991), a heterocromatina exerce importante papel na proteção de sítios eucromáticos adjacentes de modificações estruturais acarretadas por recombinação, uma vez que reduz a formação de quiasma. Essa situação nem sempre é observada em relação a blocos de heterocromatina já fixados na população, mas invariavelmente detectada quando segmentos de heterocromatina encontram-se em um estado polimórfico (ver KING, 1991, para referências). JOHN (1988) afirma em sua revisão que algumas categorias de heterocromatina permitem recombinação enquanto outras não e HAWLEY et al. (1993) defendem a capacidade de pareamento meiótico de sequências heterocromáticas homólogas encontradas em cromossomos homólogos ou não e a falha na recombinação cromossomos homólogos

heterozigotos para um determinado bloco heterocromático. Os casos de heteromorfismo de heterocromatina, em que a recombinação é reduzida nessa região, são de grande importância para o início de diferenciação sexual cromossômica, como mostrado no item 1.3. Vários outros papéis já foram propostos para essa cromatina, como a inativação de genes localizados muito próximos (BAKER, 1968; SPOFFORD, 1976; REUTER & SPIERER, 1992) e o envolvimento dessa cromatina em vários processos já relatados, como a condensação cromossômica, o reconhecimento de centrômeros e a importância desse processo no pareamento cromossômico (ver revisões de JOHN, 1988 e IRICK, 1994), o fenômeno de afinidade entre os cromossomos de uma mesma espécie (WALKER, 1971; YUNIS & YASMINEH, 1971). Segmentos heterocromáticos extras, não necessariamente adjacentes a NORs já foram relacionados com a regulação da expressão dessas regiões. CABRERO *et al.* (1986), em estudos com gafanhoto relacionaram a existência desses segmentos heterocromáticos extras a um aumento na atividade de NORs secundárias, sugerindo que esses blocos de heterocromatina possam inativar genes supressores dessas NORs, encontrados adjacentes a essa heterocromatina. LÓPEZ-LEÓN *et al.* (1995), também em estudo com gafanhoto, evidenciaram a ocorrência de vários tipos de dependência entre NORs na presença de heterocromatina supernumerária. À heterocromatina constitutiva associada a NORs já foi atribuído papel na formação de um único nucléolo durante a intérfase (BICKHAM & ROGERS, 1985). Ultimamente, a heterocromatina constitutiva também está sendo correlacionada a elementos genéticos móveis, o que a envolve em outros processos celulares, bastante estudados atualmente em insetos (DANILEVSKAYA *et al.*, 1993; SHEVELYOV, 1993).

A heterocromatina constitutiva é geralmente detectada citogeneticamente através da técnica de bandamento C. As heterocromatinas com outras características são evidenciadas por outros métodos, como bandamento N e impregnação por prata. A reação de Feulgen também é utilizada para a evidenciação de regiões cromossômicas com maior ou menor condensação (SUMNER, 1990).

O bandamento C foi descoberto por PARDUE & GALL (1970), que sugeriram que as regiões evidenciadas por esse método eram constituídas quase exclusivamente de DNA altamente repetitivo, denominado de DNA satélite. Posteriormente, DNA altamente repetitivo foi encontrado nas regiões banda C-positivas em várias espécies. Embora essa correlação entre banda C-positiva e DNA altamente repetitivo frequentemente ocorra, há casos em que não foi detectado esse tipo de DNA em regiões evidenciadas pelo bandamento C (SUMNER,

1990). BOSTOCK *et al.* (1972), CITOLER *et al.* (1972) e SPERLING & RAO (1974) observaram que as bandas C são replicadas tardiamente durante a fase S, o que é esperado uma vez que a heterocromatina tem replicação tardia (SCHMID, 1967; LIMA-DE-FARIA & JOWORSKA, 1968). SUMNER (1990), ao analisar a presença de genes na heterocromatina, sugere que esses sejam componentes de uma região eucromática pequena, microscopicamente não detectada, localizada dentro de uma região heterocromática.

O mecanismo bioquímico para explicar o bandamento C foi proposto por HOLMQUIST (1979) e apresenta, basicamente, três etapas: um tratamento ácido, que promove a remoção de purinas das moléculas de DNA; um tratamento alcalino, que provoca β -eliminação envolvendo a ribose do nucleotídeo que sofreu depurinação e desnatura irreversivelmente o DNA; e um tratamento salino, que remove segmentos de DNA quebrados. Acredita-se que a extração de DNA através desse método ocorra mais lentamente nas regiões de heterocromatina constitutiva, embora não se conheça exatamente o motivo dessa sensibilidade diferencial ao método.

Dos bandamentos conhecidos, o C é o principal nos estudos de Anura, uma vez que os bandamentos G, R e Q apresentam resultado satisfatório apenas em vertebrados superiores, como relatado por SUMNER (1990). A análise da localização e do tamanho das bandas C, assim como das marcações das NORs, permitem a identificação de cromossomos. As bandas C podem ser pericentroméricas, intersticiais ou teloméricas. Em alguns organismos, como algumas espécies de insetos, verificam-se braços ou mesmo cromossomos inteiros heterocromáticos. Cromossomos que não apresentam nenhuma região banda C-positiva são raros e provavelmente não ocorrem em cariótipos normais. Frequentemente o padrão de bandas C varia entre diferentes espécies (SUMNER, 1990), podendo portanto ser um importante caráter sistemático, que permite, inclusive, a sugestão de rearranjos genéticos ocorridos durante a evolução do grupo em estudo.

Várias espécies de Archaeobatrachia foram analisadas utilizando-se o bandamento C. Essas análises permitiram concluir que uma quantidade relativamente pequena de heterocromatina constitutiva é encontrada nesse grupo de anuros (KING, 1991). Por outro lado, apenas cerca de 15% das espécies de Neobatrachia estudadas citogeneticamente foram analisadas através da técnica de bandamento C. As análises feitas nesse nível mostram grande diferença no padrão de bandas apresentado por espécies de diferentes famílias, como Bufonidae, Hylidae, Leptodactylidae e Myobatrachidae (KING, 1991). Alguns leptodactídeos apresentam regiões banda C-positivas não-centroméricas, como *Pseudophryne occidentalis*,

Mixophyes fasciolatus, *Caudiverbera caudiverbera*, *Telmatobius montanus*, *Leptodactylus ocellatus* e *Pleurodema brachyops*, dentre outros. Espécies com heterocromatina não-centromérica também foram encontradas em outras famílias de Anura, como Hylidae e Ranidae, como citado por KING (1991).

A variação na quantidade de heterocromatina banda C-positiva observada em Amphibia levou KING (1991) a propor o envolvimento de três processos na evolução da heterocromatina constitutiva nesse grupo: a adição de heterocromatina a sítios cromossômicos específicos; a transformação de regiões cromossômicas eucromáticas em regiões de heterocromatina constitutiva; e a evolução em conjunto de múltiplos sítios heterocromáticos. A adição de heterocromatina é resultante da amplificação de sequências de DNA repetitivo e provavelmente está correlacionada a mudanças no comprimento dos cromossomos. Embora existam evidências que mostrem que a adição de heterocromatina é uma tendência em Amphibia, nada impede que deleções de regiões heterocromáticas tenham ocorrido. O conceito de transformação das regiões eucromáticas em heterocromáticas, resultando na heterocromatinização do genoma de anfíbios, foi apresentado originalmente por KING (1980). Esse processo não promove grandes alterações no comprimento do cromossomo e, embora esse mecanismo de transformação da cromatina ainda não seja bem compreendido, existem duas teorias tentando explicá-lo. Segundo uma delas, a amplificação de sequências repetitivas específicas distribuídas de forma interespaçada ao longo de uma região eucromática, acarretando uma modificação no estado de condensação dessa região, que poderia, inclusive, ser detectada por fluorocromos e pelo bandamento C. A segunda teoria sugere que essa alteração na condensação cromossômica (heterocromatinização) seja resultado da incorporação de uma sequência de DNA repetitivo, originada a partir da amplificação de um sítio específico, a uma região de DNA de sequência única. Qualquer que seja a origem causal da heterocromatinização, esse processo implica desativação gênica, conforme se acredita desde WHITE (1973).

Segundo KING (1991), o aumento da heterocromatina constitutiva é uma tendência evolutiva em Amphibia, embora não descarte a possibilidade de ocorrência de diminuição dessa cromatina em grupos isolados. Essa tendência evolutiva sugere algum papel funcional para esse DNA não-codificador, contrariando a hipótese de que a heterocromatina constitutiva seja um "lixo" sem função. Dentre as possíveis funções dessa heterocromatina já mencionadas anteriormente, a que se refere ao envolvimento da heterocromatina constitutiva

na redução de recombinação entre cromossomos sexuais em diferenciação parece ter comprovação em Amphibia (ver item 2.2, para referências).

O terceiro processo citado pelo autor refere-se à tendência de uma família de sequências de DNA repetitivo evoluir em harmonia, acarretando certa homogeneidade entre os membros dessa família, que é maior dentro de uma mesma espécie do que entre espécies relacionadas (JOHN & MIKLOS, 1988). Segundo DOVER (1988), processos como crossing-over desigual, transposição de DNA, conversão gênica, amplificação gênica e “slippage” na replicação estão envolvidos na homogeneização dessas sequências. Em Anura, a maioria das regiões heterocromáticas paracentroméricas é rica em GC, enquanto em Caudata é rica em AT. Isso mostra uma distribuição não-casual dessas regiões heterocromáticas nesses dois grupos e uma dicotomia entre eles. No entanto, a heterocromatina associada a NORs tanto em Anura com em Caudata é rica em GC, não mostrando dicotomia. A razão dessa diferença entre a heterocromatina paracentromérica e a associada a NORs ainda não é entendida (KING, 1991), embora a proposta de KING *et al.* (1990), de que a existência de sequências altamente repetitivas nas regiões intergênicas dos rDNA de Anura estejam impedindo a formação de quiasma nessas regiões de NOR, possa estar envolvida nisso.

Essas características da heterocromatina banda C-positiva mencionadas acima evidenciam que o seu estudo pode fornecer importantes informações evolutivas, sendo, portanto, um importante caráter citogenético a ser analisado.

4. As espécies *Edalorhina perezii* e *Physalaemus petersi*

Os gêneros *Edalorhina* e *Physalaemus* pertencem à subfamília Leptodactylinae (Leptodactylidae, Neobatrachia). Atualmente o gênero *Edalorhina* é composto por duas espécies, *E. nasuta* e *E. perezii*, como proposto originalmente por DUNN (1949). *E. perezii* Jiménez de la Espada, 1870, ocorre na Bacia Amazônica do Equador, Peru, Colômbia e Brasil (DUELLMAN & MORALES, 1990) e sua localidade-tipo é Napo, no Equador (FROST, 1985). DUNN (1949) sugere também que o gênero *Edalorhina* seja próximo de *Pleurodema*, enquanto LYNCH (1971) propõe que *Edalorhina* seja intermediário entre *Lithodytes* e *Physalaemus*. BOGART (1976), com base no número cromossômico de *E. perezii* e de representantes de *Physalaemus*, *Lithodytes* e *Pleurodema*, sugere que *Edalorhina* seja cariotipicamente mais próximo de algumas espécies do gênero *Physalaemus*. SCHLUTER

(1990) e DUELLMAN & MORALES (1990) concluem que comparações entre o comportamento reprodutivo de *Edalorhina* e o de diferentes espécies de *Physalaemus* suportam a proposta de BOGART (1976) relativa à relação entre esses gêneros. Embora HEYER (1975) tenha agrupado *Edalorhina* e *Pseudopaludicola*, sugerindo proximidade filogenética, DUELLMAN & MORALES (1990) concluem que essa relação não é apoiada por dados de natureza comportamental.

O gênero *Physalaemus* apresenta 33 espécies (FROST, 1985) e é provavelmente parafilético em relação a *Pseudopaludicola* (CANNATELLA & DUELLMAN, 1984). Segundo alguns caracteres morfológicos, esse gênero é mais relacionado a *Leptodactylus* e *Pleurodema*, enquanto outros indicam maior proximidade com *Edalorhina*, *Lithodytes* e *Paratelmatobius* (LYNCH, 1971).

Physalaemus petersi Jiménez de la Espada, 1872, é colocado junto com *P. coloradorum*, *P. pustulatus* e *P. pustulosus* no grupo *pustulosus*, considerado um grupo monofilético (CANNATELLA & DUELLMAN, 1984). Segundo CANNATELLA & DUELLMAN (1984), *P. pustulosus* e *P. petersi* são espécies-irmãs, o mesmo ocorrendo com *P. pustulatus* e *P. coloradorum*. *P. petersi* ocorre desde a Bacia Amazônica até os Andes na Bolívia, Peru, Equador e Colômbia. É encontrado também na foz do Amazonas e na Guiana Francesa (FROST, 1985), sendo sua localidade-tipo uma região oriental do Equador, provavelmente Napo-Pastaza (FROST, 1985).

O estudo citogenético comparativo desses diferentes gêneros de Leptodactiliinae fornecerá novos dados que poderão contribuir para o conhecimento das relações filogenéticas propostas com base em dados de outra natureza. Apesar da importante colaboração que esse estudo pode oferecer, pouco foi feito nesse nível com esses gêneros. A maioria dos estudos citogenéticos existentes relativos a esses grupos se restringem à descrição do número cromossômico característico das espécies, como é o caso do análise feita por BOGART (1973) em *Edalorhina perezii*. Dentro do grupo *pustulosus* de *Physalaemus*, a única espécie com informações citogenéticas é *P. pustulosus*, e essas também se referem ao número cromossômico, sem uma melhor caracterização cariotípica (ver KURAMOTO, 1990, para referências)

5. Objetivos

Tendo em vista a proximidade evolutiva proposta para os gêneros *Edalorhina* e *Physalaemus*, este trabalho tem por objetivo um estudo comparativo dos cariótipos de *Physalaemus petersi* e *Edalorhina perezi* encontrados na Amazônia brasileira, com o intuito de cooperar para a interpretação de relações filogenéticas que envolvem esses dois gêneros neotropicais.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Os espécimes estudados

Foram utilizados neste estudo sete espécimes de *Edalorhina perezii* Jimenez de la Espada, 1870 (Figura 1A), provenientes de uma região próxima à foz do Tejo, área pertencente à Reserva Extrativista do Alto Juruá (Estado do Acre). Dois desses espécimes eram fêmeas e foram coletados em 02 de março de 1994 (ZUEC 95.90 e 95.91) e os cinco demais eram machos, coletados em 25 de janeiro de 1996 (ZUEC 96.17-96.19, 96.22, 96.23). Foram estudados, ainda, sessenta e um espécimes de *Physalaemus petersi* Jiménez de la Espada, 1872 (Figura 1B). Dentre esses, catorze machos foram provenientes do município de Restauração, em Marechal Thaumaturgo, localizado na Reserva Extrativista do Alto Juruá (REAJ), Estado do Acre, seis deles (ZUEC 95.84-95.89) coletados em 2 de março de 1994 e oito em 29 de janeiro de 1996 (ZUEC 96.43-96.45, 96.50-96.53 e G11). Outros dezesseis exemplares, duas fêmeas (ZUEC 96.20 e 96.24) e catorze machos (ZUEC 96.21, 96.25, 96.26, 96.39-96.49) foram coletados nas proximidades da foz do Tejo, nessa mesma reserva, em 27 de janeiro de 1996. Os demais trinta e quatro exemplares foram provenientes da Reserva Florestal de Humaitá (Estado do Acre), tendo sido sete machos (ZUEC 95.92-95.98) coletados em 14 de dezembro de 1994, dezesseis machos (ZUEC 96.02-96.04, 96.07, 96.09, 96.11, 96.13, 96.14, 96.27-96.28, 96.30-96.33, 96.35-96.36) coletados em 17 e 18 de abril de 1995 e onze fêmeas (ZUEC 96.05-96.06, 96.08, 96.10, 96.12, 96.15, 96.16, 96.29, 96.34, 96.37 e 96.38) também coletadas nessa data. Um mapa com a localização aproximada das reservas mencionadas e dos locais de coleta é apresentado na Figura 2.

Todos os espécimes foram identificados pelo Prof. Dr. Adão José Cardoso (Departamento de Zoologia, UNICAMP, SP) e, após a retirada dos órgãos utilizados para a análise citogenética, foram etiquetados, fixados em formol a 10%, catalogados e depositados em álcool 70°GL no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC).



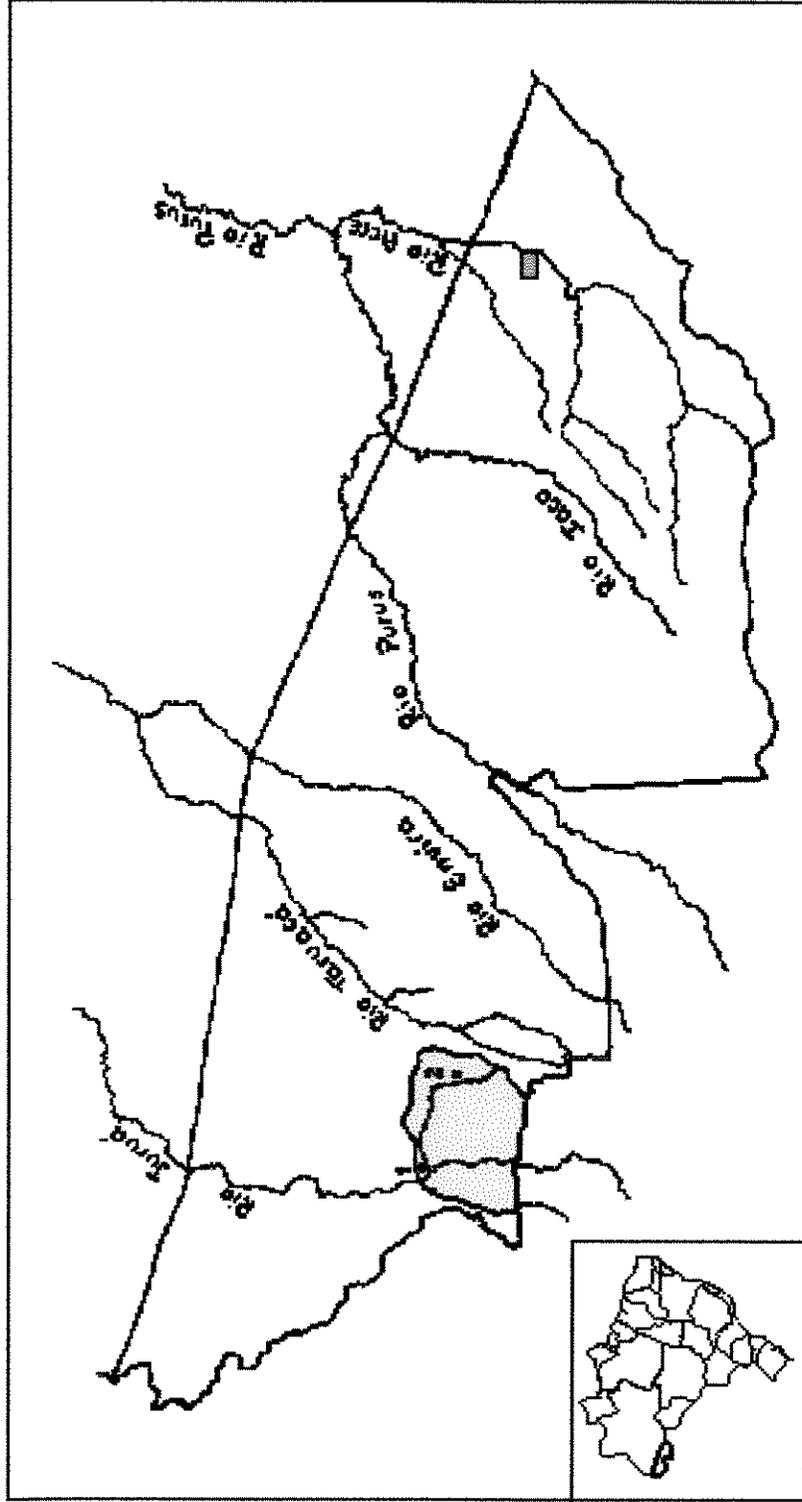


Figura 2 - Mapa do Estado de Acre, com os locais de coleta indicados. Em amarelo, a Reserva Extrativista do Alto Juruá, onde estão localizados o município de Restauração (1) e a foz do Tejo (2). Em azul, a Reserva Florestal de Humaitá. (Adaptação de Adão José Cardoso)

2. Obtenção das Preparações Cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de intestino e testículo, conforme os procedimentos descritos por BEČAK & BEČAK (1968), com algumas modificações. Os órgãos mencionados foram removidos cerca de 5 dias após a coleta dos animais. A colheita desses órgãos foi feita após os animais terem sido submetidos a um tratamento com colchicina a 1% (0,02 ml por grama do animal, injetados subcutaneamente) que durou, no mínimo, 3 horas e visava maximizar o número de células em metáfase. Logo após a remoção, os intestinos foram abertos, utilizando-se uma tesoura cirúrgica, para a exposição do epitélio, e colocados em recipiente contendo citrato de sódio a 0,9%, onde permaneceram por cerca de 15-20 minutos. Em seguida, os intestinos foram transferidos para uma placa de Petri com metanol-ácido acético (3:1) e o epitélio desses órgãos foi raspado vigorosamente. O material obtido foi desagregado, com o auxílio de pipeta Pasteur, e mantido no fixador por mais 5 minutos, aproximadamente.

Os testículos removidos dos espécimes foram submersos imediatamente em água gelada. Após aproximadamente 15-20 minutos, os testículos foram fixados em metanol-ácido acético (3:1). Nessa solução, os testículos foram recortados várias vezes com tesoura cirúrgica.

Tanto os materiais obtidos de intestino como os de testículo foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em metanol-ácido acético (3:1). Essa operação foi repetida mais duas vezes. As suspensões celulares resultantes foram gotejadas em lâminas limpas, que, em seguida, foram colocadas em caixas de madeira e mantidas a 4°C.

3. Métodos Citoquímicos

Alguns dias após a confecção das lâminas, essas foram submetidas às técnicas de coloração convencional com solução de Giemsa, de impregnação pelo íon prata ou de bandamento C. Para a coloração convencional das preparações cromossômicas, as lâminas foram cobertas com solução de Giemsa a 10% por 5 minutos.

O método de impregnação por prata utilizado foi o de HOWELL & BLACK (1980), modificando apenas a temperatura de incubação das lâminas, que foi substituída por 60°C.

A técnica de bandamento C utilizada foi a proposta por SUMNER (1972), com pequenas modificações sugeridas por KING (1980). Inicialmente as lâminas contendo material foram incubadas em solução de HCl 0,2N por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas em água destilada e secas também à temperatura ambiente. Foram, então, tratadas com solução saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, na concentração de 5%, à 50°C, por 2-5 minutos. Após esse tratamento, as lâminas foram lavadas cuidadosamente para que a película formada pelo $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ não entrasse em contato com o material e passadas rapidamente em HCl 0,2N. Após secas à temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas em 2xSSC à 65°C por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas e coradas com solução de Giemsa a 10% por 15 minutos.

As preparações cromossômicas submetidas a qualquer desses métodos foram diafanizadas em xilol por 10 minutos e, então, cobertas com entelan e laminula.

4. Análise das Preparações Cromossômicas

As preparações cromossômicas submetidas aos diferentes métodos citoquímicos foram analisadas ao microscópio óptico e núcleos interfásicos e cromossomos meióticos e mitóticos foram fotografados ao microscópio Zeiss M-35, em filme Agfa Copex. As micrografias foram confeccionadas em papel Kodabrome print RC (F3) e os cromossomos metafásicos ampliados foram medidos com régua para o cálculo do comprimento relativo, da razão de braços e do índice centromérico de cada cromossomo dos cariótipos em estudo. Foram calculados a média e o desvio padrão entre as medidas referentes a cada cariótipo encontrado. Esses dados foram utilizados para a classificação dos cromossomos em relação à posição centromérica, feita segundo LEVAN *et al.* (1964).

III - RESULTADOS

1. *Edalorhina perezii*

1.1. Descrição morfológica dos cromossomos mitóticos

O cariótipo encontrado nos sete indivíduos (cinco machos e duas fêmeas) analisados possui $2n=22$, apresentando seis pares de cromossomos metacêntricos (pares 1, 5, 6, 9, 10 e 11), quatro de cromossomos submetacêntricos (pares 2, 4, 7 e 8) e um de cromossomos subacrocêntricos (par 3) (Figuras 3 e 8; Tabela I). Na maioria das cinquenta e nove metáfases coradas com Giemsa observadas foi possível identificar uma constrição secundária no braço longo dos cromossomos do par 8 (Figuras 3 e 8).

1.2. Regiões impregnadas por prata

O método Ag-NOR permitiu identificar a existência de apenas um par de NOR em metáfases obtidas de seis dos espécimes em análise. Essas NORs se localizam no braço longo dos cromossomos do par 8 (Figuras 4A e 8) e parecem coincidir com as constrições secundárias observadas nas metáfases coradas com Giemsa (Figura 3).

Nas preparações submetidas ao método Ag-NOR foi possível detectar, ainda, núcleos interfásicos de células intestinais com um ou dois nucléolos (Figura 4B).

Nas preparações de testículos foi possível verificar atividade de NORs em espermatogônias, espermatócitos nas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno da primeira divisão meiótica e em espermátides arredondadas. Em células encontradas nas demais fases da espermatogênese, as NORs não foram detectadas pelo método Ag-NOR (Figura 5).

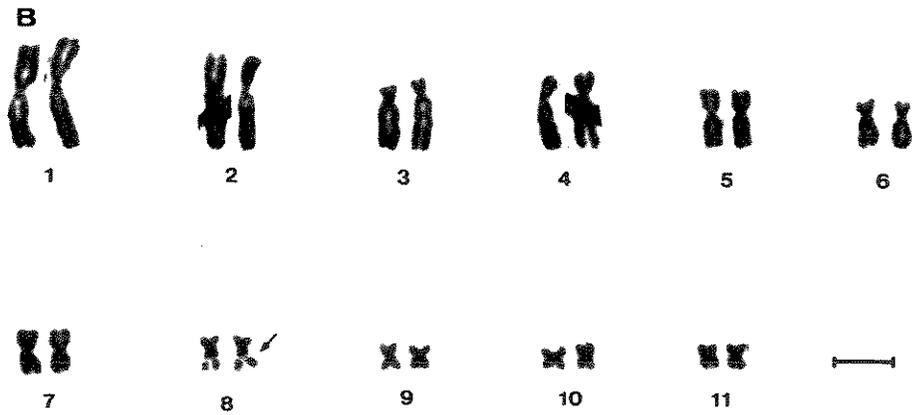
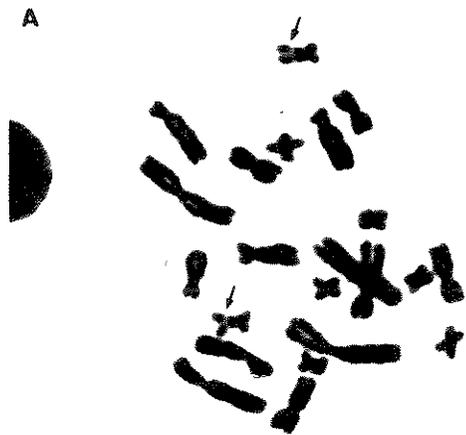
1.3. O padrão de bandamento C

A técnica de bandamento C evidenciou as regiões centroméricas de todos os cromossomos e três segmentos intersticiais em metáfases referentes a dois indivíduos

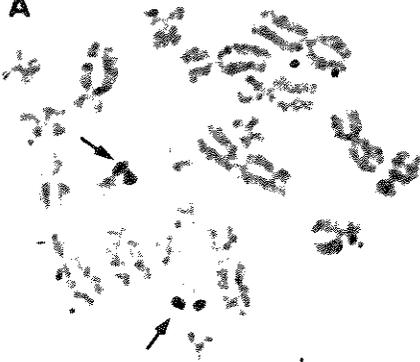
analisados (ZUEC 96.19 e 96.23). As bandas centroméricas não são muito grandes e apenas uma das bandas intersticiais, que se localiza no braço longo do par cromossômico 8, apresenta-se fortemente corada, além daquelas centroméricas. Essa banda parece ser adjacente à NOR, que é delimitada também pela heterocromatina centromérica. Outras bandas não-centroméricas foram evidenciadas no braço curto dos cromossomos do par 1 e no braço longo dos cromossomos 2. Essas bandas apresentam coloração menos intensa do que os demais blocos heterocromáticos detectados (Figuras 6 e 8). Nenhuma variação foi encontrada em relação ao padrão de distribuição de regiões banda C-positivas apresentado pelos dois indivíduos analisados através do método de bandamento C.

1.4. Os cromossomos meióticos

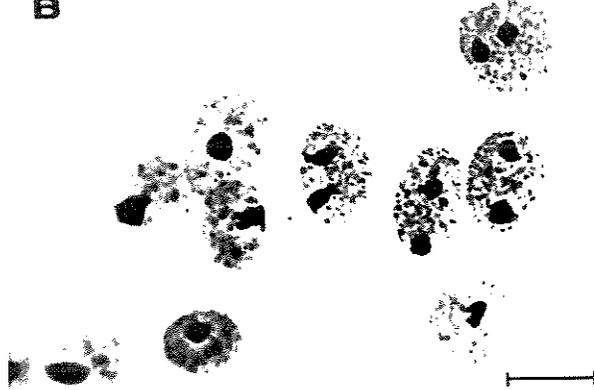
A observação de espermatócitos dos indivíduos ZUEC 96.22 e 96.23 permitiu confirmar o número diplóide de 22 cromossomos encontrado nas análises realizadas em células intestinais. Foram observados espermatócitos I com onze bivalentes isolados (Figura 7A-B) e com cadeias lineares de bivalentes, formadas por 3 pares de cromossomos grandes (Figura 7C-D).

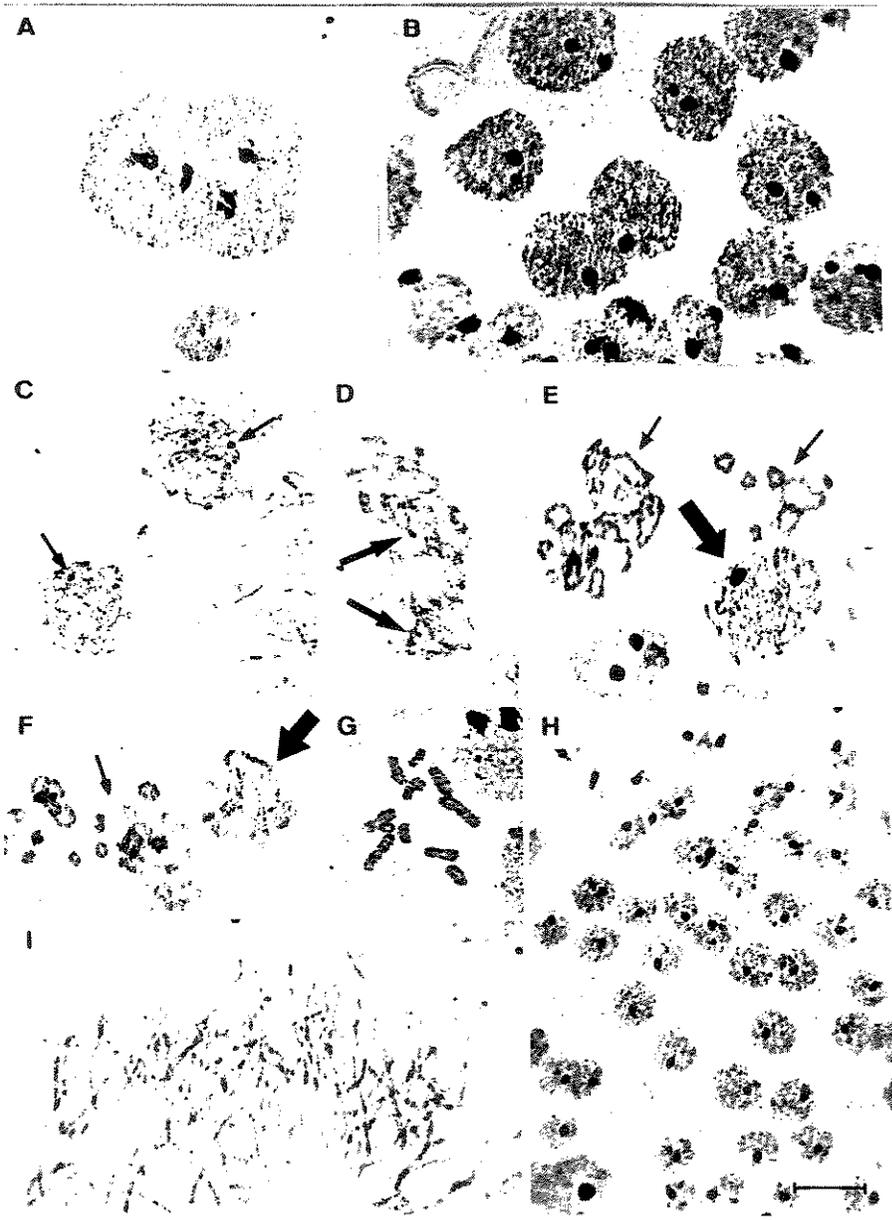


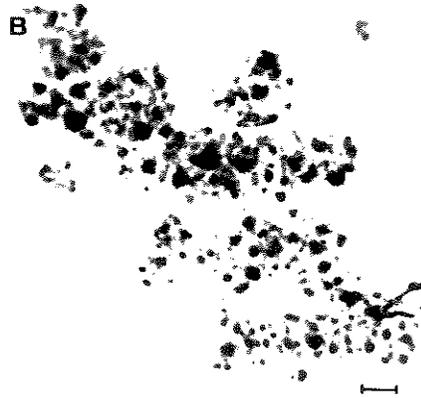
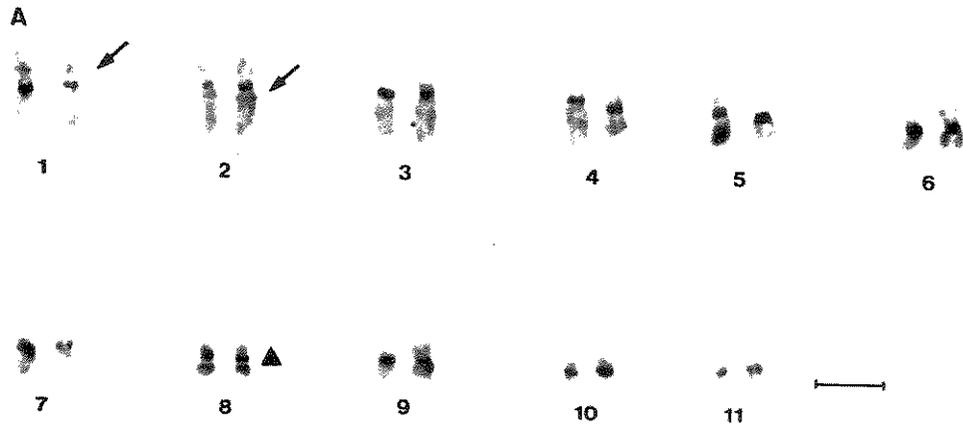
A



B



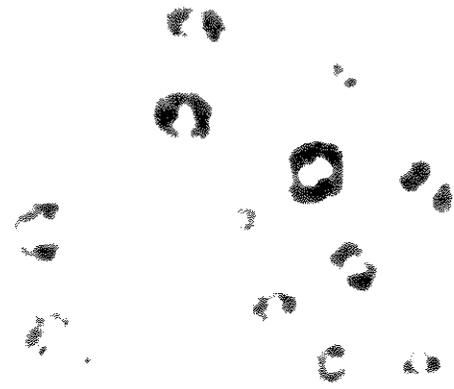




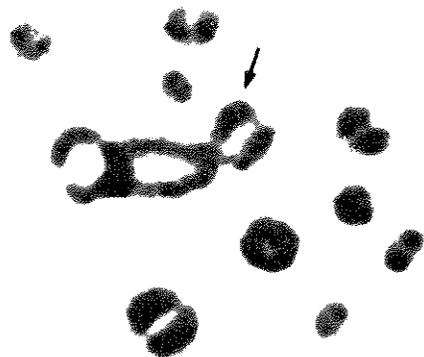
A



B



C



D

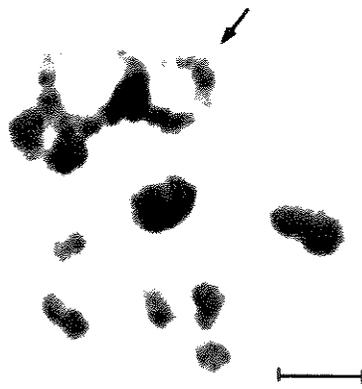


Tabela I - Discriminação do comprimento relativo (CR), calculado em relação ao comprimento total do genoma haplóide, da razão de braços (RB), índice centromérico (IC) e classificação (segundo LEVAN *et al.*, 1964) de cada cromossomo do cariótipo de *Edalorhina perezii*, obtidos a partir da medida dos cromossomos de 29 metáfases, provenientes de 8 indivíduos.

cromossomo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CR	0,17	0,14	0,12	0,11	0,10	0,08	0,08	0,06	0,05	0,04	0,04
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
RB	1,22	1,80	3,48	2,32	1,34	1,12	2,02	1,79	1,22	1,14	1,09
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,08	0,17	0,34	0,29	0,12	0,08	0,23	0,20	0,16	0,08	0,08
IC	0,55	0,64	0,78	0,70	0,57	0,53	0,67	0,63	0,55	0,53	0,52
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02
classificação	M	SM	SA	SM	M	M	SM	SM	M	M	M

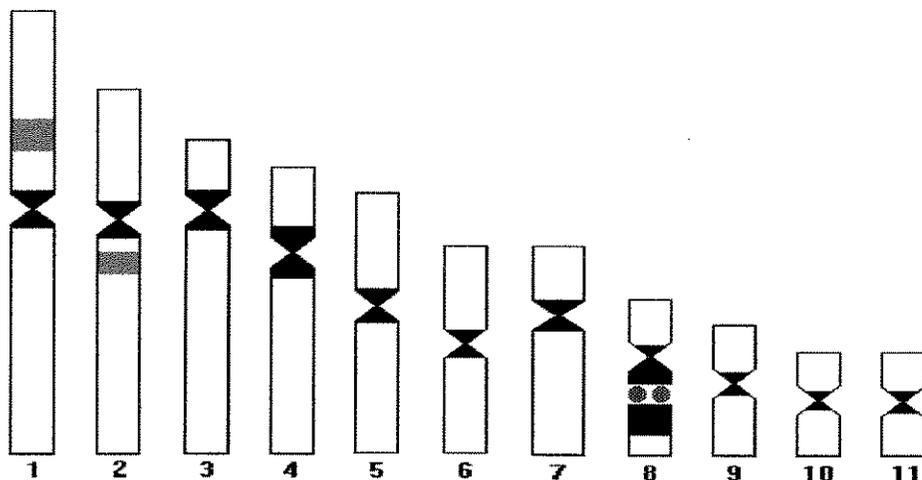


Figura 8 - Ideograma representativo do cariótipo de *Edalorhina perezii*. Os círculos hachurados representam NORs; os setores pintados em preto indicam regiões de heterocromatina fortemente coradas pelo bandamento C e em cinza, a heterocromatina fracamente corada por esse método; e a região não delimitada lateralmente corresponde à constrição secundária.

2. *Physalaemus petersi*

Dois cariótipos diferentes foram encontrados dentre os indivíduos identificados como *Physalaemus petersi*. Com o propósito de facilitar a descrição de ambos, o cariótipo encontrado na maioria dos indivíduos foi identificado como cariótipo I e o mais raro, como cariótipo II. Portanto, a descrição que se segue será dividida em duas partes, cada uma referente a um dos cariótipos.

2.1. O Cariótipo I de *P. petersi*

2.1.1. Descrição morfológica dos cromossomos mitóticos

Esse cariótipo apresenta 22 cromossomos com quatro pares de autossomos metacêntricos (1, 5, 6 e 10), quatro de submetacêntricos (2, 4, 7 e 9) e dois de subacrocentricos (3 e 8), além de um par de cromossomos sexuais heteromórficos XX/XY (Figuras 9 e 19; Tabela III) e foi encontrado em onze machos (ZUEC 95.86-95.89, 96.25, 96.41-96.43, 96.47, 96.49, 96.52) e duas fêmeas (ZUEC 96.20 e 96.24) provenientes da Reserva do Alto Juruá e em treze machos (ZUEC 95.93, 95.96, 95.97, 96.02, 96.03, 96.09, 96.13, 96.28, 96.31, 96.32, 96.34, 96.33, 96.37) e duas fêmeas (ZUEC 96.10 e 96.29) coletados na Reserva de Humaitá. Cerca de trezentas e trinta e três metáfases provenientes desses indivíduos foram observadas.

Os cromossomos sexuais desse cariótipo diferem tanto em tamanho como na posição do centrômero, sendo o cromossomo X metacêntrico ou submetacêntrico e o Y subacrocentrico (Figuras 9 e 19; Tabela III). Em uma (ZUEC 96.10) das quatro fêmeas que tiveram seus cariótipos analisados foram encontrados dois cromossomos X diferentes (Figura 15A). A comparação entre as medidas desses cromossomos X de cinco metáfases da fêmea ZUEC 96.10 através do teste t de "Student" mostrou que um dos cromossomos X (denominado de X') é significativamente maior ($t=7,9$, $p<0.001$) e apresenta maior razão de braços ($t=4,44$, $p<0.01$) do que o outro (X''), nessa fêmea. A comparação entre a razão de braços do cromossomo X apresentado pelas outras fêmeas (ZUEC 96.20, 96.24 e 96.29) ($RB = 1,02 \pm 0,05$) com aqueles da fêmea ZUEC 96.10, feita através das medidas, mostrou não haver diferença significativa entre o cromossomo X daquelas três fêmeas e o cromossomo X' ($t=0,67$; $0,5<p<0,6$), ao contrário do verificado em relação ao cromossomo X'' ($t=4,86$;

0,001<p<0,01). O valor médio da razão de braços do cromossomo X de 19 machos é intermediário em relação àquele encontrado para os cromossomos X' e X''.

Os pares cromossômicos 6, 8, 10 e o cromossomo Y podem apresentar constrição secundária, embora nesse último cromossomo sua visualização seja mais difícil. A constrição secundária dos cromossomos 6, 10 e Y, quando observada, ocorre em uma região distal do braço longo desses cromossomos (Figuras 10 e 19). O cromossomo 8 pode apresentar duas diferentes constrições secundárias, uma delas localizada em uma posição proximal do braço longo desse cromossomo e outra em uma região intersticial desse braço. Essa última ocorreu em estado heterozigoto nos indivíduos ZUEC 96.24, 96.25, 96.43 e 96.49 (Figuras 10 e 19)

Em algumas metáfases foi possível observar uma quebra cromossômica na altura da constrição secundária mais próxima do centrômero do cromossomo 8, como mostra a Figura 9B.

2.1.2. Regiões impregnadas por prata

O método Ag-NOR permitiu detectar segmentos cromossômicos com impregnação argêntica característica de NOR ativa em autossomos dos pares 6, 8 e 10 e no cromossomo Y dentre os *P. petersi* amostrados. A NOR do cromossomo 8 é localizada em uma região proximal do braço longo desse cromossomo e as NORs dos cromossomos 6, 10 e Y também ocorrem no braço longo, porém em regiões mais distais. Todas essas regiões parecem coincidir com regiões visualizadas como constrições secundárias em metáfases coradas convencionalmente com Giemsa. Esse método permitiu determinar com certeza o padrão de distribuição de NORs ativas em nove indivíduos (ZUEC 96.20, 96.25, 96.28, 96.41-96.43, 96.47, 96.49 e 96.52), embora o método tenha sido empregado nas preparações cromossômicas de vários outros espécimes. Nesses indivíduos, todas as metáfases analisadas mostram o mesmo padrão de marcação de NORs pelo método Ag-NOR, inclusive as provenientes de diferentes tecidos, como foi possível verificar em relação aos dois machos, que tiveram preparações citológicas de intestino e de testículo analisadas. O número de metáfases mitóticas utilizadas para a descrição destes resultados está discriminado na Tabela II.

Em metáfases diplóides do indivíduo ZUEC 96.25, apenas uma NOR ativa, localizada em um cromossomo 8, foi detectada, como evidenciado pelo tratamento com prata (Figura 11A) e pela análise das constrições secundárias (Figura 10A). O padrão de NORs ativas apresentado pelo indivíduo ZUEC 96.20 corresponde a duas NORs por genoma diplóide, localizadas nos cromossomos do par 8 (Figuras 10B E 11B). No material referente aos espécimes ZUEC 96.42 e 96.52, foi possível detectar blocos de impregnação por prata

característicos de NORs em um cromossomo 8 e no cromossomo Y de cada célula diplóide (Figuras 10C e 11C). Nas células diplóides do indivíduo ZUEC 96.43 foram observadas marcações de NORs em um cromossomo 6 e no cromossomo Y (Figuras 10D e 11D). O padrão de NORs do espécime ZUEC 96.47 e 96.49 caracteriza-se por uma NOR em um cromossomo 6, um cromossomo 8 e no cromossomo Y (Figuras 10E e 11E). Nas metáfases diplóides do indivíduo ZUEC 96.41 também foram detectadas três NORs ativas, duas delas nos cromossomos do par 6 e a outra em um cromossomo 8 (Figura 10F e 11F). O padrão de NORs ativas apresentado pelo indivíduo ZUEC 96.28 corresponde a quatro NORs por genoma diplóide, duas delas localizadas nos cromossomos 6, uma em um cromossomo 8 e a última em um dos cromossomos do par 10 (Figura 11G).

Metáfases do indivíduo ZUEC 96.10 também apresentaram quatro regiões de impregnação por prata indicativas de NORs. Embora a identificação dos cromossomos que apresentem essas NORs tenha sido prejudicada devido à má qualidade dessas preparações cromossômicas, uma das NORs parece ser a do cromossomo 8, outras duas dos cromossomos 10 e a quarta parece ocorrer em um dos cromossomos 6 (Figuras 10G e 12A).

Em algumas metáfases referentes aos indivíduos ZUEC 96.43 e 96.49 foi detectado, ainda, um grande segmento intersticial no braço longo de um dos cromossomos do par 8 através do método Ag-NOR, que aparece com coloração marrom, mais clara do que a coloração característica daquelas regiões descritas anteriormente como NORs (Figura 12). Esse segmento parece coincidir com uma constrição secundária observada em metáfases desses indivíduos coradas com Giemsa (Figura 10D-E). Nessas metáfases, o método Ag-NOR detectou também algumas regiões centroméricas, cuja coloração se assemelha à apresentada por aquele bloco distal de um dos cromossomo 8 citado anteriormente (Figura 12).

A Figura 13 apresenta núcleos interfásicos submetidos ao método Ag-NOR de indivíduos portadores de uma (Figura 13A), duas (Figura 13B), três (Figura 13C) e quatro (Figura 13D) NORs ativas, mostrando a relação entre o número de NORs e o número de nucléolos.

A análise das preparações citológicas de testículo submetidas à impregnação por prata mostrou que nucléolos estão presentes nos núcleos de espermatogônias e continuam presentes até a fase de paquíteno da divisão meiótica, quando desaparecem e voltam a ser detectados em espermátócitos secundários jovens. Quando essa célula inicia seu alongamento, os nucléolos novamente desaparecem, não sendo observados também nos espermatozóides maduros (Figura 14).

2.1.3. Os padrões de bandamento C

Foi possível identificar com certeza o padrão de distribuição de heterocromatina banda C-positiva apresentado por cinco indivíduos. O número de metáfases analisadas para a descrição desses padrões é mostrado na Tabela II. Embora todos os indivíduos tenham apresentado banda centromérica em todos os cromossomos, a ocorrência de bandas teloméricas e intersticiais variou entre eles. Nas metáfases do indivíduo ZUEC 96.02 pode ser detectada banda telomérica nos dois braços dos dois cromossomos 6, no braço longo de um cromossomo 8, no braço longo dos dois cromossomos 10 e no braço curto de um desses cromossomos 10, além de bandas intersticiais no braço longo de um cromossomo 8 e dos dois cromossomos do par 9 (Figura 15A). Em relação aos pares cromossômicos 6, 8 e 10, o padrão de bandas apresentado pelo indivíduo ZUEC 95.97 é igual ao do indivíduo ZUEC 96.02. No entanto, o indivíduo ZUEC 95.97 apresenta banda intersticial em apenas um dos cromossomos do par 9 (Figura 15B). O cariótipo do indivíduo ZUEC 96.10 não apresenta banda telomérica nos dois braços dos cromossomos 6 e apresenta dois cromossomos 8 com banda telomérica e intersticial, um cromossomo 9 com banda intersticial e dois cromossomos 10 com banda telomérica no braço longo. Não foi observada banda telomérica no braço curto de nenhum dos seus cromossomos 10 (Figura 15C). O indivíduo ZUEC 96.32 apresenta o mesmo padrão de bandas apresentado pelo indivíduo ZUEC 95.97, com exceção da banda telomérica do braço curto do cromossomo 10, que não é observada no indivíduo ZUEC 96.32 (Figura 15D). No espécime ZUEC 96.25 nenhuma banda telomérica foi observada e uma banda intersticial foi detectada no braço longo de um dos cromossomos do par 9 (Figura 15E). Em um dos cromossomos 8 desse indivíduo foi observado um segmento intersticial do braço longo que apresenta-se como uma constrição secundária de coloração azulada, que conforme a condensação e da proximidade das cromátides das metáfases analisadas pode se destacar, assemelhando-se a uma região banda C-positiva, no entanto de coloração azul e não rósea como os blocos heterocromáticos banda C-positivos (Figura 15E).

A análise de metáfases mitóticas do indivíduo ZUEC 96.33 permitiu detectar com certeza duas bandas teloméricas em ambos os cromossomos do par 6 e duas bandas no braço longo de um cromossomo do par 8. A escassez de metáfases nas preparações cromossômicas referentes a esse indivíduo dificultou a identificação do padrão de bandas dos cromossomos 9 e 10, embora algumas metáfases sugiram a existência de uma banda no braço longo de um dos cromossomos do par 9 e de um dos cromossomos do par 10, como mostra a Figura 15F.

A região telomérica banda C-positiva do braço curto de um dos cromossomos 10 do conjunto cromossômico dos indivíduos ZUEC 95.97 e 96.02 é de difícil detecção, não sendo

visualizada mesmo em metáfases desses indivíduos que apresentam as demais bandas bem nítidas. A Figura 15A mostra dois pares de cromossomos 10, sendo possível detectar banda telomérica no braço curto de apenas um cromossomo do par apresentado em destaque e indicado como 10'. No outro par essa banda não é observada, embora as bandas centromérica e telomérica do braço longo sejam bem nítidas.

A Figura 16 apresenta núcleos interfásicos de células intestinais submetidos à técnica de bandamento C, mostrando que a heterocromatina detectada por esse método se distribui irregularmente por todo o núcleo, podendo formar alguns aglomerados. A diferença de número e tamanho dos grumos provavelmente seja resultante de variações metodológicas ocorridas durante o tratamento dos materiais em questão.

2.1.4. Comparações estatísticas dos diferentes morfos dos cromossomos 6, 8 e 9

Várias comparações morfométricas foram feitas a fim de analisar a alteração causada pelas NORs na morfologia dos cromossomos. Para isso foram utilizados cromossomos corados com Giemsa de indivíduos cujo padrão de distribuição de NORs detectadas pelo método Ag-NOR é conhecido. A identificação dos cromossomos portadores de NORs foi feita através da visualização de constrições secundárias e o parâmetro utilizado foi a razão de braços e não o comprimento relativo, na tentativa de minimizar diferenças resultantes da variação no grau de condensação das diferentes metáfases analisadas.

A comparação de cromossomos 6 portadores ou não de NORs, feita através do teste t de "Student" com cromossomos corados não-portadores de qualquer região heterocromática banda C-positiva além da centromérica (Tabela IV - 6a e 6b), não mostrou diferença significativa entre a razão de braços desses dois morfos ($t=1,72$; $0,1 < p < 0,2$). Essa comparação não foi feita utilizando-se cromossomos com bandas heterocromáticas teloméricas devido à ausência de dados fidedignos referentes a cromossomos portadores dessas bandas e não portadores de constrição secundária. A análise comparativa de cromossomos 8 portadores ou não da constrição secundária correspondente à NOR, que não apresentavam outra constrição ou regiões banda C-positivas não-centroméricas (Tabela IV - 8a e 8b), mostrou que esses cromossomos diferem em relação à razão de braços ($t=3,63$; $0,001 < p < 0,1$). O efeito da ocorrência ou não de constrição secundária no comprimento dos cromossomos 10 e Y não foi analisado devido ao pequeno número de dados métricos fidedignos referentes a esses cromossomos.

O efeito provocado pela constrição secundária do cromossomo 8 não-correspondente à NOR na morfologia desse par cromossômico não foi analisado estatisticamente devido à pequena amostra obtida e ao grande desvio padrão observado em relação aos valores de RB

obtidos (Tabela IV - 8c). No entanto, a diferença entre esse cromossomo e o cromossomo 8 não-portador de nenhuma constrição secundária parece evidente (Figura 10).

A fim de verificar alterações na morfologia dos cromossomos 6, 8 e 9 decorrentes da ocorrência ou não de segmentos cromossômicos banda C-positivos intersticiais ou teloméricos (ver item 2.1.3 deste capítulo), esses cromossomos também foram analisados comparativamente através do teste t de "Student". Essa análise não pode ser feita em relação ao par cromossômico 10 devido à não-disponibilidade de dados relativos a cromossomo desse par em número apropriado.

A comparação de cromossomos 6 portadores ou não de bandas heterocromáticas teloméricas, feita utilizando-se cromossomos com constrição secundária (Tabela IV - 6c e 6b), mostrou que a presença ou não de blocos heterocromáticos teloméricos acarreta diferença significativa na razão de braços de cromossomos do par 6 ($t=66,67$; $p<0,001$).

Em relação aos pares cromossômicos 8 e 9, o teste estatístico aplicado mostrou não haver diferença significativa entre os cromossomos portadores de bandas heterocromáticas não-centroméricas e os cromossomos correspondentes não-portadores dessas regiões ($t=1,62$; $0,1<p<0,2$ e $t=0,33$; $0,7<p<0,8$, respectivamente). Para a comparação dos cromossomos 8 foram utilizados cromossomos não-portadores de constrições secundárias (Tabela IV - 8a e 8d).

Com base nesses resultados, foram esquematizados dois morfos do cromossomo 6 (6' e 6'') e três do cromossomo 8 (8', 8'', 8''' e 8''''') no ideograma representativo do cariótipo I de *P. petersi* (Figura 19).

2.1.5. Os cromossomos meióticos

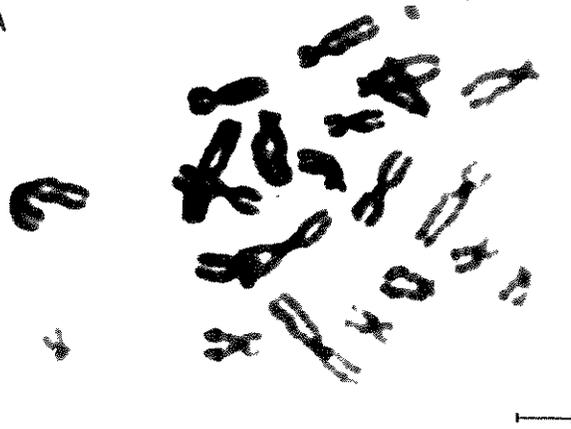
A análise de metáfases de cromossomos meióticos de machos indicou a presença de onze bivalentes, confirmando o número cromossômico encontrado nas preparações de cromossomos mitóticos ($2n=22$), como mostrado nas Figuras 17 E 18A. A análise de cromossomos meióticos submetidos ao bandamento C dos indivíduos ZUEC 95.97, 96.02, 96.25 e 96.32 permitiu verificar que a maioria dos seus espermatócitos I apresenta associação terminal de apenas um braço dos cromossomos do par 8, no caso do indivíduo ZUEC 96.02, e dos pares 8 e 9, no caso dos demais espécimes. Essa associação ocorre através do braço curto, podendo, inclusive, ser observados os blocos heterocromáticos banda C-positivos no braço longo de um dos cromossomos do par 8 nos espermatócitos I dos indivíduos ZUEC 95.97, 96.02, 96.32 e 96.33 e do par 9 nos espermatócitos I dos indivíduos ZUEC 95.97, 96.25 e 96.32 (Figura 17). No caso do indivíduo ZUEC 96.33, além da associação terminal dos pares cromossômicos 8 e 9, pode ser observado o mesmo comportamento em relação ao par

10, na maioria dos espermatócitos I tratados pelo método de bandamento C analisados (Figura 17E). Na Figura 18A são apresentados os cromossomos em diacinese de um espermatócito do indivíduo ZUEC 95.95, em que não se observa associação terminal dos cromossomos dos pares 8, 9 e 10. Nos espermatócitos I de todos os indivíduos analisados, foi possível observar a associação terminal dos cromossomos do par sexual (Figura 17 e 18A).

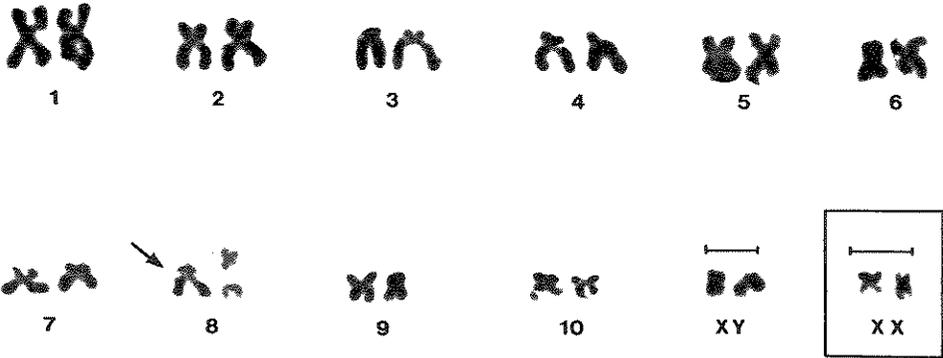
Dentre as preparações cromossômicas de testículo maduro de quatro exemplares (ZUEC 95.86, 95.89, 95.92, 96.25) provenientes da Reserva Extrativista do Alto Juruá (REAJ) e dois (ZUEC 95.95 e 95.97) da Reserva de Humaitá analisadas, foram observados bivalentes interligados entre si, formando cadeias cromossômicas multivalentes (Figura 18B-H). No material referente a outros três indivíduos (ZUEC 95.93, 95.96 e 96.33) da Reserva de Humaitá, foram observadas figuras meióticas que pareciam resultar da associação de 2 ou 3 bivalentes, no entanto, o pequeno número de células meióticas em diacinese impossibilitou a confirmação dessas suspeitas.

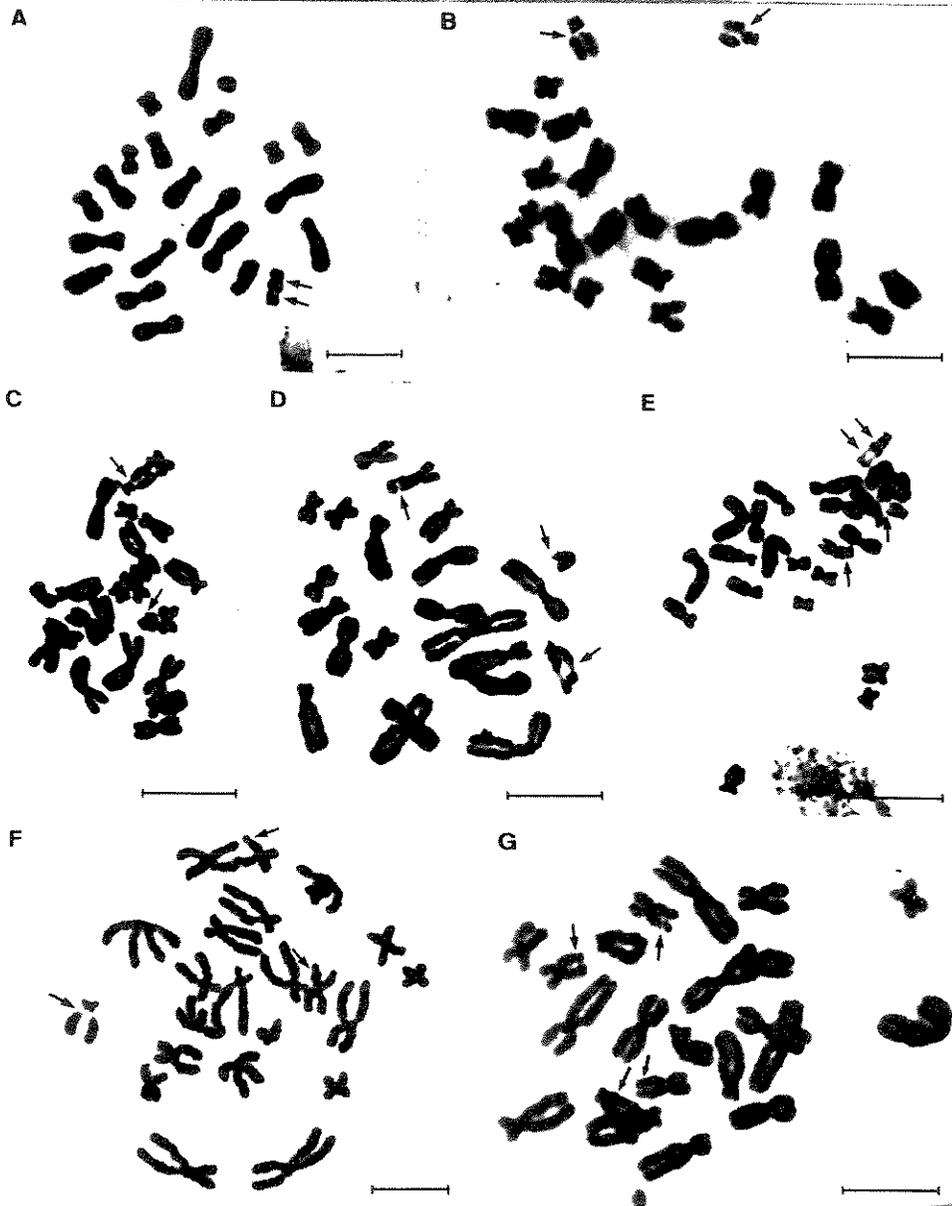
No indivíduo ZUEC 95.88 foi possível observar, inclusive, um anel aparentemente formado por todos os pares cromossômicos, mostrado na Figura 18. Nas preparações de todos os indivíduos que apresentam essas cadeias multivalentes na meiose, espermatócitos com bivalentes livres também foram observados.

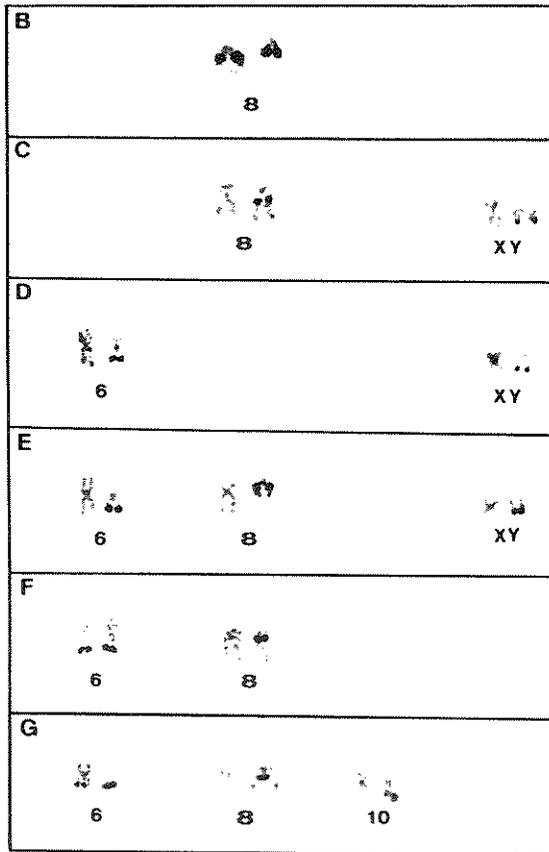
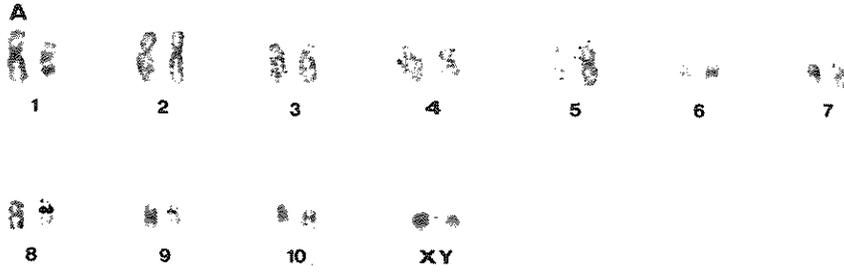
A

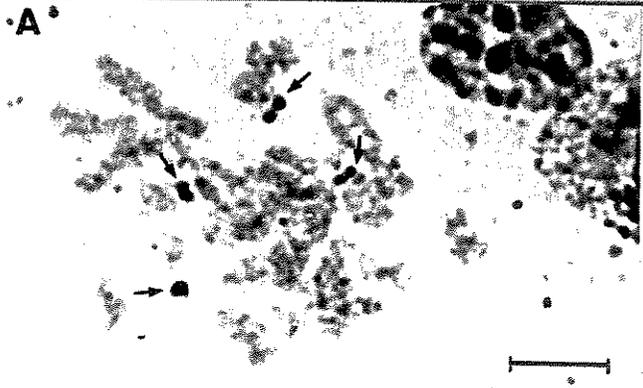


B





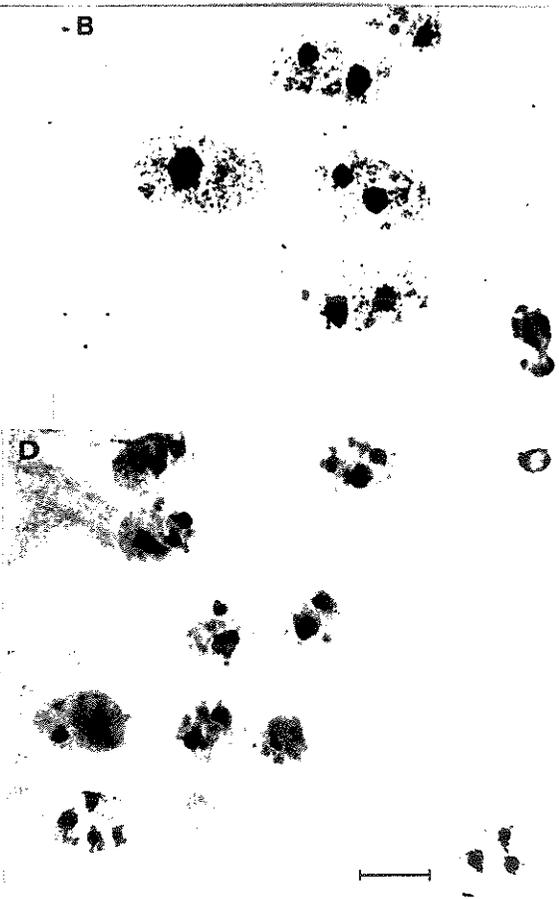




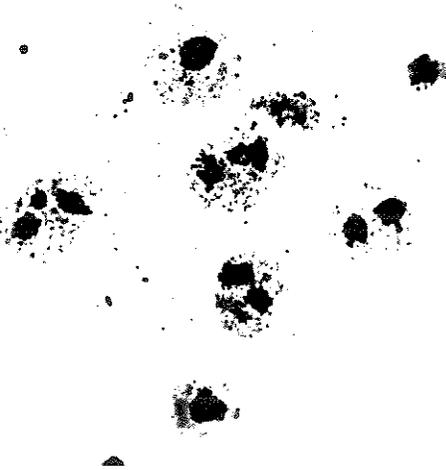
A



-B

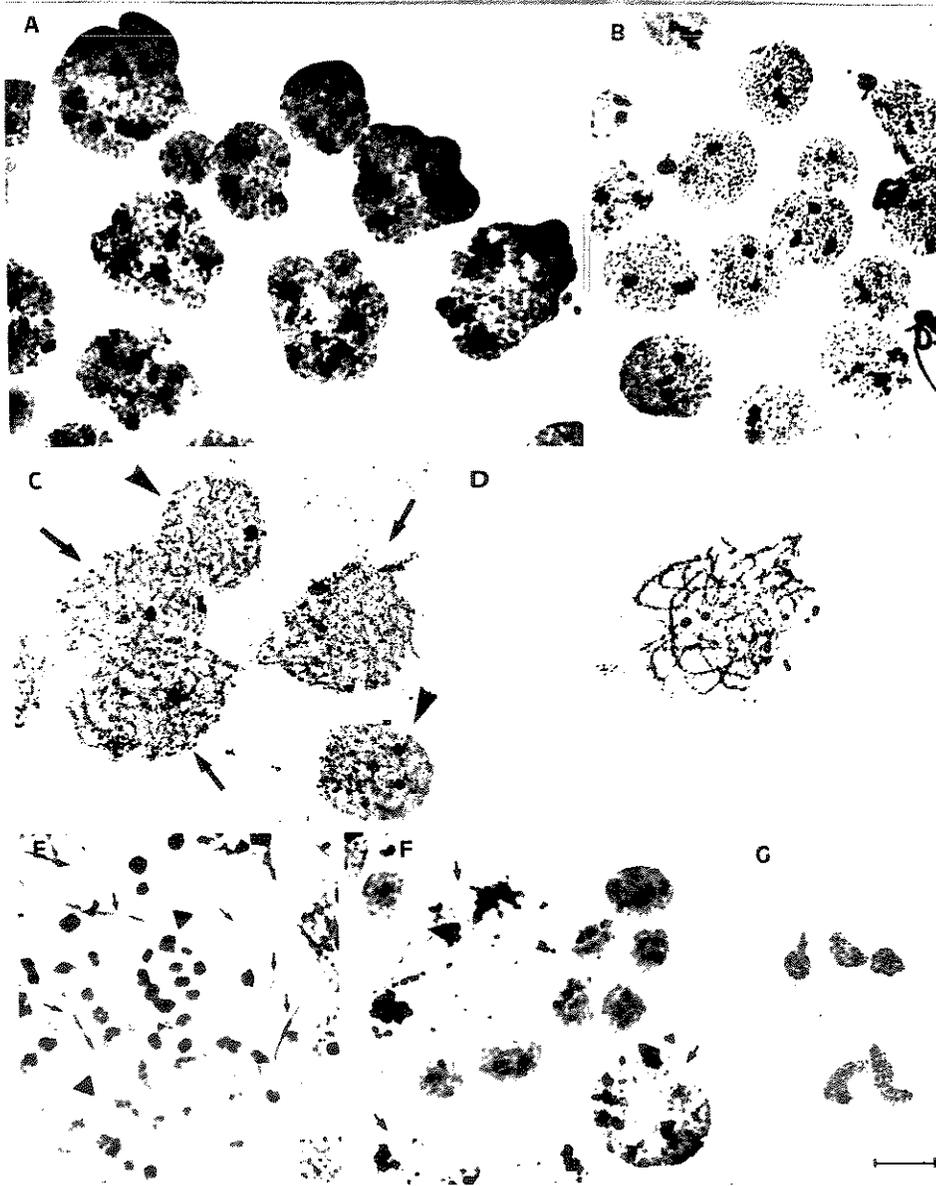


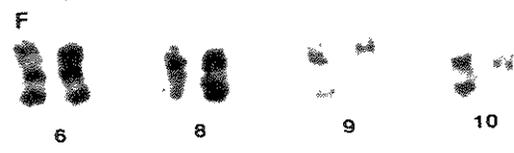
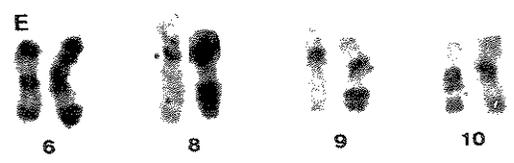
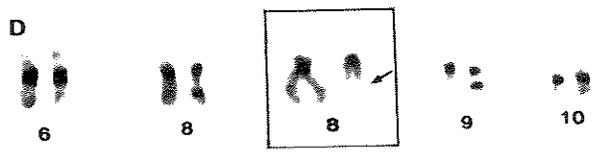
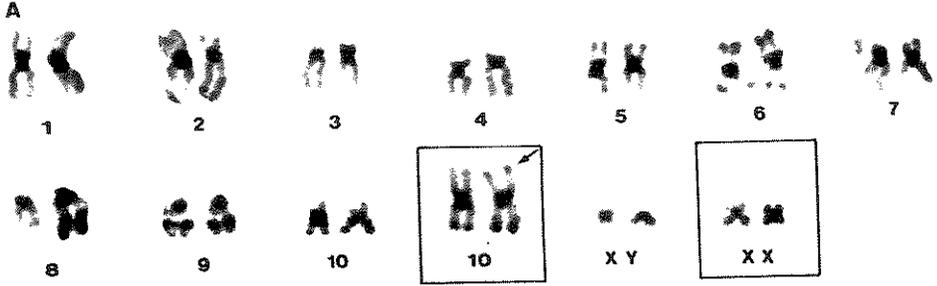
C



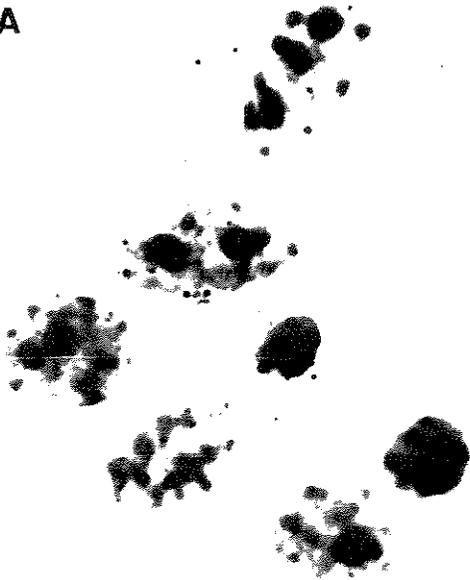
D



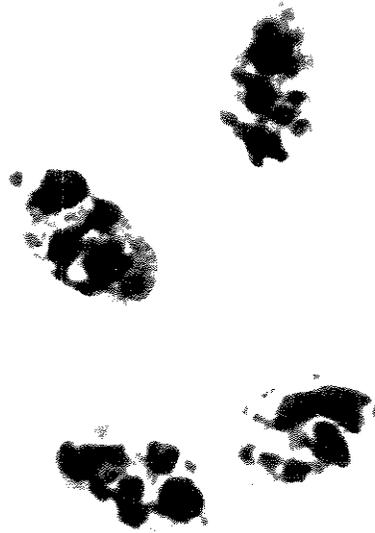


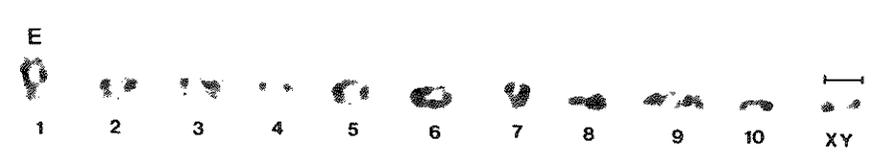
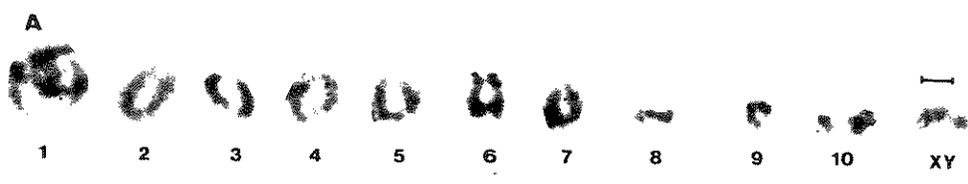


A



B





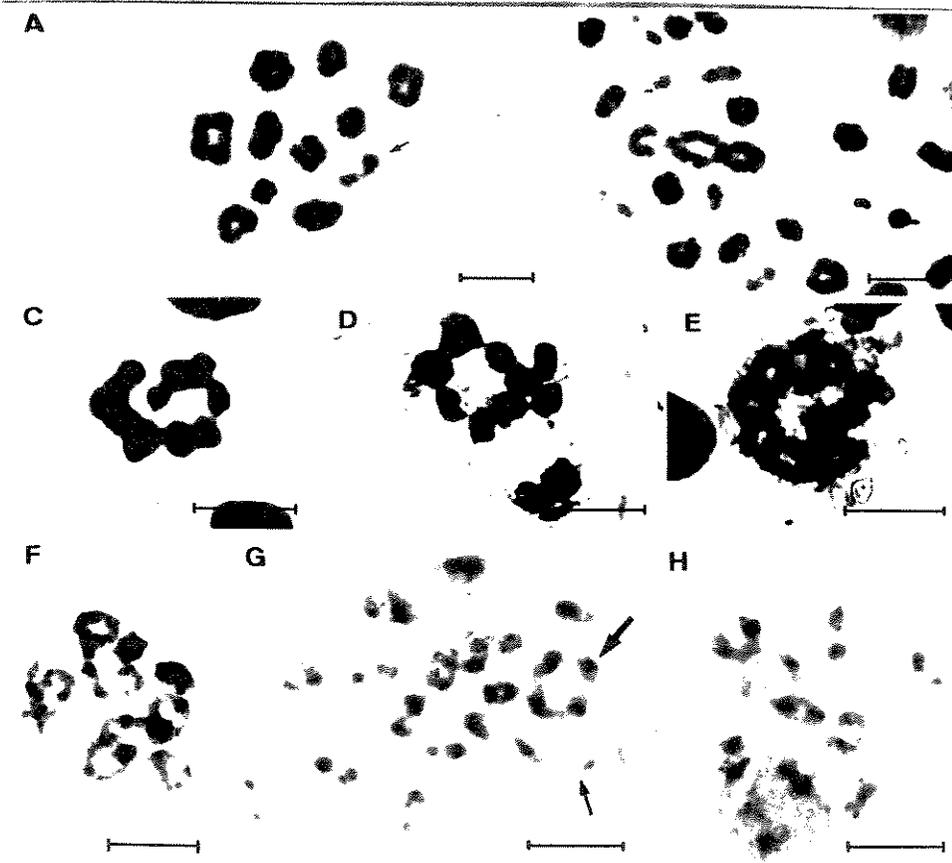


Tabela II - Número de metáfases mitóticas completas utilizadas para a definição do padrão de NORs e de heterocromatina constitutiva banda C-positiva dos diferentes exemplares de *Physalaemus petersi* do grupo cariotípico I analisados.

espécimes	número de metáfases mitóticas analisadas					
	método Ag-NOR			bandamento C		
	intestino	testículo	total	intestino	testículo	total
ZUEC 95.97	-	-	-	58	-	58
ZUEC 96.02	-	-	-	13	-	13
ZUEC 96.10	11	-	11	23	-	23
ZUEC 96.20	8	-	8	-	-	-
ZUEC 96.25	23	20	43	-	39	31
ZUEC 96.28	6	-	6	-	-	-
ZUEC 96.32	-	-	-	-	10	10
ZUEC 96.41	12	-	12	-	-	-
ZUEC 96.43	16	-	16	-	-	-
ZUEC 96.47	10	-	10	-	-	-
ZUEC 96.49	115	-	115	-	-	-
ZUEC 96.52	21	16	37	-	-	-
total	222	36	258	94	49	143

Tabela III - Discriminação do comprimento relativo (CR), da razão de braços (RB), do índice centromérico (IC) e da classificação (segundo LEVAN et al., 1964) de cada cromossomo do cariótipo I de *Physalaemus petersi*, obtidos com base na medida de 26 metáfases, de 10 indivíduos (9 machos e a fêmea ZUEC 96.10). Os comprimentos relativos de cada autossomo e dos cromossomos X foram calculados em relação ao comprimento do genoma haplóide, que incluiu um cromossomo X como representante do par sexual (X' no caso da fêmea). O comprimento do cromossomo Y foi obtido com base no cromossomo X homólogo.

cromossom	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X*	X'	X''	Y
CR	0,14	0,13	0,10	0,10	0,10	0,08	0,08	0,08	0,07	0,06	0,05	0,06	0,04	0,04
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
RB	1,23	1,76	3,72	2,65	1,17	1,28	1,86	4,29	1,87	1,30	1,24	1,36	1,04	4,81
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,10	0,24	0,38	0,26	0,12	0,13	0,28	0,67	0,29	0,15	0,13	0,15	0,06	0,81
IC	0,55	0,63	0,78	0,72	0,54	0,56	0,65	0,81	0,65	0,56	0,55	0,15	0,51	0,83
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,02	0,05	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03	0,04	0,02	0,03	0,02	0,01	0,05
classificaã	M	SM	SA	SM	M	M	SM	SA	SM	M	M	M	M	SA

X* representa os cromossomos X dos machos.

Tabela IV - Discriminação do comprimento relativo (CR), da razão de braços (RB) e da classificação (segundo LEVAN et al., 1964) dos morfos dos cromossomos 6, 8, 9 e 10 que diferem em relação a constrições secundárias e a segmentos banda C-positivos.

cromossomo	6a	6b	6c	8a	8b	8c	8d	9a	9b
constrição da NOR	-	+	+	-	+	-	-	-	-
constrição não-coincidente com a NOR	-	-	-	-	-	+	-	-	-
banda heterocromática não-centromérica	-	-	+	-	-	-	+	-	+
RB	1,33	1,48	1,26	2,59	7,37	12,47	4,53	2,00	1,96
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,10	0,20	0,02	0,46	3,12	8,28	0,52	0,22	0,33
número de metáfases analisadas	7	5	3	6	7	3	14	15	11

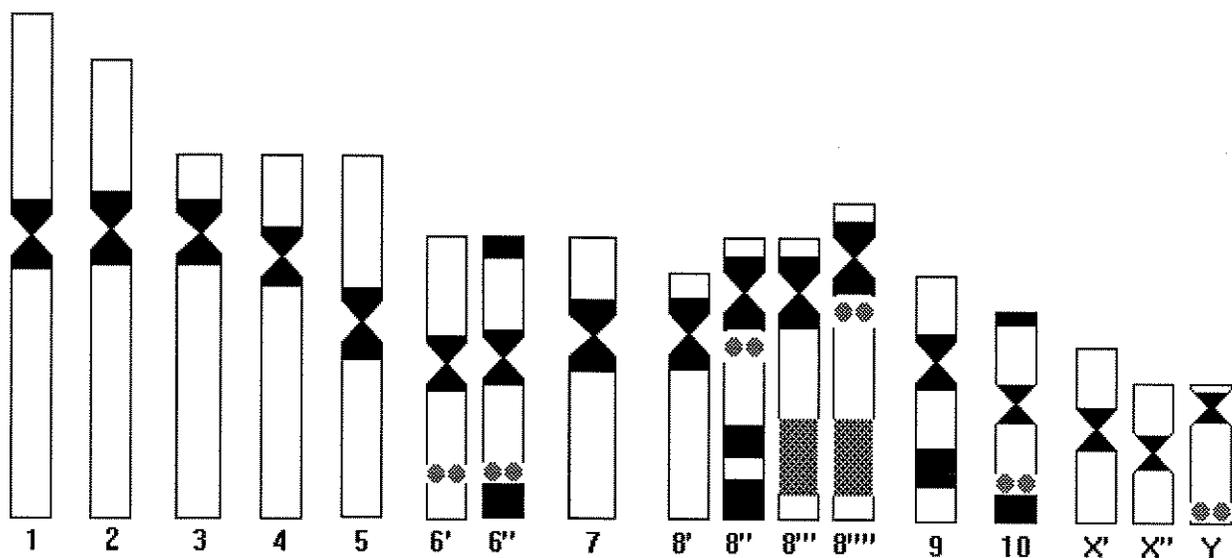


Figura 19 - Ideograma representativo do cariótipo I de *Physalaemus petersi*. Os círculos hachurados representam NORs; os setores pintados indicam regiões de heterocromatina banda C-positiva; as regiões não delimitadas lateralmente correspondem a constrições secundárias; e a região listrada corresponde a um segmento de comportamento anômalo após aplicação dos métodos Ag-NOR e de bandamento C e . As bandas heterocromáticas não-centroméricas e as NORs podem não ocorrer.

2.2. O Cariótipo II de *P. petersi*

2.2.1. Descrição morfológica dos cromossomos mitóticos

O cariótipo II de *P. petersi* foi encontrado em três indivíduos machos provenientes da Reserva Extrativista do Alto Juruá e cerca de vinte e quatro metáfases foram observadas. Dois desses espécimes foram coletados em março de 1994 (ZUEC 95.84 e 95.85) e um em janeiro de 1996 (ZUEC G11). Nesse cariótipo os pares 2, 3, 4, 7, 8 e 10 e um dos cromossomos heteromórficos do par 11 são metacêntricos, enquanto os pares 5 e 9 e o outro cromossomo do par 11 são submetacêntricos e o par 1 é subacrocentrico (Figuras 20 e 25, e Tabela V). Os cromossomos do par 8 apresentaram uma constrição secundária em uma região próxima ao telômero do braço longo nas metáfases de todos os indivíduos analisados. Nas metáfases do indivíduo ZUEC G11, além da constrição dos cromossomos 8, foi observada uma constrição secundária no braço curto de um dos cromossomos 9 (Figura 20).

2.2.2. As regiões impregnadas por prata

Através do método Ag-NOR foi detectada a existência de um par de NORs nos cromossomos do par 8, que parece coincidir com a localização da constrição secundária desses cromossomos, no material referente aos espécimes ZUEC 95.85 e ZUEC G11 (Figura 21). No indivíduo ZUEC G11 foi detectada, ainda, uma terceira NOR, localizada no braço curto de um dos cromossomos do par 9 (Figura 21B), também aparentemente coincidente com a constrição secundária observada nesse cromossomo. A comparação morfométrica entre os cromossomos 9 portadores e os não-portadores de NOR não foi realizada devido à dificuldade de observação do telômero do braço curto do cromossomo 9 portador de NOR (Figura 20A).

Os núcleos interfásicos submetidos ao método Ag-NOR apresentaram um ou dois nucléolos no material referente ao indivíduo ZUEC 95.85, cujas metáfases apresentam um par de NORs marcadas, e de um a três nucléolos nas preparações citológicas obtidas do indivíduo ZUEC G11, que apresenta três marcações nos cromossomos metafásicos (Figura 21). Os nucléolos observados nesses núcleos parecem maiores do que aqueles observados nos núcleos dos *Physalaemus petersi* que apresentam o cariótipo I, descrito no item 2.1.

O método Ag-NOR aplicado em preparações citológicas de testículo evidenciou a ocorrência de nucléolo (s) em espermatogônias e em espermatócitos que se encontram até a fase de paquíteno. Não foi detectado nucléolo em espermatócitos em fases mais avançadas da meiose. Espermátides arredondadas apresentam nucléolos e em espermatozóides essas estruturas não são mais observadas. (Figura 22).

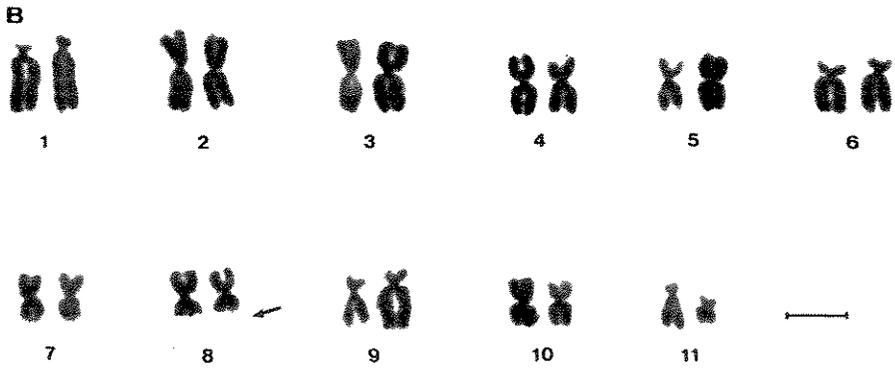
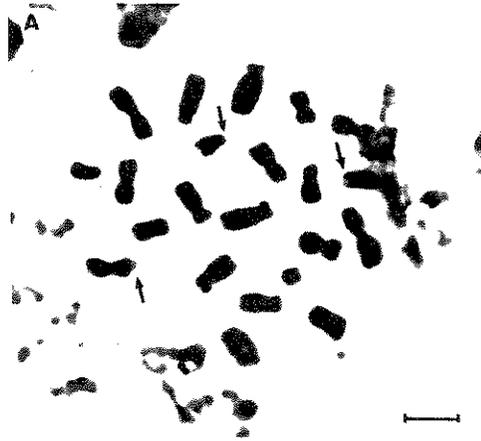
2.2.3. O padrão de bandamento C

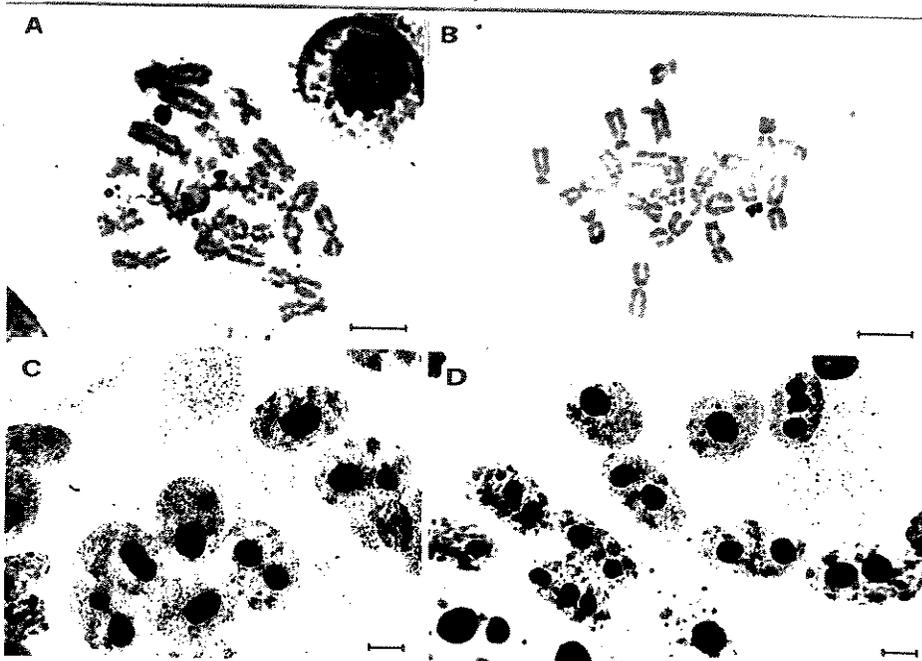
Devido à escassez de metáfases das preparações citológicas referentes aos indivíduos ZUEC 95.84 e 95.85, não foi possível a detecção do padrão de distribuição de heterocromatina banda C-positiva no cariótipo desses animais. No material proveniente do exemplar ZUEC G11 foi observada a presença de blocos de heterocromatina banda C-positiva no centrômero de todos os cromossomos. Foram detectadas também bandas heterocromáticas teloméricas nos dois braços dos cromossomos dos pares 4 e 8 e no braço longo do cromossomo 9 portador da NOR (Figura 23A). A comparação da morfologia dos cromossomos 9 portadores ou não de banda heterocromática telomérica não foi feita devido ao pequeno número de metáfases que responderam satisfatoriamente ao método de bandamento C aplicado.

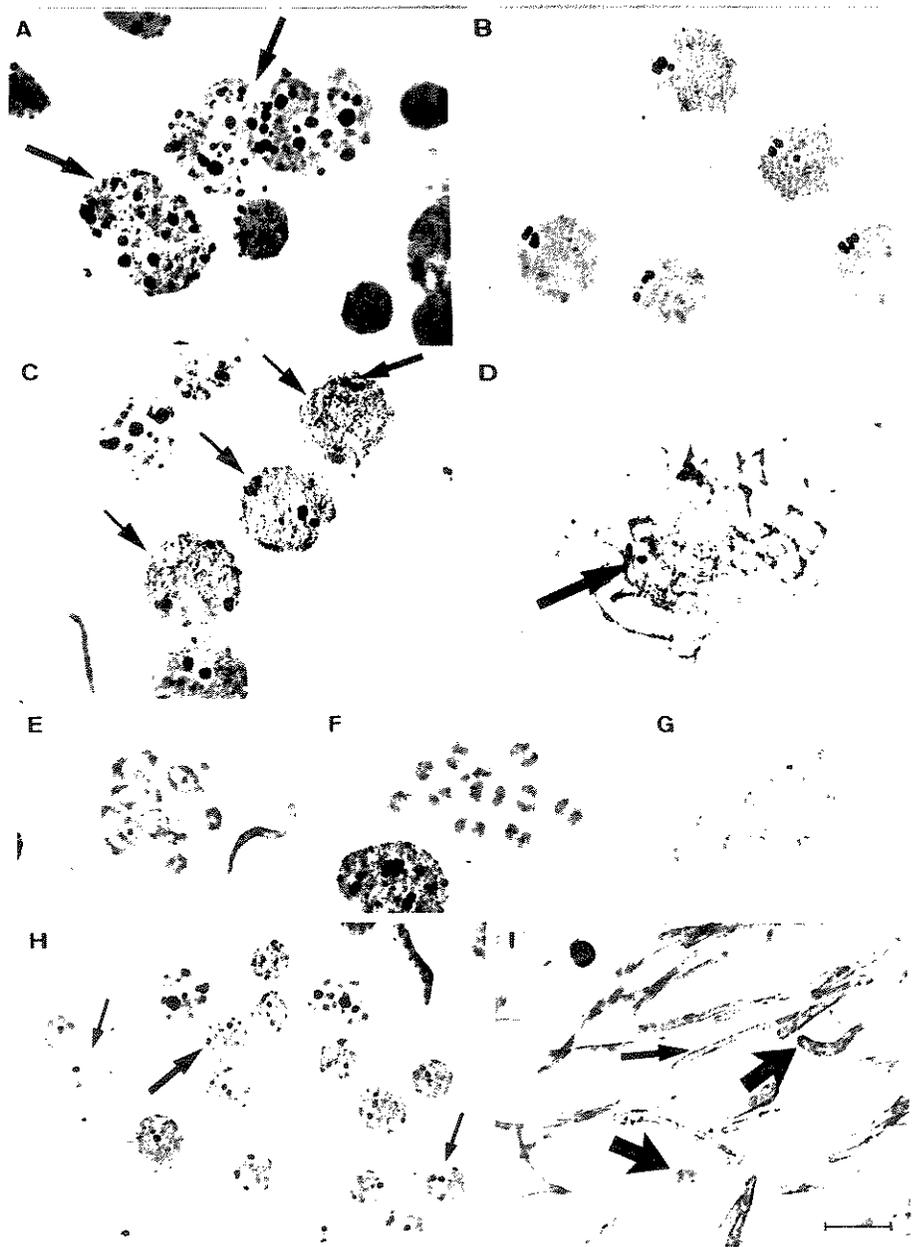
Núcleos interfásicos submetidos ao bandamento C são mostrados na Figura 23B.

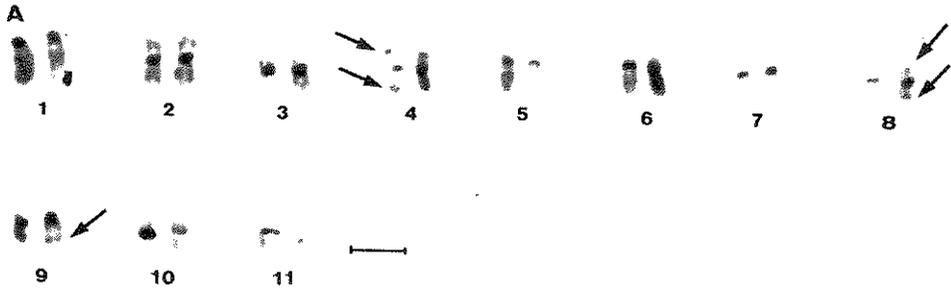
2.2.4. Os cromossomos meióticos

Nos espermatócitos dos três indivíduos que apresentaram esse cariótipo II também foram encontrados onze bivalentes, confirmando o número cromossômico observado nas metáfases mitóticas (Figura 24A). Foi observada uma desigualdade no tamanho dos dois cromossomos formadores do menor bivalente, o que também está de acordo com as observações realizadas em cromossomos mitóticos, confirmando o heteromorfismo de tamanho nesse par. A presença de bivalentes interligados foi detectada nas preparações cromossômicas referentes ao indivíduo ZUEC 95.84, como mostra a Figura 24B.

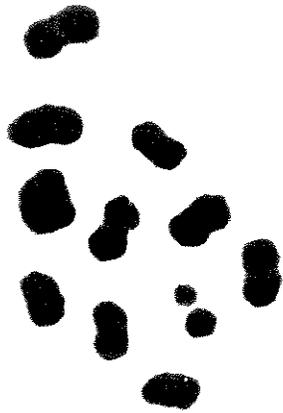








A



B



Tabela V - Discriminação do comprimento relativo (CR), calculado em função do comprimento total do genoma haplóide, da razão de braços (RB), do índice centromérico (IC) e da classificação (segundo LEVAN *et al.*, 1964) de cada cromossomo do cariótipo II de *Physalaemus petersi*, obtidos a partir da medida de 12 metáfases, de 3 indivíduos. O comprimento do cromossomo 11' foi computado no cálculo do comprimento do genoma haplóide e o comprimento relativo do cromossomo 11'' foi obtido com base no cromossomo 11'.

cromossom	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11'	11''
CR	0,12	0,12	0,10	0,10	0,10	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,04
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
RB	5,54	1,23	1,13	1,48	2,57	3,42	1,53	1,22	2,12	1,23	2,06	1,31
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,50	0,06	0,12	0,40	0,40	0,81	0,33	0,17	0,22	0,19	0,40	0,16
IC	0,84	0,55	0,53	0,59	0,72	0,77	0,60	0,55	0,67	0,55	0,68	0,56
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,01	0,01	0,03	0,05	0,03	0,04	0,04	0,03	0,02	0,04	0,05	0,03
classificaçã	SA	M	M	M	SM	SA	M	M	SM	M	SM	M

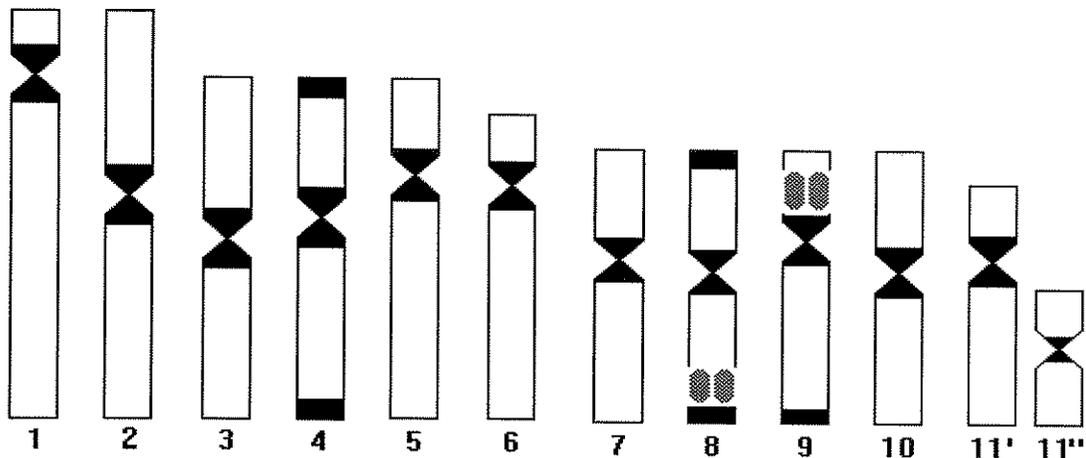


Figura 25 - Ideograma representativo do cariótipo II de *Physalaemus petersi*. Os círculos hachurados representam NORs; os setores pintados indicam regiões de heterocromatina banda C-positiva; e as regiões não delimitadas lateralmente correspondem a constrições secundárias. A NOR do cromossomo 9 nem sempre ocorre.

IV - DISCUSSÃO

1. Considerações gerais

O número cromossômico de $2n=22$ encontrado dentre os espécimes de *Edalorhina perezii* confirma o número descrito por BOGART (1973) para essa espécie. Embora dois diferentes cariótipos tenham sido observados dentre os espécimes de *Physalaemus petersi* estudados, o número cromossômico característico do atual táxon *P. petersi* é coincidente com o de todas as espécies desse gênero já analisadas citogeneticamente (ver lista de KURAMOTO, 1990).

2. NORs

As NORs detectadas pelo método Ag-NOR nos três cariótipos descritos neste estudo coincidem com a localização de constrições secundárias observadas em cromossomos corados com Giemsa. A NOR do cromossomo Y do cariótipo I de *P. petersi* é a de maior dificuldade de identificação como constrição secundária, provavelmente devido à sua proximidade com o telômero, o que dificulta a visualização da porção cromossômica delimitada pela NOR e pelo telômero. A NOR do cromossomo 6 do indivíduo ZUEC 96.10 de *P. petersi*, apesar de ser detectada pela impregnação por prata (Figura 12A), não foi observada como constrição secundária em nenhuma metáfase analisada. A observação dessa NOR como constrição secundária pode ter sido dificultada pela inexistência de banda heterocromática adjacente a ela (Figura 15C), uma vez que a presença de heterocromatina adjacente a uma NOR provavelmente torne essa região mais visível como constrição secundária em preparações coradas com Giemsa por providenciar maior contraste visual do limite entre esses segmentos de DNA.

O padrão de ocorrência de NORs detectadas pelo método Ag-NOR apresentado por *Edalorhina perezii* (um par de NORs por genoma diplóide) está de acordo com as observações referentes à maioria dos anuros, inclusive a famílias primitivas, como mostram PARDUE (1974), VITELLI et al. (1982), SCHMID (1982), KING (1980) e MAHONY & ROBINSON (1986). Também não foi observado nessa espécie heteromorfismo de tamanho de NORs, variabilidade comum de ocorrer em anuros, segundo SCHMID (1982). Essa não-observação de variabilidade em relação às NORs de *E. perezii* pode ser resultante do pequeno tamanho da amostra analisada, em vez de representar realmente uma baixa taxa de variação cariotípica nessa espécie. Por outro lado, pode, ainda, ser resultante de uma proteção contra recombinação oferecida à NOR pelos blocos de heterocromatina banda C-positivas que a

circundam. Esse papel funcional da heterocromatina constitutiva foi proposto por vários autores (revisões de JOHN, 1988 e KING, 1991).

Ao contrário, tanto dentre os *Physalaemus petersi* cujo cariótipo é do tipo I como dentre os que têm o cariótipo do tipo II, observa-se a presença de mais de um par cromossômico portador de NOR. Embora casos de múltiplos pares portadores de NOR sejam pouco numerosos em anuros, existem exemplos de espécies de diversas famílias, como Ranidae, Myobatrachidae e Hylidae, que apresentam três, quatro e cinco pares cromossômicos portadores de NOR (SCHMID, 1978; MAHONY & ROBINSON, 1986; WILEY et al., 1989; e SCHMID et al., 1995, para alguns exemplos), tendo sido descritos cariótipos com oito NORs por genoma haplóide, distribuídas entre cinco cromossomos (SCHMID, 1978 b). A ocorrência de múltiplos pares cromossômicos portadores de NOR parece ser um estado derivado em Anura (KING et al., 1990) e um fenômeno de múltiplas origens, não podendo ser esse estado utilizado para agrupar taxa sem antes uma análise dos cromossomos envolvidos em cada processo.

A análise do grupo de *P. petersi* com o cariótipo I mostrou, ainda, uma grande variabilidade de número e localização de NORs evidenciadas pelo método Ag-NOR, apesar do tamanho da amostra estudada ter sido pequena. Tal variação também parece ocorrer dentre os *P. petersi* do grupo cariotípico II, uma vez que foram encontrados cromossomos 9 portadores ou não de NOR. Variações dessa natureza tinham sido descritas em apenas cinco espécies de Anura até o momento, *Hyla versicolor*, *Hyla chrysocelis* (Hylidae), por WILEY et al. (1989), *Bufo terrestris* (Bufonidae), por FOOTE et al. (1991), *Agalychnis callidryas* (Hylidae), por SCHMID et al. (1995), e *Litoria raniformis* (Hylidae), embora nessa espécie tenha sido descrita apenas uma variação interindividual de localização e não de número de NORs, possivelmente resultante do reduzido tamanho da amostra, que consistiu de apenas dois espécimes. Em todos esses casos, experimentos de hibridação "in situ" com sondas de rDNA mostraram o mesmo resultado obtido com o método Ag-NOR e os autores interpretaram os vários padrões observados como uma variação de número e localização de NORs. A técnica de hibridação "in situ" fluorescente (FISH) com sondas de rDNA de *Xenopus laevis* (Pipidae, Anura) está sendo empregada no material previamente analisado através do método Ag-NOR com o intuito de investigar a existência de NORs inativas nesses genomas. Se essas não forem encontradas, a hipótese da existência de variação de número e localização de NORs ficará confirmada e, nesse caso, será evidenciada a inexistência de fixação de NOR no cariótipo I nas duas populações estudadas, visto que foram encontrados cromossomos 6, 8 10 e Y portadores e não-portadores de NOR. Esse tipo de análise não pode ser feita em relação ao cariótipo II de *P. petersi* devido ao pequeno número de exemplares obtidos para análise.

Apesar de todos os dados referentes à variação de NOR em anfíbios anuros (WILEY *et al.*, 1989; FOOTE *et al.*, 1991; e SCHMID *et al.*, 1995) e em anfíbios urodelos (HUTCHINSON & PARDUE, 1975; e NARDI *et al.*, 1978) indicarem a ocorrência de heteromorfismos de número e localização de cístrons ribossomais, os dados relativos a *P. petersi* ainda são insuficientes para descartar a hipótese de ativação diferencial de NORs como causa da variação encontrada, fenômeno já descrito em insetos. Essa hipótese, menos provável do que a anterior, visto os resultados observados até o momento em Amphibia, também será testada através de experimentos com hibridação "in situ" com sondas de rDNA. Se tais experimentos mostrarem que todos os *P. petersi* analisados apresentam NORs em estado homozigoto em todos os cromossomos portadores já detectados pelo método Ag-NOR, a hipótese da variação na regulação da atividade dessas NORs será a mais coerente. Nesse caso, a variação existente não será aquela citada anteriormente, mas uma variação em relação à constituição da região reguladora dos cístrons ribossomais. Dentre os vários estudos que têm investigado os mecanismos envolvidos na ativação diferencial de NORs, o fenômeno de competição entre NORs foi descrito em vários níveis, inclusive intrapopulacional em insetos (FLAVELL *et al.*, 1988). Nesse estudo, Flavell e colaboradores detectaram diferenças de metilação entre diferentes NORs e relacionaram o grau de metilação desses genes à sua atividade. SANCHEZ *et al.* (1989) também detectaram interações entre NORs homólogas e não-homólogas em insetos, sugerindo, ainda, que essas interações podem mudar de um indivíduo para outro. O tipo de interação entre a ativação das diferentes NORs detectadas em *P. petersi*, que pudesse explicar os diferentes padrões de NORs ativas encontrados, no caso da variação de padrões observados ser resultante de regulação gênica diferencial, poderá ser investigada posteriormente, em uma amostra maior. Como todos os padrões foram observados em indivíduos adultos e tanto em intestino como em testículo, no caso dos machos, a presente análise se restringe a descartar as hipóteses de relação da regulação de NORs com o tempo de desenvolvimento do animal e com o tecido.

Outros estudos sugerem a relação entre a regulação da atividade gênica de diferentes NORs e segmentos heterocromáticos extras adjacentes ou não a essas regiões (CABRERO *et al.*, 1986; LÓPEZ-LEÓN *et al.*, 1995). Devido à não-obtenção do padrão de bandas C daqueles indivíduos cujo padrão de NORs ativas foi determinado, não foi possível investigar a existência de relação entre blocos de heterocromatina constitutiva não-centroméricos e o número e localização de NORs ativas. No entanto, a análise comparativa dos indivíduos ZUEC 95.97 e ZUEC 96.10 de *P. petersi* sugere que a heterocromatina constitutiva telomérica do braço longo do cromossomo 6 encontrada no indivíduo ZUEC 95.97 não é fundamental para a expressão da NOR de localização adjacente a ela, uma vez que um dos cromossomo 6 do

indivíduo ZUEC 96.10 também apresenta NOR ativa embora nenhum dos cromossomos desse par apresente esses blocos heterocromáticos.

Blocos heterocromáticos adjacentes a NORs também foram observados nos cromossomos 8 e 10 do cariótipo I de *P. petersi*. Nos dois indivíduos de *E. perezi* analisados através dos métodos Ag-NOR e de bandamento C, sempre foi observado um bloco heterocromático adjacente às NORs.

A associação de NORs e regiões heterocromáticas já foi relatada para muitos anuros, como mostra SCHMID (1982), por exemplo. Outro papel proposto para esses blocos de heterocromatina constitutiva é o de proteger os cístrons ribossomais de recombinação, uma vez que já foi relatada a redução de quiasmas nas regiões com esse tipo de heterocromatina (ver revisões de JOHN, 1988 e de SUMNER, 1994, para referências). Isso pode estar ocorrendo nas duas espécies em estudo, podendo, inclusive, ser um dos responsáveis pela não-ocorrência de NORs amplificadas nos indivíduos analisados, uma vez que "crossing-over" desigual é um mecanismo que provoca alteração desse tipo.

No caso dos *P. petersi*, principalmente daqueles pertencentes ao grupo cariotípico I, é possível uma outra hipótese para explicar a ausência de heteromorfismo de tamanho de NORs. Pode-se sugerir que translocações e transposições que envolvam esses cístrons (rearranjos provavelmente envolvidos na difusão de NORs no genoma) possam ocorrer, desarranjando duplicações ou ampliações de cístrons ribossomais ocorridas. Dessa forma, NORs duplicadas ou amplificadas representariam um estado transitório, o que possibilita supor que um aumento no tamanho da amostra analisada possa levar à detecção dessas NORs. Uma terceira explicação para a ausência desse tipo de heteromorfismo em questão para *P. petersi* e que se enquadra também para *E. perezi* pode ser a de que existam NORs amplificadas nas populações estudadas e que rearranjos que as envolvam não sejam tão comuns como proposto pela hipótese anterior, o que sugere que elas não tenham sido identificadas devido a um problema de amostragem, que seria resolvido com o aumento do número de indivíduos analisados pelo método Ag-NOR. O tamanho da amostra já foi apontado por SCHMID (1982) como grande responsável pela não detecção de heteromorfismos existentes.

A análise estatística dos cromossomos 6 com e sem NOR ativa, feita através da comparação entre cromossomos portadores ou não de constrição secundária, sugere que a ocorrência de NOR ativa não altera o comprimento do braço cromossômico em que se encontra. A análise equivalente feita em relação ao par 8, sugere o contrário, indicando um maior comprimento do braço longo portador da NOR ativa. Ambos os resultados podem ser explicados independentemente da causa da variação de padrão de NORs ativas ser o

polimorfismo de número e localização de cístrons ribossomais ou a regulação diferencial da atividade de NORs. Se a não-detecção de NORs ativas corresponder à inexistência de cístrons ribossomais, sendo a hipótese de polimorfismo de número e localização de NORs correta, é possível supor que a diferenciação dos morfos referentes ao cromossomo 8 envolveu deleção, no caso do morfo ancestral ser portador de NOR, ou adição de NOR, no caso do morfo não-portador de NOR ser o ancestral. Ainda, se essa for a causa real, é possível supor que a diferenciação dos morfos do cromossomo 6 envolveu um conjunto de rearranjos cromossômicos ou modificações da cromatina que não resultaram em alteração no tamanho do braço longo do cromossomo. Ao contrário, se a hipótese correta for a de regulação diferencial da atividade de NORs, a diferença entre a razão de braços do morfo portador e do não-portador pode ser explicada pela diferença do grau de compactação entre a NOR ativa e a inativa, enquanto a não-observação de diferença na razão de braços entre os morfos do cromossomo 6 pode ser resultante de uma insensibilidade do método de medida utilizado. É importante lembrar, ainda, que todas essas suposições são de natureza especulativa, visto que a amostra cromossômica analisada morfometricamente foi pequena e a metodologia usada para a obtenção das medidas não é muito precisa para análises nesse nível.

3. Nucléolos

O número de nucléolos detectados pelo método Ag-NOR em núcleos interfásicos mostrou relação com o número de NORs detectadas por esse método, como pode ser visto nas Figuras 11 e 13. Por outro lado, o tamanho dos nucléolos observados também variou conforme o número de NORs que lhes deu origem e conforme o tamanho dessas NORs, ou seja, o tamanho nucleolar parece ter variado em função da quantidade de genes ribossomais ativos. Essa relação pode ser evidenciada pela variação do tamanho nucleolar conforme o número de nucléolos observados por núcleo, em um mesmo indivíduo, como pode ser observado na Figura 13. A comparação das NORs dos cariótipos I e II de *P. petersi* e de *E. perezi* e dos nucléolos correspondentes mostra que tanto as NORs como os nucléolos do grupo cariotípico I de *P. petersi* são maiores do que nos outros, evidenciando a relação de tamanho entre essas estruturas. Essa relação pode ser feita uma vez que a medida das NORs foi obtida a partir de constrições secundárias de cromossomos corados com Giemsa e não submetidos ao tratamento com prata, já que nesse último caso o tamanho da NOR também sofre influência do nível de atividade e não apenas da quantidade de rDNA presente naquela região. Tais resultados parecem estar de acordo com observações anteriores feitas inclusive em Anura, como as de MILLER & BROWN (1969) e MILLER & KNOWLAND (1970), dentre

outras, que relacionaram a quantidade de DNA ribossomal contida na NOR e o tamanho do nucléolo formado.

A variação observada em relação ao número de nucléolos encontrados em núcleos interfásicos de um mesmo indivíduo pode estar relacionada ao grau de ativação das NORs, assim como mostram alguns experimentos de indução de atividade nucleolar em linfócitos em cultura (ver revisão de SCHWARZAKER & WACHTLER, 1993, para referências). Dessa forma, os núcleos que apresentam maior número de nucléolos provavelmente apresentam NORs em início ou término de ativação, uma vez que as NORs ativas tendem a se agrupar, formando um ou poucos grandes nucléolos. Em células em início de divisão, a inativação das NORs e os movimentos mitóticos e meióticos acarretam a dispersão dos nucléolos, sendo originado maior número de nucléolos de menor tamanho.

Em relação ao comportamento dos nucléolos durante a espermatogênese, o resultado referente a *P. petersi* concorda com observações já feitas por SCHMID *et al.* (1982) em vários grupos animais, inclusive Amphibia. Foi observada a desativação das NORs após o paquíteno e reativação dessas em espermátides arredondadas, seguida de nova desativação em espermatozóides maduros.

4. Heterocromatina constitutiva

O cariótipo de *E. perezi* apresenta menor quantidade de heterocromatina centromérica banda C-positiva quando comparado com os cariótipos encontrados na amostra de *P. petersi* analisada. Além disso, a quantidade de heterocromatina constitutiva não-centromérica também é menor no cariótipo de *E. perezi* do que nos cariótipos de *P. petersi*, sendo o cariótipo I dessa espécie o que apresenta maior quantidade dessa heterocromatina.

No cariótipo de *E. perezi* foi possível detectar apenas três bandas heterocromáticas não-centroméricas através do bandamento C, uma delas adjacente à NOR e outras duas, que apresentam coloração menos intensa, nos pares cromossômicos 1 e 2. Um possível papel dessa heterocromatina adjacente à NOR do cromossomo 8 de *E. perezi* foi discutido nos itens V-1 e 5. A coloração mais fraca dos blocos heterocromáticos não-centroméricos dos cromossomos 1 e 2 sugere que essas regiões tenham constituição diferente dos demais blocos heterocromáticos encontrados nesse cariótipo, que aparecem fortemente corados após o tratamento com bário. A ocorrência ou não de variação na distribuição de heterocromatina na população amostrada de *E. perezi* não foi possível em virtude da escassez de material para análise.

Blocos heterocromáticos não-centroméricos banda C-positivos foram observados em cromossomos dos pares 6, 8, 9 e 10 do cariótipo I de *P. petersi*. Além desses, um segmento

provavelmente de natureza heterocromática, não evidenciado pelo bandamento C, foi observado no braço longo de um dos cromossomos 8 dos indivíduos ZUEC 96.24, 96.25, 96.43 e 96.49, pertencentes ao grupo I de *P. petersi*. A suspeita de que esse segmento seja heterocromático surgiu devido à evidenciação dessa região cromossômica como um segmento de coloração marrom através do método Ag-NOR em algumas metáfases dos indivíduos ZUEC 96.43 e 96.49, coloração igual à de alguns centrômeros e diferente dos blocos pretos que identificam as NORs nessa preparação, e ao comportamento dessa região após bandamento C. Essa hipótese se apóia em observações discutidas por SUMNER (1990), em sua revisão sobre os métodos de bandamento cromossômico, que defende que nem toda heterocromatina é evidenciada igualmente pelo bandamento C e que o método Ag-NOR pode detectar heterocromatinas, porém essas apresentam-se com coloração marrom. A detecção de heterocromatinas pelo método Ag-NOR representa uma inespecificidade dessa técnica, cujo principal alvo são as NORs, o que justifica a não-evidenciação daqueles segmentos heterocromáticos do braço longo do cromossomo 8 em todas as metáfases dos indivíduos ZUEC 96.41 e 96.49 e naquelas dos indivíduos ZUEC 96.24 e 96.25, submetidas ao método Ag-NOR.

Tal região heterocromática não-centromérica do cromossomo 8 detectada pela impregnação por prata parece corresponder em parte àquela região intersticial detectada através do bandamento C em metáfases de outros indivíduos (ZUEC 95.97, 96.02, 96.10, 96.32 e 96.33), embora essa seja menor do que a primeira. Isso permite sugerir uma possível origem comum desses blocos heterocromáticos de diferentes naturezas, embora seja impossível a determinação do estado ancestral entre esses dois morfos.

A análise comparativa de metáfases mitóticas e de cromossomos meióticos submetidos ao bandamento C, dos indivíduos ZUEC 95.97, 96.25, 96.32, 96.33 e 96.02, pertencentes ao grupo cariotípico I de *P. petersi*, permitiu inferir uma participação de blocos heterocromáticos não-centroméricos no pareamento cromossômico durante a meiose. Embora a configuração comumente encontrada na meiose de anuros mais derivados seja a de anel, conforme conclui SCHMID (1995), pareamento meiótico anômalo foi verificado naqueles cromossomos portadores de heteromorfismo nos espécimes estudados. A frequente observação de associação terminal apenas dos braços curtos dos cromossomos dos pares 8 e 9 heterozigotos em relação a bandas heterocromáticas não-centroméricas, durante a primeira divisão meiótica, comportamento não observado nesses mesmos quando homozigotos, permite sugerir que a heterozigose dessas bandas dificulte o pareamento e o "crossing-over" nessa região cromossômica. Com base nessas observações, a detecção de associação restrita ao braço curto em bivalentes 10 de espermátocitos em diacinese do

indivíduo ZUEC 96.02 está de acordo com a suspeita de heterozigose em relação à banda intersticial do braço longo desse par, levantada pela análise de metáfases mitóticas submetidas ao bandamento C. Por outro lado, a análise do comportamento meiótico de pares cromossômicos 6 homozigotos para blocos heterocromáticos teloméricos também não oferece evidências de que a presença desses blocos em homozigose prejudique o pareamento cromossômico na meiose.

Tal implicação de bandas heterocromáticas não-centroméricas no pareamento meiótico já foi relatado por vários autores (ver revisão de JOHN, 1988), que também sugerem uma influência negativa de segmentos heterocromáticos em homozigose no pareamento de segmentos cromossômicos homólogos, embora essa seja menor do que no caso de heterozigose. Com base nessas observações, não se pode descartar a possibilidade de que a análise de um número maior de espermátocitos I possa propiciar a detecção de associação meiótica anormal também em pares cromossômicos 6, 8, 9 e 10 homozigotos para as bandas em questão.

Considerando esses diferentes tipos de heterocromatina encontrados, a análise dos padrões de bandas heterocromáticas de *P. petersi* do grupo cariotípico I possibilitou notar grande variabilidade de distribuição dessas regiões, apesar da amostra analisada ter sido pequena. Dos seis indivíduos analisados em relação a esse caráter, cinco diferentes padrões parecem ocorrer, necessitando o quinto padrão de confirmações. A região telomérica banda C-positiva do braço curto de um dos cromossomos 10 do conjunto cromossômico dos indivíduos ZUEC 95.97 e 96.02 é de difícil detecção, não sendo visualizada mesmo em metáfases desses indivíduos que apresentam as demais bandas bem nítidas. Provavelmente isso se deva ao reduzido tamanho dessa região heterocromática, o que nos levou a não considerar essa banda como um caráter para análise. Por isso, os indivíduos ZUEC 95.97 e 96.32 foram considerados como portadores de um mesmo padrão de distribuição de bandas evidenciadas pelo tratamento com bário.

A ocorrência ou não de bandas heterocromáticas teloméricas no cromossomo 6 desse grupo de *P. petersi* parece estar envolvida na alteração da razão de braços desse cromossomo, embora a metodologia usada não tenha permitido a detecção de alteração do comprimento relativo desses cromossomos. Sabendo que o aumento de heterocromatina no genoma é considerada uma tendência evolutiva em Anura por KING (1991), pode-se supor que o cromossomo 6 que não apresenta as bandas teloméricas tenha originado o outro, embora nada impeça que o contrário tenha ocorrido. Embora se admita que o aumento de heterocromatina possa ser resultante do processo de adição ou de heterocromatinização (ver KING, 1991), qualquer afirmação a respeito da origem do cromossomo 6b, com base nos

dados apresentados, é temerária, uma vez que a análise métrica realizada não tem resolução apropriada para esse tipo de discussão.

A comparação da razão de braços dos cromossomos 8 e 9 portadores de banda heterocromática intersticial com os cromossomos 8 e 9 não-portadores, respectivamente, sugere que o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na diferenciação desses cromossomos não alteram o comprimento do braço longo, embora a amostra analisada seja pequena e a metodologia utilizada para medir os cromossomos seja imprecisa para qualquer conclusão desse tipo. Observando as bandas intersticiais dos cromossomos 8 e 9 e a telomérica do cromossomo 10 desses *P. petersi* do grupo I, pode-se levantar, ainda, a possibilidade da origem de duas delas a partir da translocação de uma já existente, durante a anáfase da mitose de células germinativas, uma vez que elas são praticamente equidistantes do centrômero, assim como propõe o modelo de SCHWEIZER & LOIDL (1987).

5. A variabilidade cariotípica em *Physalaemus petersi* e em *Edalorhina perezi*

A ausência de NORs ativas e blocos de heterocromatina constitutiva intersticiais ou teloméricas fixadas na população e a presença de vários cromossomos portadores de tais regiões dentre os *P. petersi* do grupo cariotípico I possibilitam a existência de vários padrões cariotípicos com relação a essas características. Mesmo na pequena amostra analisada, a existência de vários desses possíveis padrões foi observada, indicando a grande variabilidade cariotípica presente nesse grupo.

Os mecanismos que levaram à variabilidade de NORs em *P. petersi* podem ter sido translocação, transposição, amplificação e ativação de cístrons de rDNA latentes e reinserção de rDNA durante a amplificação extracromossômica desses cístrons na ovogênese, fenômenos já discutidos por KING *et al.* (1990) e por SCHMID *et al.* (1995) como possíveis causas da origem de NORs adicionais de *Litoria raniformis* (Anura, Hylidae) e de *Hyla versicolor* e *H. chrysocelis* (Anura, Hylidae), respectivamente. A quebra cromossômica observada na região de constrição secundária do cromossomo 8 do cariótipo I de *P. petersi* pode ser interpretada como um indicio de que a ocorrência de translocações seja provável, uma vez que esse tipo de rearranjo envolve quebras cromossômicas. Adicionalmente, a existência de bivalentes interligados nas preparações cromossômicas de indivíduos dos dois grupos cariotípicos de *P. petersi* indica a presença de translocações heterozigotas múltiplas naqueles genomas. Essa constatação da ocorrência de translocações na evolução do cariótipo dessa espécie representa outra evidência da possibilidade da dispersão dessas NORs através desse tipo de rearranjo cromossômico, ao contrário do sugerido em relação às NORs de *Hyla versicolor* e *H. chrysocelis*, por WILEY *et al.* (1989). Esses autores consideram

pouco provável o envolvimento de translocações na origem de NORs adicionais nesses hílideos devido à não alteração da razão de braços de cromossomos portadores ou não de NOR e à improvável ocorrência de translocações múltiplas sem alteração desses valores. No caso de *P. petersi*, realmente o teste estatístico aplicado para comparação de cromossomos 8 portadores ou não de NOR ativa mostrou diferença significativa entre suas razões de braço, como esperado, segundo WILEY et al. (1989), se considerarmos a ausência de NOR ativa no cromossomo 8 como a inexistência de cístrons de rDNA e o envolvimento de translocações na diferenciação desses cromossomos. No entanto, esse mesmo teste utilizado em relação ao par 6 não mostrou diferença significativa entre cromossomos 6 portadores e não-portadores de NOR. Essa observação, entretanto, não invalida a possibilidade de a origem do heteromorfismo de número e localização de NOR nesse par cromossômico estar ligada a eventos de translocação, uma vez que a figura meiótica aparentemente formada por todos os pares cromossômicos (Figura 18 E) sugere a existência de par 6 heterozigoto para translocação (s). Além disso, existe a possibilidade da ocorrência de outros heteromorfismos resultantes de rearranjos múltiplos dos cromossomos desse par, que também podem alterar a razão de braços desses cromossomos, impedindo a correlação exclusiva da alteração da razão de braços com variação na ocorrência da NOR. No entanto, nenhuma dessas observações comprova o envolvimento de translocações na origem da variabilidade observada em relação a NORs em *P. petersi* e também não descarta os outros mecanismos como possíveis causas desse fenômeno.

Devido ao pequeno número de exemplares analisados, não foi possível a aplicação do teste de Hardy-Weinberg para investigar se a frequência de ocorrência de algum dos padrões observados, tanto em relação a NORs ativas como em relação a bandas de heterocromatina constitutiva, está sofrendo alteração, provocada por pressão seletiva ou erros de amostragem, ou se ocorrência dos diferentes estados dos caracteres cariotípicos em questão está variando simplesmente segundo regras de combinação matemática, que constituem a base da equação formulada por Hardy-Weinberg. No entanto, os estudos feitos até o momento não foram capazes de relacionar de forma indubitável a ocorrência de blocos heterocromáticos intersticiais ou teloméricos com menor viabilidade do indivíduo que a apresenta, não existindo, portanto, fortes evidências que apontem pressões seletivas envolvidas na evolução dessas regiões. Por outro lado, em estudos com gafanhotos do complexo *Caledia captiva*, ARNOULD & SHAW (1985) sugerem que o componente gênico envolvido na redução de viabilidade de um híbrido entre dois taxa desse grupo deve ter relação com uma diferença na quantidade e distribuição de uma determinada sequência repetitiva, observada entre os dois taxa cruzados. Analisando resultados obtidos com *Anura*, KING (1991) sugere que o aumento de

heterocromatina seja uma tendência na evolução cariotípica desse grupo, o que permite especulações acerca da possível existência de maior valor adaptativo de regiões heterocromáticas em relação a algumas regiões eucromáticas. Esse mesmo autor tentou correlacionar essa tendência a uma proteção de sítios eucromáticos conferida por blocos de heterocromatina adjacentes, que reduzem a formação de quiasmas nessa região, principalmente em heterozigotos para essa heterocromatina. A melhor compreensão do papel funcional dos segmentos heterocromáticos em estudo poderá, no futuro, apontar novos caminhos para o entendimento do comportamento da heterocromatina no processo evolutivo, que continua desconhecido até então.

Quanto às NORs, SCHMID (1982) sugere que, aparentemente, NORs duplicadas ou triplicadas não apareçam em homozigose e que a ocorrência de NORs deletadas seja menor ainda. Mesmo dentre as quatro espécies de anuros em que foi detectada variação de padrão de NOR (WILEY et al., 1989; FOOTE et al., 1991; e SCHMID et al., 1995), homozigose de NORs amplificadas não foi encontrada. Ele ainda discute que, embora tenha sido provada a inviabilidade de indivíduos homozigotos em relação a uma NOR deletada, devido à ausência de rDNA, a inviabilidade de indivíduos com excesso desse DNA não encontra explicação plausível. SCHMID (1982) sugere, então, que as duplicações e triplicações de NORs sejam desfavoráveis não pela NOR em si, mas sim por alterações acarretadas em segmentos adjacentes a elas.

Com base nessas observações, é possível supor que NORs deletadas tenham ainda menor valor adaptativo quando ocorrem em cariótipos portadores de apenas um par de organizadores nucleolares, pois quando mais de um par cromossômico é portador de NOR, o efeito da deleção de uma NOR pode ser superado por outra NOR que esteja ativa. É possível supor, ainda, que os mecanismos de dispersão de NORs para outros locais do genoma tenham também influência deletéria, uma vez que podem alterar segmentos cromossômicos adjacentes do local onde foram inseridos, acarretando consequências como aquelas atribuídas a NORs duplicadas ou triplicadas.

Tais considerações acerca do valor adaptativo de bandas heterocromáticas e NORs impossibilitam a formulação de qualquer teoria acerca dos mecanismos evolutivos que possam estar modelando a variabilidade em relação a essas regiões cromossômicas no grupo I de *P. petersi*, analisado neste estudo. Essa variabilidade pode estar sendo mantida por seleção balanceadora ou seleção disruptiva ou pode, ainda, representar um polimorfismo transitório de uma população em que determinados morfos estão sendo selecionados favoravelmente em detrimento de outros (seleção direcional). Nesse caso, o polimorfismo deixará de existir quando esses morfos se fixarem. Alternativamente, a frequência dos

diferentes morfos observados pode estar variando casualmente na população em estudo, devido à inexistência de valores adaptativos distintos para os diferentes morfos ou devido a erros de amostragem que possam estar provocando a maior ocorrência de determinados cruzamentos em relação a outros. Tais erros de amostragem podem ocorrer em populações pequenas, que parece não ser o caso de *P. petersi* (CARDOSO, comunicação pessoal), ou, ainda, em agrupamentos reprodutivos formados dentro de uma única população. Agrupamentos desse tipo talvez possam existir na população em estudo, sendo a variação de canto um possível fator de seleção para a formação desses grupos. No entanto, essa hipótese é totalmente especulativa, uma vez que nenhum estudo etológico tenha sido desenvolvido na área em estudo, embora variação de canto tenha sido observada, mesmo dentre indivíduos do grupo cariotípico I. Não é possível descartar a hipótese de que essa população sofra reduções drásticas de tamanho, podendo acarretar erros de amostragem para a constituição de gerações futuras, fenômeno conhecido como efeito do fundador. Esses funis populacionais talvez possam ocorrer, por exemplo, em decorrência de extensos e incomuns períodos de seca.

Por outro lado, é possível supor, ainda, que a produção de novos morfos em relação aos caracteres NOR e heterocromatina não-centromérica esteja ocorrendo com certa frequência, uma vez que existem várias dessas regiões dispersas pelo genoma. A existência de maior número de regiões heterocromáticas e NORs tende a aumentar a chance de ocorrência de rearranjos que envolvam regiões com essas constituições. Dessa forma, além dos processos de modelagem da variabilidade existente, a origem de heteromorfismo pode estar exercendo papel importante na manutenção da variabilidade em *P. petersi*. Talvez essa hipótese ajude a explicar a não ocorrência de tais variações na população de *E. perezi* estudada, que é simpátrica em relação ao grupo de *P. petersi* da Reserva Extrativista do Alto Juruá.

Já em relação às translocações múltiplas, existem vários estudos (por exemplo, EICHENLAUB-RITTER & WINKING, 1990), que comprovam a influência da formação de cadeias de bivalentes interligados na não-disjunção cromossômica na meiose e consequente redução na fertilidade. Essas observações sugerem um menor valor adaptativo dos heterozigotos para translocações e permitem sugerir a ocorrência de seleção disruptiva em relação a essas translocações. Esse tipo de seleção pode levar à formação de uma barreira reprodutiva entre os cariótipos translocados e não-translocados, fenômeno importante nos processos de especiação. Por outro lado, enquanto essa barreira for incipiente, pode acarretar um aumento na frequência de indivíduos portadores de translocações heterozigotas, como discutido por FUTUYMA (1992), por exemplo. Dessa forma, a observação de vários indivíduos

portadores de anéis e cadeias lineares multivalentes pode estar de acordo com essa hipótese. Em *P. petersi*, no entanto, como os cromossomos de ambos os cariótipos não apresentam grande variação de tamanho, a identificação de cada bivalente é dificultada, o que impossibilita observar se um mesmo par cromossômico apresenta-se heterozigoto em relação a uma translocação em vários indivíduos ou se as configurações observadas em diferentes indivíduos são formadas por cromossomos diferentes. Nesse caso, as configurações observadas não permitem deduzir se a frequência de indivíduos heterozigotos para translocações envolvendo determinados cromossomos é alta ou não no grupo em estudo, além de ser a amostra analisada muito pequena para uma análise quantitativa. De qualquer forma, com base na observação de vários indivíduos portadores de anéis e cadeias lineares multivalentes, é possível inferir a ocorrência de várias translocações na evolução do cariótipo I de *P. petersi*, importante mecanismo de produção de variabilidade. Tal dedução pode ser estendida para o cariótipo II de *P. petersi*, pois, embora a amostra seja composta por apenas três indivíduos, configurações desse tipo foram observadas em espermátocitos de um deles.

A análise de exemplares de *E. perezi* não detectou polimorfismo de NOR e a investigação de polimorfismo de heterocromatina não foi possível devido à não-obtenção de material para estudo. Mesmo que exista polimorfismo de NOR na população amostrada, não tendo sido detectado devido ao pequeno número de exemplares analisados, sua ocorrência deve ser menor do que a verificada na população de *P. petersi* estudada. Por outro lado, cadeias lineares multivalentes foram detectadas em espermátocitos de *E. perezi*, indicando a presença de translocações no cariótipo. Visto que a análise de espermátocitos se restringiu ao material de apenas dois animais, quaisquer especulações acerca da frequência com que essas translocações ocorrem e mecanismos evolutivos envolvidos nesse processo tornam-se impossíveis de serem feitas. Entretanto, sabendo que as cadeias lineares multivalentes observadas em *E. perezi* são formadas por três dos cromossomos grandes, é possível sugerir que os blocos heterocromáticos do cromossomo 8 evitem recombinações que envolvam a NOR adjacente a eles, podendo ser observados rearranjos envolvendo outros cromossomos. Isso poderia acarretar, ainda, a inexistência de polimorfismos que envolvam NOR.

6. Os cromossomos sexuais heteromórficos de *Physalaemus petersi*

A análise cariotípica de *P. petersi* mostrou a existência de um par de cromossomos sexuais do tipo XX/XY pelo menos dentre os indivíduos com o cariótipo I, representado na Figura 19. Esse é um dos raros casos de heteromorfismo sexual cromossômico encontrados em Anura (ver revisões de SCHMID *et al.*, 1991 e de NISHIOKA *et al.*, 1993, e os estudos de MIURA, 1994 e SCHMID *et al.*, 1992). Dentre os Leptodactylidae apenas três casos já haviam

sido descritos, o de *Eupsophus roseus* e *E. migueli* (ITURRA & VELOSO, 1989) e o de *Eleutherodactylus maussi* (SCHMID et al., 1992). Em relação ao grupo cariotípico II de *P. petersi* formado pelos indivíduos ZUEC 95.84, 95.85 e G11 nada pode ser concluído a respeito da existência de heteromorfismo de cromossomos sexuais, visto que nenhuma fêmea pertencente a esse grupo foi coletada.

Os cromossomos X e Y do cariótipo I de *P. petersi* diferem em relação à razão de braços, conforme observado em metáfases mitóticas. Tal observação pode sugerir a ocorrência de inversão pericêntrica durante o processo de diferenciação desses cromossomos. No entanto, a resolução do presente estudo não permite descartar a possibilidade de que processos que não tenham envolvido inversão pericêntrica possam ter resultado nesses cromossomos X e Y. A aplicação de técnicas mais modernas, que possibilitam melhor caracterização longitudinal dos cromossomos e, conseqüentemente, propiciam estudos mais refinados de homologias cromossômicas, poderá fornecer mais subsídios para a análise da diferenciação morfológica desses cromossomos X e Y.

A análise de cromossomos mitóticos também possibilitou observar que o comprimento relativo do cromossomo Y difere do apresentado pelo cromossomo X' (X maior da fêmea ZUEC 96.10) e que os cromossomos X' e X'' (o outro cromossomo X dessa fêmea) diferem tanto em relação à razão de braços como ao comprimento relativo. Esse heteromorfismo em relação ao cromossomo X parece não representar uma diferença na compactação cromossômica entre os dois X da fêmea, uma vez que outras três fêmeas analisadas não mostraram esse dimorfismo. Ao contrário, os cromossomos X' e X'' parecem ser dois morfos de cromossomo X. Essa hipótese justifica que a média entre a razão de braços do cromossomo X de machos seja um valor intermediário entre a média referente aos cromossomos X' e X'' (Tabela III), visto que podem existir machos com X' e X''. Dessa forma, não existe nenhuma característica que possa sugerir algum mecanismo de compensação de dose nessa espécie, o que está de acordo com as observações feitas em outros anuros (ver revisão de SCHMID et al., 1991). O heteromorfismo entre o tamanho dos cromossomos X' e Y pode ser explicado pela ocorrência de deleção em um cromossomo precursor do Y atual ou de uma adição em um cromossomo ancestral do X' atual, embora a diminuição no tamanho do cromossomo Y seja esperado ao longo da diferenciação dos cromossomos sexuais segundo a teoria de DARLINGTON (1958).

Os cromossomos meióticos de machos também evidenciam a ocorrência de heteromorfismo entre os cromossomos X e Y do cariótipo em questão, pois esses cromossomos mostram diferença de tamanho e associação telomérica, fenômeno que indica a existência de heteromorfismo estrutural entre os cromossomos do par.

Embora o envolvimento de heterocromatina constitutiva no processo de diferenciação sexual seja apontado por muitos autores, que muitas vezes atribuem a heteromorfismos dessa cromatina o desencadeamento da diferenciação sexual cromossômica, nenhum heteromorfismo de banda C foi identificado entre os cromossomos sexuais encontrados neste estudo. No entanto, assim como discutido por SCHEMPP & SCHMID (1981) e SCHMID *et al.* (1988), segmentos de DNA repetitivo não identificados pelo bandamento C podem estar presentes em um dos cromossomos sexuais detectados e terem exercido papel importante na diferenciação desses cromossomos, em decorrência da diminuição de recombinação provocada. Por outro lado, segmentos heterocromáticos podem ter existido e desencadeado o início da diferenciação cromossômica, tendo sido deletados posteriormente. Contudo, a inversão pericêntrica hipotética no par sexual de *P. petersi* pode representar o evento inicial para a diferenciação desse par. Esse tipo de rearranjo estrutural já foi apontado como possível responsável pelo início da diferenciação sexual cromossômica, como citado por JOHN (1988), embora esse mecanismo ainda não tenha sido sugerido como passo inicial na diferenciação de cromossomos sexuais em Anura. Essa inversão pericêntrica observada na espécie em estudo pode, ainda, não ser o desencadeador de um processo de diferenciação cromossômica, e, sim, ser um fenômeno posterior ao início desse processo, apesar de exercer efeito na diminuição de recombinação entre os cromossomos do par já parcialmente diferenciados.

A comparação do cariótipo I de *P. petersi* com o de outros *Physalaemus* (ver KURAMOTO, 1990, para referências), tendo em vista o caráter derivado atribuído aos cromossomos sexuais heteromórficos (JOHN, 1988), permite inferir que a diferenciação sexual cromossômica nesse gênero seja um evento recente, que ocorre em nível de espécie. Resultados obtidos com outros anuros também indicam processos recentes de diferenciação sexual cromossômica, como já inferido por MAHONY (1991), em estudo com *Crinia bilingua* (Anura, Myobatrachidae).

7. Proposição de um novo táxon

A detecção de dois cariótipos dentre os espécimes identificados como *Physalaemus petersi* levanta outra discussão, que se refere à classificação sistemática nesse grupo. Embora os dois cariótipos não tenham sido estudados com técnicas que permitissem uma melhor diferenciação longitudinal dos cromossomos (como bandamento de replicação tardia) e consequente identificação de rearranjos envolvidos na diferenciação desses conjuntos cromossômicos, fica evidente a grande diferença existente entre eles. A morfologia e o comprimento relativo dos cromossomos desses cariótipos não são correspondentes e a

localização e o tamanho das NORs também não coincidem nesses conjuntos cromossômicos. A não-observação de nenhum cariótipo que possa ter resultado de hibridação dos dois outros em questão dentre os 27 indivíduos provenientes da Reserva do Alto Juruá (localidade onde foram encontrados os três espécimes com o cariótipo II) analisados citogeneticamente pode indicar a existência de uma barreira reprodutiva entre esses dois grupos.

Com base nos resultados discutidos no parágrafo anterior e na diferença entre o canto apresentado pelos indivíduos ZUEC 95.84, 95.85 e G11 e os demais (CARDOSO, 1996, comunicação pessoal), é possível sugerir uma revisão de *Physalaemus petersi* e a formação de um novo táxon para agrupar os indivíduos ZUEC 95.84, 95.85 e G11 separadamente dos demais espécimes denominados de *Physalaemus petersi*.

Embora esses grupos distintos encontrados dentro do que se identifica como *P. petersi* possam ser diferenciados em nível citogenético e não morfologicamente, nada pode ser inferido a respeito do papel da evolução cariotípica na diferenciação desses grupos. Ou seja, não é possível concluir se as diferenças cromossômicas provocaram ou foram resultantes do isolamento reprodutivo dos dois grupos em questão, ao contrário do que ocorre quando o fenômeno de poliploidização é a causa da diferença cariotípica de espécies crípticas e da consequente especiação (como descrito, por BOGART E WASSERMAN, 1972). A comparação feita neste estudo também não permite inferir a respeito do parentesco entre esses dois cariótipos, o que poderá ser melhor entendido após a identificação de rearranjos envolvidos no processo de diferenciação desses conjuntos cromossômicos, possível após uma maior caracterização longitudinal dos cromossomos.

A observação de dois cariótipos diferentes dentre indivíduos não diferenciados morfologicamente e identificados como *P. petersi* evidenciam que a taxa de variação cariotípica, nesse caso, é maior do que a de variação morfológica, podendo ser atribuído importante papel ao estudo citogenético nas investigações de relações filogenéticas em táxons mais basais dentro desse grupo de indivíduos chamados de *Physalaemus petersi*.

8. Inferências filogenéticas

O cariótipo I de *P. petersi* reúne caracteres considerados apomórficos dentre os anfíbios, como grande quantidade de heterocromatina constitutiva, cromossomos sexuais heteromórficos e numerosos pares cromossômicos portadores de NOR. A mesma observação pode ser feita em relação ao cariótipo II dessa espécie, exceto em relação à presença de cromossomos sexuais, que ainda não foi confirmada devido à não-obtenção de fêmeas para análise. Ao contrário, o cariótipo de *E. perezi* apresenta menor quantidade de heterocromatina

heteromórficos. O cariótipo de *E. perezii* também difere do cariótipo I de *P. petersi* em relação ao tamanho relativo dos cromossomos. O cariótipo de *E. perezii* apresenta um decréscimo gradual do tamanho relativo dos cromossomos do par 1 até o par sexual, diferente do que ocorre no cariótipo I de *P. petersi*, onde são encontrados, inclusive, pares cromossômicos com o mesmo tamanho relativo (Figura 26).

A análise comparativa do cariótipo I, apresentado pela maioria dos *Physalaemus petersi* analisados, com os cariótipos de *Paratelmatoebius lutzi* (De LUCCA et al., 1974) e *P. poecilogaster* (LOURENÇO et al., em preparação), gênero já apontado como próximo de *Physalaemus* (LYNCH, 1971), mostra grandes diferenças entre eles, a começar pelo número cromossômico, que é $2n=24$ no genoma diplóide de *Paratelmatoebius* (Figura 26).

Por outro lado, a comparação do cariótipo I de *P. petersi* com os de *Pleurodema thaul* e *Pleurodema brachyops* (SCHMID et al., 1993b) sugere a ocorrência de semelhanças entre eles (Figura 26). O tamanho relativo dos cromossomos do par 1 até os do par 11 (par sexual, no caso do cariótipo de *P. petersi* em questão) não decresce progressivamente nesses cariótipos, podendo ser observados pares cromossômicos com o mesmo tamanho relativo nesses três cariótipos em análise. Quanto à razão de braços, os dois cariótipos de *Pleurodema* diferem daquele de *P. petersi* em relação aos pares 3, 4 e ao par 11, que é sexual nessa última espécie, havendo certa semelhança em relação aos demais pares. Essa diferença observada entre os cromossomos 3 e 4 daqueles cariótipos pode representar apenas uma inversão na ordenação desses cromossomos, visto que tais cromossomos apresentam o mesmo tamanho relativo nos três cariótipos. Se essa hipótese for verdadeira, esses cariótipos de *Pleurodema* e o cariótipo I de *P. petersi* também seriam semelhantes em relação a esses cromossomos, sendo a diferença observada apenas um artefato metodológico. Analisando a heterocromatina constitutiva desses três cariótipos (distribuição de bandas heterocromáticas, tonalidade de coloração dessas bandas e quantidade de heterocromatina constitutiva centromérica), o cariótipo de *P. petersi* parece mais semelhante ao de *P. brachyops* do que ao de *P. thaul*. Tais considerações tornam a investigação de homologias cromossômicas entre essas espécies, utilizando-se técnicas citogenéticas mais refinadas, um interessante campo de estudo.

Tais considerações permitem sugerir que, em uma análise preliminar, os dados citogenéticos parecem indicar maior proximidade entre o grupo cariotípico I de *P. petersi* e *Pleurodema* do que entre esse grupo de *Physalaemus* e os gêneros *Edalorhina* e *Paratelmatoebius*. Essa observação corrobora a relação filogenética apontada com base em alguns dados anatômicos, enquanto outros defendem a maior proximidade entre *Physalaemus*, *Edalorhina*, *Lithodytes* e *Paratelmatoebius* (ver LYNCH, 1971).

Se a proximidade filogenética entre *Physalaemus* e *Pleurodema* realmente existir, é possível sugerir que a NOR do cromossomo 8 do cariótipo de *P. petersi* e a do cromossomo 8 de *P. thaul* tenham a mesma origem evolutiva, sendo uma inversão pericêntrica o possível mecanismo que resultou na diferente localização dessas NORs no cromossomo 8 dessas duas espécies. É possível levantar, ainda, a hipótese de homologia entre as bandas teloméricas dos cromossomos 6 de *Pleurodema brachyops* e *Physalaemus petersi* e entre as do cromossomo 10 dessas espécies. Sabendo que o aumento de heterocromatina é considerado uma tendência na evolução cariotípica em Anura, pode-se suspeitar, também, que eventos que levaram a esse fenômeno, resultando no cariótipo de *Pleurodema thaul* e de *P. brachyops*, teriam ocorrido após a divergência de *Pleurodema* e *Physalaemus*. Porém, deve ser lembrado que, embora o aumento de heterocromatina seja uma tendência da maioria dos Anura, exceções podem ocorrer, existindo a possibilidade de que a suposição anterior seja errônea.

Todas essas especulações filogenéticas discutidas neste item necessitam de confirmações, que podem ser fornecidas após melhor caracterização longitudinal dos cromossomos dos cariótipos mencionados e pela análise de cariótipos de outros *Physalaemus*, outros *Pleurodema* e de espécies de *Pseudopaludicola*, gênero considerado parafilético em relação à *Physalaemus*. Vale ressaltar, ainda, que os dados citogenéticos são apenas mais um conjunto de dados, que deve ser analisado juntamente com dados de outras naturezas para o melhor entendimento das relações de parentesco entre diferentes grupos.

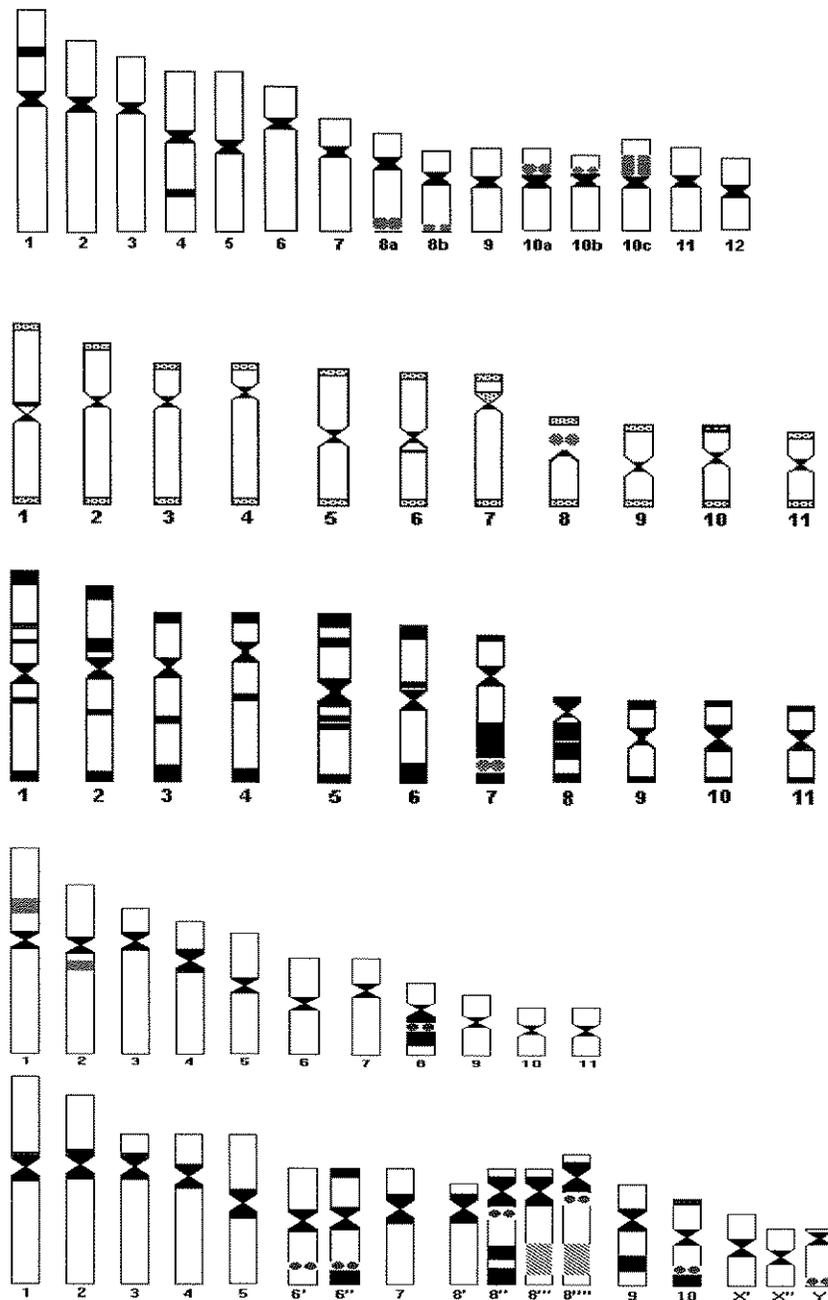


Figura 26 - Ideogramas representativos do cariótipo de *Paratelmatobius poecilogaster* (A), de *Pleurodema thaul* (B), de *Pleurodema brachyops* (C), de *Edalorhina perezii* (D) e do cariótipo I de *Physalaemus petersi* (E). Os círculos hachurados representam NORs; as regiões não-delimitadas lateralmente indicam constrições secundárias; os segmentos listrados equivalem a regiões de comportamento anômalo após aplicação dos métodos Ag-NOR e de bandamento C; os blocos pretos correspondem a segmentos de heterocromatina fortemente corados pelo bandamento C e os blocos pontilhados a regiões fracamente evidenciadas por esse método. Os ideogramas B e C foram obtidos por SCHMID *et al.* (1993b) e ilustram o número máximo de regiões banda C-positivas detectadas na amostra analisada.

V - CONCLUSÕES

1. O cariótipo de *Edalorhina perezii* apresenta $2n=22$ e é composto por seis pares de cromossomos metacêntricos (1, 5, 6, 9, 10 e 11), quatro submetacêntricos (2, 4, 7 e 8) e um subacrocentrico (3).

2 - Dentre os espécimes identificados como *Physalaemus petersi* foram encontrados dois cariótipos bastante distintos, o que permite sugerir a divisão do táxon *P. petersi*. Ambos os cariótipos apresentam $2n=22$, confirmando o número cromossômico encontrado para as espécies de *Physalaemus* já analisadas. O cariótipo mais comumente encontrado dentre os espécimes analisados no presente trabalho apresenta quatro pares de cromossomos metacêntricos (1, 5, 6 e 10), quatro submetacêntricos (2, 4, 7 e 9), dois subacrocentricos (3 e 8) e um par de cromossomos sexuais XX/XY. O outro cariótipo, encontrado em três machos, apresenta seis pares de cromossomos metacêntricos (2, 3, 4, 7, 8 e 10), dois de cromossomos submetacêntricos (5 e 9), dois subacrocentricos (1 e 6) e um par heteromórfico.

3 - Grande variabilidade de distribuição de NORs e de heterocromatina constitutiva foi observada no grupo cariotípico I de *Physalaemus petersi*. Essa observação e a existência de dois diferentes cariótipos dentre espécimes identificados como *P. petersi* evidenciam uma maior taxa de variação cariotípica do que de variação anatômica.

4 - A heterozigose de bandas heterocromáticas nos pares cromossômicos 8, 9 e possivelmente 10 do cariótipo I de *Physalaemus petersi* parece exercer importante influência no pareamento cromossômico na meiose.

5 - O cariótipo I de *Physalaemus petersi* apresenta grande quantidade de heterocromatina constitutiva e cromossomos sexuais heteromórficos, características consideradas derivadas em Anura.

6 - A diferenciação dos cromossomos sexuais de *P. petersi* parece ter ocorrido em nível de espécie nesse grupo, visto que nenhum par sexual heteromórfico foi encontrado no cariótipo de outras espécies de *Physalaemus* já estudadas.

7 - Configurações meióticas multivalentes foram encontradas em espécimes de *Edalorhina perezii* e nos dois grupos cariotípicos de *Physalaemus petersi*, sugerindo a ocorrência de translocações na evolução desses cariótipos.

8 - O cariótipo de *Edalorhina perezii* e os de *Physalaemus petersi* diferem bastante em relação à morfologia dos cromossomos e aos padrões de distribuição de NORs e heterocromatina constitutiva.

9 - O cariótipo mais comumente encontrado dentre os *Physalaemus petersi* (cariótipo I) difere bastante do cariótipo de *Paratelmatoebius lutzi* e *Paratelmatoebius poecilogaster* e apresenta certa semelhança com o cariótipo de *Pleurodema thaul* e *Pleurodema brachyops*. Essa aparente semelhança merece investigações mais refinadas.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEÇAK, M.L., BEÇAK, W. Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae - Amphibia). **Experientia** **30**: 624-625, 1974.
- BEÇAK, M.L., DENARO, L., BEÇAK, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. **Cytogenetics** **9**: 225-238, 1970.
- BERNARDI, G., OLOFSSON, B., FILIPSKI, J., ZERIAL, M., SALINAS, J., CUNY, G., MEUNIER-ROTIVAL, M., RODIER, M. The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. **Science** **228**: 953-958, 1985.
- BICKHAM, J.W., BAKER, R.J. Canalization model of chromosomal evolution. In "Models and Methodologies in Evolutionary Theory" (J.H. Schwartz and H.G. Rollins, eds.), pp. 70-84. **Bull. 13, Carnegie Mus. Nat. Hist. Pittsburgh**, 1979.
- BICKHAM, J.W., ROGERS, D.S. Structure and variation of the nucleolus organizer region in turtles. **Genetica**, **67**: 171-184, 1985.
- BICUDO, H.E.M. Nucleolar organizer activity and its regulatory mechanisms in *Drosophila* species of the "mulleri" complex and their hybrids. **Caryologia** **34**: 231-253, 1981.
- BOGART, J.P. Evolution of anuran karyotypes. In **Evolutionary Biology of The Anurans: Contemporary Research on Major Problems** (J.L. Vial, ed.), pp. 337-349, University of Missouri Press, Columbia, 1973.
- BOGART, J.P. Ethology, karyology and taxonomy position of the South American leptodactylid frog genus *Edalorhina*. **Herpetol. Rev.** **7**: 75, 1976.
- BOGART, J.P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution**, pp. 233-257, Academic Press, San Diego, 1991.
- BOGART, J.P., WASSERMAN, A.O. Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. **Cytogenetics** **11**: 7-24, 1972.

- BOSTOCK, C.J. The organization of DNA sequences in chromosomes. In **Cell Biology**, Vol.3 (L. Goldstein & D.M. Prescott, eds.), pp. 1-59, Academic Press, New York, 1972.
- BULL, J.J. **Evolution of sex determining mechanisms**, Benjamin/Cummings Publ., Menlo Park, Calif., 1983.
- BUSCH, H., SMETANA, K. **The nucleolus**. Academic Press, New York & London, 1970.
- BUSCH, G.L., CASE, S.M., WILSON, A.C., PATTON, J.L. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**: 3942-3946, 1977.
- BUYS, C.H.C.M., OSINGA, J. Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs. **Chromosoma** **89**: 387-396, 1984.
- CABRERO, J., NAVAS-CASTILHO, J., CAMACHO, J.P.M. Effects of supernumerary chromosome segments on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Chorthippus binotatus*. **Chromosoma**, **93**: 375-380, 1986.
- CANNATELLA, D.C. **A phylogeny of primitive frogs (Archaeobatrachia)**. Ph.D. dissertation. University of Kansas, Lawrence, 1985.
- CANNATELLA, D.C., DUELLMAN, W. Leptodactylid frogs of the *Physalaemus pustulosus* group. **Copeia** **1984**: 902-921, 1984.
- CHAN, E.K.L., IMAI, H., HAMEL, J.C., TAN, E.M. Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. **J. Exp. Med.** **174**,:1239-1244, 1991.
- CITOLER, P., GROPP, A., NATARAJAN, A.T. Timing of DNA replication of autosomal heterochromatin in the hedgehog. **Cytogenetics** **11**: 53-62, 1972.
- COYNE, J.A. Correlation between heterozygosity and rate of chromosome evolution in animals. **Am. Nat.** **123**: 725-729, 1984.

- DANILEVSKAYA, O., LOFSKY, A., KURENOVA, E.V., PARDUE, M. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* contains a distinctive subclass of HET-A related repeats. **Genetics** **134** (2): 531-534, 1993.
- DARLINGTON, C.D. **Evolution of genetic systems**, 2nd edition, Edinburgh: Oliver and Boyd, 1958.
- De CAPOA, A., FERRARO, M., LAVIA, P., PELLICIA, F., FINAZZI-AGRO, A. Silver staining of nucleolus organizer regions (NORs) requires clusters of sulphhydryl groups. **J. Histochem. Cytochem.** **30**: 908-911, 1982.
- De LUCCA, E.J., JIM, J., FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia** **27**: 183-191, 1974.
- De LUCCHINI, S., ANDRONICO, F., ANDREAZZOLI, M., GIULIANI, M., SAVINO, R., NARDI, I. Extra-ribosomal spacer sequences in *Triturus*. **J. Mol. Biol.** **204**: 805-813, 1988.
- DOVER, G.A. The new genetics. In: **The handing of chromosomes**. Allen and Unwin, London, 1988.
- DUELLMAN, W.E., MORALES, V.R. Variation, distribution, and life history of *Edalorhina perezii* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Stud. Neotrop. Fauna Environ.** **25**: 19-30, 1990.
- DUNN, E.R. Notes on the South American frog genus *Edalorhina*. **Amer. Mus. Novitates** **1416**: 1-10, 1949.
- EICHENLAUB-RITTER, U. WINKING, H. Nondisjunction, disturbances in spindle, structure, and characteristics of chromosome alignment in maturing oocytes of mice heterozygous for Robertsonian translocations. **Cytogenet. Cell Genet.** **54**: 47-54, 1990.
- FAUST, J., VOGEL, W. Are "N bands" selective staining of heterochromatin? **Nature** **249**: 352-353, 1974.

- FLAVELL, R.B., O'DELL, M. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. **J. Mol. Biol.** **204**: 523-534, 1988.
- FOOTE, D.L., WILLEY, J.E., LITTLE, M.L., MEYNE, J. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenet. Cell Genet.** **57**: 196-199, 1991.
- FORD, L., CANNATELLA, D.C. The major clades of frogs. **Herpetol. Monogr.** **7**: 94-117, 1993.
- FROST, D.R. **Amphibian Species of the World**. Allen Press and the Association of Systematics Collections, Lawrence, Kansas, 1985.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2ª edição, Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 631pp., 1992.
- GOESSENS, G. Nucleolar structure. **Int. Rev. Cytol.** **87**: 107-158, 1984.
- GREEN, D.M. Evidence for chromosome number reduction and chromosomal homosequentiality in the 24-chromosome Korean frog *Rana dybowskii* and related species. **Chromosoma** **88**: 222-226, 1983.
- GREEN, D.M. Heteromorphic sex chromosomes in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zealand. **J. Hered.** **79**: 165-169, 1988a.
- GREEN, D.M. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. **Chromosoma** **97**:55-70, 1988b.
- GREEN, D.M., SHARBEL, T.F. Comparative cytogenetics of the primitive frog *Leiopelma archeyi* (Anura, Leiopelmatidae). **Cytogenet. Cell. Genet.** **47**: 212-216, 1988.
- GULDNER, H.H., SZOSTECKI, C., VOSBERG, H.P., LAKOMEK, H.J., PENNER, E., BAUTZ, F.A. Sc1 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 KDa protein identified as DNA topoisomerase I. **Chromosoma** **94**: 132-138, 1986.

- HAWLEY, R.S., IRICK, H., ZITRON, A.E., HADDOX, D.A., LOHE, A., NEW, C., WHITLEY, M.D., ARBEL, T., JANG, J., MCKIM, K., CHILDS, G. There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila*, one of which requires heterochromatic homology. **Dev. Genet.** **13**: 440-467, 1993.
- HEITZ, E. Das heterochromatin der moose. I. **JABET. WISS. BOT.** **69**: 762-818, 1928.
- HENDERSON, A.S., WARBURTON, D., ATWOOD, K.C. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **69**: 3394-3398, 1972.
- HERNANDEZ-VERDUN, D., ROUSSEL, P., GAUTIER, T. Nucleolar proteins during mitosis. **Chromosomes Today** **11**: 79-90, 1993.
- HEYER, W.R. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. **Smithsonian Contr. Zool.** **199**: 1-55, 1975.
- HILLIS, D.M. Molecular versus morphological approaches to systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** **18**: 23-42, 1987.
- HILLIS, D.M. The phylogeny of amphibians. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution**, pp. 7-31, Academic Press, San Diego, 1991.
- HOLMQUIST, G. The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination. **Chromosoma** **72**: 203-224, 1979.
- HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** **36**: 1014-1015, 1980.
- HOWELL, W.M., DENTON, T.E., DIAMOND, J.R. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. **Experientia** **31**: 260-262, 1975.
- HSU, T.C., SPIRITO, S.E., PARDUE, M.L. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma** **53**: 25-36, 1975.

- HUBBELL, H.R. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. **Stain Techn.** **60**: 285-294, 1985.
- IMAI, H.T. Quantitative analyses of karyotype alteration and species differentiation in mammals. **Evolution** **37**: 1154-1161, 1983.
- IRICK, H. A new function for heterochromatin. **Chromosoma** **103**: 1-3, 1994.
- ITURRA, P., VELOSO, A. Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. **Genetica** **78**: 25-31, 1989.
- JOHN, B. **The biology of heterochromatin**. In: Heterochromatin: molecular and structural aspects (R.S. Verma, ed.), pp. 1-128, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1988.
- JOHN, B., MIKLOS, G. **The Eukaryote Genome in Development Evolution**. Allen & Unwin, London, 1988.
- JONES, K.W. Evolution of sex chromosomes. **Dev. Mamm.** **5**: 297-320, 1983.
- JONES, K.W. The evolution of sex chromosomes and their consequences for the evolutionary process. **Chromosomes Today** **8**: 241-255, 1984.
- JONES, K.W., SINGH, L. Conserved repeated DNA sequences in vertebrates sex chromosomes. **Hum. Genet.** **58**: 46-53, 1981.
- JORDAN, E.G. The nucleolus at Weimar. **Nature** **281**: 529-530, 1979.
- KING, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** **80**: 191-217, 1980.
- KING, M. The canalization model of chromosomal evolution: a critique. **Syst. Zool.** **34**: 69-75, 1985.

- KING, M. The interrelationship of G-banding, C-banding pattern and nucleolus organizer structure in anuran amphibians. In **Kew Chromosome Conference 111** (P.E. Brandam, ed.), pp. 51-63, 1988.
- KING, M. The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution**, pp. 359-391, Academic Press, San Diego, 1991.
- KING, M., CONTRERAS, N., HONEUCUTT, R.L. Variation within and between nucleolar regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S and 28S "in-situ" hybridization. **Genetica 80**: 17-29, 1990.
- KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. of Educ. 39**: 83-127, 1990.
- LANDE, R. Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangement. **Evolution 33**: 234-251, 1979.
- LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas 52**: 201-220, 1964.
- LEWIN, B. **Genes V**, Oxford Univ. Press, New York, Tokyo, 1272pp., 1994.
- LI, W-H, GRAUR, D. **Fundamentals of Molecular Evolution** Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass., 1991.
- LIMA-DE-FARIA, A., JAWORSKA, H. Late DNA synthesis in heterochromatin. **Nature 217**: 138-142, 1968.
- LONG, E.O., DAVID, I.B. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Bioch. 49**: 727-764, 1980.
- LÓPEZ-LÉON, M.D., CABRERO, J., CAMACHO, J.P.M. Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genome 38**: 68-74, 1995.

- LYNCH, J.D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Univ. Kans. Mus. Nat. Hist., Misc. Publ. 53**: 1-238, 1971.
- MAHONY, M.J. Heteromorphic sex chromosomes in the Australian frog *Crinia bilingua* (Anura: Myobatrachidae). **Genome 34**: 334-337, 1991.
- MAHONY, M.J., ROBINSON, E.S. Nucleolar organiser region (NOR) location in karyotypes of Australian ground frogs (Family Myobatrachidae). **Genetica 68**: 119-127, 1986.
- MATSUI, S.I., SASAKI, M. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. **Nature 246**: 148-150, 1973.
- MAYR, E. Species, speciation and chromosomes. In Benirschke, K (ed) **Comparative Mammalian Cytogenetics**. Springer-Verlag, New York, 1-7, 1969.
- MILLER, O.L. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. **J. Cell Biol. 91**: 15-17, 1981.
- MIURA, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla*, and *Bufo* (Amphibia: Anura). **Chromosoma 103**: 567-574, 1995.
- MIURA, I. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica*. II. Sex-linkage analyses of the nucleolar organizer regions in chromosomes no. 4 of the Hiroshima and Saeki populations. **Zool. Sci. 11**: 807-815, 1994a.
- MIURA, I. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog, *Rana japonica*. I. Sex-related heteromorphism of the distribution pattern of constitutive heterochromatin in chromosome no 4 of the Nakuya population. **Zool. Sci. 11**: 797-806, 1994b.
- MIURA, I., NISHIOKA, M., BORKIN, L.J., WU, Z. The origin of the brown frogs with 2n=24 chromosomes **Experientia 51**: 179-188, 1995.
- MORESCALCHI, A. Le relazioni tra il cariotipo di Anuri Displasioceli. I. Il corredo cromosomico di alcuni Ranidae. **Caryologia 20**: 65-85, 1967.

- MORESCALCHI, A. Hypotheses on the phylogeny of the Salientia, based on karyological data. **Experientia** **24**: 964-966, 1968.
- MORESCALCHI, A. Amphibia. In **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution** (A.B. Chiarelli and E. Capana eds.), pp. 233-348, Academic Press, New York, 1973.
- NISHIOKA, M., MIURA, I., SAITOH, K. Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanism. **Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol.** **12**: 55-81, 1993.
- OCHS, R., LISCHWE, M., O'LEARY, P., BUSCH, H. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. **Exp. Cell Res.** **146**: 139-149, 1983.
- OHNO, S. **Sex chromosomes and sex linked genes**. Springer, Berlin. 192pp., 1967.
- OLERT, J., SAWATZKI, G., KLING, H., GEBAUER, J. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). **Histochemistry** **60**: 91-99, 1979.
- PARDUE, M.L., GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science** **168**: 1356-1358, 1970.
- PARDUE, M.L., HENNING, W. Heterochromatin: junk or collector's item? **Chromosoma** **100**: 3-7, 1990.
- PFEIFLE, J., BOLLER, K., ANDERER, F.A. Phosphoprotein pp135 is an essential component of the nucleolus organizer region (NOR). **Exp. Cell Res.** **162**: 11-22, 1986.
- REUTER, G., SPIERER, P. Position effect variegation and chromatin proteins. **Bioessays** **14**: 605-612, 1992.
- RIS, H., KORENBERG, J. Chromosome structure and levels of chromosome organization. In: **Cell Biology: a comprehensive treatise** (D.M. Prescott & L. Goldstein, eds.), New York, 1979.

- SALCEDO, F.J., VISERAS, E., CAMACHO, J.P.M. The B chromosomes of *Locusta migratoria*. III. Effects on the activity of nucleolar organizer regions. **Genome** 30: 387-394, 1988.
- SANTOS, J., SENTÍS, C., ROBLEDO, M., FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J. Nucleolar dominance in interracial hybrids of the *Steropleurus martorelli* complex. **Genome** 33: 153-155, 1990.
- SATOH, K., BUSCH, H. Silver staining of phosphoserine and phosphothreonine in nucleolar and other phosphoproteins. **Cell Biol. Int. Rep.** 5: 857-866, 1981.
- SCHEER, U., ROSE, K.M. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 81: 1431-1435, 1984.
- SCHEMPP, W., SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. VI. BrdU-replication patterns in *Anura* and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. **Chromosoma** 83: 697-710, 1981.
- SCHLUTER, A. Reproduction and tadpole of *Edalorhina perezii* (Amphibia, Leptodactylidae). **Stud. Neotrop. Fauna Environ.** 25: 49-56, 1990.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** 66: 361-388, 1978a.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma** 68: 131-148, 1978b.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). **Chromosoma** 80, 69-96, 1980a.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in *Anura*. **Chromosoma** 77: 83-103, 1980b.

- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma 87**: 327-344, 1982.
- SCHMID, M., ALMEIDA, C.G. Chromosome banding in Amphibia. XII. Restriction endonuclease banding. **Chromosoma 96**: 283-290, 1988.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C. Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. **Chromosoma 101**, 123-132, 1991.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., FEICHTINGER, W. Chromosome banding in Amphibia. XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). **Chromosoma 97**: 434-438, 1989.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., FEICHTINGER, W. Chromosome banding in Amphibia. XVII. First demonstration of multiple sex chromosomes in amphibians: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma 101**: 284-292, 1992.
- SCHMID, M., SIMS, S.H., HAAF, T., MACGREGOR, H.C. Chromosome banding in Amphibia. X. 18S and 28S ribosomal RNA genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrotheca riobambae*. **Chromosoma 94**: 139-145, 1986.
- SCHMID, M., OHTA, S., STEINLEIN, C., GUTTENBACH, M. Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeria* (Anura, Rhacophoridae). **Cytogenet. Cell. Genet. 62**: 238:246, 1993a.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., FEICHTINGER, W., POOT, M. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Cell. Genet. 62**: 42-48, 1993b.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., FEICHTINGER, W., ALMEIDA, C.G., DUELLMAN, W.E. Chromosome banding in Amphibia. XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hyliidae). **Chromosoma 97**: 33-42, 1988.

- SCHMID, M., NANDA, I., STEINLEIN, C., KAUSCH, K., HAAF, T., EPPLEN, J. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution**, pp. 393-430, Academic Press, San diego, 1991.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., FRIEDL, R., ALMEIDA, C.G., HAAF, T., HILLIS, D.M., DUELLMAN, W.F. Chromosome banding in Amphibia. XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseutes* (Anura, Hylidae) **Chromosoma** **99**: 413-423, 1990.
- SCHMID, M., FEICHTINGER, W., WEIMER, R., MAIS, C., BOLAÑOS, F., LEÓN, P. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** **69**: 18-26, 1995.
- SCHMID, W. Heterochromatin in mammals. **Arch. Klaus-Stiftung Vererbungs-Forsch** **42**: 1-60, 1967.
- SCHWARZACHER, H.G., WACHTLER, F. The nucleolus. **Anat. Embryol.** **188**: 515-536, 1993.
- SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma** **58**: 307-324, 1976.
- SCHWEIZER, D., LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. **Chromosomes Today** **9**: 61-74, 1987.
- SHEVELYOV, Y.Y. Aurora, a non-mobile retrotransposon in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Mol. Gen. Genet.** **239**: 205-208, 1993.
- SINGH, L., PURDOM, I.F., JONES, K.W. Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. **Chromosoma** **59**: 43-62, 1976.
- SINGH, L., PURDOM, I.F., JONES, K.W. Behavior of sex chromosome-associated satellite DNAs in somatic and germ cells in snakes. **Chromosoma** **71**: 167-181, 1979.

- SPERLING, K., RAO, P.N. Mammalian cell fusion. V. Replication behavior of heterochromatin as observed by premature chromosome condensation. **Chromosoma** **45**: 121-131, 1974.
- SPOFFORD, J.B. Position-effect variegation in *Drosophila*. In **The genetics and biology of *Drosophila*** (M. Ashburner and E. Novitski, eds.), vol. 1c, pp.955-1018, Academic Press, London, 1976.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** **83**: 438-442, 1972.
- SUMNER, A.T. **Chromosome Banding**. Unwin Human Ltda, London, 1990.
- SUMNER, A.T. Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem.** **38**: 91-109, 1994.
- TESSIER, C., SLAVEN, D., GREEN, D.M. Population density and daily movement patterns of Hochstetter's frog, *Leiopelma hochstetteri*, in a New Zealand mountain stream. **J. Herpetol.** **25**: 213-214, 1991.
- TRERÈ, D., PESSON, A., DERENZINI, M. The silver stained proteins of interphase nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Exp. Cell. Res.** **184**: 131-137, 1989.
- TYMOWSKA, J. Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution**, pp. 233-257, Academic Press, San Diego, 1991.
- WALKER, P.M.B. "Repetitive" DNA in higher organisms. **Prog. Biophys. Molec. Biol.** **23**: 147-190, 1971.
- WATERHOUSE, R.N., BOULYER, D., GATEHOUSE, J.A. An organ-specific hypomethylation of cotyledon genomic rDNA in *Pisum sativum* L. **FEBS Letters** **209**: 223-226, 1986.
- WATSON, J.C., KAUFMAN, L.S., THOMPSON, W.F. Developmental regulation of cytosine methylation in the nuclear ribosomal RNA genes of *Pisum sativum*. **J. Mol. Biol.** **193**: 15-26, 1987.

- WHITE, M.J.D. **Animal cytology and evolution**. 3rd edition, Cambridge Univ. Press, London, 1973.
- WHITE, M.J.D. **Modes of speciation**. W.H. Freeman, São Francisco, 1978.
- WILEY, J.E., LITTLE, M.L., ROMANO, M.A., BLOUNT, D.A., CLINE, G.R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Chromosoma** **97**: 481-487, 1989.
- WILSON, A.C., SARICH, V.M., MAXSON, L.R. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal, protein, and anatomical evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **71**: 3028-3030, 1974.
- YUNIS, J.J., YAMINEH, W.G. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. **Science** **174**: 1200-1209, 1971.
- ZEYL, C.W., GREEN, D.M. Heteromorphism for a highly repeated sequence in the New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*. **Evolution** **46**: 1891-1899, 1992.