
CITOGENÉTICA COMPARATIVA

DAS FAMÍLIAS

LEPTODACTYLIDAE

E HYLIDAE

DO CERRADO GOIANO*

HUGO HENRIQUE PÁDUADE OLIVEIRA, CAIO CESAR NEVES SOUZA, CRISTIANO LUIZ RIBEIRO, ROGÉRIO PEREIRA BASTOS, APARECIDO DIVINO DA CRUZ, DANIELA DE MELO E SILVA

*Resumo: este estudo descreve a diversidade citogenética de anfíbios anuros com ênfase nas famílias Hylidae e Leptodactylidae de diferentes localidades do cerrado goiano. Foram analisadas 10 diferentes espécies coletadas nos municípios de Rio Verde, Bela Vista, Serranópolis, Barro Alto, Pirenópolis e Nazário. Foram obtidos cariótipos com número diplóide variando de $2n=22$ a $2n=24$. Marcações para Regiões Organizadoras de Nucléolo foram obtidas no cromossomo 8 da espécie *Leptodactylus fuscus*. A grande variação cromossômica pode ser explicada pelo padrão reprodutivo diversificado destes animais.*

Palavras-chave: Citogenética. Anfíbios. Cariótipo. Cerrado. Nucléolo.

Atualmente são conhecidas 6.638 espécies de anfíbios em todo o mundo, sendo que 5.858 pertencentes à ordem anura. Os anuros são animais cosmopolitas apresentando uma distribuição heterogênea com predominância nas regiões tropicais (POUGH et al., 2002; FROST, 2010). Estes animais possuem adaptações características ao grupo como membros posteriores alongados e as últimas vértebras fundidas adaptadas para saltos. Desempenham importante papel ecológico no controle de populações de insetos e outros invertebrados, principais itens de sua dieta, além de serem um dos grupos mais sensíveis a variação do meio ambiente, sendo assim amplamente utilizados como biomarcadores ambientais (ETEROVICK; SAZIMA, 2004).

A anurofauna da América do Sul é a mais abundante do mundo, sendo o Brasil o país de maior riqueza e a segunda maior diversidade ecológica de espécies, com 877 espécies descritas, sendo que, desta quantia, aproximadamente 131 ocorrem no cerrado brasileiro, correspondendo a pouco mais de 15 % das espécies brasileiras (SBH, 2010; COLLI *et al.*, 2002). Entretanto, o conhecimento sobre a anurofauna do cerrado ainda é muito limitado, devido aos poucos estudos relacionados a este grupo de animais, assim se torna comum a descoberta de novas espécies no bioma Cerrado, já que a maioria dos estudos já conduzidos foram realizados na região Sudeste do país (BASTOS *et al.*, 2003; 2005).

Os anuros da família Leptodactylidae são representados por 99 espécies distribuídas em 4 gêneros (Hydrolaetare, Scythrophrys, Paratelmatoebius, e Leptodactylus), sendo o gênero Leptodactylus o mais representativo com 88 espécies, representados em geral por animais de pequeno e médio porte, terrestres, insetívoros, semi-aquáticos e com hábitos noturnos, vivendo associados em serrapilheiras de florestas tropicais úmidas, ou próximas à água, com exceção de algumas espécies que habitam ambientes áridos e cujos modos reprodutivos são bastante diversificados (DE-CARVALHO *et al.*, 2008; FROST, 2010).

A família Hylidae é atualmente a mais numerosa dentre os anuros, sendo constituída por aproximadamente 891 espécies (FROST, 2010; SBH, 2010). No Brasil, é representada por 338 espécies situadas em 27 gêneros. Esta família possui ainda três subfamílias: Phyllomedusinae; Pelodyadinae e Hylinae, sendo esta última a maior delas, com 636 espécies (FROST, 2010). Os hílídeos são extremamente variáveis no tamanho (1,7-14 cm de comprimento) e aparência externa, porém possuem discos adesivos arredondados nas pontas dos dedos, presentes na maioria das espécies, que os diferencia das outras famílias (LIMA *et al.*, 2006).

O presente trabalho foi conduzido em áreas de cerrado nos municípios de Serranópolis, Rio Verde, Bela Vista, Barro Alto, Nazário e Pirenópolis. Vários estudos têm demonstrado que anuros de diferentes regiões podem apresentar grande variabilidade citogenética, permitindo análises entre os distintos cariótipos, pela identificação das regiões organizadoras de nucléolo e constrições secundárias. Assim, a utilização de ferramentas citogenéticas se torna uma poderosa ferramenta para o entendimento da evolução cromossômica e para o estabelecimento das relações filogenéticas entre as espécies da anurofauna do cerrado (NUNES, 2006; SOUZA, 2007).

Os objetivos deste estudo foram caracterizar a diversidade de anuros com ênfase nas famílias Hylidae e Leptodactylidae, incluindo a análise comparativa e a presença de polimorfismo nas mesmas, em diferentes regiões do cerrado goiano.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos Anuros

As coletas foram realizadas em regiões de cerrado nos municípios de Serranópolis, Rio Verde, Bela Vista, Pirenópolis, Barro Alto e Nazário, no período de Janeiro de 2007 a Novembro de 2008. Foram coletados um total de 33 hílídeos e 12 leptodactylídeos totalizando 45 espécimes (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies e Exemplos de Anuros Analisados no Presente Estudo

Espécies	Número de exemplares coletados	Local de Coleta
Família Leptodactylidae		
<i>Leptodactylus Ocellatus</i>	4	Rio Verde/Bela Vista
<i>Leptodactylus fuscus</i>	5	Serranópolis
<i>Leptodactylus labyrinthicus Hilidae</i>	3	Serranópolis Família
<i>Hypsiboas raniceps</i>	4	Rio Verde
<i>Hypsiboas multifasciatus</i>	3	Serranópolis
<i>Hypsiboas lundii</i>	2	Pirenópolis
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	8	Pirenópolis
<i>Pseudis bolbodactyla</i>	3	Pirenópolis
<i>Scinax similis</i>	4	Pirenópolis
<i>Scinax constrictus</i>	9	Pirenópolis
		Barro Alto/Nazário
Total	45	

Para a realização da citogenética foi utilizada a técnica de obtenção de cromossomos a partir do fígado, da medula óssea e do baço dos anfíbios anuros coletados, devido à intensa atividade mitótica das células nestas estruturas. Na preparação direta dos órgãos, foi utilizada solução de Fitoemaglutinina M (10%), que foi injetada intraperitonealmente, na proporção de 0,1mL/10g de peso do animal durante três dias consecutivos.

Para a obtenção de cromossomos metafásicos a partir de fígado, baço e medula óssea, utilizou-se a metodologia descrita por Baldissera-Jr *et al.*, (1993), com modificações. Esse procedimento foi realizado injetando intraperitonealmente solução de colchicina a 0,1%, na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso do animal 4 horas antes do sacrifício. As preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa a 8% em solução tampão fosfato pH 6,8 por 8 minutos para a caracterização do número e da morfologia dos cromossomos, seguindo protocolos de rotina.

Para a coloração de regiões organizadoras de nucléolo (RONs), seguiu-se a metodologia de Howell e Black (1980), com modificações. As lâminas foram hidrolisadas em solução de 1M de ácido clorídrico a 60°C por 7 minutos. Sobre o material das lâminas, foi colocada 1 gota de solução coloidal reveladora e duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO₃) a 50%. As lâminas foram cobertas com uma lamínula e incubadas por 5 minutos em câmara úmida a 60°C. Após este tempo, foi realizado a coloração com Giemsa a 8%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Cromossomos dos Leptodactylideos

No estudo citogenético das espécies de anfíbios anuros da família Leptodactylidae, *Leptodactylus fuscus*, *L. labyrinthicus* e *L. ocellatus*, o número cromossômico encontrado foi de $2n=22$ para todas as espécies, não apresentando nenhuma diferença numérica entre eles, apenas diferenças morfológicas em seus cariótipos. Foram encontrados cromossomos predominantemente metacêntricos e submetacêntricos sendo observado apenas um par cromossômico acrocêntrico nas espécies *L. labyrinthicus* e *L. ocellatus* (figura 1).

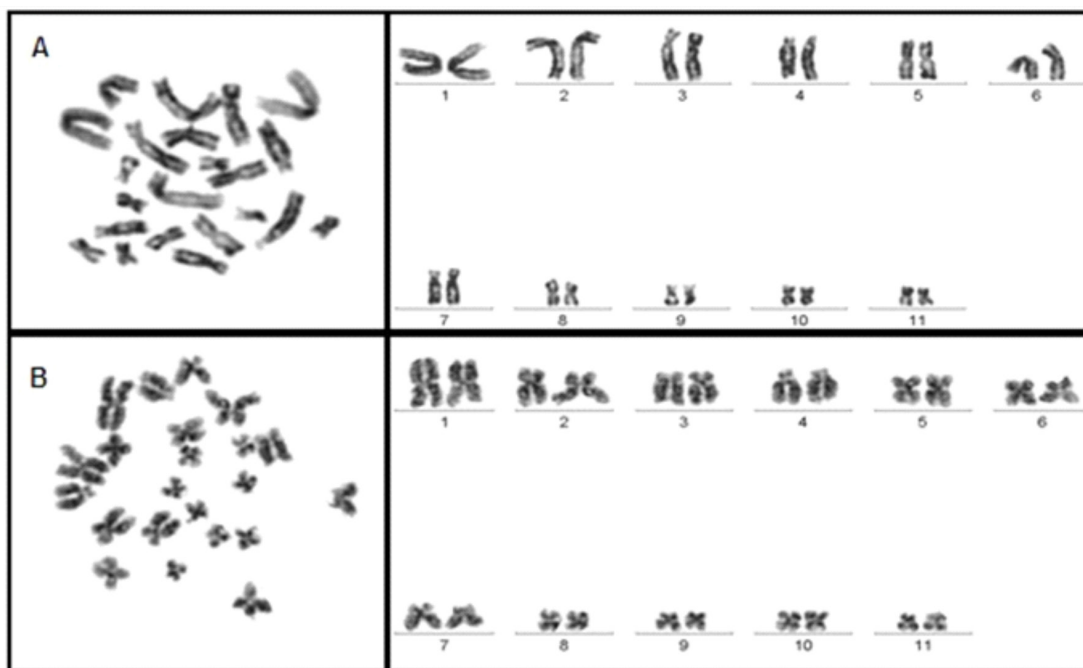


Figura 1: Cariótipo De Leptodactylideos em Coloração Convencional

Legenda: A- *Leptodactylus labyrinthicus* (2n =22 e NF = 42); B- *Leptodactylus ocellatus* (2n =22 e NF= 42). Ambas as espécies apresentado o par 4 acrocêntrico.

Quanto à morfologia cromossômica as espécies *L. labyrinthicus* e *L. ocellatus* apresentou os pares 1, 5, 6, 8, 10 e 11 metacêntricos, os pares 2, 3, 7 e 9 submetacêntricos e o par 4 acrocêntrico, diferindo dos resultados encontrados por Amaro-Ghilardi (2005) onde os pares cromossômicos 4 e 8 foram classificados como submetacêntrico e o par 9 como metacêntrico.

O cariótipo de *L. fuscus* apresentou os cromossomos 1, 5, 6, 8 e 10 metacêntricos e 2, 3, 4, 7, 9 e 11 submetacêntricos, dados estes que estão em conformidade com os dados encontrados por Silva et al., (2000). A presença das RONS na posição terminal do braço curto do cromossomo 8 também confirma os dados obtidos pelo mesmo autor. O bandeamento por impregnação com nitrato de prata no par cromossômico 8, foi obtido em *L. fuscus* o que pode caracterizar esta região como uma região organizadora de nucléolo (figura 2).

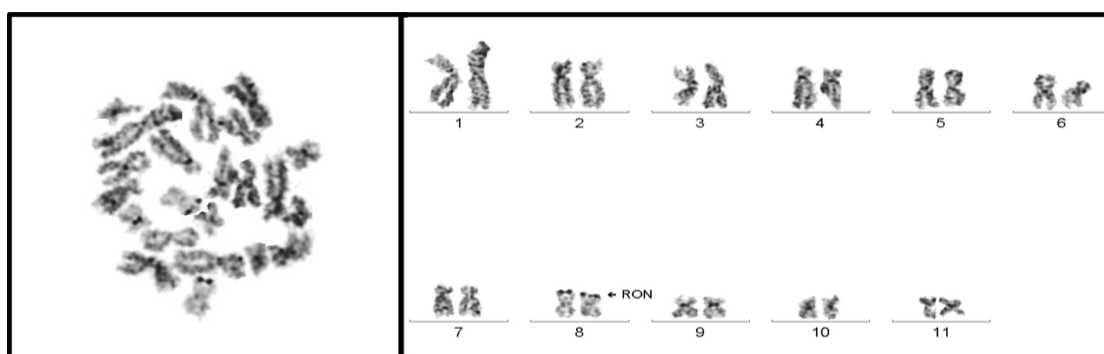


Figura 2: Cariótipo em coloração diferencial por nitrato de prata evidenciando as regiões organizadoras de nucléolo no par cromossômico 8 do *Leptodactylus fuscus* (2n=22 e NF=44)

Os Cromossomos dos Hylideos

Os Hylideos analisados apresentaram número diplóide variando em $2n = 22$ a

$2n=24$. Por coloração convencional, a espécies *Hypsiboas multifasciatus*, *Hypsiboas raniceps* e *Hypsiboas lundii* apresentaram o número diplóide $2n = 24$ e número fundamental $NF = 48$, evidenciando um padrão de conservação cariotípica no gênero (figura 3). Os dados encontrados reforçam aqueles obtidos por King (1990), Gruber (2006), Sousa (2007) e Carvalho *et al.* (2009) para as espécies desta família.

Dentro da família Hylidae, apenas a espécie *Hypsiboas albopunctatus* apresentou número diplóide $2n = 22$ e o número fundamental $NF = 44$ (figura 3), resultado este similar ao número diplóide apresentado pelos estudos citogenéticos de Beçak (1968) e Gruber (2006).

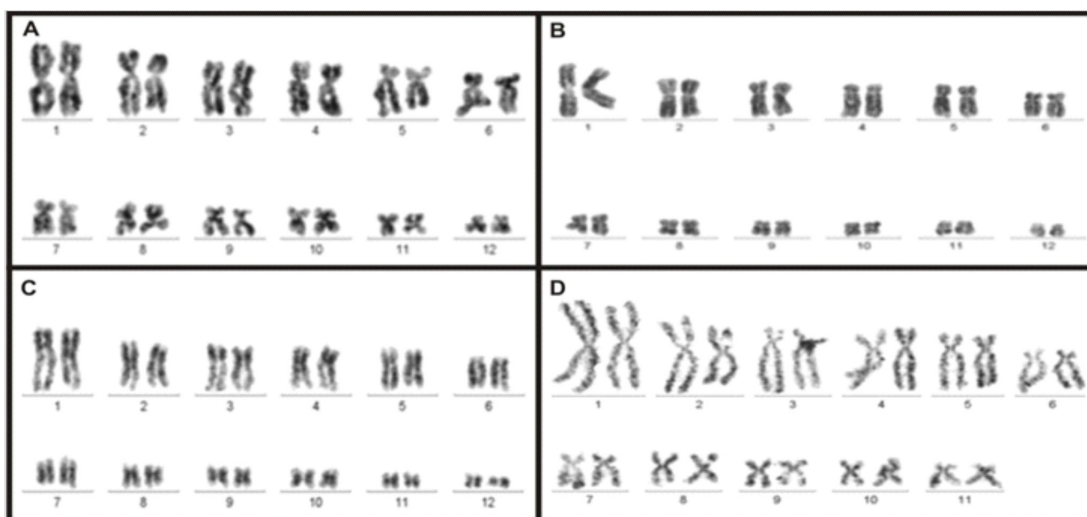


Figura 3: Cariótipo De Hylideos em Coloração Convencional

Legenda: A- *Hypsiboas multifasciatus* ($2n=24$ e $NF=48$); B- *Hypsiboas raniceps* ($2n =24$ e $NF = 48$); C- *Hypsiboas lundii* ($2n =24$ e $NF = 48$); D- *Hypsiboas albopunctatus* ($2n =22$ e $NF = 42$).

A espécie *Pseudis bolbodactyla* apresentou número diplóide $2n = 24$ e $NF=46$ evidenciado pelo par acrocêntrico 4 (figura 4). O número diplóide encontrado foi o mesmo obtido por Busin *et al.*, (2008) para as espécies do gênero *Pseudis* (*Pseudis paradoxa* *paradoxa*, *P. platensis*, *P. bolbodactyla*, *P. fusca* e *P. tocantins*).

O cariótipo de *Scinax similis* apresentou 24 cromossomos com número fundamental $NF = 48$, sendo o par 1 metacêntrico e o restante dos pares submetacêntricos (figura 5A). O cariótipo encontrado para *Scinax similis* foi descrito por Lemes *et al.* (2004) e de acordo com estes autores o cariótipo desta espécie é praticamente indistinguível de outras espécies pertencentes ao grupo de *Scinax ruber*.

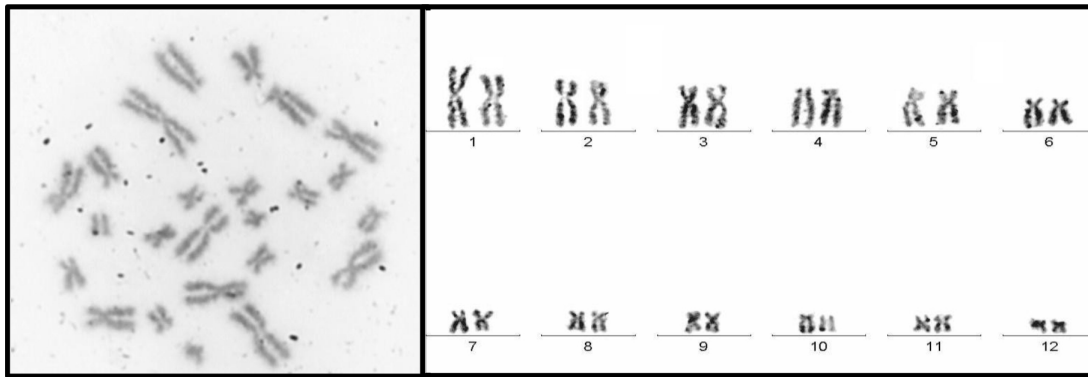


Figura 4: Cariótipo de *Pseudis bolbodactyla* ($2n=24$ e $NF=46$) em coloração convencional.

Quanto à coloração convencional a espécie *Scinax constrictus*, apresentou cariótipo $2n = 22$ e $NF = 44$, sendo os pares 1, 8, 9, 10 e 11 metacêntricos e o restante dos pares submetacêntricos (figura 5B). A espécie *Scinax constrictus* tem seu cariótipo descrito no trabalho de Sousa (2007), com $2n=22$ confirmando, quanto ao número, os resultados encontrados nesse estudo, porém quanto à posição dos centrômeros os resultados discordam dos encontrados por Sousa (2007), uma vez que o autor descreveu como metacêntricos os pares 4 e 7, e como submetacêntricos os pares 8, 9 e 10.

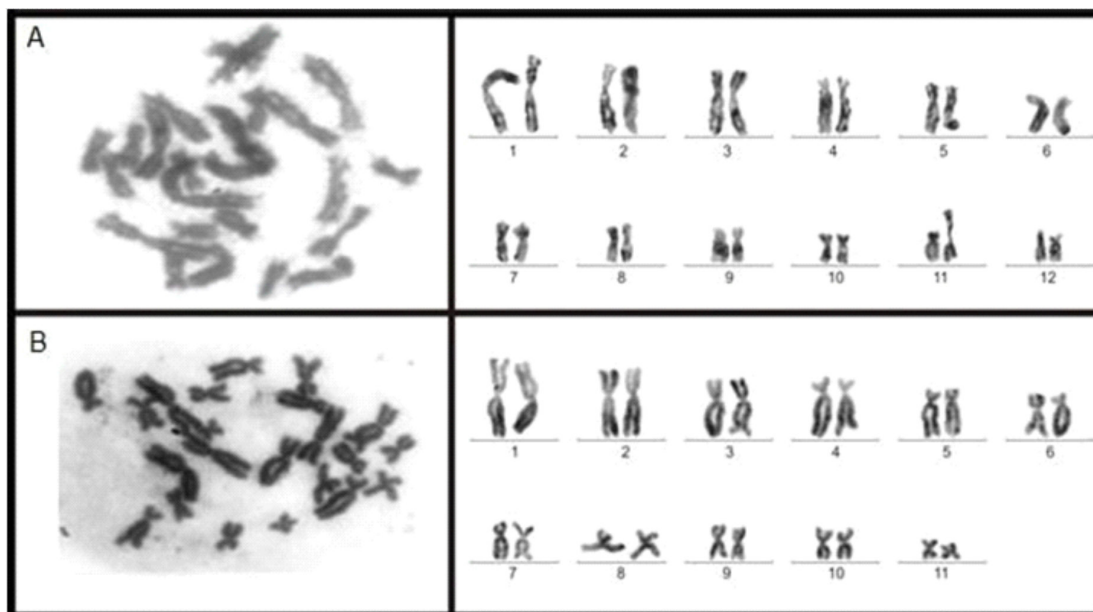


Figura 5: Cariótipo Do gênero *Scinax* em Coloração Convencional

Legenda: A- *Scinax similis* ($2n = 24$ e $NF = 48$); B- *Scinax constrictus* ($2n = 22$ e $NF = 44$).

A Família Hylidae em geral apresenta uma alta variação cariotípica, como pôde ser observado nos resultados encontrados nesse trabalho. Esta variação está presente em ambos os gêneros, *Scinax* e *Hypsiboas*, sendo visualizadas apenas com coloração convencional uma vez que a origem das diferenças é o polimorfismo numéricas entre os táxons. O fato que pode explicar a grande heterogeneidade nos anfíbios em geral, está relacionado com a reprodução, que acontece de forma muito frequente, fazendo com que a troca genética seja maior.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram uma variabilidade numérica nos cariótipos de táxons de um mesmo gênero, corroborando a idéia de que existe um padrão diversificado no modo reprodutivo deste grupo de animais.

Faz-se necessário, para uma maior elucidação quanto a taxonomia dos anuros, a utilização de outras técnicas que permitam uma análise mais detalhada de seus cariótipos, como a coloração por DAPI, Bandeamento C e fluorescência em hibridização “in situ” “Fish”, já que a técnica de coloração convencional e diferencial por nitrato de prata não permitem a análise detalhada do cariótipo do animal.

CYTOGENETICS COMPARATIVE HYLIDAE AND LEPTODACTYLIDAE FAMILIES OF SAVANNAH GOIÁS

*Abstract: this study describes the cytogenetic diversity of anuran amphibians with emphasis on families Hylidae and Leptodactylidae from different localities of the Cerrado in Goiás. We analyzed 10 different species collected in the cities of Rio Verde, Bela Vista, Serranópolis, Barro Alto, Pirenópolis and Nazário. Karyotypes were obtained with diploid number ranging from $2n = 22$ to $2n = 24$. Markings for Nucleolar Organizer Regions were obtained on chromosome 8 of the *Leptodactylus fuscus* species. The major chromosomal variation can be explained by different reproductive pattern of these animals.*

Keywords: *Cytogenetics. Amphibians. Karyotype. Cerrado. Nucleolus.*

Referências

- AMARO-GHILARDI, R. C. Estudos citogenéticos comparativos em 26 espécies da família Leptodactylidae (Amphibia, Anura). Tese de doutorado. Instituto de Biociência. Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 162p. 2005.
- BALDISSERA-JR, F. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian Hyla species (Amphibia-Anura) and description of a case of supernumerary chromosome. *Revista Brasileira de Genética*, 16: 335-345.1993.
- BASTOS, R. P. Anfíbios do cerrado, p. 87-100. In L. B. Nascimento & M. E. Oliveira. (Ed.). *Herpetologia no Brasil II*. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 354p. 2005.
- BASTOS, R. P.; MOTTA, J. A. O.; LIMA, L. P.; GUIMARÃES, L. D. Anfíbios da floresta nacional de Silvânia, Estado de Goiás. 1º ed. Goiânia, GO. 82 p. 2003.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, 21(3): 191–208. 1968.
- BUSIN, C. S.; ANDRADE, G. V., BERTOLDO, J.; GRANDE, M. L.; M. & S. UETANABARO, M. RECCO-PIMENTEL. Cytogenetic analysis of four species of Pseudis (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in P. tocantins. *Genetica*, 133(2):119-127. 2008.
- CARVALHO, F. K., A. FERNANDES, A. BARTH & R. J. CUSTÓDIO. Tempo ou antropismo como fatores causadores de alterações cromossômicas para uma população de Hypsiboas

raniceps (Anura: Hylidae) (Cope, 1862). 4 p. In IV Congresso de Iniciação Científica. Tangará da Serra, MT. 2009.

COLLI, G. R., R. P. BASTOS; A. F. B. HADDAD. The character and dynamics of the cerrado herpetofauna, p. 223-241. In P. S. Oliveira & R. J. Marquis. (Ed.). The cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna. New York, Columbia University. 398 p. 2002.

DE-CARVALHO, C. B.; FREITAS, E. B.; FARIA, R. G.; BATISTA, R. C.; BATISTA, C. C.; COELHO, W. A.; BOCCHIGLIERI, A. História natural de *Leptodactylus mystacinus* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) no Cerrado do Brasil Central. *Biota Neotropica*, 8 (3): 105-115. 2008.

ETEROVICK, P. C.; SAZIMA, I. Anfíbios da Cerra do Cipó. Ed. Pucminas. Belo Horizonte, MG. 150 p. 2004.

FROST, D. R. Amphibia Species of the World: an online reference. Version 5.3. Disponível em <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/references>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em 06 de abril de 2010. 2010.

GRUBER, S., HADDAD, C.; KASAHARA, S. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B- chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n = 24$ to $2n = 22$ in the genus. *Genetica*, 130 (3): 281-291. 2006.

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

KING, M. Animal Cytogenetics. Amphibia, 4. Chordata 2. Berlin, John B. 241 p. 1990. LEMES, D. M., BORTOLETO, J. F.; GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F. B.;

KASAHARA, S. In: Resumo completo: Avaliação dos padrões cariotípicos no gênero *Scinax* (Hylidae, Anura), baseada na análise de nove espécies. XXV Congresso brasileiro de Zootologia, Brasília. Disponível em: <http://www.unb.br/ib/zoo/CBZ/resumo/XXVCBZcompleto.pdf>. Acessado em 11 de maio 2010. 2004.

LIMA A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMANN, L. K.; RODRIGUES, D. J.; KELLER, C.; HÖDL, W. Guia de sapos da reserva Adolpho Ducke. Amazônia Central. Ed. Attenua. Manaus, AM. 168 p. 2006.

NUNES, R. R. A. Citogenética de anfíbios da família Hylidae do Espírito Santo. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES. 72p. 2006.

POUGH, F. H., HEISER, J. B.; MCFARLAND, W. N. Vertebrate Life, 6ª ed. Ed. Prentice Hall. 768 p. 2002.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Lista de anfíbios do Brasil. 13 de maio de 2010. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>. Acesso em: 3 de novembro de 2010.

SOUSA, I. M. C. Caracterização Citogenética de Anfíbios Anuros do bioma Cerrado em Municípios do Estado de Goiás. Monografia pra conclusão do Curso de Biologia. Depto. de Biologia. Universidade Católica de Goiás. 35 p. 2007.

* Recebido em: 02.03.2012. Aprovado em: 12.03.2012.

HUGO HENRIQUE PÁDUA DE OLIVEIRA

Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás).

CAIO CESAR NEVES SOUZA,

Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da PUC Goiás.

CRISTIANO LUIZ RIBEIRO

Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da PUC Goiás.

ROGÉRIO PEREIRA BASTOS,

Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da PUC Goiás.

APARECIDO DIVINO DA CRUZ,

Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da PUC Goiás.

DANIELA DE MELO E SILVA

Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da PUC Goiás. Universidade Federal de Goiás.