

FAUSTO FORESTI
Licenciado em História Natural
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS DE BOTUCATU

ASPECTOS CROMOSSÔMICOS DA FAMÍLIA HYLIDAE
(AMPHIBIA-ANURA)

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, pa-
Scientiae".

PIRACICABA
São Paulo - 1.972

FAUSTO FORESTI

ASPECTOS CROMOSSÔMICOS DA FAMÍLIA HYLIDAE (AMPHIBIA-ANURA)

PIRACICABA

São Paulo - 1972

FAUSTO FORESTI

ASPECTOS CROMOSSÔMICOS DA FAMÍLIA HYLIDAE (AMPHIBIA-ANURA)

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

Orientador: Prof. Dr. ALMIRO BLUMENSCHNEIN

PIRACICABA
São Paulo - 1972

À Miriam,
ao Renato
ao Fabio,
aos meus pais e irmãos,
aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Queremos expressar nossos agradecimentos a todos aqueles que colaboraram conosco no desenvolvimento deste trabalho:

Ao Dr. Almiro Blumenschein, que orientou e apoiou a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Jorge Jim, que além de fornecer e classificar os exemplares aqui estudados, esteve sempre disposto a discutir e incentivar.

Ao Dr. Willy Beçak e Dra. Maria Luiza Beçak, pela leitura do manuscrito e sugestões dadas.

Ao Prof. Edmundo José de Lucca, com quem vimos desenvolvendo trabalhos nesse campo, pela colaboração.

Aos colegas do Departamento de Morfologia da F.C.M.B.B. e de maneira especial à Dra. Edy de Lello e Prof. Luis Antonio Toledo, pelas sugestões e estímulo prestados.

À Srta. Doralice Coneglian, pelos serviços técnicos e Srtas. Angelina J. Spernega, Carmen H. Mamede e Sueli Serra pelos serviços datilográficos.

À Disciplina de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da F.C.M.B.B., que colocou a nossa disposição seu fotomicroscópio e à Seção de Fotografias do Serviço de Documentação Científica, pelo material fornecido.

À Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, onde este trabalho foi realizado e ao Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de Piracicaba, pelas facilidades concedidas.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODO.....	15
4. RESULTADOS.....	19
4.1. <u>Aparasphenodon brunoi</u>	30
4.2. <u>Hyla bischoffi</u>	31
4.3. <u>Hyla circundata</u>	32
4.4. <u>Hyla cuspidata</u>	33
4.5. <u>Hyla duartei</u>	34
4.6. <u>Hyla geographica</u>	35
4.7. <u>Hyla langsdorffii</u>	36
4.8. <u>Hyla pachychnus</u>	37
4.9. <u>Hyla punctata</u>	38
4.10. <u>Hyla semiguttata</u>	39
4.11. <u>Hyla squalirostris</u>	40
4.12. <u>Phrynohyas mesophaea</u>	41
4.13. <u>Sphaenorhyncus planicola</u>	42
4.14. <u>Phyllomedusa bahiana</u>	43
4.15. <u>Phyllomedusa hypochondrialis</u>	45
4.16. <u>Hyla anceps</u>	46
4.17. <u>Hyla bipunctata</u>	47
4.18. <u>Hyla branneri</u>	48
4.19. <u>Hyla decipiens</u>	49
4.20. <u>Hyla leucophyllata</u>	50
4.21. <u>Hyla meridiana</u>	51
4.22. <u>Hyla oliveirai</u>	52
4.23. <u>Hyla berthaltutzae</u>	53
5. DISCUSSÃO.....	54
5.1. Número e morfologia dos cromossomos.....	55
5.1.1. Espécies com número diplóide igual a 24..	57
5.1.2. Espécies com número diplóide igual a 26..	61
5.1.3. Espécies com número diplóide igual a 30 e possivelmente 32.....	64

5.2. Considerações gerais sobre as espécies.....	68
5.3. Cromossomos sexuais.....	70
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	72
7. SUMMARY.....	74
8. BIBLIOGRAFIA.....	75

1. INTRODUÇÃO

Os estudos citogenéticos mostraram nos últimos anos serem de grande utilidade no estabelecimento das relações filogenéticas para vários grupos de animais e plantas. Um surto importante de pesquisas iniciou-se com a aquisição de métodos mais efetivos e precisos para obtenção de preparações mais adequadas, com a finalidade de proporcionar uma perfeita identificação dos cromossomos. Assim, principalmente através de técnicas como a pré-colchicinização, do emprego de soluções hipotônicas e de culturas de tecidos, inúmeros resultados foram obtidos, constituindo-se num novo instrumento para melhor visualização do relacionamento e evolução das espécies dentro dos grupos e entre os diversos grupos biológicos.

Entre os Anuros, tal tipo de abordagem se prestou perfeitamente ao esclarecimento de certos mecanismos envolvidos no processo da evolução. Esta parece ter ocorrido principalmente através de uma redução do número cromossômico, diminuindo concomitantemente o número de cromossomos acrocêntricos no genoma. Verifica-se ainda que as espécies mais primitivas caracterizam-se, geralmente, por um alto número de diplóide, onde esse tipo de cromossomos aparece com frequência, enquanto as espécies consideradas mais recentes apresentam um número menor de cromossomos, na sua maioria metacêntricos e submetacêntricos.

O mecanismo dessa redução provavelmente envolve a fusão de dois cromossomos acrocêntricos, com a formação de um cromossomo metacêntrico ou submetacêntrico e a perda subsequente do segmento heterocromático.

O objetivo do presente trabalho é a aprentação dos dados obtidos sobre as características dos cromosomos de vinte e três espécies de anuros da família Hylidae, pertencentes a cinco gêneros e coletadas em localidades de seis Estados brasileiros.

Serão estudados os aspectos relacionados ao número e à morfologia dos cromossomos mitóticos e, quando possível, dos cromossomos meióticos destas espécies. Estes dados serão comparados aos das demais espécies já descritas, pertencentes a esta família, com a finalidade de uma melhor compreensão dos mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação deste grupo. Também será investigada a ocorrência de heteromorfismo cromossômico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento e a utilização de métodos citológicos mais adequados marcam um grande progresso na Citogenética, em relação ao conhecimento das características cromossômicas de animais e plantas. Inúmeros trabalhos têm sido apresentados nesse campo, marcadamente em relação aos vertebrados. A extensão desse assunto entre os Anura, pode ser verificada pelos levantamentos realizados por MAKINO (1951), RABELLO (1969, 1970) e por BENIRSCHKE e HSU (1971).

A Tabela 1 sumariza os dados obtidos até o presente, em relação ao número de cromossomos em células mitóticas e meióticas das espécies componentes da Família Hylidae. Apesar de ser o grupo mais numeroso entre os Anura, compreendendo aproximadamente 450 espécies (COLE, 1971), são relativamente poucos os trabalhos existentes que descrevem suas características cromossômicas.

IRIKI (1930), um dos primeiros autores a descrever os cromossomos dos Hylideos, estudou o cariótipo de Hyla arborea japonica ($2n=24$, $n=12$), afirmando ter encontrado heteromorfismo cromossômico sexual. Esta hipótese foi amplamente discutida posteriormente, por outros autores.

BUSHNELL e BUSHNELL (1939) descreveram o cariótipo de cinco membros da família Hylidae, encontrando um número diplóide de 24 cromossomos em Hyla avivoca, Hyla versicolor versicolor e Hyla cinerea e de 22 cromossomos em Acris crepitans e Acris gryllus. Em todas estas espécies foi verificada a presença de um par com seus homólogos diferenciados entre si, em relação ao tamanho e heteropiconose.

Tabela 1 - Número de cromossomos apresentados pelas espécies pertencentes a Família Hylidae (Anura)

Espécie	2n	n	Autores
<u>Acris crepitans</u>	22	11	Bushnell e col., 1939
<u>Acris crepitans blanchardi</u>	-	11	Duellman e Cole, 1965
<u>Acris crepitans blanchardi</u>	22	11	Cole, 1966
<u>Acris gryllus</u>	22	11	Bushnell e col., 1939
<u>Agalychnis annae</u>	-	13	Leon, 1970
<u>Anotheca coronata</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Diaglena reticulata</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Diaglena spatulata</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Fritziana goeldii</u>	26	13	Beçak, M.L., 1967, 1968
<u>Gastrotheca ceratophrys</u>	-	14	Duellman, 1967
<u>Hyla albomarginata</u>	24	12	Beçak, M.L., 1967, 1968
<u>Hyla albopunctata</u>	22	11	Beçak, M.L., 1967, 1968
<u>Hyla andersonii</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla andersonii</u>	24	12	Wasserman, 1970
<u>Hyla angiana</u>	-	15	Duellman, 1967
<u>Hyla angustilineata</u>	-	12	Leon, 1970
<u>Hyla arenicolor</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla arborea</u>	24	12	Galgano, 1933
<u>Hyla arborea arborea</u>	24	12	Morescalchi, 1965
<u>Hyla arborea japonica</u>	24	12	Iriki, 1930
<u>Hyla arfakiana</u>	-	13	Duellman, 1967
<u>Hyla avivoca</u>	24	12	Bushnell e col., 1939
<u>Hyla becki</u>	-	13	Duellman, 1967
<u>Hyla bidistincta</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla boulengeri</u>	-	12	Duellman, 1967
<u>Hyla caerulea</u>	26	13	Stephenson e col., 1970
<u>Hyla californiae</u>	24	-	Maxson e col., 1968
<u>Hyla cinerea</u>	24	12	Bushnell e col., 1939
<u>Hyla crepitans</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla crepitans</u>	24	12	Rabello, 1969, 1970
<u>Hyla chrysoscelis</u>	24	-	Wasserman, 1970
<u>Hyla crucifer crucifer</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965

Espécie	2n	n	Autores
<u>Hyla darlingtoni</u>	-	13	Duellman, 1967
<u>Hyla ebraccata</u>	-	15	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla elaeochroa</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla elongata</u>	30	15	Rabello e col., 1968
<u>Hyla erythromma</u>	-	12	Duellman, 1967
<u>Hyla euphorbiacea</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla faber</u>	24	12	Beçak, M.L., 1967, 1968
<u>Hyla fuscomarginata</u>	24	12	Rabello, 1969, 1970
<u>Hyla hayi</u>	24	12	Beçak, M.L., 1967, 1968
<u>Hyla hazelae</u>	24	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla lafrentzi</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla legleri</u>	-	12	Duellman, 1967
<u>Hyla microcephala martini</u>	-	15	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla microps</u>	30	15	Beçak, M.L., 1967, 1968
<u>Hyla minuta</u>	30	15	Rabello, 1969, 1970
<u>Hyla multilineata</u>	24	12	Beçak, M.L., 1967, 1968
<u>Hyla nana</u>	30	15	Rabello, 1969, 1970
<u>Hyla parkeri</u>	24	-	Beçak, W. e col. 1970
<u>Hyla pentheter</u>	-	12	Duellman, 1967
<u>Hyla phlebodes</u>	-	15	Duellman, 1967
<u>Hyla phyllochroa</u>	26	-	Stephenson e col., 1970
<u>Hyla polytaenia</u>	24	12	Rabello, 1969, 1970
<u>Hyla pseudopuma</u>	-	12	Leon, 1970
<u>Hyla pulchella prasina</u>	24	12	Beçak, M.L., 1967, 1968
<u>Hyla pulchella pulchella</u>	24	12	Saez e Brum, 1960
<u>Hyla raddiana raddiana</u>	24	-	Saez e Brum, 1959, 1960
<u>Hyla raniceps</u>	24	12	Rabello, 1969, 1970
<u>Hyla regilla</u>	24	12	Morescalchi, 1965
<u>Hyla rivularis</u>	-	12	Leon, 1970
<u>Hyla robertsorum</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla rosenbergi</u>	-	12	Leon, 1970
<u>Hyla rubicundula</u>	30	15	Rabello, 1969, 1970
<u>Hyla rufiocularis</u>	-	12	Duellman, 1967
<u>Hyla rufitela</u>	-	12	Duellman, 1967
<u>Hyla septentrionalis</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965

Espécies	2n	n	Autores
<u>Hyla smithi</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Hyla squalirostris</u>	24	-	Barrio e Rubel, 1970
<u>Hyla staufferi</u>	-	12	Duellman, 1967
<u>Hyla tica</u>	-	12	Leon, 1970
<u>Hyla trachytorax</u>	24	12	Rabello, 1969, 1970
<u>Hyla versicolor</u>	24	12	Bushnell e col., 1939
<u>Hyla versicolor</u>	48	24	Wasserman, 1970
<u>Hyla uranochroa</u>	-	12	Leon, 1970
<u>Nyctimystes foricula</u>	-	13	Duellman, 1967
<u>Nyctimystes kubori</u>	-	13	Duellman, 1967
<u>Nyctimystes papua</u>	-	13	Duellman, 1967
<u>Nyctimystes semipalmata</u>	-	13	Duellman, 1967
<u>Phyllomedusa annae</u>	-	13	Duellman e Cole, 1965
<u>Phyllomedusa burmeisteri</u>	52	26	Beçak, M.L. e col. 1970
<u>Phyllomedusa calcarifer</u>	-	13	Duellman e Cole, 1965
<u>Phyllomedusa callidryas</u>			
<u>callidryas</u>	26	13	Duellman e Cole, 1965
<u>Phyllomedusa dacnicolor</u>	26	13	Duellman e Cole, 1965
<u>Phyllomedusa dacnicolor</u>	26	-	Cole, 1971
<u>Phyllomedusa helenae</u>	26	13	Duellman e Cole, 1965
<u>Phyllomedusa lemur</u>	-	13	Leon, 1970
<u>Phrynohyas hebes</u>	24	12	Rabello e col., 1968
<u>Phrynohyas spilomma</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Phrynohyas venulosa</u>	24	12	Rabello, 1969, 1970
<u>Pseudacris triseriata kalmi</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Pseudacris triseriata</u>			
<u>triseriata</u>	24	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Pternohyla fodiens</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Ptychohyla ignicolor</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Smilisca baudini</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Smilisca cyanostica</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965
<u>Tripurion petasatus</u>	-	12	Duellman e Cole, 1965

YOSIDA (1957), estudando a morfologia dos cromossomos de Hyla arborea japonica, descreveu a ocorrência de dimorfismo sexual cromossômica do tipo XY nesta espécie. O cromossomo X seria submetacêntrico e estaria localizado em relação ao tamanho, entre os pares 6 e 7, enquanto o cromossomo Y seria metacêntrico, com a mesma medida do par 8. Na prófase meiótica o cromossomo Y mostrou-se frequentemente heteropicnótico.

SAEZ e BRUM (1960) realizaram o estudo dos cromossomos em espécies de Anuros pertencentes às famílias Bufo fonidae, Brachycephalidae, Pseudidae, Ceratophrydidae e Hylidae. A esta última pertence Hyla raddiana raddiana, que apresentou um número diplóide igual a 24 cromossomos, do tipo metacêntrico. Em nenhuma das espécies estudadas pertencentes a estas famílias foi evidenciada a presença de cromossomos sexuais, pela análise citogenética.

SETO (1964) analisou o cariótipo de machos e fêmeas de Hyla arborea japonica, através da técnica de esmagamento de material obtido de preparações "in vitro" e "in vivo", encontrando o mesmo número diplóide de 24 cromossomos já descrito anteriormente para esta espécie. Verificou a ausência de uma diferença significativa entre os cariótipos dos dois sexos, a exceção de uma fraca diferença que ocorre em relação aos membros do par 6 em ambos os sexos. Nas metáfases meióticas não foi notado qualquer comportamento diferencial que pudesse caracterizar a presença de cromossomos sexuais.

DUELIMAN e COLE (1965) determinaram o número de cromossomos em 33 espécies representantes de duas famílias de Anuros. Destas, 32 pertenciam à família Hylidae. Apenas

Acris crepitans blanchardi ($2n=22$) apresentou número haplóide igual a 11. As seguintes espécies apresentaram um número haplóide igual a 12: Anotheca coronata, Diaglena reticulata, Diaglena espatulata, Hyla andersoni, Hyla arenicolor, Hyla bistrincta, Hyla crepitans, Hyla crucifer, Hyla euphorbiacea, Hyla eximia, Hyla hazelae ($2n=24$), Hyla lafrentzi, Hyla robertsonum, Hyla septentrionalis, Hyla smithi, Phrynohyas spilomma, Pseuda cris brachyphona ($2n=24$), Pseudacris triseriata kalni, Pseudacris triseriata ($an=24$), Pternohyla fodiens, Ptychohyla ignicolor, Smilisca baudini, Smilisca cyanoptica e Tripurion petasatus. Apresentaram número haplóide igual a 13, as espécies Phyllomedusa calcarifer, Phyllomedusa callidryas callidryas ($2n=26$), Phyllomedusa dacnicolor e Phyllomedusa helenae ($2n=26$). Apresentaram número haplóide igual a 15, as espécies Hyla ebraccata, Hyla microcephala martini e Hyla microcephala microcephala. Com esses dados, os autores fazem considerações sobre o possível relacionamento das espécies dentro desse grupo.

MORESCALCHI (1965) fez uma comparação das características cromossômicas entre Hyla arborea japonica e Hyla regilla, verificando grande semelhança entre os cariótipos destas duas espécies, que apresentam número diplóide igual a 24 cromossomos. Não foi encontrado heteromorfismo cromossômico sexual em nenhuma das espécies, ao contrário do que foi descrito para Hyla arborea japonica por YOSIDA (1957) e outros autores.

BEČAK, M.L. e col. (1966) relataram o estudo citogenético de quatro espécies da família Hylidae. Investigaram-se as metáfases mitóticas e meióticas de Hyla pulchella.

prasina (= Hyla raddiana raddiana) e de Hyla hayi, que apresentaram $2n=24$ e $n=12$; Fritziana goeldii apresentou $2n=26$ e $n=13$ e Hyla microps apresentou $2n=30$ e $n=15$ cromossomos. A variação numérica encontrada foi explicada pelo mecanismo das fusões cêntricas. Não se notou a presença de cromossomos sexuais diferenciados morfologicamente, com exceção de um bivalente, em forma de V na metáfase I de Hyla pulchella prasina, interpretado como uma terminalização precoce em relação aos demais bivalentes.

COLE (1966) descreveu as características mitóticas e meióticas dos cromossomos de Acris crepitans blanchardi, cuja constituição cromossômica já havia sido relatada anteriormente por DUELLIMAN e COLE (1965). O cariótipo desta espécie apresentou três grupos distintos de cromossomos, constituindo-se de um par maior, seis intermediários e quatro menores que os demais. Os 11 bivalentes apresentaram forma anelar na metáfase I, com quiasmas terminais.

DUELLIMAN (1967) determinou o número de cromossomos de 30 espécies representantes de oito famílias de Anuros, das quais 16 pertenciam à família Hylidae: Hyla bou-lengeri, Hyla elaeochroa, Hyla erythroma, Hyla legleri, Hyla rufioculis, Hyla rufitela e Hyla staufferi, apresentaram número haplóide de 12 cromossomos; as espécies Hyla arfakiana, Hyla becki, Hyla darlingtoni, Nyctimystes foricula, Nyctimystes kubori, Nyctimystes papua e Nyctimystes semipalmata apresentaram número haplóide igual a 13; Gastrotheca ceratophrys apresentou número haplóide igual a 14, num único caso descrito nesse grupo e Hyla angiana e Hyla plebodes com número haplóide de 15 cromossomos. O autor analisa a existência de es-

pécies com o mesmo número de cromossomos em regiões geográficas distintas, sugerindo a hipótese de evolução cariotípica independente desses grupos.

BEÇAK, M.L. (1968) estudou e descreveu o cariótipo de 18 espécies de Anuros brasileiros, entre os quais oito pertencentes à família Hylidae: Hyla pulchella prasina, Hyla hayi, Hyla faber, Hyla multilineata e Hyla albomarginata apresentaram $2n=24$ e $n=12$; Hyla albopunctata apresentou $2n=22$ e $n=11$; Hyla microps apresentou $2n=30$ e $n=15$ e Fritziana goeldii apresentou $2n=26$ e $n=13$. Não se encontraram evidências de cromossomos sexuais e as variações numéricas observadas foram explicadas como devidas, principalmente, ao mecanismo das fusões cêntricas, que agiriam diminuindo o número de cromossomos pela fusão de cromossomos acrocêntricos.

MAXSON e JAMESON (1968) descreveram e compararam o cariótipo de Hyla californiae com o de Hyla regilla (anteriormente descrito por MORESCALCHI, 1965), não observando qualquer diferença estrutural entre os cromossomos. Três grupos distintos de pares de homólogos foram identificados em cada cariótipo e o comprimento total dos cromossomos de Hyla regilla apresentou valor maior que o de Hyla californiae, provavelmente devido à condensação diferencial dos cromossomos das duas espécies.

RABELLO e col. (1968) descreveram a constituição cromossômica e o cariótipo de seis espécies de Anuros da família Hylidae: Hyla polytaenia, Hyla raniceps, Hyla fuscomargita e Phrynohyas hebes apresentaram $2n=24$ e $n=12$ cromossomos; Hyla nana e Hyla elongata apresentaram $2n=30$ e $n=12$ cromossomos; Hyla nana e Hyla elongata apresentaram $2n=30$

e n=15 cromossomos. O estudo das células meióticas destas espécies não evidenciou a presença de cromossomos sexuais diferenciados.

BARRIO e RUBEL (1970), com a finalidade de comparar as características cromossômicas de Pseudideos e Hylideos, descreveram o cariótipo de um macho de Hyla squali-rostris, que apresentou um número diplóide igual a 24. A presença de uma constricção secundária foi demonstrada nos braços longos do par 7 e nenhuma evidência de heteromorfismo cromossômico sexual foi encontrada nesta espécie.

BEÇAK, M.L. e col. (1970) estudaram citogeneticamente o fenômeno da poliploidia entre 14 espécies e uma subespécie de Anuros, pertencentes às famílias Ceratophrydidae, Leptodactylidae, Hylidae, Brachycephalidae e Bufonidae e as modificações na constituição cromossômica desse grupo de vertebrados durante o curso da evolução. Novas evidências de ocorrência do fenômeno da poliploidia foram encontradas entre os Anura, além daquelas já caracterizadas na família Ceratophrydidae. Uma espécie pertencente à família Hylidae, Phyllomedusa burmeisteri, mostrou-se tetraplóide, com 52 cromossomos. Os aspectos mitóticos e meióticos das espécies estudadas não evidenciaram a presença de cromossomos sexuais.

BEÇAK, W. e col. (1970) compararam os valores do conteúdo de DNA entre 30 espécies de Salientia, 2 espécies de Caudata e uma espécie de Gymnophiona. Os resultados, em geral, mostraram a ocorrência de variações dentro das famílias e o conteúdo de DNA apresentou diferenças significativas mesmo entre espécies com igual número cromossômico. Entre os anuros, os valores mais elevados da quantidade de DNA

encontrados, foram 147% em Hyla pulchella prasina (Hylidae) e 181% em Ceratophrys dorsata (Ceratophrydidae), comparados em relação aos mamíferos como padrão 100%. Entre os membros da família Hylidae estudados, Hyla nana (2n=30) apresentou 54% de DNA e esse valor aumentou até atingir 147% em Hyla pulchella prasina (Hylidae) e 181% em Ceratophrys dorsata (Ceratophrydidae), comparados em relação aos mamíferos como padrão 100%. Entre os membros da família Hylidae estudados, Hyla nana (2n=30) apresentou 54% de DNA e esse valor aumentou até atingir 147% em Hyla pulchella prasina (2n=24).

LEON (1970) determinou o número de cromossomos de 21 espécies de anuros da Costa Rica. Os números encontrados nas células da linhagem germinativa das espécies pertencentes à família Hylidae foram: 12 bivalentes em Hyla angustilineata, Hyla pseudopuma, Hyla rivularis, Hyla rosenbergi, Hyla tica e Hyla uranochroa e 13 bivalentes em Agalychnis annae e Phyllomedusa lemur. Um aspecto considerado pelo autor é a ocorrência, de um modo geral entre os anuros, de números cromossômicos mais altos nas unidades taxionomicamente mais primitivas.

RABELIO (1970), descrevendo o cariótipo de 10 espécies de anuros brasileiros, dos quais 9 pertencentes à família Hylidae, encontrou para Hyla raniceps, Hyla crepitans, Hyla polytaenia, Hyla fuscomarginata, Hyla trachytorax e Phrynohyas venulosa, 2n=24 e n=12. Para Hyla minuta, Hyla rabcundula, e Hyla nana, encontrou 2n= 30 e n=15. A presença de satélites ficou evidenciada nos cromossomos do par 6 de Hyla crepitans e nos cromossomos dos pares 5 e 11 de Hyla fuscomarginata. Algumas metáfases meióticas de machos de Hyla

trachytorax, apresentaram 12 bivalentes e 1 univalente, além da ocorrência de mitoses com 24 e 25 cromossomos; este fato foi explicado por uma possível não disjunção nas células germinativas primordiais. Não se evidenciou a presença de cromossomos sexuais.

STEPHENSON e STEPHENSON (1970) descreveram o cariótipo de duas espécies de Hylidos australianos, que se caracterizaram pelo seu número diplóide igual a 26. Foram comparadas as características cromossômicas de Hyla caerulea e Hyla phyllochroa, que se assemelham às das hylas Papuan, com os cariótipos das demais espécies de Hylideos de outras regiões, das quais diferem grandemente. Não se observaram evidências de heteromorfismo cromossômico sexual. Foram descritas regiões heterocromáticas nos cromossomos do par 11 das duas espécies.

ULLERICH (1970) efetuou um estudo comparativo entre os dados da análise cariotípica e dos valores de DNA obtidos por citofotometria em 6 espécies de anfíbios anuros: Hyla arborea, Bombina variegata, Bombina bombina, Triturus vulgaris, Triturus alpestris e Salamandra salamandra. Foi investigada a ocorrência da polinemia neste grupo, não esclarecida em estudos anteriores. Observações das alças dos cromossomos plumulados ao microscópio eletrônico não confirmaram a presença deste processo de duplicação genética nestas espécies. Em algumas regiões das alças cromatídicas foram frequentemente evidenciadas separações dos fios, com as alças possivelmente duplicadas nesses locais. Tais fatos poderiam explicar os altos valores de DNA encontrados e as diferenças interespecíficas em relação ao seu conteúdo, como a ocorrência

de um processo evolutivo por aumento local do DNA nos cromossomos.

WASSERMAN (1970) descreveu o cariótipo tetraplóide ($4n=48$) de Hyla versicolor. A comparação individual dos cromossomos desta espécie com os de Hyla andersonii e de Hyla arborea japonica, mostrou uma perfeita correlação. O autor sugere que a espécie anteriormente descrita como Hyla versicolor por BUSHNELL e col. (1939), com $2n=24$ cromossomos, trata-se na verdade de Hyla chrysocelis.

COLE (1971) descreveu as características do cariótipo de Phyllomedusa dacnicolor, cujos números diplóide ($2n=26$) e haplóide ($n=13$), já haviam sido relatados anteriormente por DUELLMAN e COLE (1965). O cariótipo desta espécie mostrou-se comparável ao das demais espécies do mesmo gênero, o que não ocorreu quando comparado com os cariótipos das espécies australianas, apesar destes apresentarem o mesmo número de cromossomos. O par 6 caracterizou-se por apresentar uma região heterocromática bem evidente no braço menor.

3. MATERIAL E MÉTODO

Os animais estudados no presente trabalho pertencem a cinco gêneros da Família Hylidae. Sua posição sistêmica é a seguinte:

Classe: Amphibia
Ordem: Anura (Salientia)
Sub-Ordem: Procoela
Família: Hylidae
Gênero: Aparasphenodon
Hyla
Phyllomedusa
Phrynohyas
Sphaenorhynchus

Descrevemos o cariótipo das seguintes espécies:

1. Aparasphenodon brunoi Miranda Ribeiro, 1920 - 1 macho, procedente de Grumari - Guanabara.
2. Hyla anceps A. Lutz, 1929 - 2 machos, procedentes de Linhares - Espírito Santo.
3. Hyla berthalutzae Bokermann, 1962 - 1 macho, procedente de Linhares - Espírito Santo.
4. Hyla bipunctata Spix, 1824 - 1 macho, procedente de Linhares - Espírito Santo e 1 macho, procedente de Restinga da Marambaia - Guanabara.
5. Hyla bischoffi Boulenger, 1887 - 3 machos, procedentes de Rio dos Cedros - Santa Catarina.
6. Hyla branneri Cochran, 1948 - 1 fêmea, procedente de Jequié - Bahia.

7. Hyla circumdata (Cope, 1867) - 1 fêmea, procedente de Botucatu - São Paulo.
8. Hyla cuspidata A. Lutz, 1925 - 1 fêmea, procedente de Grumari - Guanabara.
9. Hyla decipiens A. Lutz, 1925 - 1 macho, procedente de Itaguaí - Rio de Janeiro.
10. Hyla duartei B. Lutz, 1951 - 1 fêmea, procedente de Itatiaia - Rio de Janeiro.
11. Hyla geographica Spix, 1824 - 1 macho, procedente de Itajibá - Bahia.
12. Hyla langsdorffii Duméril e Bibrom, 1841 - 1 macho, procedente de Grumari - Guanabara.
13. Hyla leucophyllata (Beireis, 1783) - 1 macho, procedente de Itaguaí - Rio de Janeiro.
14. Hyla meridiana B. Lutz, 1954 - 1 macho, procedente de Itaguaí - Rio de Janeiro.
15. Hyla oliveirai Bokermann, 1963 - 1 fêmea, procedente de Itajibá - Bahia.
16. Hyla pachychnus Miranda Ribeiro, 1937 - 1 macho, procedente de Jequié - Bahia.
17. Hyla punctata Wied, 1824 - 1 fêmea, procedente de Jequié - Bahia.
18. Hyla semiguttata A. Lutz, 1925 - 1 macho, procedente de Rio dos Cedros - Santa Catarina.
19. Hyla squalirostris A. Lutz, 1925 - 2 machos, procedentes de Itatinga - São Paulo.
20. Phyllomedusa bahiana A. Lutz, 1925 - 1 macho, procedente de Jequié - Bahia.

21. Phyllomedusa hypochondrialis (Daudin, 1803) - 1 macho, procedente de Jequié - Bahia.
22. Phrynohyas mesophaea (Hensel, 1867) - 1 macho, procedente de Itajibá - Bahia.
23. Sphaenorhyncus planicola (A. Lutz e B. Lutz, 1867) - 2 machos, procedentes de Linhares - Espírito Santo.

Os exemplares examinados foram doados e identificados por J. Jim, do Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.

Para obtenção de cromossomos mitóticos e meióticos necessários ao estudo citogenético, utilizamos a técnica de esmagamento de fragmentos de órgãos de animais pré-colchicinizados (OHNO e col., 1964).

Os animais foram injetados intraperitonealmente com uma solução de colchicina a 0,5%, na proporção de 0,02 ml por grama de peso. Após aproximadamente duas horas, os animais foram sacrificados e dissecados, retirando-se intestino, baço, fígado e gônadas. Estes órgãos foram cortados em pequenos fragmentos e colocados em solução hipotônica (água destilada). Os fragmentos de testículo e ovário foram tratados por 10 minutos e os de esôfago, baço e fígado, por 15 minutos, a temperatura ambiente. Procedeu-se, em seguida, à fixação do material em ácido acético glacial a 50% durante um tempo mínimo de 15 minutos. Após fixação, os fragmentos foram pulverizados sobre lâminas com o auxílio de uma pinça e o material esmagado entre lâmina e lamínula. A lamínula foi descolada por meio de imersão da lâmina em uma cuba contendo ácido acético glacial a 50%.

Após a secagem das lâminas a temperatura ambiente, procedeu-se à coloração. O material remanescente foi hidrolizado em HCL 1N a 60°C por 10 minutos; seguiu-se um rápido banho em água destilada gelada e lavagem em água corrente. As lâminas foram então cobertas com um filme de solução tampão fosfato de sódio e potássio (Sorensen) pH 6,8 e corada com Giemsa, por 7 minutos. Depois de secas, as lâminas foram montadas com lamínulas em resina, procedendo-se ao exame em microscópio.

As metáfases mais nítidas foram selecionadas, marcadas e fotografadas. Quando a metáfase apresentava os cromossomos pouco espalhados, era desenhada ao microscópio, para facilitar o recorte da fotografia. O número de cromossomos e a descrição de sua morfologia foram determinados através do pareamento dos homólogos, recortados e dispostos em ordem decrescente de tamanho. Também foram fotografadas metáfases meióticas do macho (MI e MII) para determinação do número haplóide da espécie.

A determinação do comprimento relativo (CR) e da relação de braços (RB) de cada cromossomo foi feita segundo o método de ROTHFELS e SIMINOVITCH (1958). Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), $RB < 1,5; IC: > 0,40$, submetacêntricos (sm), $RB: 1,5-4,0; IC: 0,20-0,40$ e acrocêntricos (a), $RB: > 4,0; IC: < 0,20$, para uniformização dos nossos dados com os de alguns autores como BEÇAK, M.L., 1967, 1968; RABELLO, 1969, 1970. Entre os acrocêntricos, foram incluídos os de centrômero terminal e também aqueles que apresentaram aspecto de telocêntricos.

4. RESULTADOS.

Foi determinada a constituição cromossômica de 23 espécies de anuros pertencentes a cinco gêneros da família Hylidae. Na Tabela 2 encontram-se relacionados o número de cromossomos e os locais de coletas das espécies e a Figura 1 refere-se à distribuição do material estudado, segundo sua localização geográfica. Verificou-se uma variação no número diplóide de cromossomos de $2n=24$, 26 e 30, anteriormente descritos por outros autores, para outras espécies e possivelmente $2n=32$ em Hyla berthalutzae, que pode constituir-se no maior número diplóide descrito neste grupo. Algumas espécies tiveram determinado também seu número haplóide, através da contagem dos cromossomos em suas células da linhagem germinativa.

Nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 estão expressas as características dos cromossomos dessas espécies em relação ao comprimento relativo, relação de braços, índice centromérico e sua designação.

Os dados apresentados na Tabela 3 referem-se aos comprimentos relativos (CR) encontrados para os pares de cromossomos nas espécies aqui descritas. Entre aquelas com número diplóide de 24 cromossomos encontramos, de um modo geral, o genoma diferenciado em dois lotes, com um grupo formado por cromossomos maiores, abrangendo os seis primeiros pares e outro grupo, formado pelos seis pares restantes e relativamente menores que os primeiros. As espécies com 26, 30 e 32 cromossomos apresentaram uma diminuição gradativa dos valores do comprimento relativo. Verificou-se ainda que os pri

meiros pares das espécies com $2n=24$ cromossomos mostraram sempre valores maiores de comprimento relativo quando comparados aos das demais espécies.

A Tabela 4 mostra valores da relação de braços (RB) encontrados nos cromossomos dessas espécies. Para o grupo com $2n=24$ evidencia-se uma certa homogeneidade dos valores e as variações ocorridas não chegam a determinar grandes alterações na caracterização dos cariótipos. Nas espécies com $2n=26$, apenas os pares 8 e 9 de Phyllomedusa bahyana, mostraram valores altos de RB. Naquelas com $2n=30$ e 32 , nem sempre os valores de RB puderam ser comparados em todos os cariótipos mas mostraram-se bastante semelhantes para a maioria dos pares menores. Não foi possível a determinação do valor de RB para o par 16 de Hyla berthalutzae, pelo fato dos cromossomos apresentarem-se muito condensados, o que tornou difícil a visualização dos seus braços.

A Tabela 5 mostra os valores encontrados para o índice centromérico (IC) dos cromossomos nessas espécies. Apesar da importância relativa destes dados, uma vez que as características dos cromossomos poderiam ser determinadas pelos demais valores calculados, sua utilização foi feita quando havia dúvidas para a correta designação de determinados pares.

Na Tabela 6 estão sumarizados os resultados encontrados para designação dos cromossomos (D) e os valores do comprimento total do genoma das espécies aqui apresentadas. Esses dados resumem os resultados encontrados nas tabelas anteriores e utilizados em conjunto para a caracterização morfológica de cada par. Nas espécies com $2n=24$ cromossomo

mos, verifica-se uma predominância de metacêntricos e submetacêntricos. Os pares 1, 3, 4 e 5 mostraram-se, respectivamente, metacêntrico, submetacêntrico, submetacêntrico e submetacêntrico em todas as espécies. O par 2 foi metacêntrico em Hyla geographica e em Hyla langsdorffii e submetacêntrico nas demais. O par 6 apresentou-se acrocêntrico em Hyla langsdorffii, Hyla semiguttata, Phrynohyas mesophaea e em Sphaenorhyncus planicola e submetacêntrico nas demais espécies. O par 11 foi submetacêntrico apenas em Hyla circundata, enquanto nas demais foi metacêntrico. Apenas Hyla pachychrus apresentou o par 12 submetacêntrico, que apareceu como metacêntrico nas outras espécies. Os pares 7, 8, 9 e 10 mostraram-se mais variáveis em relação à morfologia, com a ocorrência frequente de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

A presença de regiões heterocromáticas foi evidenciada em algumas espécies deste grupo: nos braços longos do par 11 de Hyla bischoffi, nos braços longos do par 7 de Hyla geographica, nos braços longos do par 8 de Hyla langsdorffii e próximo à região do centrômero, nos braços longos do par 10 de Hyla punctata. O comprimento total do genoma nestas espécies com $2n=24$ cromossomos variou entre 32,84 micra em Phrynohyas mesophaea e 71,04 micra em Hyla punctata.

Na metáfase I destas espécies com $2n=24$ cromossomos verificou-se a presença de bivalentes com formas anelares, com dois quiasmas terminais, como mostram as Pranchas I, II, VI, VII, VIII, X, XI, XII e XIII. Em alguns casos observou-se a presença de bivalentes abertos, com um único quiasma terminal.

Entre as espécies com $2n=26$, mostraram-se me

tacêntricos os pares 1, 4, 7, 11 e 13. Os pares 2, 3, 5, 6, 10 e 12 mostraram-se submetacêntricos e os pares 8 e 9, acrocêntricos em Phyllomedusa bahiana, foram submetacêntricos em Phyllomedusa hypochondrialis. Mostraram ainda uma grande diferença no comprimento total do genoma, com os valores respectivos de 148,70 micra para a primeira e 96,85 micra para a segunda.

Na metáfase I destas espécies com $2n=26$ cromossomos os bivalentes apresentaram geralmente uma forma anelar, com quiasmas terminais, como pode ser observado nas Pranchas XV e XVI.

No grupo com $2n=30$ e 32 cromossomos, apenas os pares 1, 2, 6, 10 e 11, respectivamente submetacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico, metacêntrico e metacêntrico, mostraram-se constantes em relação a sua morfologia em todas as espécies estudadas. O par 4 foi sempre metacêntrico, com exceção de Hyla decipiens, onde foi metacêntrico. O par 9 foi submetacêntrico apenas em Hyla oliveirai, sendo metacêntrico nas demais. O par 13 apresentou-se submetacêntrico em Hyla decipiens e metacêntrico nas demais e o par 15 foi acrocêntrico em Hyla leucophyllata e metacêntrico nas outras espécies. Os pares restantes 3, 5, 7 e 8 mostraram uma sequência de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos e os pares 12 e 14 mostraram apenas cromossomos metacêntricos e acrocêntricos nas espécies consideradas.

Foi impossível uma perfeita caracterização do par 16 Hyla berthaltutzae, devido ao pequeno tamanho dos cromossomos mas em células mitóticas do baço estes pareceram mostrar-se metacêntricos. O comprimento total do genoma des-

tas espécies mostrou uma variação entre 42,54 micra em Hyla leucophyllata, e 61,97 micra em Hyla oliveirai; para Hyla berthaltzae, o valor encontrado foi de 37,35 micra.

O estudo da meiose no macho de algumas destas espécies com $2n=30$ e daquela com $2n=32$ mostrou, em quase todas, os bivalentes com forma anelar, com os quiasmas terminalizados (Pranchas XVII, XVIII, XXI, XXII e XXIV). Na metáfase I de Hyla decipiens, alguns bivalentes parecem apresentar quiasmas intersticiais.

No material aqui descrito, quando da observação de células meióticas, não foi detectado comportamento diferencial dos bivalentes em relação a aspectos como condensação ou heteropicnose, que pudessem sugerir a presença de cromossomos sexuais heteromorfos. Os resultados obtidos nas espécies estudadas, são apresentados nas Pranchas I a XXIV e estão relacionados como se segue:

Tabela 2 - Distribuição do número de cromossomos (n e 2n) em 23 espécies de Anfíbios (Família Hylidae)

Espécie	Procedência	Número de cromossomos	
		2n	n(♂)
<u>A. brunoi</u>	Grumari (GB)	24	12
<u>H. bischoffi</u>	Rio dos Cedros (SC)	24	12
<u>H. circundata</u>	Botucatu (SP)	24	-
<u>H. cuspidata</u>	Grumari (GB)	24	-
<u>H. duartei</u>	Itatiaia (RJ)	24	-
<u>H. geographica</u>	Itajibá (BA)	24	12
<u>H. langsdorffii</u>	Grumari (GB)	24	12
<u>H. pachychrus</u>	Jequié (BA)	24	12
<u>H. puctata</u>	Jequié (BA)	24	-
<u>H. semiguttata</u>	Rio dos Cedros (SC)	24	12
<u>H. squalirostris</u>	Itatinga (SP)	24	12
<u>P. mesophaea</u>	Itajibá (BA)	24	12
<u>S. planicola</u>	Linhares (ES)	24	12
<u>P. bahiana</u>	Jequié (BA)	26	13
<u>P. hypochondrialis</u>	Jequié (BA)	26	13
<u>H. anceps</u>	Linhares (ES)	30	15
<u>H. bipunctata</u>	Restinga da Marambaia (GB)	30	15
<u>H. branneri</u>	Jequié (BA)	30	-
<u>H. decipiens</u>	Itaguaí (RJ)	30	15
<u>H. leucophyllata</u>	Itaguaí (RJ)	30	15
<u>H. meridiana</u>	Itaguaí (RJ)	30	15
<u>H. oliveirai</u>	Itajibá (BA)	30	-
<u>H. berthaltzae</u>	Linhares (ES)	32	16

Figura I - Mapa do Brasil assinalando a distribuição geográfica e o número diplóide das espécies coletadas.



<u>LOCAIS</u>	<u>NÚMERO DE CROMOSSOMOS</u>
1 Itajibá (BA)	24 30
2 Jequié (BA)	24 26 30
3 Linhares (ES)	24 30 32
4 Restinga da Marambaia (GB)	30
5 Grumari (GB)	24
6 Itaguaí (RJ)	30
7 Itatiaia (RJ)	24
8 Botucatu (SP)	24
9 Itatinga (SP)	24
10 Rio dos Cedros (SC)	24

Tabela 3 - Comprimento Relativo (CR) dos cromossomos nas espécies estudadas.

	Pares de cromossomos															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A. <u>brunoi</u>	17,1	12,9	11,6	10,6	10,0	7,5	6,6	5,8	5,2	5,0	4,1	3,4				
H. <u>bischoffi</u>	16,9	13,7	11,3	10,4	9,9	7,5	6,3	5,5	5,1	5,1	5,0	3,1				
H. <u>circundata</u>	14,2	12,2	11,6	11,0	9,9	8,2	7,1	7,1	6,2	5,7	4,2	3,4				
H. <u>cuspidata</u>	14,2	11,0	10,6	9,7	8,4	8,4	7,7	7,4	6,4	6,1	5,2	4,8				
H. <u>duartei</u>	17,6	12,1	10,7	10,0	8,7	7,7	7,0	5,9	5,6	5,6	5,2	4,2				
H. <u>geographica</u>	16,9	12,3	10,9	10,0	8,8	8,2	7,7	6,4	5,6	4,9	4,5	3,8				
H. <u>pachychnus</u>	15,9	12,4	11,1	9,7	8,3	7,6	7,1	6,9	6,2	5,5	4,8	3,7				
H. <u>punctata</u>	14,9	13,3	11,5	10,9	9,8	8,2	6,6	6,3	5,7	5,1	4,4	3,3				
H. <u>semiguttata</u>	18,6	12,9	11,2	10,7	9,8	8,3	6,5	5,8	5,0	4,3	3,3	2,9				
H. <u>squalirostris</u>	15,0	12,3	11,4	10,1	8,4	7,9	6,9	6,4	5,8	5,5	5,2	4,7				
P. <u>mesophaea</u>	14,5	12,4	11,3	10,7	9,2	7,9	7,5	6,6	6,0	5,6	4,7	3,6				
S. <u>planicola</u>	15,4	13,5	12,0	10,4	9,6	7,9	5,9	5,6	5,6	5,0	4,7	4,3				
P. <u>bahiana</u>	13,4	13,2	11,3	10,1	8,8	8,3	7,2	5,8	5,7	5,2	4,2	3,7	2,7			
P. <u>hypochoondrialis</u>	14,7	12,0	10,9	10,1	9,7	7,8	6,5	6,5	5,7	5,1	3,8	3,4	3,4			
H. <u>anceps</u>	12,2	9,9	9,1	8,4	7,6	6,8	6,5	6,1	5,7	5,3	4,9	4,6	4,6	4,2	3,8	
H. <u>bipunctata</u>	11,3	9,5	8,6	7,9	7,4	7,1	7,0	6,5	6,1	5,7	5,4	4,9	4,4	4,3	3,8	
H. <u>branneri</u>	10,0	9,3	8,8	7,9	7,5	7,2	7,2	6,6	6,3	5,7	5,6	5,0	4,8	4,3	3,8	
H. <u>decipiens</u>	11,6	10,1	9,8	7,5	7,1	6,8	6,4	6,4	6,0	5,6	5,3	4,9	4,5	4,1	3,8	
H. <u>leucophyllata</u>	10,9	10,4	10,2	8,7	7,6	7,0	6,5	5,9	5,7	5,4	5,0	4,6	4,3	4,1	3,5	
H. <u>meridiana</u>	9,1	8,7	8,3	7,9	7,5	7,0	7,0	6,6	6,6	6,2	5,8	5,4	5,4	4,6	3,7	
H. <u>oliveirai</u>	11,6	9,9	8,2	8,1	7,2	7,0	6,3	6,3	6,1	5,5	5,2	4,8	4,6	4,5	4,0	
H. <u>berthalutzae</u>	11,7	8,9	7,9	7,7	7,7	6,9	6,4	6,0	5,7	5,4	5,4	5,0	4,5	4,2	4,0	2,5

Tabela 4 -- Relação de Braços (RB) dos cromossomos das espécies estudadas.

	Pares de cromossomos															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<u>A. brunoi</u>	1,1	1,6	2,1	1,8	2,2	3,4	1,9	1,2	2,1	2,0	1,1	1,5				
<u>H. bischoffi</u>	1,1	1,6	2,1	2,9	2,0	2,7	1,5	1,0	1,1	1,1	1,5	1,0				
<u>H. circundata</u>	1,1	1,9	2,4	1,8	1,7	2,6	1,8	1,1	1,7	1,0	2,0	1,0				
<u>H. cuspidata</u>	1,2	1,6	1,7	2,0	2,8	1,6	1,7	1,1	1,0	1,1	1,0	1,0				
<u>H. duartei</u>	1,1	1,7	1,8	2,2	1,9	2,1	1,2	1,7	1,0	1,0	1,0	1,0				
<u>H. geographica</u>	1,1	1,3	2,0	2,3	2,9	3,2	2,7	2,7	1,7	1,0	1,2	1,0				
<u>H. langsdorffii</u>	1,2	1,2	2,0	2,4	2,0	4,2	1,3	1,7	1,1	1,1	1,2	2,2				
<u>H. pachychrus</u>	1,1	1,6	2,5	1,7	2,9	2,1	1,5	1,0	1,1	1,1	1,1	2,5				
<u>H. punctata</u>	1,2	1,6	2,1	3,2	2,1	2,1	1,7	1,2	2,1	1,8	1,1	1,1				
<u>H. semiguttata</u>	1,2	1,6	2,4	3,1	2,1	4,4	1,9	1,7	1,2	1,1	1,1	1,0				
<u>H. squalirostris</u>	1,2	1,5	2,8	2,1	2,5	2,9	1,3	1,1	1,0	1,1	1,1	1,0				
<u>P. mesophaea</u>	1,2	1,7	3,3	2,0	1,7	4,2	1,7	1,1	1,1	1,5	1,1	1,1				
<u>S. planicola</u>	1,4	1,6	1,6	1,8	2,1	4,1	1,4	1,6	1,2	1,5	1,0	1,1				
<u>P. bahiana</u>	1,4	1,9	2,6	1,4	2,5	1,8	1,2	4,9	4,1	2,5	1,0	2,3	1,2			
<u>P. hypochoondrialis</u>	1,4	1,7	2,2	1,2	2,8	1,7	1,0	2,4	2,0	1,7	1,0	1,6	1,2			
<u>H. anceps</u>	2,2	2,2	1,4	2,7	5,7	8,0	1,8	1,3	1,1	1,0	1,2	5,0	1,0	1,2	1,0	
<u>H. bipunctata</u>	2,2	2,2	1,3	2,5	1,3	8,8	1,9	1,6	1,0	1,0	1,1	1,2	1,0	1,1	1,1	
<u>H. branneri</u>	1,5	3,0	1,9	1,7	2,2	12,2	1,9	1,6	1,2	1,1	1,1	6,0	1,1	6,9	1,1	
<u>H. decipiens</u>	2,9	1,7	2,7	1,5	5,3	8,0	1,1	4,7	1,0	1,1	1,3	1,2	2,0	1,2	1,0	
<u>H. leucophyllata</u>	1,8	1,7	1,1	1,7	1,2	5,4	1,5	2,4	1,0	1,1	1,1	5,9	1,5	8,5	15,7	
<u>H. meridiana</u>	2,8	1,6	1,0	1,7	2,0	4,7	3,2	1,8	1,0	1,1	1,0	5,5	1,2	1,2	1,2	
<u>H. oliveirai</u>	2,9	1,5	12,8	2,9	1,7	10,8	9,5	1,3	2,4	1,3	1,2	1,0	1,1	1,0	1,1	
<u>H. bertnaluzae</u>	2,1	2,0	3,0	1,6	10,5	12,8	12,0	1,2	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,1	*

* não determinada

Tabela 5 - Índice Centromérico (IC) dos cromossomos nas espécies estudadas.

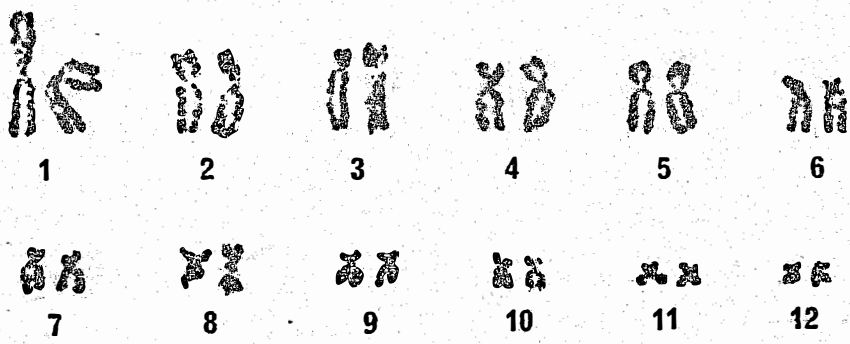
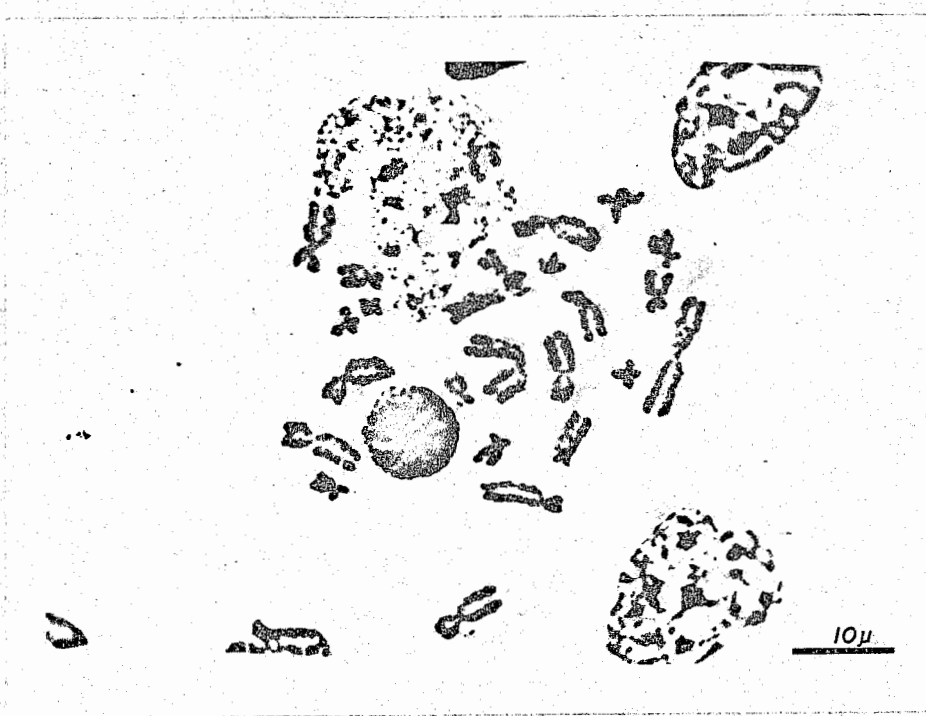
	Pares de cromossomos															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<u>A. brunoi</u>	0,48	0,38	0,29	0,33	0,29	0,23	0,35	0,42	0,33	0,35	0,48	0,40				
<u>H. bischoffi</u>	0,47	0,39	0,32	0,26	0,33	0,27	0,39	0,49	0,48	0,48	0,40	0,50				
<u>H. circundata</u>	0,48	0,35	0,29	0,36	0,34	0,28	0,36	0,48	0,36	0,50	0,33	0,50				
<u>H. cuspidata</u>	0,45	0,38	0,36	0,33	0,31	0,38	0,37	0,48	0,50	0,47	0,50	0,47				
<u>H. duartei</u>	0,47	0,38	0,36	0,32	0,36	0,32	0,45	0,47	0,50	0,50	0,50	0,50				
<u>H. geographica</u>	0,48	0,44	0,33	0,30	0,26	0,24	0,27	0,27	0,37	0,49	0,46	0,49				
<u>H. langsdorffii</u>	0,46	0,45	0,33	0,30	0,33	0,19	0,43	0,37	0,47	0,47	0,46	0,45				
<u>H. pachyurus</u>	0,47	0,39	0,29	0,36	0,26	0,33	0,40	0,49	0,49	0,48	0,48	0,29				
<u>H. punctata</u>	0,46	0,38	0,32	0,24	0,32	0,32	0,37	0,46	0,32	0,36	0,47	0,48				
<u>H. semiguttata</u>	0,46	0,38	0,30	0,25	0,32	0,19	0,34	0,37	0,46	0,48	0,49	0,50				
<u>H. squallrostris</u>	0,45	0,39	0,26	0,32	0,28	0,26	0,44	0,47	0,50	0,47	0,48	0,50				
<u>H. mesophaea</u>	0,45	0,36	0,23	0,33	0,37	0,19	0,38	0,49	0,47	0,39	0,48	0,47				
<u>S. planicola</u>	0,42	0,38	0,38	0,36	0,32	0,20	0,42	0,39	0,44	0,41	0,50	0,47				
<u>P. bahiana</u>	0,41	0,34	0,27	0,41	0,28	0,36	0,45	0,17	0,20	0,29	0,50	0,30	0,45			
<u>P. hypochondrialis</u>	0,42	0,37	0,32	0,47	0,25	0,37	0,50	0,29	0,33	0,37	0,50	0,39	0,44			
<u>H. anceps</u>	0,31	0,31	0,42	0,27	0,15	0,11	0,35	0,44	0,47	0,50	0,46	0,17	0,50	0,45	0,50	
<u>H. bipunctata</u>	0,31	0,32	0,43	0,29	0,44	0,10	0,35	0,39	0,49	0,50	0,47	0,46	0,49	0,14	0,47	
<u>H. branneri</u>	0,39	0,25	0,35	0,36	0,31	0,08	0,35	0,38	0,46	0,47	0,48	0,14	0,42	0,13	0,48	
<u>H. decipiens</u>	0,26	0,37	0,27	0,40	0,16	0,11	0,47	0,18	0,50	0,47	0,43	0,46	0,33	0,45	0,50	
<u>H. leucophyllata</u>	0,36	0,38	0,47	0,38	0,46	0,16	0,40	0,30	0,50	0,48	0,48	0,14	0,40	0,11	0,06	
<u>H. meridiana</u>	0,27	0,38	0,50	0,37	0,33	0,18	0,24	0,38	0,50	0,47	0,50	0,15	0,46	0,45	0,44	
<u>H. oliveirai</u>	0,26	0,39	0,07	0,26	0,38	0,09	0,10	0,43	0,29	0,43	0,46	0,50	0,48	0,50	0,48	
<u>H. berthaltutzae</u>	0,32	0,33	0,25	0,39	0,06	0,07	0,08	0,46	0,48	0,45	0,45	0,45	0,44	0,47	0,38	*

* não determinado

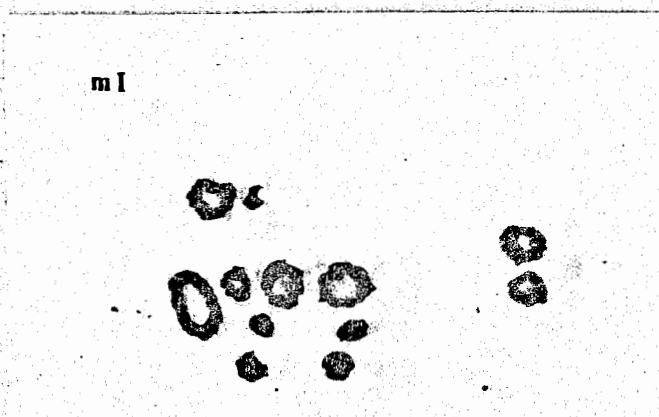
Tabela 6 - Designação e Comprimento Total (CT) do genoma das espécies de Hylideos estudadas.

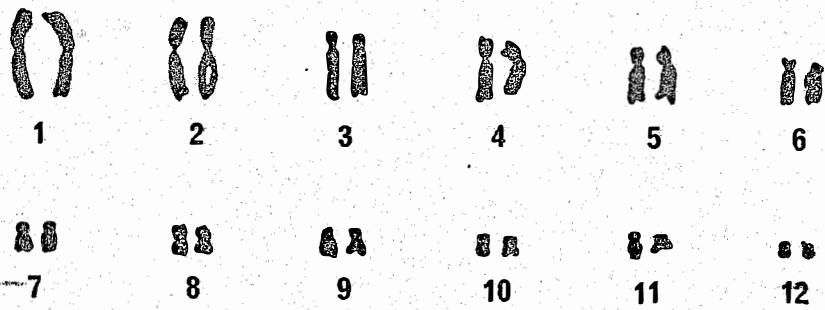
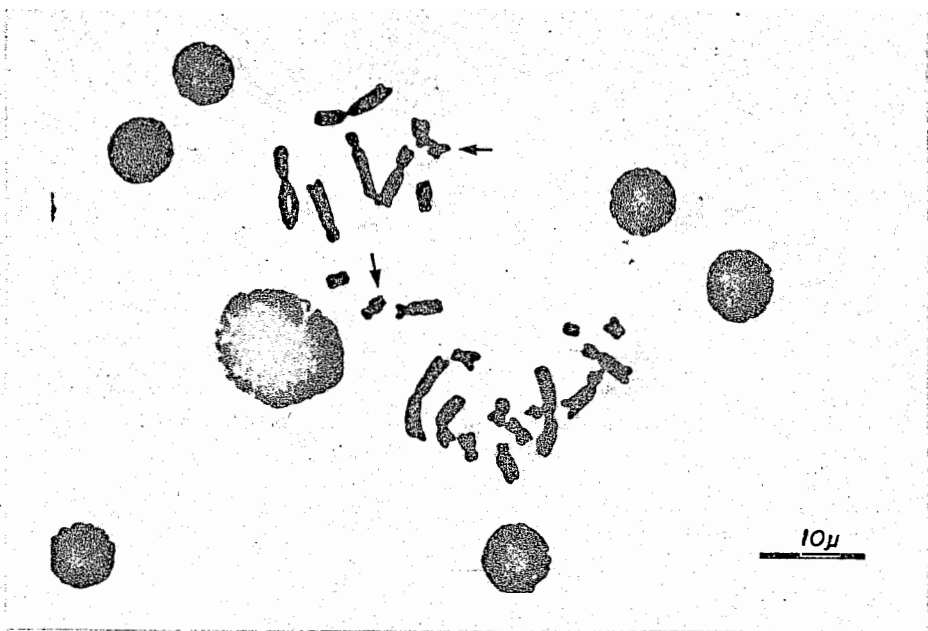
	2n	Pares de cromossomos															CT
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
<i>A. brunoi</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	63, 10
<i>H. bischoffi</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	sm	(m)	m	m	m	m	55, 07
<i>H. circumdata</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	sm	m	sm	m	sm	m	m	m	m	56, 37
<i>H. cuspidata</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	57, 41
<i>H. duartei</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	53, 17
<i>H. geographica</i>	24	m	m	sm	sm	sm	sm	(sm)	sm	sm	m	m	m	m	m	m	56, 54
<i>H. langsdorffii</i>	24	m	m	sm	sm	sm	sm	(sm)	m	m	m	m	m	m	m	m	48, 71
<i>H. pachyurus</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	52, 36
<i>H. punctata</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	sm	(sm)	m	m	m	m	m	71, 04
<i>H. semiguttata</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	63, 66
<i>H. squalirostris</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	57, 20
<i>P. mesopnaea</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	sm	m	m	m	m	m	32, 84
<i>S. planicola</i>	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	59, 57
<i>P. bahiana</i>	26	m	sm	sm	m	sm	m	m	a	a	sm	m	sm	m	m	m	148, 70
<i>P. hypochochondrialis</i>	26	m	sm	sm	m	sm	m	m	sm	sm	sm	m	sm	m	m	m	96, 85
<i>H. anceps</i>	30	sm	sm	m	sm	a	sm	sm	m	m	m	m	a	m	m	m	48, 70
<i>H. bipunctata</i>	30	sm	sm	m	sm	a	sm	sm	m	m	m	m	m	a	m	m	51, 49
<i>H. branneri</i>	30	sm	sm	sm	sm	a	sm	sm	m	m	m	m	a	a	m	m	51, 72
<i>H. decipiens</i>	30	sm	sm	sm	m	a	m	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	49, 26
<i>H. leucophyllata</i>	30	sm	sm	m	sm	a	m	sm	m	m	m	m	a	a	m	a	42, 54
<i>H. meridiana</i>	30	sm	sm	m	sm	a	sm	sm	m	m	m	m	a	m	m	m	44, 63
<i>H. oliveirai</i>	30	sm	sm	a	sm	a	a	sm	m	sm	m	m	m	m	m	m	61, 97
<i>H. berthelutzae</i>	32	sm	sm	sm	sm	a	a	a	m	m	m	m	m	m	m	m	37, 35

() cromossomos com regiões heterocromáticas * possivelmente metacêntrico



Prancha I - Aparasphenodon brunoi, metáfase mitótica, cariótipo e metáfase I.





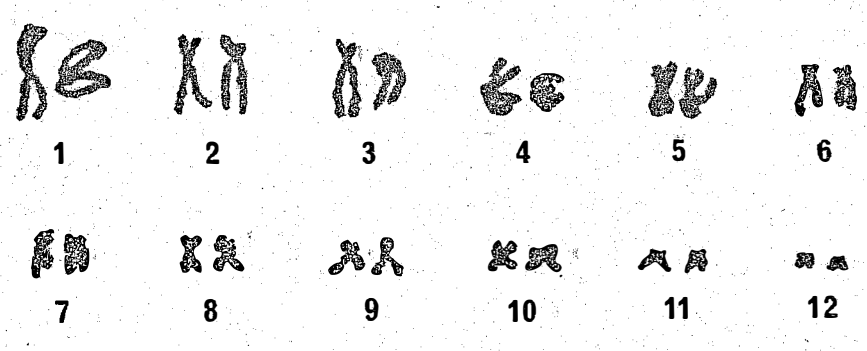
Prancha II - Hyla bischoffi, metáfase mitótica, cariótipo e me
táfases I e II.

m I

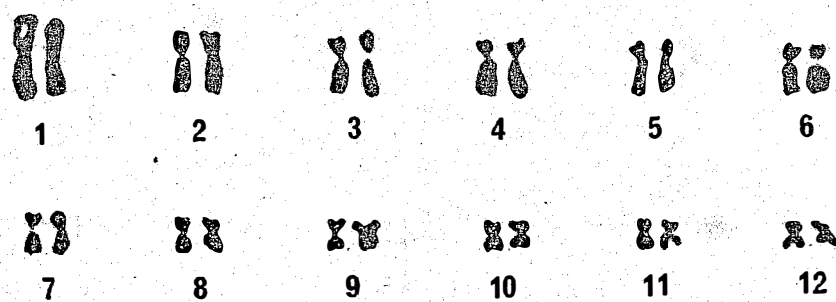
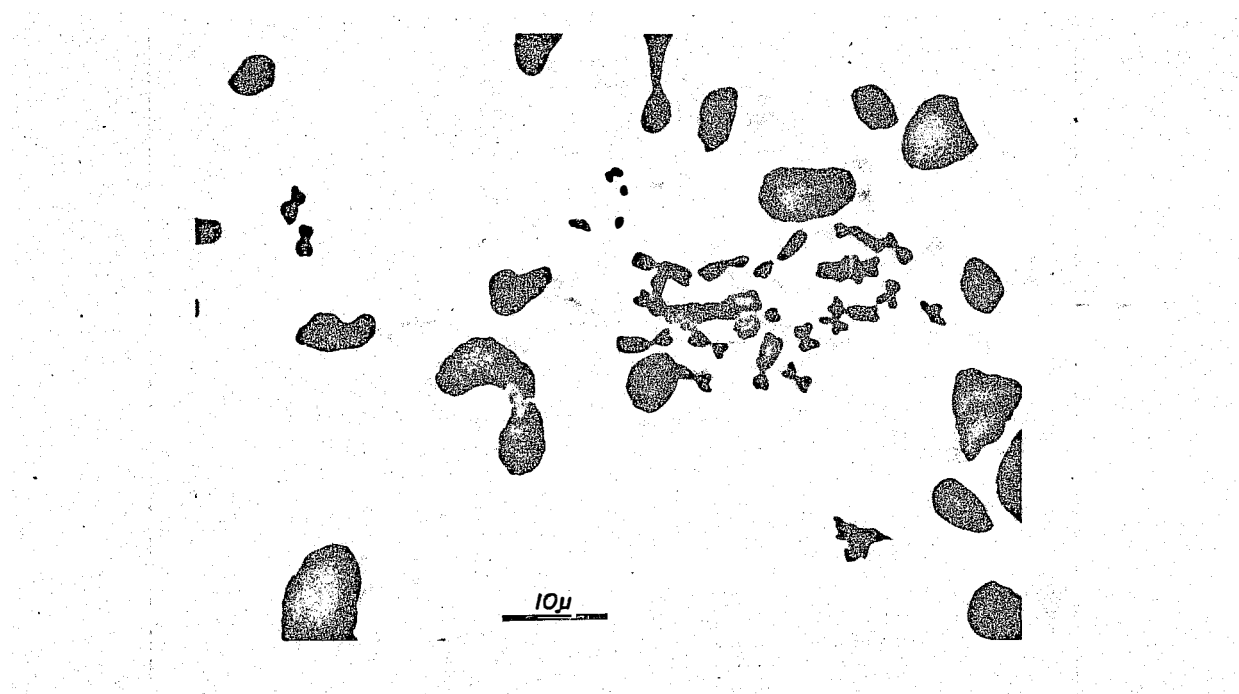


m II

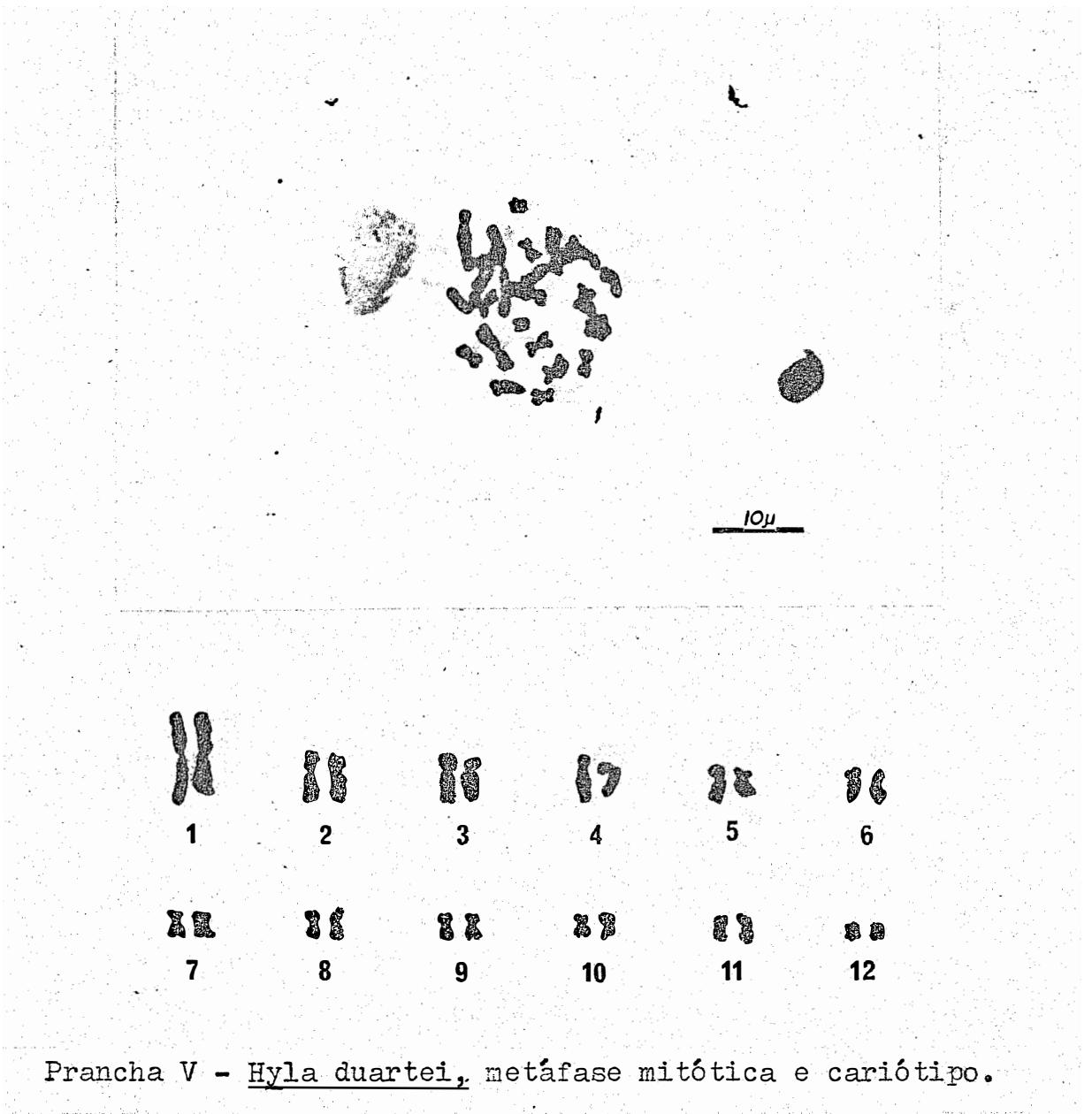


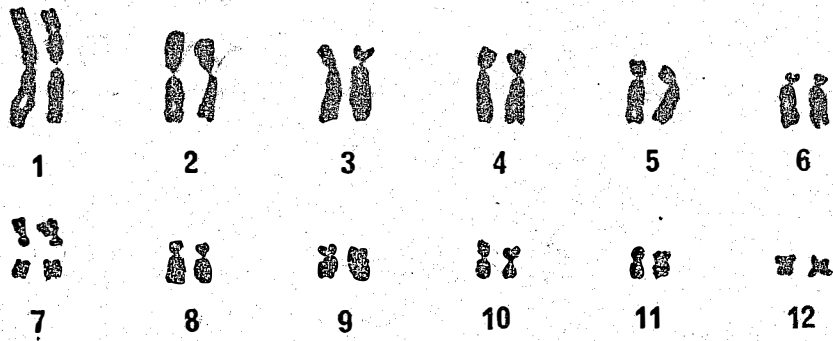


Prancha III - Hyla circumdata, metáfase mitótica e cariótipo.

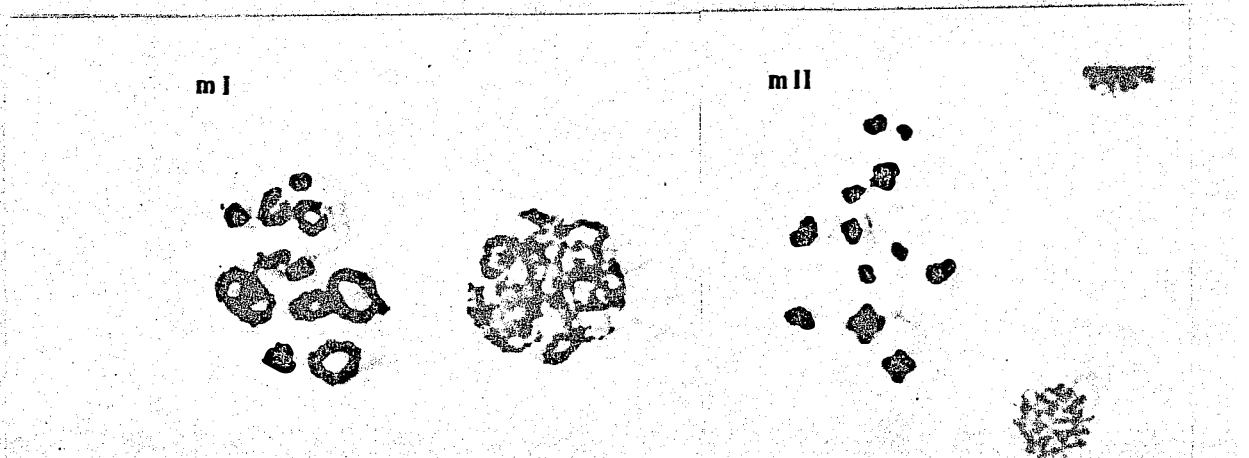


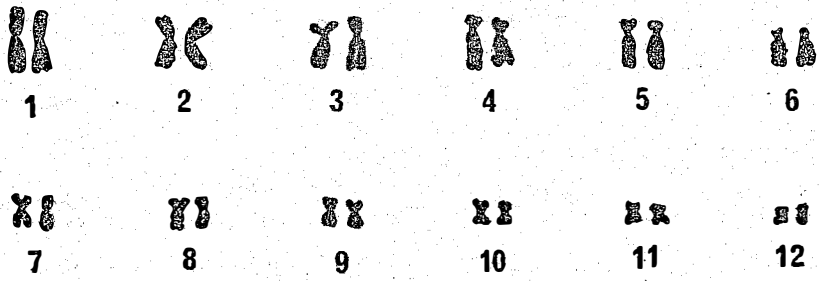
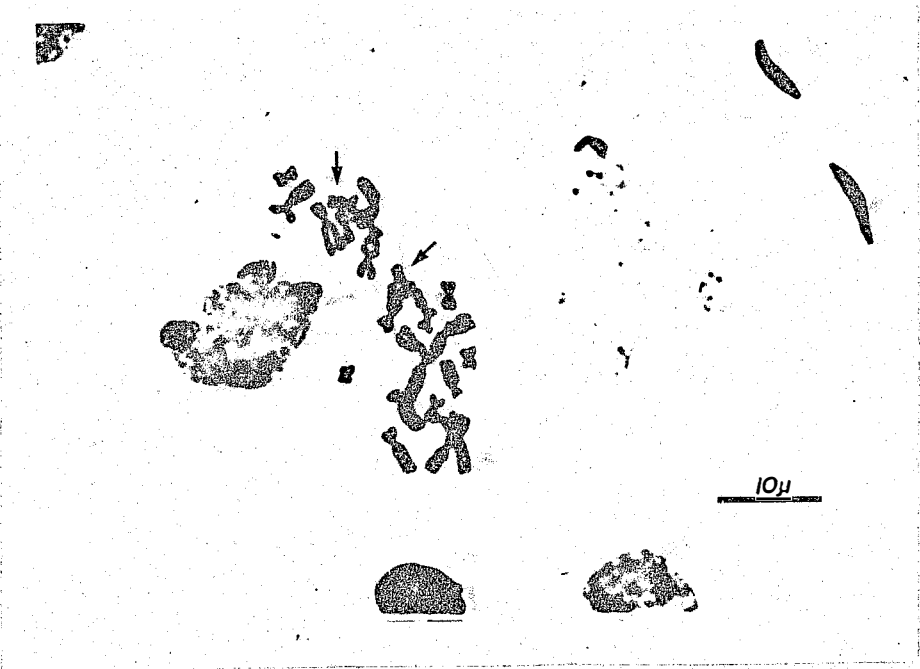
Prancha IV - Hyla cuspidata, metáfase mitótica e cariótipo.



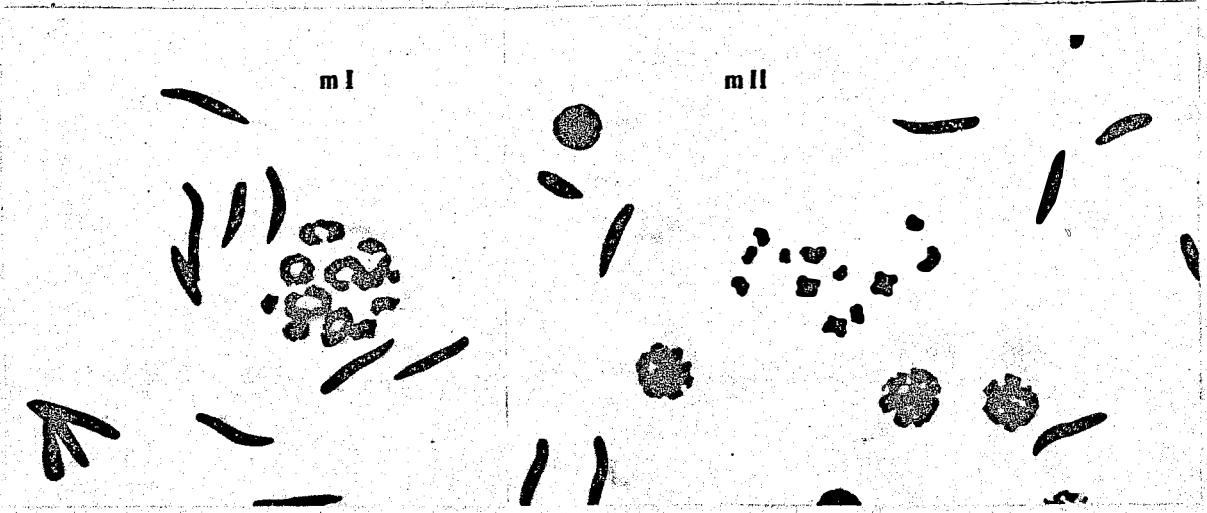


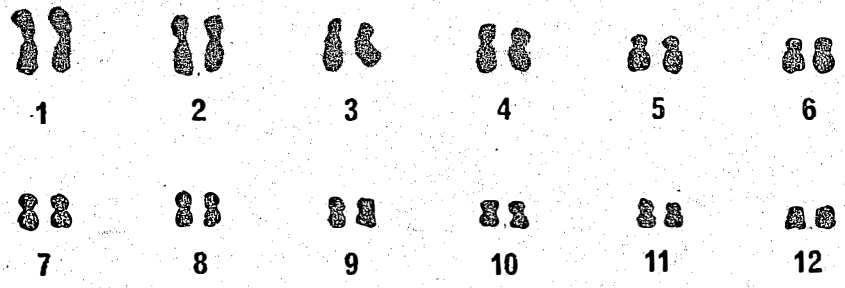
Prancha VI - Hyla geographica, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.





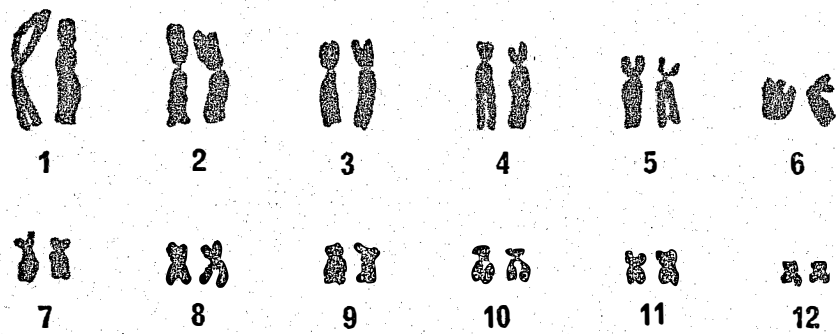
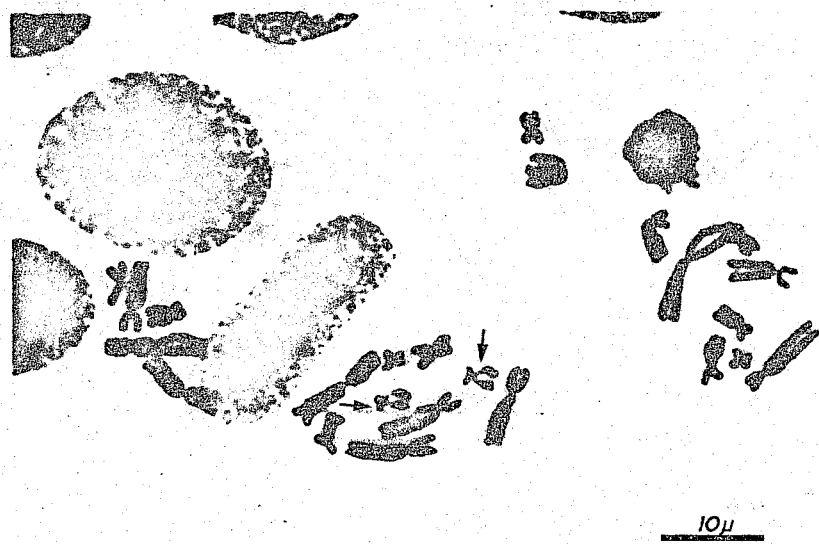
Prancha VII - Hyla langsdorffii, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.



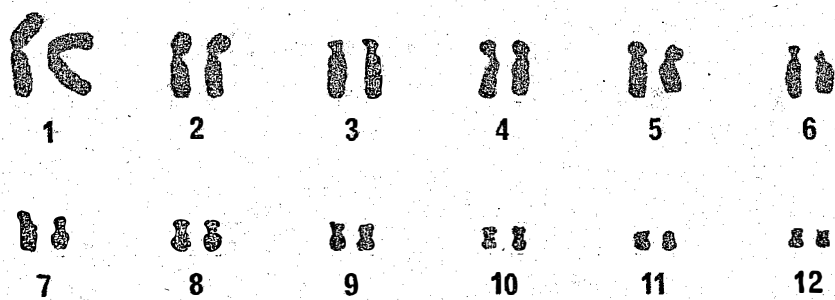


Prancha VIII - Hyla pachychrus, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.

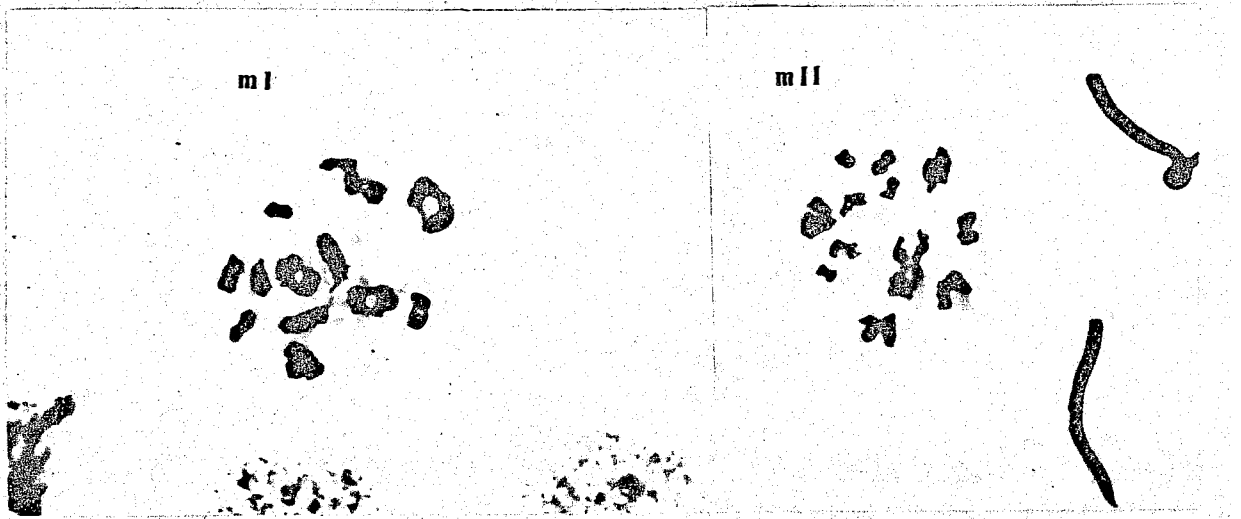


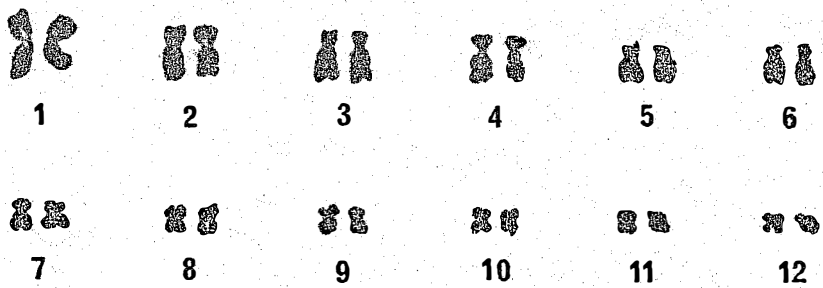
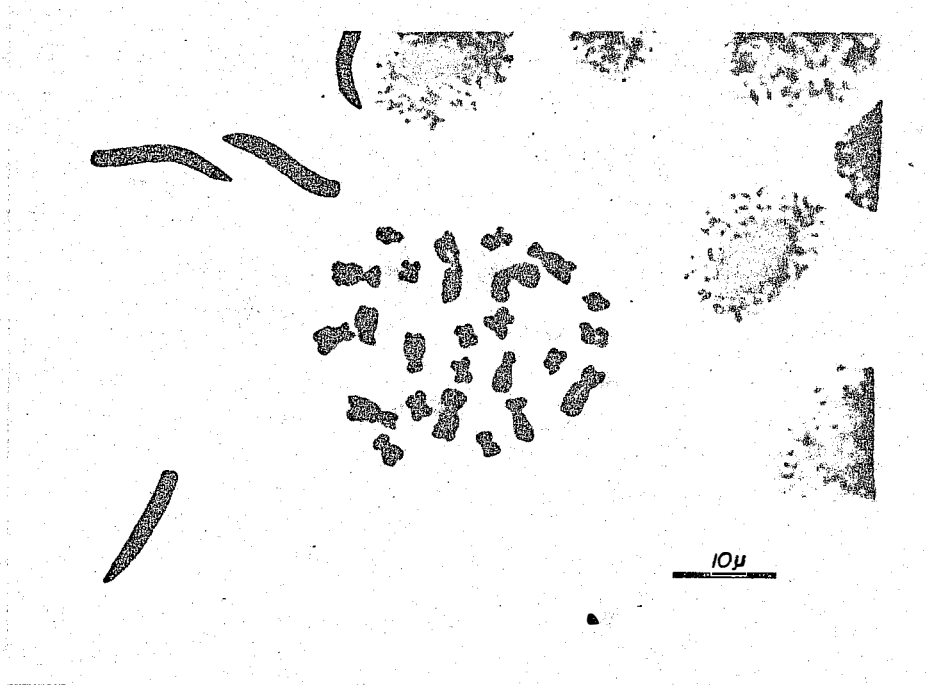


Prancha IX - Hyla punctata, metáfase mitótica e cariótipo.

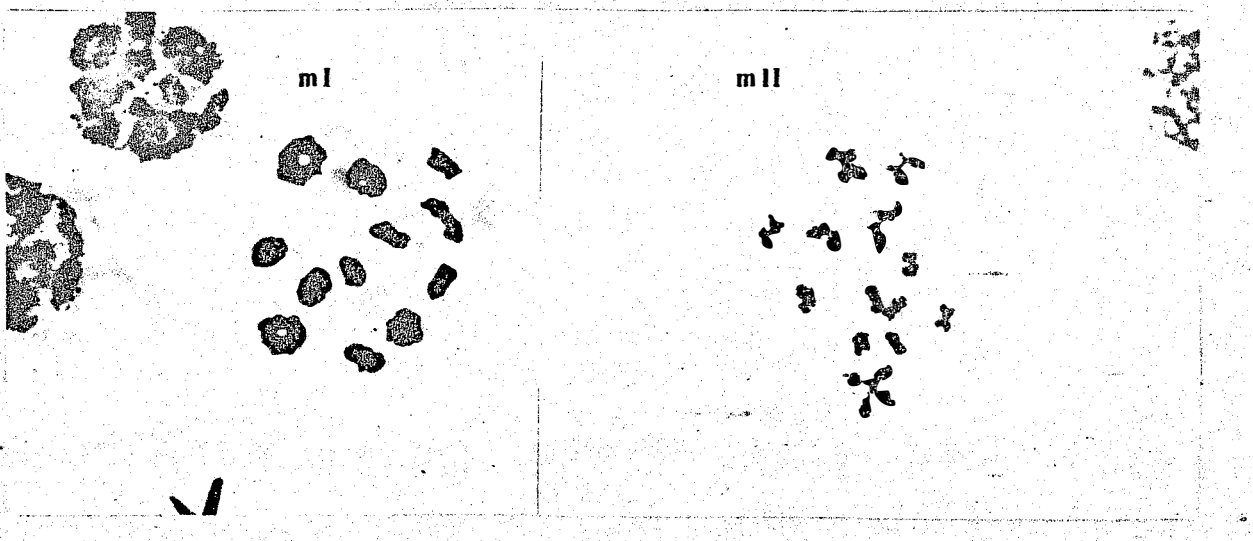


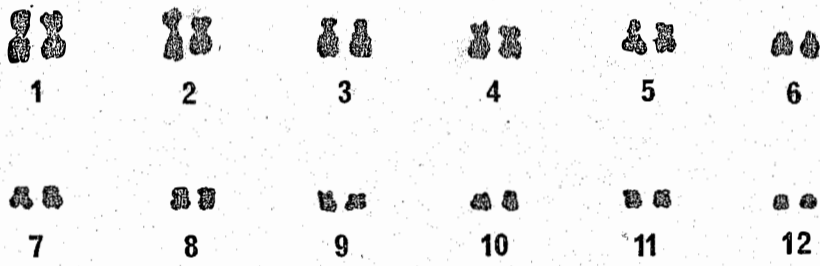
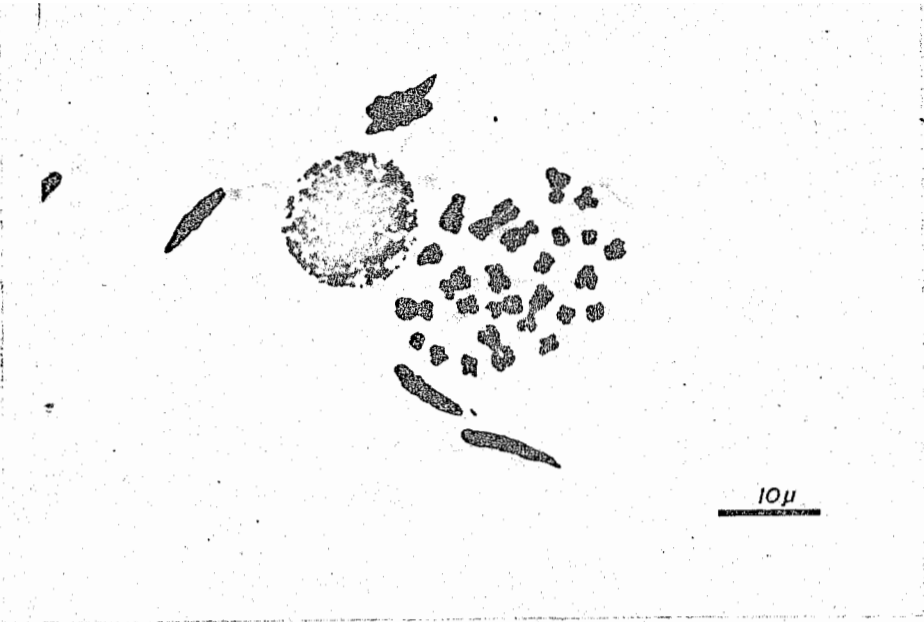
Prancha X - Hyla semiguttata, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.



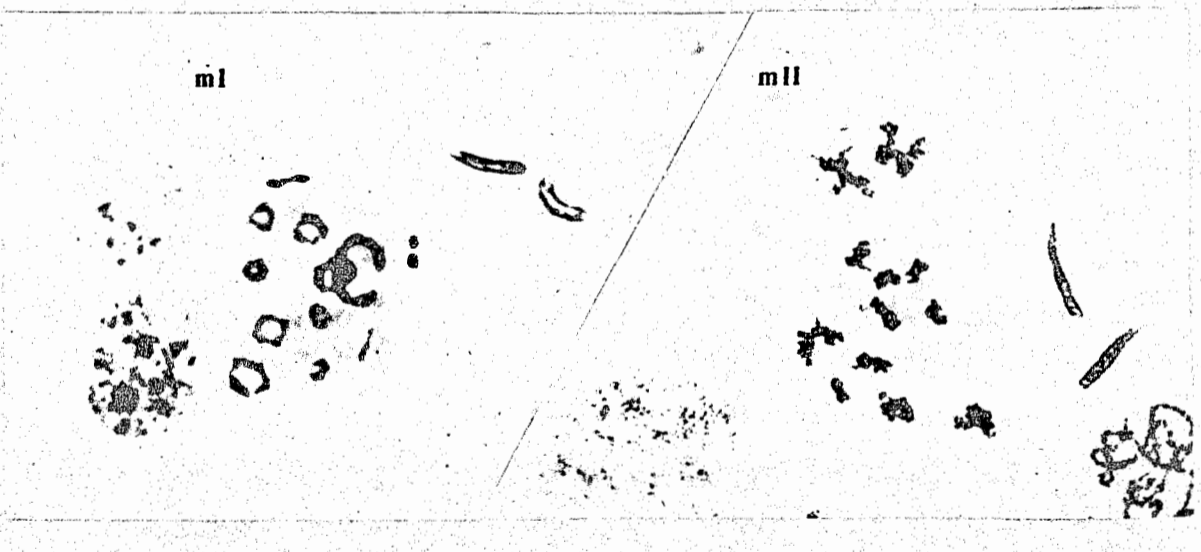


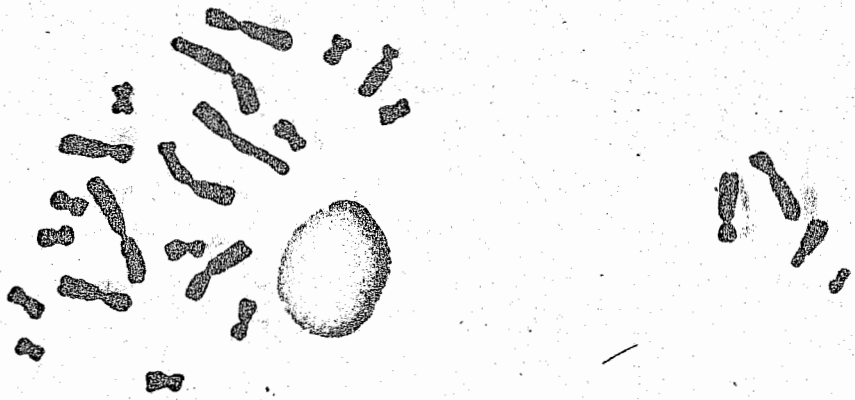
Prancha XI - *Hyla squalirostris*, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.



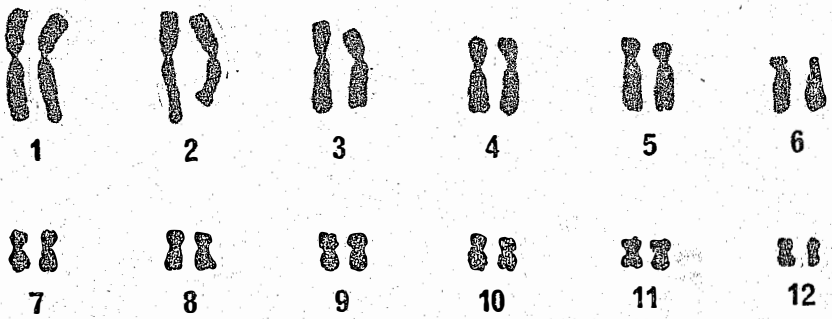


Prancha XII - Phrynohyas mesophaea, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.

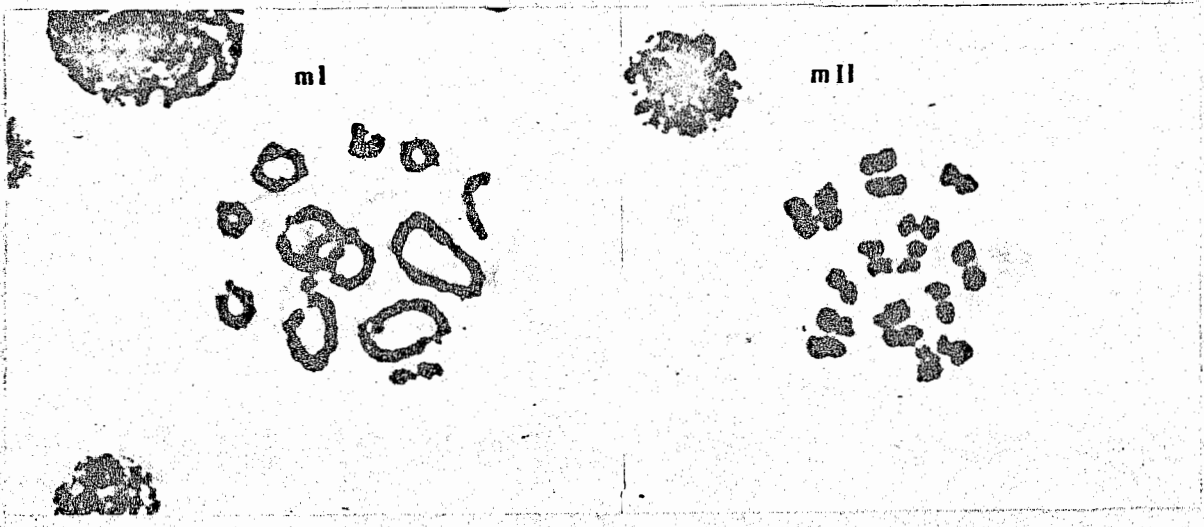


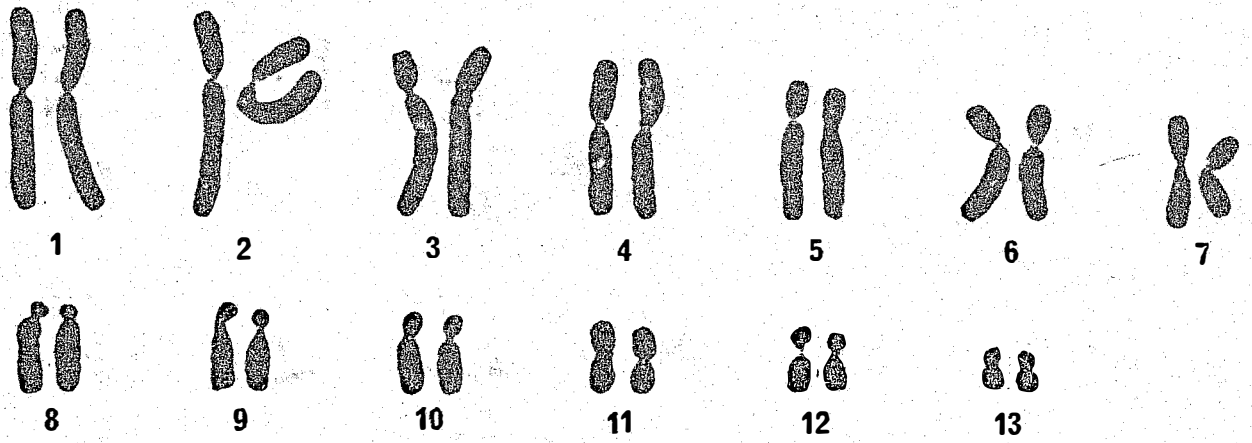


10μ



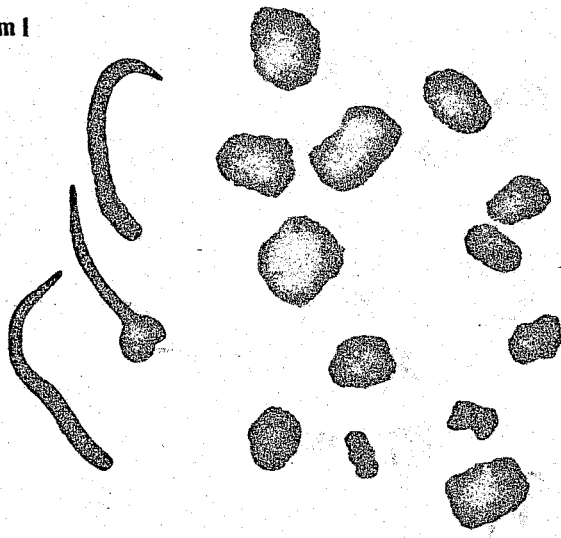
Prancha XIII - Sphaenorhyncus planicola, metáfase mitótica, ca
riótipo e metáfases I e II.





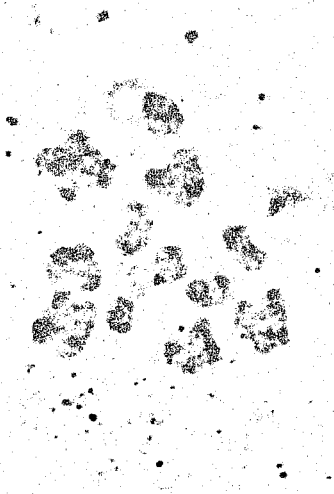
Prancha XIV - Phyllomedusa bahiana, metáfase mitótica e carió-tipo.

m I

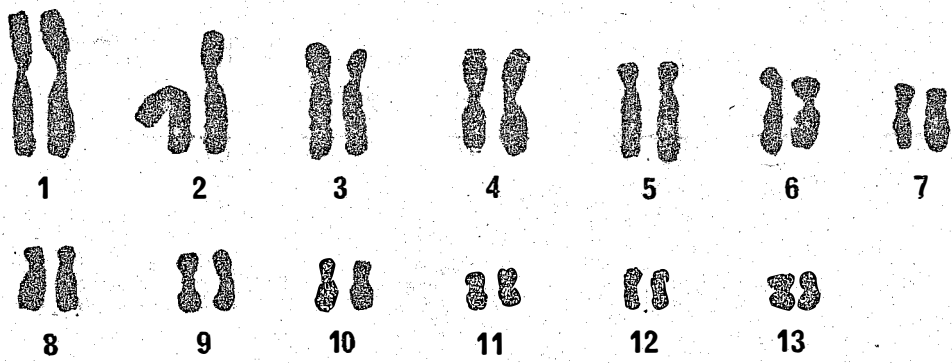
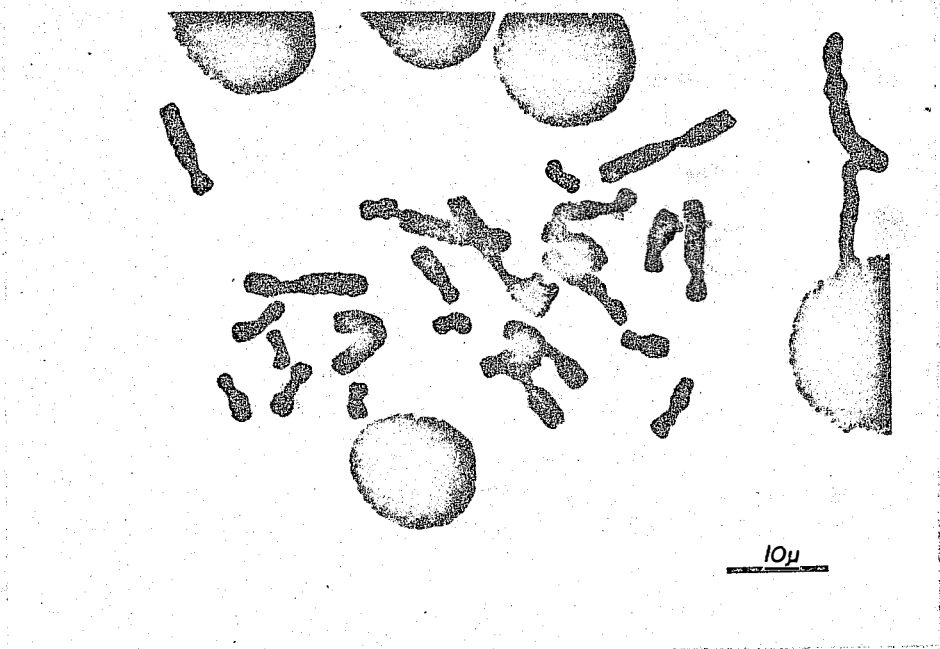


10μ

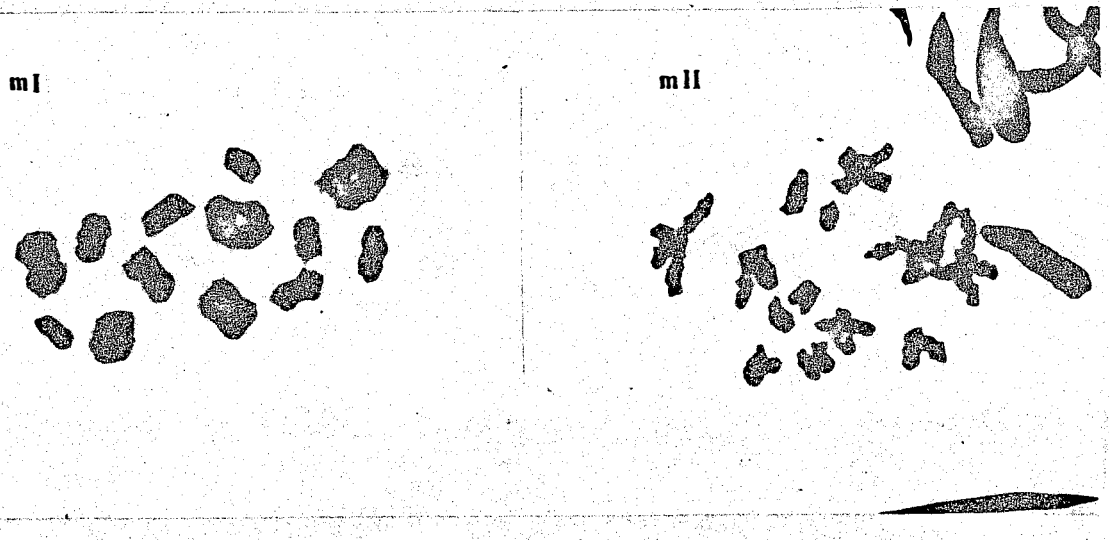
m II

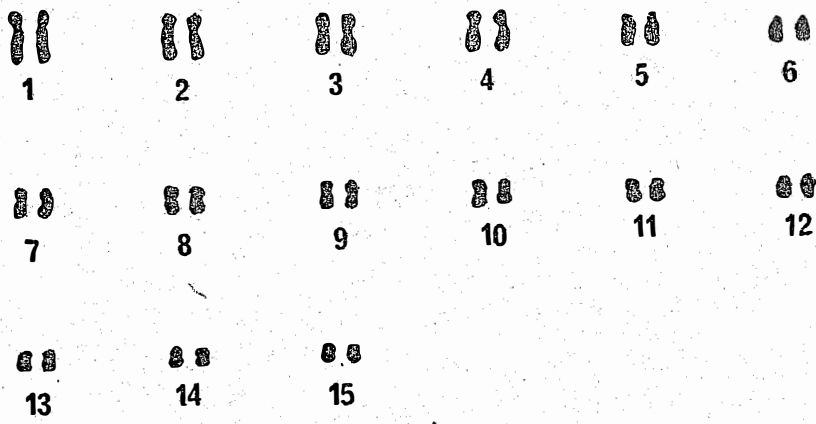
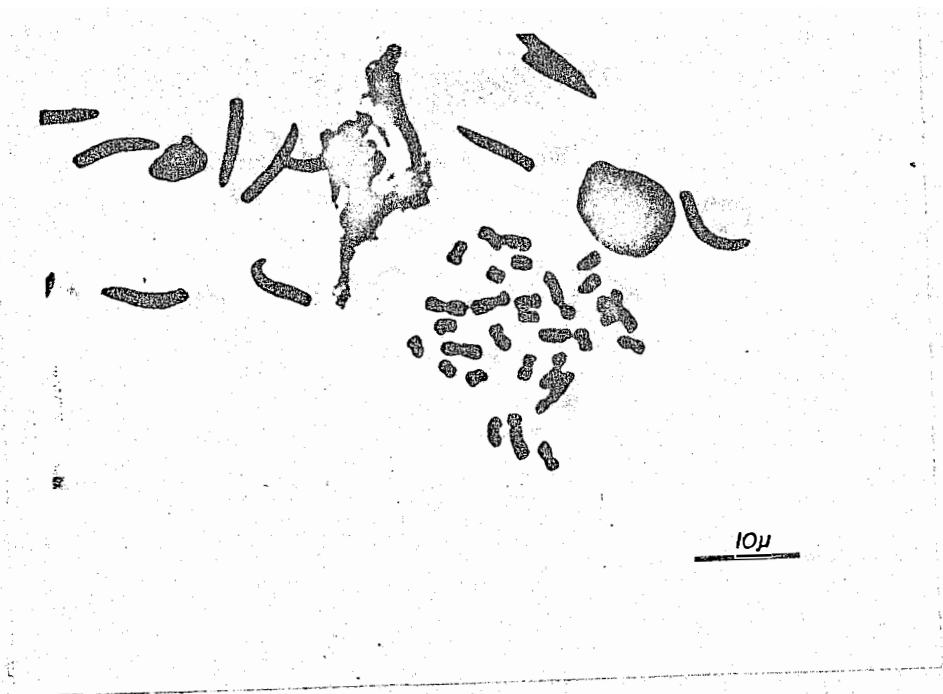


Prancha XV - Phyllomedusa bahiana, metáfases I e II.



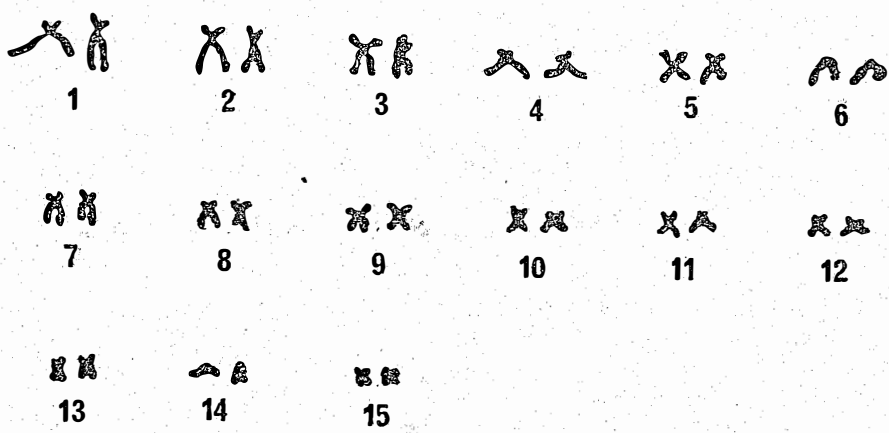
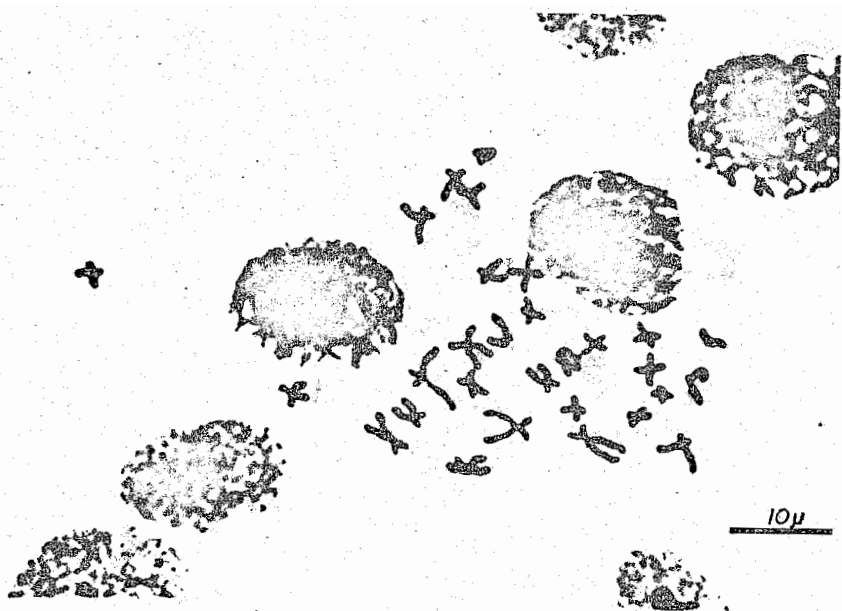
Prancha XVI - Phyllomedusa hipochondrialis, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.



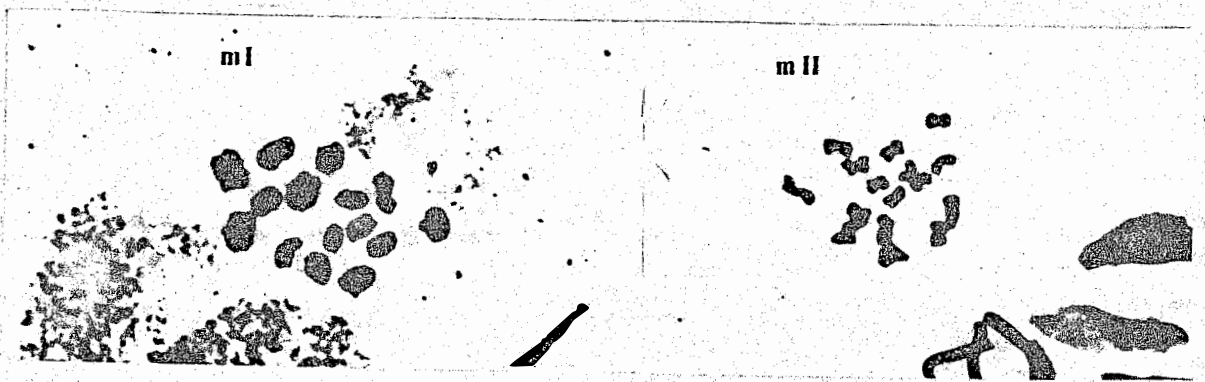


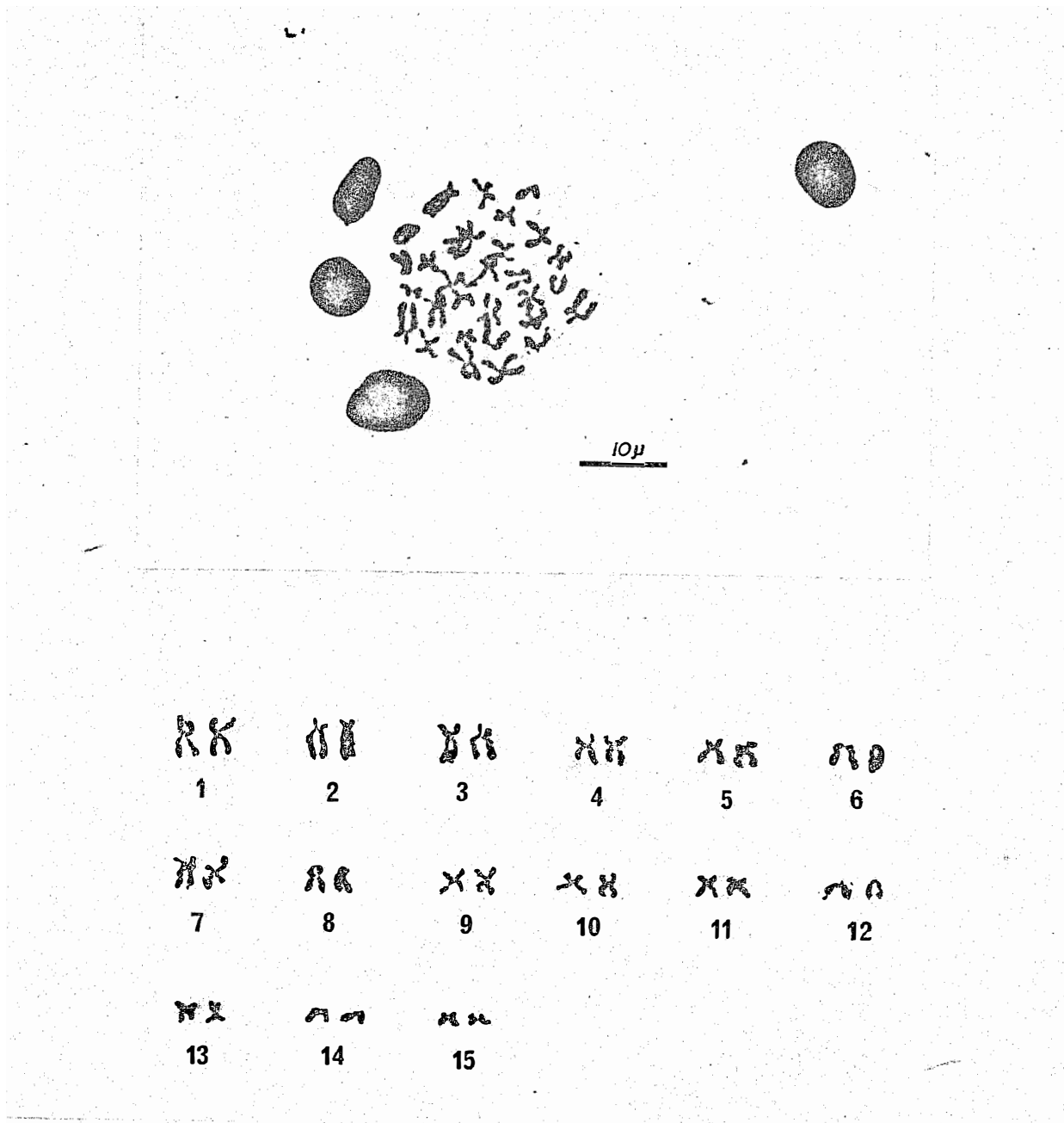
Prancha XVII - Hyla anceps, metáfase mitótica, cariótipo e me-
táfases I e II.



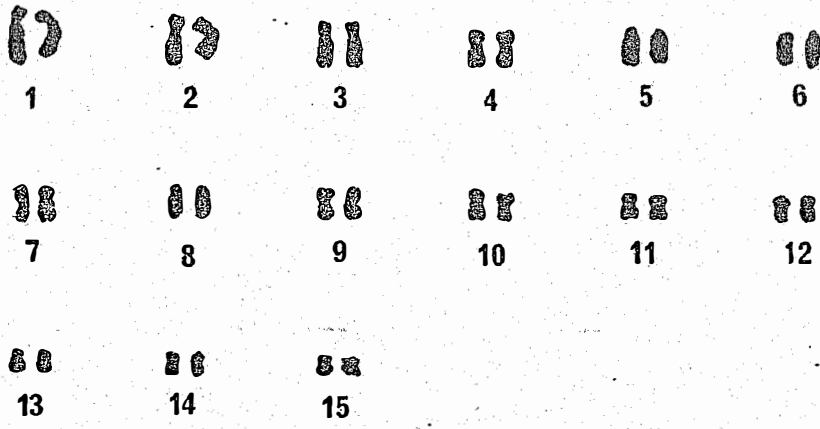
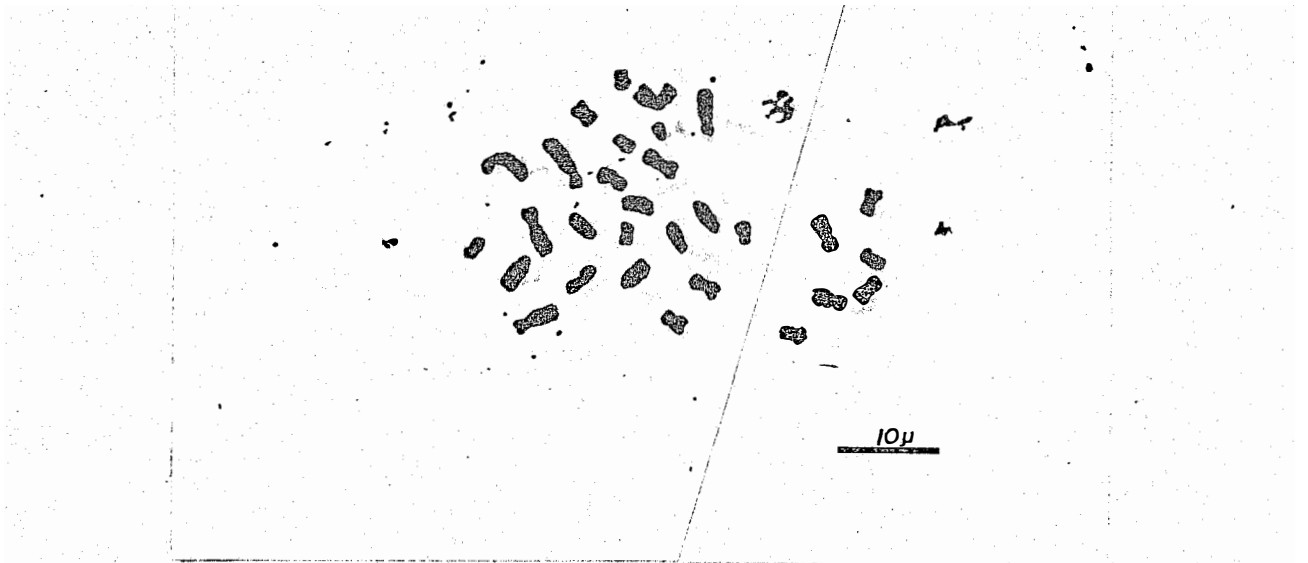


Prancha XVIII - Hyla bipunctata, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.

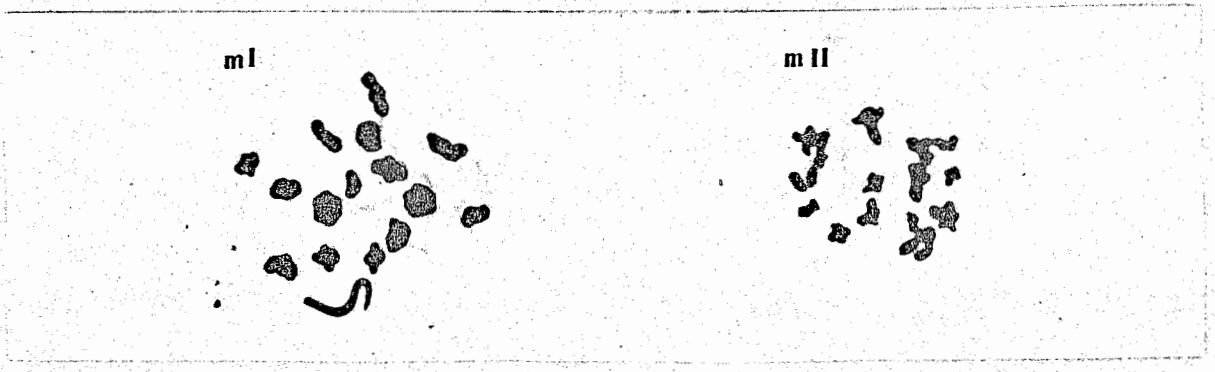


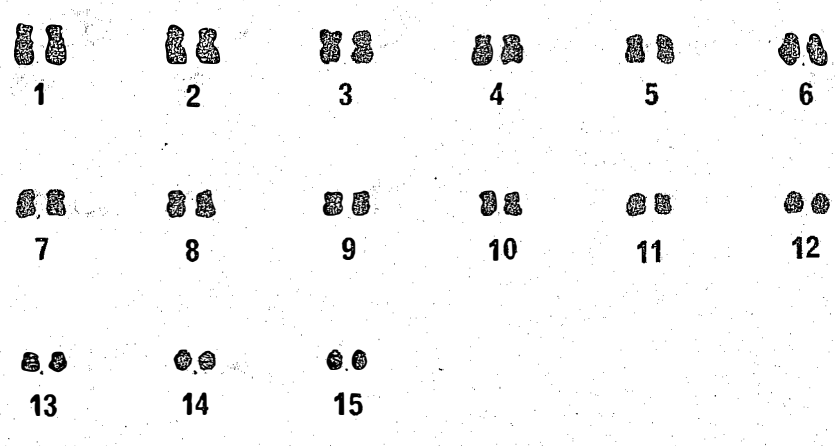
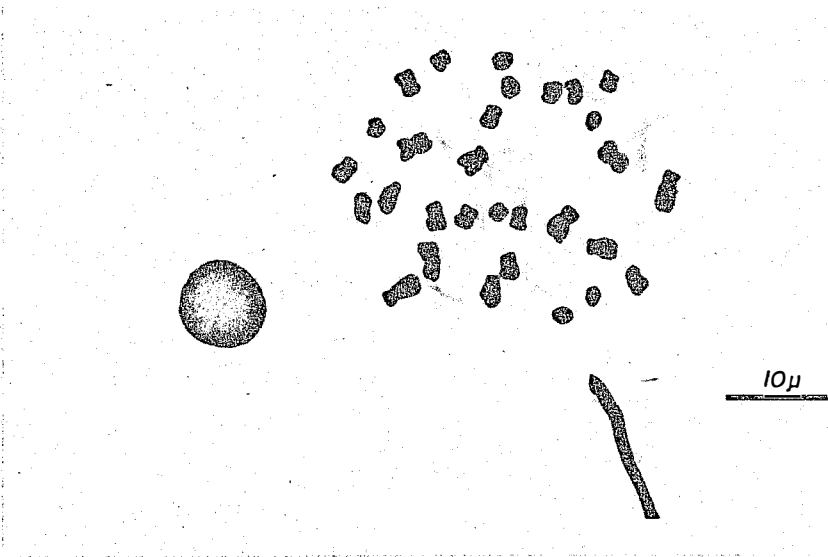


Prancha XIX - Hyla branneri, metáfase mitótica e cariótipo.

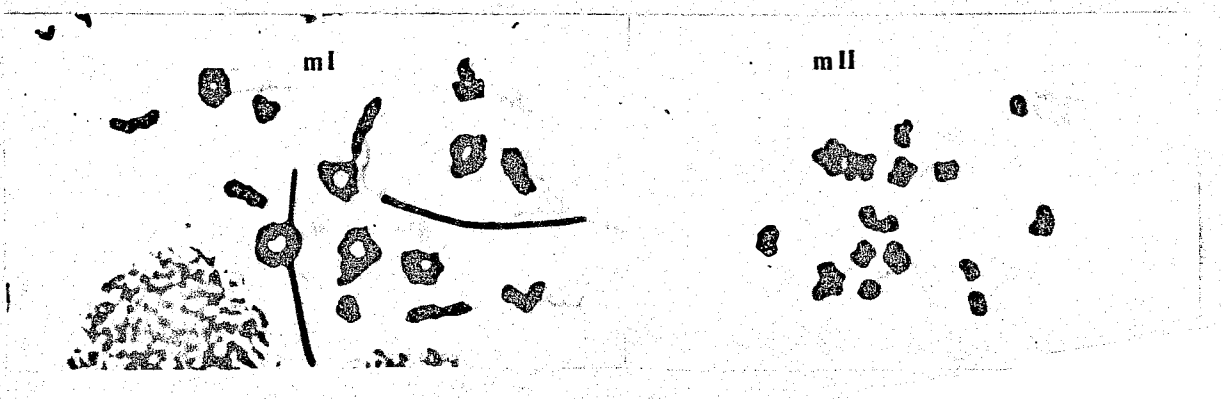


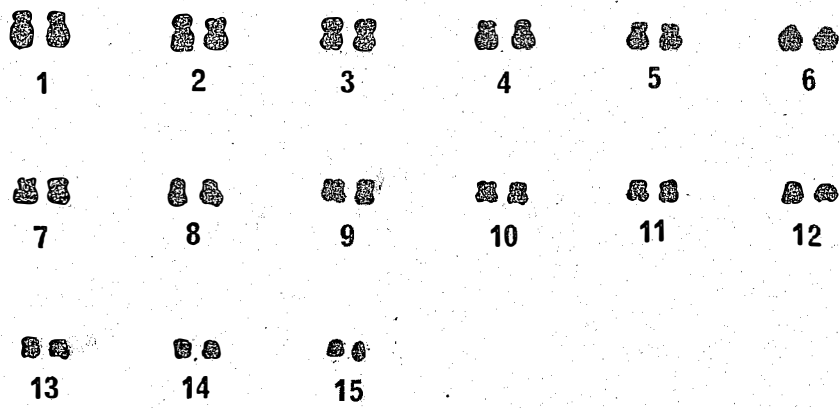
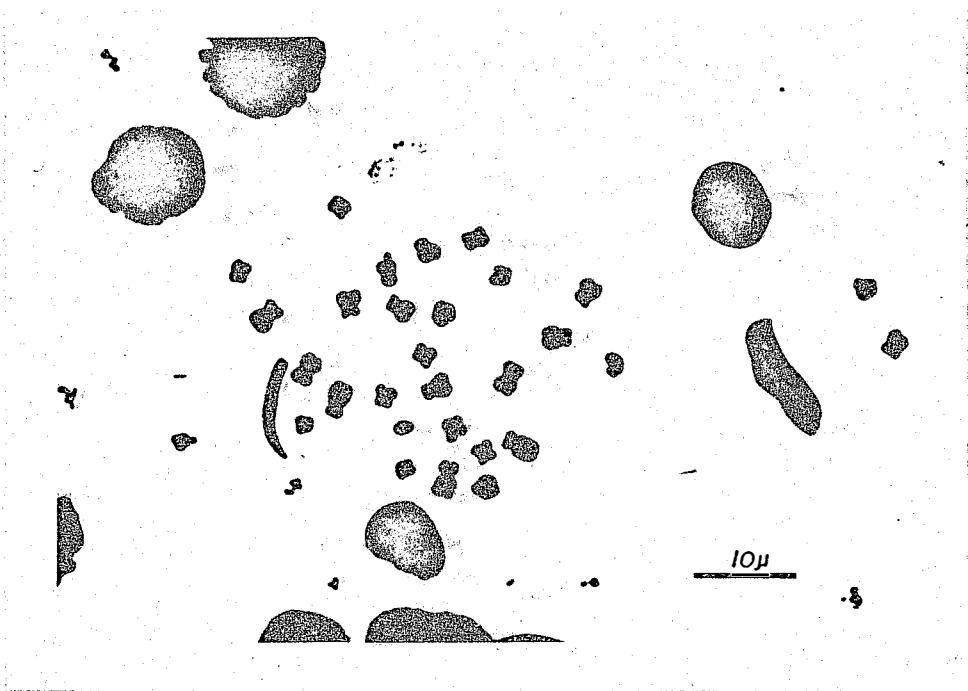
Prancha XX - Hyla decipiens, metáfase mitótica, cariótipo e me
táfases I e II.



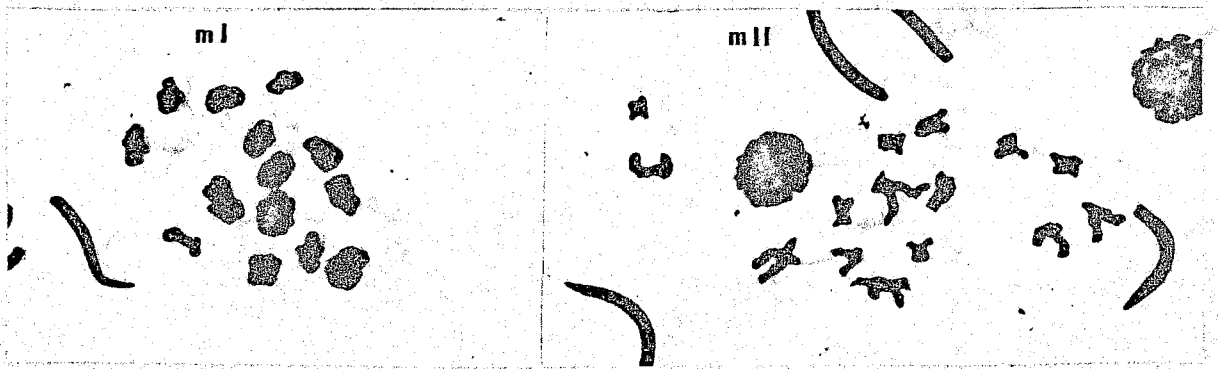


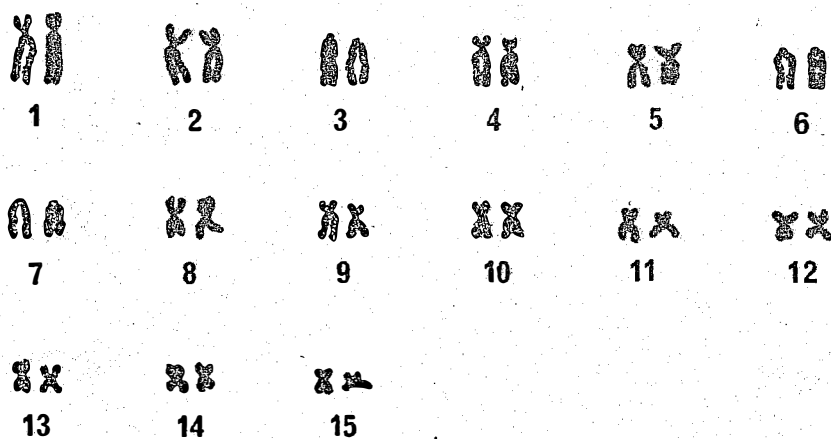
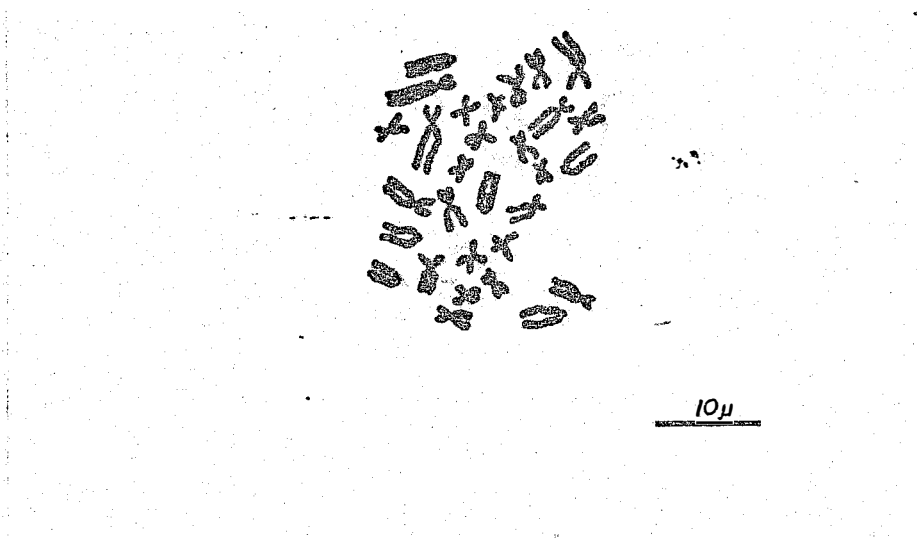
Prancha XXI - Hyla leucophyllata, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.





Prancha XXII - *Hyla meridiana*, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.

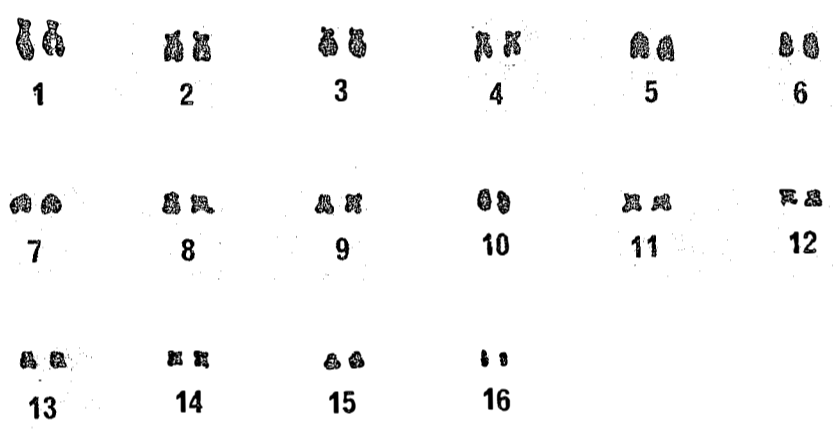




Prancha XXIII - Hyla oliveirai, metáfase mitótica e cariótipo.



10μ



Prancha XXIV - Hyla bertalutzae, metáfase mitótica, cariótipo e metáfases I e II.

m I



m II



5. DISCUSSÃO

A ocorrência de uma grande variabilidade no número e forma dos cromossomos entre os vertebrados inferiores, incluindo os Anura, determinada principalmente por rearranjos cromossômicos e por aumento ou diminuição do material genético, não parece constituir-se em fator negativo ou deletéreo para o grupo, como vem a ser para organismos onde o material genético e os mecanismos de regulação da atividade gênica já alcançaram alto grau de especialização. Pelo contrário, tais fatores proporcionam diferentes oportunidades para a especialização desses grupos, a partir de reorganização interna do material já existente ou pelo aumento do potencial de adaptação, com o aparecimento e fixação de novo material genético.

Dois fatores principais são apontados por BEČAK, ML e col. (1970) como envolvidos na diferenciação cariotípica entre os Anura: 1) rearranjos estruturais, modificando a morfologia e número dos cromossomos ou apenas a morfologia e 2) alterações do número dos cromossomos através da poliploidia, seguida algumas vezes por rearranjos estruturais. Neste ítem poder-se-ia relacionar o aumento do DNA por duplicações regionais de segmentos cromossômicos, por duplicação de todo o genoma ou por replicação longitudinal do número de cromonemas (nesse caso haveria um aumento do material genético sem grande mudança no aspecto do cariótipo). Este tipo de fenômeno, denominado polinemia, não foi evidenciado por ULLERICH (1970) quando estudou os cromossomos de algumas espécies de Anura, utilizando microscopia eletrônica. Mas, algumas evidências parecem indicar a ocorrência de fenômeno semelhante

uma das espécies descritas no presente trabalho, Phyllomedusa bahiana, e que será posteriormente analisada.

Entre os Anuros da família Hylidae por nós estudada ocorre uma grande diversificação no número e forma dos cromossomos, como mostram os dados de DUELLMAN e COLE (1965), DUELLMAN (1967), BEÇAK, M. L. (1967, 1968) e RABELLO (1970). Este último trabalho relaciona o número de cromossomos de uma grande parte dos anfíbios já descritos. Mais recentemente, BEÇAK, ML e col (1970) e WASSERMAN (1970) descreveram casos de poliploidia natural nesta família.

5.1. Número e morfologia dos cromossomos

No presente trabalho são apresentados e discutidos os cariótipos de espécies com número diplóide igual a 24, 26, 30 e possivelmente com 32 cromossomos, o mais alto valor encontrado para espécies pertencentes à família Hylidae até o presente. Relacionam-se desse modo, três cariótipos básicos e já descritos morfologicamente, compreendendo vinte e duas das espécies estudadas e um cariótipo inédito. Pequenas variações entre os cariótipos agrupados com o mesmo número de cromossomos serão discutidos com detalhes nas considerações que se seguem.

Os primeiros autores a descreverem os aspectos cromossômicos desta família foram IRIKI (1930) e GALGANO (1933), apresentando espécies com um número diplóide de cromossomos igual a 24, que parece constituir-se no número modal para o grupo e BUSHNELL (1939) descrevendo espécies com 22 e espécies com 24 cromossomos. Numa segunda fase das pesquisas

em citogenética de vertebrados, utilizando técnicas de pré-colchinação e tratamento hipotônico, DUELLMAN e COLE (1965) encontraram uma variação de 11, 12, 13 e 15 no número de bivalentes das células germinativas dos machos em um estudo envolvendo 29 espécies pertencentes a esta família. DUELLMAN (1967) descreveu o número de cromossomos de 15 espécies de Hylideos, ampliando a variação numérica para 11, 12, 13, 14 e 15 bivalentes nas células germinativas. Em estudos realizados com espécies sulamericanas, BEÇAK, M.L. (1967, 1968) demonstrou a mesma variação no número diplóide deste grupo, ao descrever espécies apresentando cariótipo com 22, 24, 26 e 30 cromossomos. Estas variações, ocorridas na maioria dos grupos de organismos, têm sido explicadas como sendo devidas principalmente ao mecanismo das fusões cêntricas, descrito por ROBERTSON (1916) e indicam, no curso da evolução, uma certa relação entre a diminuição do número de cromossomos do genoma e a diminuição do número de acrocêntricos (WICKBOM 1945, 1949; MATTHEY, 1949, 1951; WHITE, 1954). Entre os Hylideos, esse mecanismo foi evidenciado por BEÇAK, M.L. (1967, 1968) e por RABELLO (1970), que apontam também outros mecanismos menos frequentes, mas que podem levar aos mesmos resultados. Variações mais bruscas no número de cromossomos, encontradas em espécies com um número diplóide igual a 48 (WASSERMAN, 1970) e de 52 (BEÇAK, M.L. e col., 1970), foram explicadas como uma poliploidização do genoma.

Os resultados apresentados no presente trabalho, no que se refere à forma e ao número dos cromossomos das espécies estudadas, pertencentes à família Hylidae, mostram-se de acordo com aqueles já descritos por diferentes au-

tores para outros membros deste grupo e sumarizados por RABELLO (1970), com exceção de Hyla berthalutzae.

5.1.1. Espécies com número diplóide igual a 24

Nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 estão sumarizados os dados cariotípicos das espécies componentes dos gêneros Aparasphenodon, Hyla, Phrynohyas e Sphaenorhyncus, com um número diplóide de 24 cromossomos e apresentados nas Pranchas de número I a XIII. A característica geral das espécies que apresentam esse número diplóide é a presença de seis pares maiores e de seis pares relativamente menores, evidenciando a separação em dois grupos bem distintos de cromossomos. No presente caso, os pares 1, 2, 3, 4 e 5 mostraram-se semelhantes para todas as espécies, ocorrendo apenas pequenas variações na relação de braços (RB), mas sem chegar a modificar sua designação. As exceções são Hyla geographica e Hyla langsdorffii, que têm seu par 2 metacêntrico e não submetacêntrico como as demais espécies. Em relação ao par 6, que na maioria das espécies mostrou-se submetacêntrico, em Hyla langsdorffii, Hyla semiguttata, Phrynohyas mesophaea e Sphaenorhyncus planicola caracterizou-se como acrocêntrico. Os pares de 7 a 12, bem menores que os anteriores, aparecem como uma sequência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e em Hyla duartei e Hyla squalirostris, esses pares menores mostraram-se todos metacêntricos.

Para BEÇAK, M.L. (1968), a presença de acrocêntricos mesmo entre espécies com baixo número de cromossomos, pode ser devida a um mascaramento do fenômeno das fusões

cêntricas por modificações posteriores como inversões pericêntricas ou outros tipos de translocações, anulando assim o mecanismo de fusão cêntrica.

Na metáfase I, essas espécies com número diplóide de 24 cromossomos comumente apresentaram todos os bivalentes em forma anelar e esse comportamento é caracterizado por MORESCALCHI (1968) como de ocorrência geral entre os anuros mais evoluídos.

Foi constatada a ocorrência de constricções secundárias, todas nos braços longos dos cromossomos: Hyla geographyca apresentou satélites bem evidentes no par 7; Hyla langsdorffii mostrou satélites no par 8 e Hyla punctata mostrou constricção secundária próxima ao centrômero do par 10. São poucas as informações disponíveis a respeito da ocorrência de regiões heterocromáticas associadas aos cromossomos dos Hylideos. Constricções secundárias foram descritas por SETO (1964) e MORESCALCHI (1965) em Hyla arborea, embora aparentemente, nem sempre pudessem ser bem evidenciadas. Entre sete espécies de Hyla brasileiras, BEÇAK, M.L. (1968) demonstrou a ocorrência de constricção secundária apenas em Hyla pulchella prasina na região distal do braço longo do par 9 e RABELLO (1970) encontrou satélites em Hyla crepitans, nos braços curtos do par 6 e em Hyla fuscomarginata, nos braços curtos dos pares 5 e 11. BARRIO e RUBEL (1970) demonstraram a ocorrência de constricção secundária nos braços longos do par 7 de Hyla squalirostris, o que não foi por nós evidenciado nesta mesma espécie, provavelmente devido ao maior grau de condensação dos cromossomos nas nossas preparações.

Além deste aspecto, verificamos em Hyla bis-

choffi a ocorrência de satélites em apenas um dos homólogos do par 11. Segundo STEPHENSON e STEPHENSON (1970), que constataram uma variação no aspecto da região heterocromática localizada no par 11 em Hyla caerulea e em Hyla phyllochroa, a ocorrência deste fato, embora pouco comum, parece não ter nenhuma relação com aspectos de heteromorfismo cromossômico sexual e sim com vários fatores, tais como a contração da região heterocromática durante a preparação do material, a densidade do corante e o tamanho e a forma desta região do cromossomo, que se mostrou bastante variável. Estes autores encontram similaridade nestas conclusões com resultados descritos e ilustrados por ULLERICH (1966) em Bufo bufo e Bufo viridis, onde os cromossomos do par 6 apresentam uma região heterocromática terminal que desaparece com a contração progressiva durante a metáfase. A nossa observação em relação ao par 11 de Hyla bischoffi, parece mais provável tratar-se de uma condensação diferencial dos homólogos durante o processo mitótico e provavelmente não deve ter relação com diferenciação morfológica deste par relacionada ao sexo. Este fato deverá ser esclarecido com montagem do cariótipo de fêmeas desta espécie.

Os dados relativos ao comprimento total médio do genoma dessas espécies, constantes da Tabela 6, deixam evidente uma variação dentro desse grupo, desde 32,84 micra para Phrynohyas mesophaea até 71,04 micra para Hyla punctata. Estas comparações são até certo ponto subjetivas, se levamos em conta os efeitos do tratamento na preparação do material e os diferentes graus de condensação dos cromossomos nas metáfases observadas; contudo, pesquisas recentes so

bre os valores de DNA mostram o grupo dos Anura como extremamente heterogêneo, segundo GOIN e col. (1968), BEÇAK, W. e col. (1970) e RABELLO (1970). Tal consideração se estende para as comparações dos valores de DNA quando se comparam espécies dentro de uma família, com diferentes números de cromossomos e até entre espécies com o mesmo número de cromossomos. Um fator principal, as duplicações gênicas intersticiais, é apontado por BEÇAK, M.L. e col. (1970) e por BEÇAK, W. e col. (1970) como causa dessas diferenças no conteúdo de DNA nas espécies de Anura por eles estudadas. ULLERICH (1967) tira conclusões semelhantes, comparando espécies de Rana e de Bufo. Em outros organismos, as duplicações gênicas intersticiais, além da poliploidia, tiveram papel importante no aumento da quantidade de DNA, com ou sem alterações cariotípicas (MURAMOTO e col., 1968).

Essa variação nos valores do comprimento total do genoma entre as espécies por nós estudadas, considerando-se as condições limitantes já mencionadas, pode estar exprimindo uma variação na quantidade do material genético nos cromossomos, o que só poderá ser verificado através de medidas citofotométricas.

Na meiose destas espécies com 24 cromossomos, geralmente foi observada na metáfase I a presença de bivalentes fechados, com formas anelares, que podem ser evidenciados nas Pranchas I, II, VI, VII, VIII, X, XI, XII e XIII. Este fato demonstra certo grau de evolução dentro dos Anura, segundo MORESCALCHI (1968). Ocasionalmente, foram observados alguns destes bivalentes abertos, com um só quiasma, porém, isso não foi associado a um par de homólogos determinado e pare

ce não se tratar de um comportamento diferencial de algum cromossomo em particular.

5.1.2. Espécies com número diplóide igual a 26

Até o presente, poucas foram as espécies de Hylideos descritas que apresentaram um número diplóide de 26 cromossomos. DUELLMAN e COLE (1965) descreveram o número de cromossomos de quatro espécies pertencentes ao gênero Phyllomedusa: P. calcarifer, P. callidryas callidryas, P. dacnicolor e P. helenae, todas com $2n=26$. COLE (1971) descreveu o cariótipo de P. dacnicolor e comparou-o com os anteriores, P. lemur, com $2n=26$ (LEON, 1970) e a espécie poliplóide sulamericana P. burmeisteri, $2n=52$, (BEÇAK, M.L. e col., 1970). Os demais Hylideos conhecidos que apresentam este número de cromossomos são: Fritziana goeldii, citada por BEÇAK, M.L. (1967, 1968), algumas espécies do gênero Litoria, para os autores modernos Hylas Australo-Papuan (TYLER, 1968) e do gênero Nyctinystes, descritas por DUELLMAN (1967) e por STEPHENSON e STEPHENSON (1970). Destes, apenas foram descritos os cariótipos de L. caerulea e de L. phyllochroa, por STEPHENSON e STEPHENSON (1970), sendo muito semelhantes entre si mas mostrando muitas diferenças em relação aos cariótipos de Phyllomedusa (COLE, 1971). Este autor encontrou maior semelhança na comparação entre os cariótipos de P. dacnicolor e P. burmeisteri, com exceção da condição poliplóide que na comparação com as espécies de Hylideos australianos, apesar de apresentarem mesmo número diplóide. Isto

parece evidenciar uma evolução independente nos dois grupos.

No presente trabalho são descritos os cariótipos de Phyllomedusa bahiana, Pranchas XIV e XV e de Phyllomedusa hypochondrialis, Prancha XVI. As duas espécies apresentaram um número diplóide igual a 26 e nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 estão apresentadas as características dos seus cromossomos.

Na comparação dos cariótipos destas duas espécies com o de Phyllomedusa burmeisteri, a única espécie sul americana desse gênero a ter seu cariótipo descrito (BEÇAK, M.L. e col., 1970), pôde ser evidenciada uma certa similaridade em relação ao comprimento relativo e à morfologia de cada um dos pares de cromossomos. O cariótipo de P. burmeisteri (considerando-se seu número básico de 13 cromossomos) difere do cariótipo de P. bahiana nos pares 9, 10 e 11 (respectivamente submetacêntrico, metacêntrico e submetacêntrico em P. burmeisteri) e do cariótipo de P. hypochondrialis em relação aos pares 8, 10 e 11 (respectivamente acrocêntrico, metacêntrico e submetacêntrico em P. burmeisteri). Na descrição dos cromossomos de P. dacnicolor, COLE (1971) aponta a presença de uma região heterocromática no par 6. Essa característica não foi encontrada em qualquer das espécies aqui apresentadas.

Na meiose destas duas espécies, a metáfase I caracterizou-se pela presença de bivalentes em forma de anel com dois quiasmas terminais, comum neste grupo de anuros.

O comprimento total dos genomas, apresentados na Tabela 6, mostrou uma diferença bastante significativa

va entre os valores encontrados para Phyllomedusa bahiana (148,70 micra) e para Phyllomedusa hypochondrialis (96,85 micra). Observa-se que, apesar do tamanho relativamente maior dos cromossomos de Phyllomedusa bahiana, não houve modificação marcante no aspecto do cariótipo, quando comparado com os das outras espécies pertencentes ao mesmo gênero: Phyllomedusa hypochondrialis, P. dacnicolor e P. burmeisteri (poliplóide). Essas observações permitem aventar a hipótese de ocorrência do fenômeno da polinemia, com a replicação longitudinal dos cromonemas, um consequente aumento do tamanho dos cromossomos e um provável aumento do DNA.

Estaríamos assim, diante de um caso interessante, envolvendo três espécies deste gênero, com Phyllomedusa hypochondrialis apresentando 26 cromossomos de tamanho normal, Phyllomedusa bahiana mostrando um cariótipo com 26 cromossomos maiores e Phyllomedusa burmeisteri, uma espécie tetraplóide, com 52 cromossomos de tamanho semelhante aos de Phyllomedusa hypochondrialis. A mesma comparação pode ser feita em relação às metáfases meióticas das duas espécies por nós estudadas, onde se nota a diferença de tamanho entre os bivalentes anelares de Phyllomedusa bahiana (Prancha XV) e os de Phyllomedusa hypochondrialis (Prancha XVI).

A ocorrência de um grande aumento na quantidade de DNA em Phyllomedusa bicolor, uma espécie diplóide descrita por GOIN e col. (1968), levou BEÇAK, M.L. e col. (1970) a considerarem a hipótese desta ser possivelmente tetraplóide. O fenômeno da poliploidia natural, embora

relativamente mais encontrado em certos grupos de Anura (BEÇAK, M.L. e col., 1966, 1967; BOGART, 1968), foi descrita na família Hylidae em apenas dois casos até o presente: em Phyllomedusa burmeisteri, já citado e em Hyla versicolor (WASSERMAN, 1970).

Um estudo mais detalhado faz-se necessário para a determinação dos mecanismos efetivamente envolvidos na diferenciação do aspecto cariotípico destas espécies. A análise de maior número de exemplares, conjugada ao emprego de técnicas mais aperfeiçoadas poderão conduzir a resultados satisfatórios.

5.1.3. Espécies com número diplóide igual a 30 e possivelmente 32.

As Tabelas 3, 4, 5 e 6 mostram os dados cariotípicos das espécies descritas com um número diplóide de 30 cromossomos, pertencentes ao gênero Hyla, apresentados nas Pranchas XVII a XXIII. Para efeito de comparação, Hyla berthalutzae que apresentou 32 cromossomos (Tabela 2, Prancha XXIV), também está relacionada neste grupo.

Certa dificuldade foi encontrada para a montagem do cariótipo de algumas destas espécies, que apresentaram um alto grau de condensação dos seus cromossomos. O fato de terem sido examinados poucos exemplares de cada espécie e na maioria dos casos apenas um, limita sob certos aspectos nossas conclusões. Pretendemos repetir a análise do cariótipo de algumas delas, permanecendo, entretanto, os resultados conseguidos na determinação do número haplóide e

aiplóide.

Na maioria das células analisadas para observação dos cromossomos metafásicos, os pares maiores apresentaram-se bem distintos, apesar de condensados, enquanto os pares menores, com exceção dos pares acrocêntricos, mostraram-se muito semelhantes para serem identificados e pareados com certeza. De modo geral, os pares 1, 2, 3 e 4 apresentaram-se submetacêntricos para a maioria das espécies, exceção para o par 4 de Hyla decipiens (metacêntrico) e par 3 de Hyla oliveirai (acrocêntrico). Em todas o par 6 foi acrocêntrico. Em relação aos demais pares verificou-se uma distribuição irregular de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos nas diferentes espécies (Tabela 6). Esta tabela mostra também a ocorrência de cariótipos com 2, 3 e 4 cromossomos acrocêntricos. A presença desse tipo de cromossomos já era esperada nestas espécies com altos números diplóides no grupo, desde que BEÇAK, M.L. (1967, 1968) e RABELLO (1970) mostraram a presença de 4 acrocêntricos em H. microps, H. rubicundula e H. nana e nenhum em H. minuta, embora esta apresentasse o mesmo número diplóide das demais. Neste caso, possivelmente mecanismos como translocações ou inversões pericêntricas podem ter sido os fatores responsáveis pela diferenciação cromossômica das espécies. DUELLMAN (1967) discute, para certos gêneros de Anura, a possibilidade de espécies portadoras de altos números diplóides serem consideradas mais primitivas. Nestas, MORESCALCHI (1967, 1968) também encontra outras características, como a presença de quiasmas intersticiais, de um período de diplóteno longo e uma diacinese curta.

Desse modo, a presença de acrocêntricos entre as espécies com 26, 30 e 32 cromossomos por nós estudadas, parece demonstrar certa primitividade cariotípica em relação às aquelas com 24 cromossomos, dentro desta família.

Os dados obtidos no presente trabalho parecem reforçar a importância do mecanismo das fusões cêntricas na evolução cromossômica dos Hylidae, conforme evidências apresentadas por BEČAK, M.L. (1967, 1968) e por RABELLO (1969, 1970), apesar deste não ter sido provavelmente o único meio de diversificação cariotípica do grupo.

A comparação entre os valores do comprimento total dos genomas mostrou uma variação entre 42,54 micra para H. leucophyllata e 61,97 micra para H. oliveirai. (Tabela 6).

Evidências da presença de um décimo sexto par de cromossomos no cariótipo de Hyla berthalutzae (um único exemplar macho foi estudado) estão indicadas na Prancha XXIV e o valor do seu comprimento relativo na Tabela 3. Este fato deverá ser revisado com o estudo de maior número de exemplares uma vez que, devido ao tamanho reduzido desses cromossomos e ao alto grau de condensação em que se encontrava a maioria das células estudadas, não foi possível a determinação precisa do tamanho dos seus braços. Em células mitóticas do baço, estes dois menores cromossomos pareceram mostrar-se metacêntricos. Em células meióticas, nas metáfases I e II, verificou-se algumas vezes a ausência do bivalente menor que, contudo, está bem evidente na Prancha XXIV e este fato também ocorre em células mitóticas, que algumas vezes mostrou-se incompleta, com apenas 31 cromossomos. Por

outro lado, nunca foram observadas metáfases meióticas com mais de um destes bivalentes punctiformes e nem metáfases mitóticas com mais de 32 cromossomos.

Essas observações poderiam ser explicadas por perdas ocasionais de cromossomos durante a preparação do material ou pelo fato de, devido ao seu tamanho reduzido, estes estarem sobrepostos a outros maiores, dificultando sua visualização. Outra hipótese aventada seria a de esses pequenos cromossomos serem extra-numerários. Em Hyla trachytorax, RABELLO (1970) faz considerações sobre a ocorrência de células com 12 bivalentes, ao lado de células com 12 bivalentes e 1 univalente na metáfase I, provavelmente devido à ocorrência de não disjunção no tecido gonadal primitivo. ULLERICH (1967) descreve a presença de cromossomos extra-numerários em Rana temporaria, caracterizados por se apresentarem pequenos e heterocromáticos na meiose, muito condensados no paquíteno e aparecendo como univalentes na metáfase I. Estas características, também descritas para microcromossomos de sáurios por BEÇAK, M.L. e col. (1972), não foram encontradas na espécie aqui descrita, com exceção do tamanho reduzido. Assim, os cromossomos menores do cariótipo de Hyla berthalutzae poderiam ser considerados componentes de um décimo sexto par, uma vez que em células do baço ficou bem evidente sua forma metacêntrica.

O estudo dos aspectos meióticos de algumas dessas espécies com $2n=30$ e da com 32 cromossomos mostrou que, nesses anfíbios, os bivalentes apresentam geralmente forma anelar (Pranchas XVII, XVIII, XXI, XXII e XXIV). Em Hyla decipiens (Prancha XX) parece ocorrer bivalentes em

forma de cruz, consequentes de quiasmas intersticiais não terminalizados. Segundo MORESCALCHI (1968), a ocorrência de tais quiasmas seria uma característica primitiva entre os Anura.

Nenhuma constrição secundária ou região heterocromática nucleolar foi observada nos cromossomos destas espécies com número diplóide de 30 ou 32 cromossomos. A maioria das células estudadas apresentou cromossomos muito condensados, dificultando a observação quanto a esse aspecto. Possivelmente essas regiões ocorram muito próximas ao centrômero, impossibilitando sua visualização em células de prófase e metáfase mitóticas.

5.2. Considerações gerais sobre as espécies

Os Hylideos constituem um grupo de anuros bastante numeroso. As 450 espécies, aproximadamente, que o representam encontram-se distribuídas em diversas regiões, sendo especificamente mais numerosos e mais diversificados na região Neotropical.

COCHRAN (1955) apresenta uma descrição das espécies de Anuros que ocorrem no sudoeste brasileiro. Nessa relação, a família Hylidae é representada por sete gêneros: Amphodus, Aparasphenodon, Gastrotheca, Hyla, Nototheca, Phyllomedusa e Trachycephalus. Posteriormente, espécies pertencentes a novos gêneros foram descritas, incluindo algumas pertencentes a dois gêneros estudados no presente trabalho - Phrynohyas e Sphaenorhyncus. Entre esses, Hyla é o que apresenta maior número de representantes encontrando-se sub-

dividido em grupos naturais, particularizados pelos seus aspectos morfológicos e características biológicas. Assim, segundo a classificação desse autor, estudamos do grupo albopunctata as espécies: H. bischoffi e H. semiguttata; do grupo faber: H. circumdata; do grupo rubra: H. cuspidata, H. squalirostris, H. duartei e H. pachychrus; do grupo punctata; do grupo geographica: H. geographica; do grupo anceps: H. anceps e do grupo minuta, segundo IZ ECKSOHN (1972), desmembrado em grupo decipiens com as espécies H. decipiens, H. oliveirai e H. berthallutzae e grupo microcephala com as espécies H. meridiana, H. branneri, H. bipunctata e H. leucophyllata.

A todos os grupos acima descritos correspondeu um agrupamento de cariótipos com o mesmo número diplóide e as mesmas características morfológicas gerais. Verifica-se na Tabela 2 e na Figura I a vasta distribuição dos cariótipos desses grupos, em que espécies apresentando as mesmas características cromossômicas foram coletadas em regiões relativamente distanciadas. Localidades dos seis Estados apresentaram espécies com 24 cromossomos, que é apontado como o número modal dentro dessa família.

Em relação ao cariótipo de Hyla langsdorffii ainda um aspecto pode ser considerado. Este apresenta-se um pouco diferenciado dentro dos cariótipos característicos das espécies com 24 cromossomos do gênero Hyla. TRUEB (1970) considera muito próximos filogeneticamente os gêneros Ostheocephalus, Trachycephalus e Phrynohyas em relação aos seus caracteres osteológicos. IZ ECKSOHN e JIM (1971) descrevem um provável híbrido natural entre Trachycephalus

e Phrynohyas e JIM (1972) aproxima Hyla langsdorffii dos mesmos gêneros pelas características semelhantes que apresentam no desenvolvimento larval. Nossas observações em relação aos cariótipos de H. langsdorffii (Tabela 6, Prancha 7) e Phrynohyas mesophaea (Tabela 6, Prancha 12) mostram uma certa semelhança em relação aos pares cromossômicos 1, 3, 4, 5, 6, 9, 11 e 12. Os pares 2, 7, 8 e 10 respectivamente metacêntrico, metacêntrico, submetacêntrico e metacêntrico em H. langsdorffii, mostram-se em Phrynohyas mesophaea respectivamente submetacêntrico, submetacêntrico, metacêntrico e submetacêntrico (Tabela 6). A existência de afinidades entre esses grupos deverá ser melhor investigada sob o ponto de vista citogenético. Tipo de comparação semelhante pode ser feita em relação ao cariótipo de Hyla semiguttata.

5.3. Cromossomos sexuais

É praticamente generalizada e comprovada a afirmação feita por MAKINO (1947) e WHITE (1954) de que, se existem cromossomos sexuais em Anfíbios, estes são tão pouco diferenciados morfológicamente dos autossomos que sua identificação se torna impossível na maioria dos casos. Mas, a falta desse tipo de diferenciação não significa, entretanto, a ausência de digametia genética.

O problema da existência de um par sexual heteromórfico em Anura tem sido motivo de investigação por parte de diversos pesquisadores. Afirmações de diferenciação cariotípica sexual nesse grupo foram logo contestadas

ou não puderam ser comprovadas.

Entre os membros da família Hylidae, IRIKI (1930) demonstrou a presença de um bivalente com comportamento diferencial na metáfase I de Hyla arborea japonica, como evidência de digametismo sexual e, segundo YOSIDA (1957), nesta espécie o macho seria portador de um par heteromórfico do tipo XY. Este fato foi corroborado por MATSUDA (1963) mas, segundo SETO (1964), não ficou evidenciado o heteromorfismo sexual anteriormente encontrado nesta mesma espécie. Os trabalhos mais recentes referentes ao grupo dos Anura e, de maneira particular, às espécies pertencentes à família Hylidae (BEÇAK, M.L., 1967, 1968; BRUM-ZORILLA e SAEZ, 1968; RABELLO, 1969, 1970; BEÇAK, M. L. e col., 1970) negam a existência de dimorfismo cromossômico ligado ao sexo.

Nas espécies de Hylideos estudadas no presente trabalho, não encontramos qualquer evidência de pares de cromossomos heteromórficos nas metáfases e nenhum bivalente com morfologia ou comportamento desigual na meiose dos machos, que pudesse sugerir a presença de um par sexual. A ocorrência de satélites em apenas um dos homólogos do par 11 de Hyla bischoffi (Prancha II), é explicada como uma variação no grau de condensação desta região terminal dos cromossomos durante o processo mitótico, o que não caracteriza um comportamento heteromórfico sexual deste par. Tal fato também foi observado entre os cromossomos do par 11 de Hyla caerulea e Hyla californiae por STEPHENSON e STEPHENSON (1970). Contudo, os cariótipos de fêmeas desta espécie deverão ser examinados.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Foi realizado um estudo citogenético para de terminação do aspecto cariotípico de 23 espécies representando do cinco gêneros de anuros pertencentes à família Hylidae (Tabla 2) com uma distribuição geográfica abrangendo seis Estados brasileiros.

A técnica utilizada foi a de esmagamento de orgãos em animais pré-tratados com colchicina e solução hipotônica.

Os números diplóides encontrados nessas espécies foram 24, 26 e 30, que estão de acordo com os valores já descritos por outros autores, para outras espécies e 32 em Hyla berthalutzae, inédito neste grupo.

Na análise de metáfases mitóticas desta últi ma espécie, os dois menores cromossomos foram considerados como constituintes do décimo sexto par. A hipótese de se trata rem de cromossomos extra-numerários não foi confirmada, uma vez que seu comportamento não se assemelhou ao daqueles descritos por ULLERICH (1967), com exceção do seu tamanho redudo.

Uma associação entre o número de cromossomos e o número de acrocêntricos ficou evidenciada nas espécies por nós estudadas, assim como naquelas estudadas por BEÇAK, M.L. (1967, 1968) e por RABELLO (1969, 1970). As espécies com maior número de cromossomos apresentaram maior número de acrocêntricos.

O estudo dos cariótipos dessas espécies reforçam a afirmação dos autores acima citados sobre a importa ncia.

tância do mecanismo das fusões cêntricas na evolução desse grupo, mas outros mecanismos parecem estar também envolvidos.

Para explicar a diferença de tamanho dos cromossomos de Phyllomedusa bahiana, em relação aos das demais espécies conhecidas deste gênero, foi aventada a hipótese da ocorrência de polinemia, que deverá ser comprovada por técnicas mais refinadas de análise dos cromossomos.

O estudo de células meióticas de machos de algumas das espécies aqui descritas, geralmente mostrou a presença de bivalentes anelares, com dois quiasmas terminais, considerados por MORESCALCHI (1968) como característica de anuros mais evoluídos. Uma das espécies apresentou bivalentes com quiasmas intersticiais.

Em quatro espécies foi constatada a presença de regiões heterocromáticas, todas nos braços longos dos cromossomos. Em Hyla bischoffi, a ocorrência de satélites em apenas um dos homólogos foi considerada como uma condensação diferencial durante o processo mitótico e provavelmente não tem relação com heteromorfismo cromossômico ligado ao sexo.

As espécies com número diplóide igual a 24, considerado como modal do grupo, apresentaram uma distribuição geográfica relativamente grande, sendo encontradas em localidades pertencentes aos seis Estados (Figura 1).

Nas espécies de Hylideos estudadas no presente trabalho, não foram encontradas quaisquer evidências de pares de cromossomos heteromórficos nas metafases mitóticas e nenhum bivalente com morfologia ou comportamento desigual na meiose dos machos, que pudesse sugerir a presença de cromossomos sexuais.

7. SUMMARY

Chromosome numbers and karyotypes of 23 Brazilian anuras, from five genera of the family Hylidae, were described. Animals were pretreated with colchicine and ether anesthetized; fragments of spleen, liver, intestine and gonads were obtained, fixed and slides prepared from these organs through the squash technique. Diploid numbers observed were 24, 26 and 30, as previously described in other hylid species but in Hyla berthalutzae was 32, the highest number recorded for this group. The 16th pair of this species is made up by very small chromosomes. In species of this family a relationship was observed between high diploid numbers and numbers of acrocentrics; this fact agrees with BEÇAK, M.L. (1967,1968) and RABELLO (1969, 1970) and points to the importance of centric fusions mechanisms during evolution, in the morphological differentiation of karyotypes in this group. Besides, other mechanisms of chromosomal modification may occur. In Phyllomedusa bahiana, the differential size of chromosomes, when compared with that of species of the same genera, suggests the hypothesis of occurrence of polinemy, but this should be confirmed by future studies. The majority of the studied species showed ring-like bivalent chromosomes, a very common fact in this group of Anura. One of them showed bivalents with interstitial quiasmata. The occurrence of heterochromatic regions in the longer arms of chromosomes of Hyla bischoffi, Hyla geographica, Hyla langsdorffii and Hyla punctata was described and compared with other hylids. No evidence of sexual heteromorphism was found.

8. BIBLIOGRAFIA

- BARRIO, A. y D.P. DE RUBEL - Características del cariotipo de los Pseudidos (Amphibia, Anura). *Physis* XXIX: 505-510, 1970.
- BEÇAK, M.L. - Cariótipos e evolução cromossômica em Amphibia Anura. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1967.
- BEÇAK, M.L. - Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, 21: 191-208, 1968.
- BEÇAK, M.L., W. BEÇAK and L. RABELLO - Chromosome polymorphism, Geographical variation and Karyotype in Sauria - *Caryologia*, 25: 313-326, 1972.
- BEÇAK, M.L., W. BEÇAK, M.N.I. RABELLO e W. JORGE - Evolução cariotípica na Família Hylidae (Anura). XVII Reunião Anual da SBPC, Blumenau (SC), 1966. (resumo)
- BEÇAK, M.L., L. DENARO e W. BEÇAK - Polyploidy mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics* 9: 225-238, 1970.
- BEÇAK, W., M.L. BEÇAK, G. SCHREIBER; D. LAVALLE and F.O. AMORIM - Interspecific variability of DNA content in Amphibia. *Experientia* 26: 204-206, 1970.
- BENIRSCHKE, K. and T.C. HSU - Chromosome atlas of fish, amphibians, reptiles and birds. Spring Verlag, N.Y., vol. I 170 pp., 1971.

- BOGART, J.P. - Chromosome number difference in the Amphibian genus Bufo: the Bufo regularis species group. Evolution 22: 42-45, 1968.
- BRUM-ZORRILLA, N. and F.A. SAEZ - Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia anura). Experientia 24: 969, 1968.
- BUSHNELL, R.J., E.P. BUSHNELL and M.V. PARKER - A chromosome study of five members of the family Hylidae. Jour. Tennessee Acad. Sci. 14: 209-215, 1939. Biol. Abstr. 1939, n. 10722.
- COCHRAN, M.D. - "Frogs of Southeastern Brazil" - Smithsonian Institution United States National Museum - Bulletin 206, 423 pp., 1955.
- COLE, C.J. - The chromosomes of Acris crepitans blanchardi Harper (Anura: Hylidae). Copeia 3: 578-580, 1966.
- COLE, C.J. - Chromosomes of the hylid frog, Phyllomedusa dancinicolor Cope. Herpetol. Rev. 3: 55-56, 1971.
- DUELIMAN, W.E. - Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. Syst. Zool. 16: 38-43, 1967.
- DUELIMAN, W.E. and C.J. COLE - Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). Syst. Zool. 14: 139-143, 1965.
- GALGANO, M. - Evoluzione degli spermatociti di I ordine e cromosomi pseudosessuali in alcune specie di anfibi. Arch. Ital. Anat. Embriol. 32: 171-200, 1933, apud Rabello, 1969.
- GOIN, O.B., J.C. GOIN and K. BACHMANN - DNA and amphibian life history. Copeia, 3: 532-540, 1968.

- IRIKI, S. - Studies on Amphibian chromosomes. I. On the chromosomes of Hyla arborea japonica Guenther. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B. 5: 1-17, 1930, apud Rabello, 1969.
- IZECHSOHN, E. - 1972 (comunicação pessoal).
- IZECHSOHN, E. e J. Jim - Hibridação natural entre Trachycephalus nigromaculatus Tschudi e Phrynohyas mesophaea (Hensel) (Amphibia, Hylidae). Anais da I Jornada Científica F.C.M.B.B., p. 239, 1971.
- JIM, J. - 1972 (comunicação pessoal).
- LEON, P.E. - Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. Rev. Biol. Trop. 17: 119-124, 1970.
- MAKINO, S. - A study of chromosomes in the two sexes of Hynobius retardatus (an urodelan), with a consideration on the chromosomes and sex. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI, 9: 251-265, 1947, apud Jaylet, 1966.
- MAKINO, S. - "An atlas of the chromosome numbers in animals". Ames, Iowa St. Coll., 290 pp, 1951.
- MATSUDA, K. - Culture technique with some amphibian tissues and a chromosome study of the tree frog, Hyla arborea japonica. Zool. Magazine 72: 105-109, 1963.
- MATTHEY, R. - "Les chromosomes des vertébrés". F. Rouge - Lausanne, 356 pp., 1949.
- MATTHEY, R. - The chromosomes of the vertebrates. Adv. Genet. 4: 159-180, 1951.

- MAXSON, L.R. and D.L. JAMESON - A comparison of the chromosomes of Hyla regilla and Hyla californiae. Copeia 968: 704-707, 1968.
- MORESCALCHI, A. - Il corredo cromosomico di Hyla arborea arborea (L) e di Hyla regilla Baird and Girard: il problema dei cromosomi sessuali e l'evoluzione del cariotipo di Hyla. Caryologia 18: 193-206, 1965.
- MORESCALCHI, A. - The close karyological affinities between a Ceratophrys and Pelobates (Amphibia - Salientia). Experientia 23: 1071, 1967.
- MORESCALCHI, A. - Hypothesis on the phylogeny of the Salientia based on Karyological data. Experientia 24: 964, 1968.
- MURAMOTO, J., S. OHNO e N.B. ATKIN - On the diploid state of the fish order Ostariophysi. Cromosoma (Berl.) 24: 59-66, 1968.
- OHNO, S., C. STENIUS, L.C. CHRISTIAN, W. BEÇAK and M.L. BEÇAK chromosomal uniformity in the avian sub-class Carinatae. Chromosoma (Berl.) 15: 280-288, 1964.
- RABELLO, M.N.I. - Estudo cromossômico de alguns anuros brasileiros. Memória de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP, 57 pp., 1969.
- RABELLO, M.N.I. - Chromosomal studies in brazilian anurans. Caryologia 23: 45-59, 1970.
- RABELLO, M.N.I., M.L. BEÇAK e W. BEÇAK - Contribuição à citotaxionomia da família Hylidae. III Congresso Brasileiro de Zoologia - Rio de Janeiro (GB), 1968.

- ROBERTSON, W.R.B. - Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae. V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae and Gryllidae: Chromosomes and variation. J. Morph. 27: 179-331, 1916, apud Matthey, 1949.
- ROTHFELS, K.H. and L. SIMINOVICH - The chromosome complement of the Rhesus monkey (Macaca mulata) determined in kidney cells cultivated in vitro. Chromosoma (Berl.) 9: 163-175, 1958.
- SAEZ, F.A. e N. BRUM - Investigaciones citogenéticas de anfibios anuros de sudamerica. Actas y trabajos del primer congreso sudamericano de Zoología. La Plata, V: 303-305, 1959.
- SAEZ, F.A. and N. BRUM - Chromosomes of south american amphibians. Nature 185: 945, 1960.
- SETO, T. - The karyotype of Hyla arborea japonica with some remarks on heteromorphism of the sex chromosome. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ, Serv. VI, Zool. 15: 366-373, 1964.
- STEPHENSON, E.M. and N.G. STEPHENSON - Karyotypes of two australian hylids. Chromosoma (Berl.) 30: 38-50, 1970.
- TRUEB, L. - Evolutionary relationships of casque-headed with co-ossified skulls (Family Hylidae). Univ. Kansas Publ., Mus. Nat. Hist. 18: 574-716, 1970.
- TYLER, M.J. - Papuan hylid frogs of the genus Hyla. Zool. Verh., Leiden 96: 1-203, 1968, apud Stphenson and Stephenson, 1970.

- ULLERICH, F.H. - Karyotype and DNS-Gehalt von Bufo bufo, Bufo viridis, B. bufo x B. viridis und B. calamita (Amphibia, Anura). Chromosoma (Berl.) 18: 316-342, 1966.
- ULLERICH, F.H. - Weitere Untersuchungen über chromosomenverhältnisse und DNS-gehalt bei anuren (Amphibia). Chromosoma (Berl.) 21: 345-368, 1967.
- ULLERICH, F.H. - DNS-Gehalt und chromosomenstruktur bei Amphibien. Chromosoma (Berl.) 30: 1-37, 1970.
- WASSERMAN, A.O. - Polyploidy in the common tree toad Hyla versicolor Le Conte. Science 167: 385-386, 1970.
- WHITE, M.J.D. - "Animal Cytology and evolution". Cambridge University Press, 2nd edit., 454 pp., 1954.
- WHITE, M.J.D. - Chromosomal rearrangements and speciation in animals. Ann. Rev. Gen. 3: 75-98, 1969.
- WICKBOM, T. - Cytological studies on Dipnoi, Urodela, Anura and Emys. Hereditas 31: 241-246, 1945.
- WICKBOM, T. - Further cytological studies on Anura and Urodela. Hereditas 35: 33-48, 1949.
- YOSIDA, T.H. - Sex chromosomes of the tree frog Hyla arborea japonica. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Serv. VI, Zool. 13: 352-358, 1957.