

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ- UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS-CSHNB
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA RITA DOS SANTOS CÂNDIDO

CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA ESPÉCIE *Rhinella jimi*
(STEVAUX, 2002) (ANURA, BUFONIDAE) DA REGIÃO DE
PICOS, PIAUÍ

PICOS - PI

2016

MARIA RITA DOS SANTOS CÂNDIDO

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA ESPÉCIE *Rhinella jimi*
(STEVAUX, 2002) (ANURA, BUFONIDAE) DA REGIÃO DE
PICOS, PIAUÍ**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do PiauÍ, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: PROFA. DRA. TAMARIS GIMENEZ PINHEIRO

PICOS - PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

C217c Cândido, Maria Rita dos Santos

Caracterização cromossômica da espécie *Rhinella jimi*
(STEVAUX, 2002) (ANURA, BUFONIDAE) da região de
Picos-Piauí / Maria Rita Santos Cândido – 2016.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (36f.)

Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas)-
Universidade Federal do Piauí, Picos, 2016.

Orientador: Prof^ª. Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro.

1. Anfíbios. 2. Citogenética. 3. Semiárido Brasileiro. I.
Título.

CDD 567.8

MARIA RITA DOS SANTOS CÂNDIDO


**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA ESPÉCIE *Rhinella jimi*
(STEVAUX, 2002) (ANURA, BUFONIDAE) DA REGIÃO DE PICOS,
PIAUI**

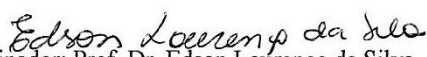
Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

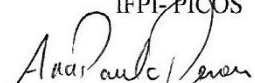
Orientadora: PROFA. DRA. TAMARIS
GIMENEZ PINHEIRO

Aprovado em 03 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA


Orientadora: Profa. Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro
UFPI/CSHNB


Primeiro Examinador: Prof. Dr. Edson Lourenço da Silva
IFPI-PICOS


Segunda Examinadora: Prof. Dra. Ana Paula Peron
UFPI/CSHNB

Prof. Dra. Suzana Gomes Lopes
UFPI/CSHNB

Dedico este trabalho a meus pais, Matildes Maria dos Santos e José Adilson Cândido (*in memoriam*) e ao meu amado esposo Joelton Antônio dos Santos, por serem meus fiéis companheiros e refúgio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

É chegado o momento de agradecer a todas aquelas pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho:

À santíssima trindade (Pai, filho e espírito santo), a quem recorri durante tantas vezes, seja em oração, em lágrimas ou mesmo em pensamento pedindo intercessão e veio em meu auxílio, me ajudando e me dando as forças necessárias para vencer os obstáculos.

Ao Prof. Dr. Edson Lourenço, por aceitar compartilhar seus valiosos conhecimentos comigo, pelas várias horas de orientação, ensinamentos de técnicas, habilitação no uso dos equipamentos laboratoriais, paciência para lidar com meus medos, dedicação e por me apresentar um mundo de oportunidades, até então desconhecido.

À Prof. Dra. Tamaris Gimenez Pinheiro, por ser essa profissional espontânea e dedicada, nunca esquecerei todos os momentos de motivação, orientação, conhecimentos compartilhados, questionamentos, puxões de orelha que só você sabe dar, hoje sei o quanto tudo isso foi necessário para que eu concluísse esta etapa.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí, bem como a todos os funcionários que compõem o *campus* de Picos, pelo acolhimento e suporte físico indispensável para a realização deste trabalho.

Aos professores exemplares que tive durante a graduação: João Marcelo de Castro Sousa, Mariluce Gonçalves Fonseca, Ana Carolina Landim Pacheco, Maria Carolina de Abreu, Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva, Marcia Maria Mendes Marques, em especial a Prof. Dra. Ana Paula Peron, por aceitar contribuir com este trabalho e compor a banca de apresentação, pela generosidade, atenção e carinho com que sempre me tratou. Vocês são os maiores exemplos de profissionais para mim, e inspiração para realização deste trabalho.

A todos que fazem parte do nosso grupo de pesquisa: Ana Paula Araújo, pela amizade que começou desde os primeiros dias da graduação, pelas horas difíceis em que estive ao meu lado e além de tudo pela imensa contribuição na realização deste trabalho. Ao Marcelo João da Silva, por tornar nossos dias de laboratório mais animados, pela partilha de conhecimentos, pelo auxílio com os equipamentos e apoio nas horas em que tudo se tornou mais difícil. A Flávia Manoela Cipriano, por todo tempo de convivência, motivação nas tentativas frustradas, pela ajuda na manipulação do material e por sua valiosa companhia;

Aos inesquecíveis colegas de sala: Marília Borges, Helenice Rocha, Sebastião Almeida, Manoel Barbosa, Edeilma Barros, Maria Aparecida, Marielly, Amanda Macêdo e a todos os outros, obrigada por todos esses agradáveis anos de convivência, pelas conversas, risos, brincadeiras e lágrimas. Cada um do seu jeito me cativou!

A todos os familiares, por compreenderem as minhas ausências durante o curso. Aos meus pais Matildes Santos e José Adilson Cândido (*In memória*), pela vida digna e honesta que me deram e por todo o esforço que fizeram desde sempre, para que eu chegasse até a Universidade e permanecesse até o fim deste ciclo. Sem vocês não teria conseguido! Aos meus irmãos Suzana Cândido e Edimilson Cândido que mesmo sem entender o que fiz, me apoiaram sempre, sem nunca questionarem minhas escolhas. Ao meu amado esposo Joelton, pela paciência comigo durante o curso, por me apoiar tantas vezes, encorajar, compreender as várias horas em que estive ausente e também pela grande colaboração com as coletas, necessárias para realização deste trabalho;

Agradeço também as inúmeras pessoas que contribuíram indiretamente na realização desse trabalho sogros Inês e Antônio, todos os tios, professores e a todos os amigos Maria de Fátima, Maria José, Cristina Ribeiro, Tamires Rodrigues, Gicélia da Conceição, Rejane Barros, Cristiana, Fátima Lacerda, Luciene, Josélia e aos demais.

Muito obrigada a todos vocês!

“Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários.”

(Santa Paulina)

RESUMO

Dentre os anfíbios anuros da fauna brasileira, os integrantes da família Bufonidae são os mais conhecidos. Esta família possui 528 espécies, distribuídas em 46 gêneros. O gênero *Rhinella* é o mais representativo no Brasil, com 40 espécies descritas. Dentre estas, a espécie *R. jimi* é a que mais se destaca no nordeste brasileiro, principalmente pela estreita relação com o ambiente urbano. Dessa forma, o presente trabalho objetivou analisar o cariótipo dos indivíduos de *R. jimi* capturados na região Picos, semiárido piauiense. As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células do epitélio intestinal e pulmões, e analisadas por meio de coloração convencional com Giemsa, bandamento C e Regiões Organizadoras de Núcleolos (NOR). Tanto indivíduos machos quanto fêmeas apresentaram $2n=22$ cromossomos (NF=44), constituído de 11 pares de macrocromossomos do tipo metacêntricos e submetacêntricos. Não foi evidenciado heteromorfismo sexual na espécie. Segmentos heterocromáticos discretos foram visualizados em regiões pericentroméricas e teloméricas da maioria dos cromossomos. Não foi possível observar constrições secundárias e as regiões organizadoras de nucléolos ficaram restritas somente ao sétimo par cromossômico em regiões terminais dos braços curtos. O cariótipo analisado corrobora em vários aspectos com a morfologia cromossômica altamente conservada apresentada por espécies de *Rhinella*.

Palavras-chave: Anfíbios; Banda C; Citogenética; NOR; Semiárido brasileiro;

ABSTRACT

Among the Brazilian frogs, the best known are those belonging to family Bufonidae. This family has 528 species, distributed in 46 genera. The genus *Rhinella* is most representative in Brazil, comprising 40 species. *Rhinella jimi* is the most popular bufonid living in northeastern of Brazil, mainly due to its relationship with the urban environment. Thus, this study aimed to analyze karyotypes of *R. jimi* specimens from Picos, Piauí. Chromosome preparations were obtained from lung and gut epithelial cells, and analyzed by conventional staining with Giemsa, C-banding and nucleolar organizing regions (NOR). These specimens had $2n = 22$ chromosomes ($FN = 44$), with 11 pairs of metacentrics and submetacentrics macrochromosomes. No evidence of heteromorphic sex chromosomes was observed. Discrete heterochromatic segments were visualized in pericentromeric and telomeric regions in the most chromosomes. It was not possible to observe secondary constrictions and, the nucleolar organizer regions were restricted to only one chromosome (pair 7) in terminal regions of the short arms. The karyotype analysis confirms the highly conserved *Rhinella* morphology chromosome.

Keywords: Amphibians; C Band; Karyotype; NOR; Brazilian semi-arid;

LISTA DE FIGURAS

- Figura1-** Exemplar de *Rhinella jimi*. 19
- Figura 2-** Cariótipo de *Rhinella jimi* com coloração convencional em Giemsa mostrando $2n=22$ cromossomos. (A) indivíduo macho; (B) indivíduo fêmea..... 23
- Figura 3-** Padrão de distribuição de Banda C em *Rhinella jimi*. (A) indivíduo macho; (B) indivíduo fêmea. Setas: regiões heterocromáticas evidentes em regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas. 24
- Figura 4-** Metáfase com marcação das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) da espécie *Rhinella jimi*. Setas: localização das NORs, no braço curto do sétimo par..... 24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO₃- Nitrato de Prata

BaOH – Hidróxido de Bário

CSHNB – Campus Senador Helvídio Nunes de Barros

HCL- Ácido clorídrico

KCL- Cloreto de potássio

NF- Número fundamental

NOR – Regiões Organizadoras de Nucléolos

PI – Piauí

RNA - Ácido Ribonucléico

rRNA- RNA ribosômico

SBH- Sociedade Brasileira de Herpetologia

SSC- Sal Citrato de Sódio

UFPI- Universidade Federal do Piauí

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Caatinga	14
3.2 Ordem Anura.....	15
3.3 Grupo <i>Rhinella marina</i>	16
3.4 Citogenética de anfíbios anuros	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Área de estudo.....	18
4.2 Procedimentos em campo	18
4.2.1 Material biológico	18
4.3 Procedimentos em laboratório.....	19
4.3.1 Indução de mitoses.....	19
4.3.2 Obtenção de metáfases	19
4.3.3 Preparações citológicas a partir do epitélio intestinal.....	19
4.3.4 Preparações citológicas a partir do pulmão.....	20
4.3.5 Técnica de coloração convencional com Giemsa.....	20
4.3.6 Detecção de heterocromatina constitutiva.....	21
4.3.7 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs).....	21
4.3.8 Análise cariotípica.....	21
5 RESULTADOS	22
6 DISCUSSÃO.....	25
7 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios foram os primeiros vertebrados a habitarem o ambiente terrestre (ORR, 1986). Compreendem um grupo com 6.771 espécies conhecidas no mundo (FROST, 2011) e estão divididos em três grandes ordens: Anura, que inclui sapos, rãs e pererecas; Caudata que agrupa as espécies de salamandras; e Gymnophiona, com as cobras-cegas (ORR, 1986). Dentre estas, a ordem Anura é a mais abundante com 5.966 espécies (OLIVEIRA, 2011), distribuídas de modo heterogêneo, principalmente em regiões tropicais (POUGH; HEISER; MCFARLAND, 2002; FROST, 2010), sendo o Brasil o país detentor da maior, com 988 espécies descritas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2015).

Dentre todos os anfíbios as espécies de anuros são as mais estudadas do ponto de vista citogenético, com um total de 830 espécies com cariótipos descritos o que representa 15% das espécies (MEDEIROS, 2000). Os primeiros dados referentes aos cromossomos de anuros da fauna brasileira foram obtidos apenas com uso de coloração convencional (BECAK, 1968). A partir da década de 1960, esta linha de pesquisa teve um grande avanço devido ao desenvolvimento de metodologias e técnicas de obtenção das preparações com uso da colchicina e tratamento hipotônico e, sobretudo, dos procedimentos de análise e identificação de cromossomos (SCHMID et al., 1990). Os dados disponíveis atualmente permitem sugerir que os anuros apresentam um certo grau de estabilidade cromossômica, nos quais o número diploide $2n=22$ cromossomos é o mais comum, com padrões de banda C característicos (BOGART, 1972; MATSUI et al., 1985).

Os representantes da família Bufonidae, designados como sapos verdadeiros, são caracterizados principalmente pela presença de glândulas paratóides localizadas lateralmente na cabeça e atualmente estão representados por 571 espécies distribuídas em 48 gêneros (FROST et al., 2006; VIEIRA, 2010; FIGUEIREDO- DE- ANDRADE; SILVEIRA, 2013). Essa família é uma das mais representativas da Caatinga, um surpreendente bioma brasileiro, entretanto ainda pouco conhecido, devido a escassez de estudos (OLIVEIRA et al., 2014; MAGALHÃES-JÚNIOR; 2009). No ambiente da Caatinga uma espécie de sapo bufonídeo que merece destaque é *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (OLIVEIRA et al., 2014). Conhecido popularmente como sapo cururu, apresentando uma ampla distribuição por todo o nordeste brasileiro, colonizando áreas próximas as habitações humanas (KUET; DI- BERNARDO, 1999; STEVAUX, 2002; BENÍCIO; FONSECA, 2014).

Devido a estreita relação com o homem observada para a espécie, aliado ao fato de serem bons indicadores de impactos antrópicos, e a relativa escassez de informações a respeito das características citogenéticas dos indivíduos de *R. jimi* para a região, estudos

abordando estes aspectos são considerados muito importantes. Dessa forma, realizar este trabalho é uma maneira de contribuir com a geração de novas informações sobre a citogenética desses anfíbios na região nordeste projetando o estudo para o estado do Piauí, no cenário da pesquisa nacional sobre o referido grupo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar citogeneticamente indivíduos da espécie *R. jimi* investigando a ocorrência de variações no cariótipo dos espécimes encontrados no semiárido de Picos, Piauí com relação às demais regiões brasileiras.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva no cariótipo da espécie;
- Descrever o padrão de localização das regiões organizadoras de nucléolos;
- Investigar a existência de marcadores citogenéticos sexo específicos;
- Contribuir para uma maior expansão na área da citogenética de anfíbios da Caatinga, em especial na região de Picos-PI.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Caatinga

A vegetação de Caatinga abrange todos os estados da região Nordeste do Brasil, (Bahia, Ceará, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Alagoas, Maranhão) e o norte de Minas Gerais, único estado localizado na região Sudeste (LOIOLA et al., 2012). A Caatinga possui diferentes fisionomias e um patrimônio biológico diversificado, apresentando variadas espécies de animais e vegetais, raros e endêmicos (GIULIETTI et al., 2004; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004).

Assim como os demais ecossistemas xéricos, esse bioma representa um local desafiador, para a fauna habitante (MARES; WILLIG; LANCHER JR., 1985). Neste ambiente, a disponibilidade de água é um elemento decisivo para a vegetação e a fauna, contudo, os anfíbios mesmo necessitando de disponibilidade de água para sua reprodução, aparentam boa adaptação às condições exigidas por este bioma (MINISTÉRIO DO MEIO

AMBIENTE; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2011; ARZABE, 1999). Dentre essas adaptações podem ser visualizadas, diversas estratégias ecológicas de sobrevivência como: associar-se nos locais com maior disponibilidade de água, passar grandes períodos em estivação na seca e desova em ninhos de espuma (DAYTON, 2005).

3.2 Ordem Anura

Anura é a mais numerosa e diversificada ordem de anfíbios (POUGH; JANIS; HEISER, 2008) representada por indivíduos com ausência da cauda e com membros posteriores adaptados ao salto. As 988 espécies descritas no Brasil, estão distribuídas em 19 famílias: Alsodidae (1 espécie); Allophrynidae (2 espécies); Ranidae (2 espécies); Pipidae (4 espécies); Ceratophryidae (6 espécies); Eleutherodactylidae (8 espécies); Centrolenidae (11 espécies); Hemiphractidae (17 espécies); Aromobatidae (23 espécies); Dendrobatidae (25 espécies); Cycloramphidae (36 espécies); Odontophrynidae (44 espécies); Hylodidae (45 espécies); Microhylidae (51 espécies); Brachycephalidae (54 espécies); Craugastoridae (58 espécies); Bufonidae (79 espécies); Leptodactylidae (152 espécies) e Hylidae (370 espécies) (SEGALLA et al., 2014). Os anuros apresentam variados modos de reprodução (RIEVERES, 2010). São encontrados em sua maioria nos trópicos (DUELLMAN; TRUEB, 1986), dependendo de ambiente com umidade, ao menos em fase de reprodução (ORR, 1986), sendo a heterogeneidade desses habitats um importante fator para a variação da diversidade das espécies (PAULA, 2012).

Assim como os demais anfíbios, a pele dos anuros é recoberta por várias glândulas, responsáveis por mantê-los úmidos (ORR, 1986). Aliado a estas, alguns anuros exibem ainda outro tipo de glândulas formando verrugas bilaterais, responsáveis pela secreção de um veneno, utilizado na defesa destes (CAMPLESI, 2006; ORR, 1986; JARED; ANTONIAZZI, 2009). Além desse mecanismo de defesa natural, possuem ainda a capacidade de inflar os pulmões para demonstrar um tamanho maior, como é o exemplo a espécie *R. jimi* (MONTI; CARDELLO, 1994; JARED; ANTONIAZZI, 2009).

Quanto à alimentação, anfíbios Anuros são declarados predadores oportunistas, utilizando a estratégia de captura do tipo “senta-espera” para obtenção dos recursos tróficos (OLIVEIRA et al. 2014). Alimentam-se de insetos e pequenos invertebrados desempenhando assim um relevante papel biológico no controle de suas presas (SANTOS, 2013; SANTANA; JUNCÁ, 2007; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004).

3.3 Grupo *Rhinella marina*

A família Bufonidae, é constituída por 46 gêneros e 528 espécies, sendo *Rhinella* Fitzinger, 1826 o gênero mais representativo no Brasil, contando com 40 espécies (FONTANA, 2012, FROST, 2009). Todas as espécies agrupadas atualmente em *Rhinella* estavam distribuídas no gênero *Bufo* Laurenti, 1768 (FROST, 2004). Frost et al. (2006), com base em dados moleculares, lançaram uma proposta evolutiva para os anfíbios, dividindo as espécies restritas a América do Sul em gêneros distintos *Rhinella*, *Rhaebo* Cope, 1862 e *Chaunus* Wagler, 1828. Quase que concomitantemente, Pramuk (2006) baseando-se em dados biogeográficos, morfológicos e moleculares exibidos pelas espécies sulamericanas do gênero *Bufo*, conclui que espécies da América do Sul, América Central e América do Norte formam um grupo irmão, fazendo parte de um agrupamento monofilético.

Um ano mais tarde, Chaparro et al. (2007) utilizando análises filogenéticas e moleculares com indivíduos da família Bufonidae, sugeriram o nome *Rhinella* para incluir a maioria dos clados “recentes” que antes era atribuídas ao gênero *Bufo* sulamericanos. O gênero *Rhinella* desde então vem sendo usado fazendo referência as espécies do grupo *R. marina* (CHAPARRO et al., 2007; PRAMUK et al., 2008).

Segundo Maciel (2008) o grupo *Rhinella marina* é composto por 10 espécies: *R. arenarum* (Hensel, 1867), *R. icterica* (Spix, 1824), *R. marina* (Linnaeus, 1758), *R. schneideri* (Werner, 1894), *R. poeppigii* (Tschudi, 1845), *R. rubescens* (Lutz, 1925), *R. jimi*, *R. achavali* (Maneyro, Arrieta & de Sá, 2004), *R. veredas* (Brandão, Maciel & Sebben, 2007) e *R. cerradensis* (Maciel, Brandão, Campos & Sebben, 2007).

3.4 Citogenética de anfíbios anuros

Análises citogenéticas em anuros são importantes por fornecerem dados que permitem visualizar amplamente a história evolutiva exibida através do cariótipo dessas espécies (BARTH et. al., 2013). Dessa forma, tais informações, contribuem na investigação sistemática e taxonômica de vários grupos da ordem Anura (MEDEIROS, 2000).

São diversos os bandamentos que mostram aspectos estruturais gerais dos cromossomos e a maneira como a cromatina está organizada, sendo o padrão de banda, muito importante na sistematização de anfíbios, que possuem cariótipos semelhantes (HILIS; MORTIZ; MABLE, 1990; SUMNER, 1990). Miura (1995) por exemplo, usando padrões de Banda C, diferiu dois cariótipos em *Bufo japonicus japonicus* Matsui, 1984, aparentemente semelhantes sobre coloração convencional. Estudos indicam que dentre os vertebrados, os

anfíbios são os que apresentam maior divergência na frequência das regiões de heterocromatina constitutiva nos cromossomos (MIURA, 1995).

Os anuros em geral exibem grandes quantidades de heterocromatina em seus cariótipos, localizados em sua maioria nos centrômeros, telômeros e próximos às NORs. Tais características tornam a técnica de banda C, uma das mais utilizadas para estudos com esses animais (SCHIMID et al., 1990; GALLEGO, 2008; MEDEIROS, 2000).

Desde 1990, muitos anuros brasileiros tiveram seus cariótipos estudados (NUNES; FAGUNDES, 2008). Inicialmente as descrições citogenéticas baseavam-se apenas em caracterização do número e morfologia cromossômica, sendo raras informações sobre constrições secundárias e regiões de satélites (OLIVEIRA, 2012). Segundo Gazoni (2011) o aperfeiçoamento dos procedimentos citogenéticos em anuros, com obtenção direta dos cromossomos e a introdução do cultivo de linfócitos e de fibroblastos, tiveram como consequência uma melhor qualidade das preparações citológicas, contribuindo assim com uma gama maior de informações. Ainda segundo este mesmo autor, estudos citogenéticos de anuros, mostraram uma utilização frequente de coloração com fluorocromos base-específicos, visto que estes podem informar mais detalhadamente as regiões repetitivas nos cromossomos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas na cidade de Picos, localizada na porção centro-sul do estado do Piauí, com uma área de aproximadamente 803 Km², a uma latitude 7°04'37" Sul e a uma longitude 41°28'01" Oeste, situado a margem direita do rio Guaribas (ALEIXO et al., 2014). Apresenta uma distância de 320 km da capital Teresina, pela BR-316. (BARBOSA et al., 2007). Possui uma população de 73.417 habitantes (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

O clima do município é do tipo seco e semiárido, com uma vegetação de caatinga arbórea e arbustiva (VIDAL, 2003; CEPRO, 1990). A precipitação média anual é de 706,7 mm, sendo que 83,59% aproximadamente concentram-se nos meses de dezembro a abril, com distribuição irregular e período seco de maio a novembro (PORTELA et al., 2008; DEPARTAMENTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 1992). A temperatura média anual é de 28 a 30°C, sendo a maior parte das chuvas concentradas nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro (ANDRADE- JÚNIOR, 2004; MEDEIROS et al., 2012).

4.2 Procedimentos em campo

4.2.1 Material biológico

As coletas dos exemplares de *R. jimi* (FIG.1) ocorreram, no período noturno, durante os meses de julho a novembro de 2015. O método empregado para coleta dos indivíduos foi a busca ativa (auditiva-visual), por meio de caminhadas noturnas na zona rural da cidade com auxílio de lanternas e o encontro ocasional. A captura dos espécimes foi realizada manualmente e os exemplares coletados transportados ao laboratório de Biologia do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí, *campus* Picos, onde foram realizados os procedimentos para a coleta de material citogenético, catalogação, registro e posterior fixação e preservação.

Figura 1: Indivíduo de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002), proveniente de Picos-PI.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

4.3 Procedimentos em laboratório

4.3.1 Indução de mitoses

Para obtenção de cromossomos mitóticos, foi utilizada ativação da proliferação celular *in vivo*, por meio da técnica de indução de mitoses descrita por Cole; Leavens (1971), na qual uma solução de fermento biológico é aplicada nos espécimes. A solução de fermento biológico foi preparada com 0,3g de fermento, 0,3g de açúcar e 10 mL de água destilada, incubada em estufa a 37°C, durante 20 minutos, até iniciar a fermentação. Em seguida a solução foi injetada intrapeitoralmente no anfíbio, na proporção de 1mL dessa suspensão para cada 10g do peso do animal.

4.3.2 Obtenção de metáfases

Em cada espécime, foi administrada intraperitonealmente, solução de colchicina na concentração entre 0,01% a 0,1%, na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso do animal. Após 6 horas os animais foram anestesiados e sacrificados.

4.3.3 Preparações citológicas a partir do epitélio intestinal

Os cromossomos metafásicos foram obtidos por meio da raspagem do epitélio intestinal, seguindo o protocolo de Schmid (1978) com algumas modificações. Após retirado, o intestino foi aberto longitudinalmente e lavado com solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075M e então colocado em uma placa Petri contendo solução hipotônica e mantido por 45 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, o intestino foi transferido

para outra placa contendo fixador Carnoy (metanol e ácido acético, na proporção 3:1), gelado, e preparado no momento do uso, onde foi realizada a raspagem da mucosa intestinal com auxílio de uma pequena espátula. Seguidos 20 minutos após a raspagem, a suspensão foi transferida para um tubo tipo Falcon e centrifugada por sete minutos a 1000 rpm e descartado o sobrenadante. O sedimento foi dissociado com ajuda de uma pipeta Pasteur e 3mL do fixador foi adicionado vagarosamente, sendo pipetado logo em seguida lavando bem as células. Tal procedimento foi realizado, pelo menos, mais duas vezes, dependendo da quantidade de material retirado. Após, última centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado ao mesmo uma quantidade de fixador suficiente para o preparo das lâminas.

4.3.4 Preparações citológicas a partir do pulmão

Preparações citológicas foram também obtidas a partir do pulmão, seguindo o protocolo de Bertollo; Takahashi; Moreira-Filho (1978), com adaptações. Com o auxílio de pinças e tesouras os pulmões, foram retirados e colocadas em placa de Petri onde o órgão foi desagregado com auxílio de pinças e seringa sem agulha, para liberação das células.

A suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga e incubada a 45 minutos. Decorrido esse tempo, foi feita a pré-fixação adicionando à suspensão cerca de seis gotas de fixador Carnoy (metanol e ácido acético, na proporção 3:1), gelado, e preparado no momento do uso. Após adicionado o fixador, a suspensão foi agitada levemente e aguardado cinco minutos, em seguida foi feita uma nova adição de mais seis gotas de fixador, que depois de pipetado levemente esperou-se mais cinco minutos. Após todos esses procedimentos a suspensão foi transferida para um tubo Falcon e centrifugada entre 900 a 1000 rpm por sete minutos e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi dissociado com uma pipeta Pasteur e 3mL do fixador foi adicionado vagarosamente, sendo homogeneizado logo em seguida lavando bem as células. Tal procedimento foi realizado, pelo menos, mais duas vezes, dependendo da quantidade de material retirado. Após a última centrifugação foi feito o descarte do sobrenadante e adicionado uma quantidade de fixador suficiente para o preparo das lâminas.

4.3.5 Técnica de coloração convencional com Giemsa

Sobre uma lâmina limpa e seca, mantida horizontalmente sobre um suporte de arame colocado em banho-maria a 60°C, a 0,5cm do nível de água, foi pingado uma ou duas gotas da suspensão. Logo em seguida, a lâmina foi retirada do banho-Maria e colocada para secar ao ar. Depois de secas as mesmas foram coradas com solução de Giemsa diluída a 5% em

água destilada, durante 10 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada em água destilada ou água corrente e deixada secar à temperatura ambiente.

4.3.6 Detecção da heterocromatina constitutiva

O estudo da heterocromatina constitutiva foi realizado conforme a técnica de bandamento C, descrita por Sumner (1972), com algumas modificações. As lâminas foram colocadas em 0,2 N de ácido clorídrico (HCl) durante 45 minutos à temperatura ambiente, em seguida lavadas com água destilada e transferidas para uma solução salina de 2xSSC, a 60°C por 15 minutos. Após serem lavadas em água destilada, as lâminas foram incubadas em solução de hidróxido de bário a 42°C durante 15 segundos e mergulhadas rapidamente em solução 0,2 N de ácido clorídrico, lavada novamente e posta para secar. Após esse procedimento as lâminas foram submetidas a uma solução salina de 2xSSC a 60° e agitadas. Por fim, a preparação foi lavada com água destilada e corada com Giemsa a 10% por 10 minutos.

4.3.7 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs)

Para a caracterização das (NORs) foi utilizada basicamente a técnica descrita por Howell; Black (1980), com algumas alterações. A lâmina foi hidrolisada em ácido clorídrico 1N a 60°C, por três minutos e após secar, recebeu uma gota de gelatina dissolvida e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%. Posteriormente a lâmina foi coberta com lamínula e incubada em câmara úmida (placa de Petri com papel alumínio e dois suportes de apoio) a 60°C, durante três a quatro minutos. Passado esse tempo a lâmina foi corada com Giemsa por cerca de 30 segundos, lavada em água destilada e posta para secar.

4.3.8 Análise cariotípica

Foram analisadas preparações cromossômicas de quatro espécimes (dois machos e duas fêmeas) ao microscópio de luz, as melhores metáfases foram selecionadas e capturadas com software Image Pro Plus, 6.0 (Media Cybernetics), com objetiva de imersão de 100x. Para montagem do cariótipo, os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop Elements 6.0 e organizados em pares, em ordem decrescente de tamanho com base no proposto por Levan et al. (1964).

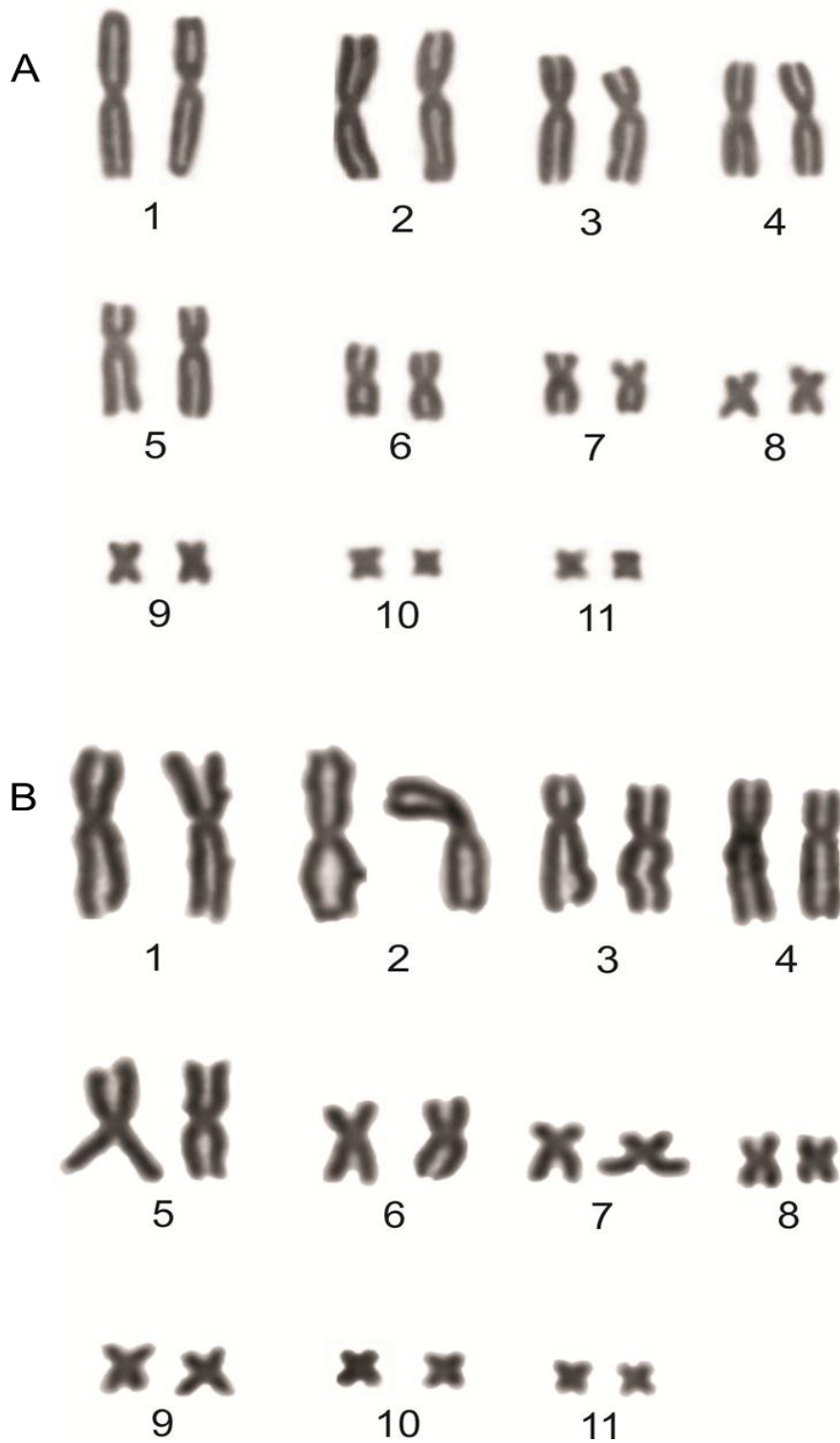
5 RESULTADOS

A análise kariotípica de *R. jimi*, em coloração convencional, revelou número diploide de $2n=22$ cromossomos e fórmula kariotípica composta por 11 pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Número Fundamental=44) para machos e fêmeas (FIG. 2).

A heterocromatina constitutiva apresentou-se distribuída principalmente nas regiões centromérica, pericentromérica e telomérica da maioria dos cromossomos, porém em alguns, foi evidenciada uma pequena variação, havendo cromossomos com quantidades ainda maiores de heterocromatina, difundidas por toda extensão cromossômica (FIG. 3).

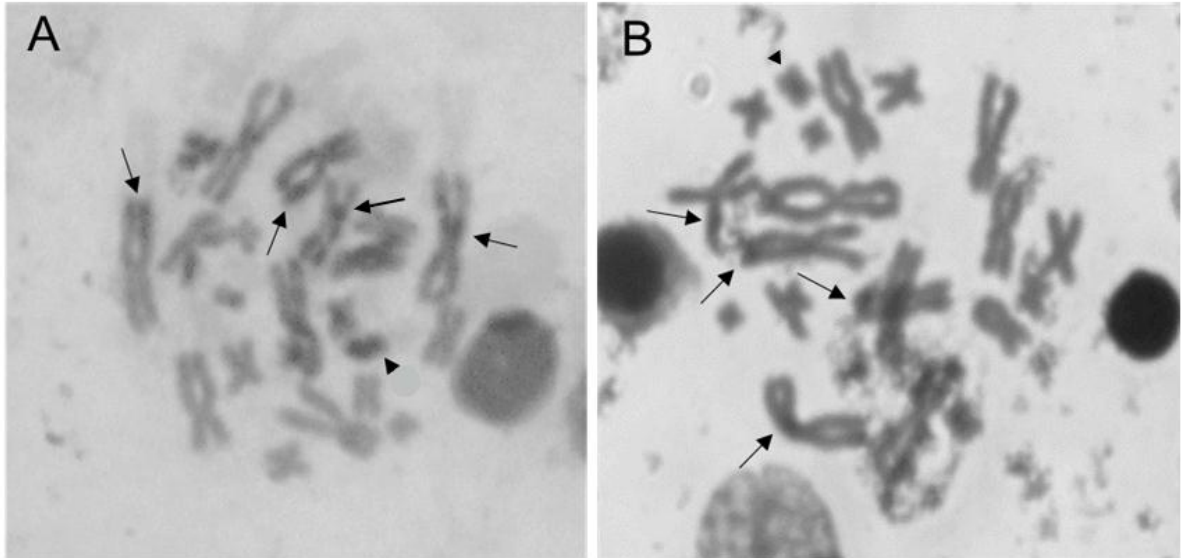
Sob este tipo de coloração não foi verificado indícios de heteromorfismo sexual. Na espécie *R. jimi* não foi visualizada a presença de constrições secundárias. Quanto as regiões organizadoras de nucléolo, marcadas pela prata, foi observado apenas um par portador da NOR, correspondente ao sétimo em regiões terminais dos braços curtos (7p) (FIG. 4).

Figura 2. Cariótipo em coloração convencional por GIEMSA de *Rhinella jimi*. (A) Cariótipo de um espécime macho; (B) Cariótipo de um espécime fêmea.



FONTE: Elaborado pela autora (2016).

Figura 3. Padrão de distribuição de Banda-C em *Rhinella jimi*. (A) indivíduo macho; (B) indivíduo fêmea. Setas: regiões heterocromáticas evidentes em regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas.



FONTE: Elaborado pela autora (2016).

Figura 4. Metáfase com marcação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) da espécie *Rhinella jimi*. Setas: localização das NORs, no braço curto do sétimo par.



FONTE: Elaborado pela autora (2016).

6 DISCUSSÃO

O número diploide $2n=22$ encontrado em *R. jimi* foi o mesmo observado em várias espécies pertencentes ao mesmo gênero, *R. ornata* (Spix, 1824) (BALDISSERA-JR; BATISTIC; HADDAD, 1999; AMARO-GHILARD; RODRIGUES; YONENAGA-YASSUDA, 2004) *R. pombali* (Baldissera, Caramaschi & Haddad, 2004) (SILVA, 2010), *R. boulengeri* Chaparro, Pramuk, Gluesenkamp & Frost, 2007 (LANTYER SILVA et al., 2009) e em *R. crucifer* (Wied-Neuwied, 1821) (BALDISSERA-JR; BATISTIC; HADDAD, 1999; SILVA, 2010), bem como em oito espécies de *Bufo* (atualmente *Rhinella*) (*B. ictericus* Spix, 1824, *B. spinulosus spinulosus* Andersson, 1908, *B. arenarum* Hensel, 1867, *B. g. fernandezae* Gallardo, 1957, *B. g. d'orbignyi* Müller & Hellmich, 1936, *B. crucifer* Wied-Neuwied, 1821, *B. paracnemis* Lutz, 1925, *B. marinus* (Linneus, 1758)) (BRUM-ZORILA; SAEZ, 1973). Tal fato demonstra que esse número cromossômico é comum ao gênero, e vem se mantendo ao longo do tempo. Relatos de estabilidade cromossômica como o evidenciado para *R. jimi*, é compartilhado entre espécies dos gêneros *Anaxyrus* Tschudi, 1845, *Atelopus* Duméril & Bibron (1841), *Bufo*, *Capensibufo* Grandison, 1980, *Melanophryniscus* Gallardo, 1961, *Nannophryne* Günther, 1870, *Nectophrynoides* Noble, 1926, *Ollotis* Cope, 1875, *Schismaderma* Smith, 1849 e *Werneria* Poche, 1903 (KING 1990; KURAMOTO 1990), demonstrando também que esse número é comum a grande maioria das espécies pertencentes a família (AMARO-GHILARDI et al., 2007).

Casos de estabilidade no número cromossômico tem sido relatado em outros grupos de vertebrados como é o caso de espécies de lagartos do gênero *Salvator* Duméril & Bibron, 1839 (VERONESE; FREITAS; KRAUSE, 2003; SANTOS et al., 2008; HERNANDO, ALEJANDRA B., 1999) e de peixes *Piabina* J. T. Reinhardt, 1867 (PORTELA; GALETTI-JR; BERTOLLO, 1988; PERES; BERTOLLO; MOREIRA-FILHO, 2008; FERNANDES et al., 2010). Diferente do que ocorre em outros grupos, uma característica marcante observada também nos indivíduos de *R. jimi*, foi a presença de macrocromossomos, organizados nos tipos metacêntricos e submetacêntricos. A ausência de microcromossomos e constituição exclusiva de cromossomos de dois braços também é observado nas espécies *Chaunus jimi* Stevaux, 2002 analisada por Amaro- Ghilardi et al. (2007) proveniente de Ibiraba-BA, assim como *R. pombali* e *R. crucifer* (SILVA, 2010).

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva no genoma de *R. jimi* mostram sinais discretos nas regiões centromérica, pericetroméria e telomérica da maioria dos cromossomos. Embora o material não seja totalmente preciso para indicar nos cromossomos a

presença de heteromorfismo, é o suficiente para constatar presença de cromossomos com banda C positiva em toda sua extensão.

A marcação eventual na posição centromérica restrita a alguns cromossomos, mostraram-se diferente das encontrados por (KASAHARA; SILVA; HADDAD; 1996); Lantyer Silva et al., (2009), Amaro-Ghilardi et al. (2007) e Silva (2010) para algumas espécies do gênero *Rhinella*. Segundo estes autores, os espécimes analisados apresentaram padrão de bandas centromérica distribuída em todos os cromossomos. Por outro lado, resultados similares aos de *R. jimi*, foram observados no trabalho de Gallego (2008), na espécie *Bokermannohyla hylax* (Heyer, 1985) da família Hylidae, onde foi evidenciada heterocromatina em regiões teloméricas e pericentroméricas de alguns pares.

Padrões de banda C distintos, no que diz respeito a espécies com cariótipos muito próximos, são bastante relevantes (GAZONI, 2011), podendo sugerir possíveis rearranjos ocorridos na evolução (SUMNER, 1990). Oliveira (2011) estudou três populações de *Leptodactylus latrans* Steffen, 1815 ($2n=22$), que submetidos a técnica de bandeamento C apresentaram diferentes padrões de banda, centromérica/ pericentromérica em duas populações e marcações teloméricas somente em uma das populações.

Padrões diferenciados de distribuição de heterocromatina entre espécies são observados tanto em Anuros primitivos quanto nos mais derivados (KING, 1991). A técnica de Banda C na citogenética de anuros, aliado a outras técnicas citológicas, vem se tornando extremamente importante para entendimento de constituição molecular e organização cromossômica, principalmente no que diz respeito às regiões heterocromáticas (GAZONI, 2011) podendo trazer informações evolutivas referentes a esses animais (MEDEIROS, 2005).

A ausência de contrições secundárias no cariótipo, contrastam com o observado nas espécies *R. pombali* e *R. crucifer*, nas quais esta estrutura está localizada no braço curto do sétimo par cromossômico (SILVA, 2010). Da mesma forma, como em alguns grupos e espécies de *Rhinella* sulamericanas como, por exemplo, *R. atacamensis* (Ceil, 1962), *R. arenarum*, *R. marina*, *Rhaebo haematiticus* (COPE 1862), *R. granulosa* (Spix, 1824), *Incilius valliceps* (Wiegmann, 1833) e “*Bufo*” *stomaticus* Lütken, 1864 (BOGART, 1972). Contudo exemplos de ausência são comuns em outros gêneros, como observado em três populações de *Leptodactylus* (Fitzinger, 1826) como *L. latrans*, provenientes de fragmentos de Caatinga do estado Sergipano (OLIVEIRA, 2011).

Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) são áreas cromossômicas na qual encontram-se localizados genes responsáveis pela produção de determinados tipos de RNA ribossômicos (rRNA), os quais comporão grande parte do nucléolo (SUMNER, 1990;

GUERRA, 1988). Regiões organizadoras de nucléolos do tipo simples têm sido apontadas como uma característica basal para anfíbios com cariótipo diploide (KING; WOOLLARD; IRVING, 1990). A análise de NORs usando impregnação com nitrato de prata (AgNO_3), mostrou que *R. jimi*, possui somente um par de cromossomos portadores desta estrutura, muito semelhante aos resultados observados em répteis como jacarés (VALENCIA, 1993) e em algumas ordens de aves (GUNSKI, 1992).

Posições diferenciadas das NORs nos cromossomos de espécies próximas têm permitindo sugerir rearranjos cromossômicos, tendo um importante papel na diferenciação de espécies aparentemente conservadas (SCHIMID, 1978; RABER, 2000). A dinâmica destes cístrons pode estar relacionada com a natureza repetitiva dessas regiões do genoma dos vertebrados. A NOR localizada no braço curto do par cromossômico 7 da espécie *R. jimi*, corroborou com as NORs encontradas em outras do mesmo gênero: *R. ictericus* (Spix, 1824), *R. rubescens* e *R. schneideri* (tratados como *Chaunus*) por Amaro-Ghilardi et al. (2007), diferindo destas apenas quanto a localização ocupada no cromossomo.

A análise cromossômica de *R. jimi*, permitiu identificar que a espécie possui um cariótipo muito próximo do observado em outras espécies da família Bufonidae nas quais o número diploide permanece inalterado na maioria das espécies, sem maiores indícios de rearranjos estruturais. Além disso, é possível observar a presença de NOR em apenas um par cromossômico, geralmente restrita ao par número 7, para a maioria das espécies bem como pequenas variações quanto ao tamanho dos blocos heterocromáticos, e distribuição dos mesmos entre as espécies.

7 CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- O número cromossômico para a amostra estudada e para o gênero *Rhinella* é bastante conservado, mantendo o cariótipo diploide de $2n=22$ e $NF=44$ diferindo apenas na composição de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos;
- O cariótipo constituído apenas por macrocromossomos é uma característica bastante compartilhada para o gênero, sendo esta uma característica pouco observada entre os vertebrados.
- As análises citogenéticas empregadas revelaram diferenças citogenéticas quanto a distribuição dos blocos heterocromáticos, com relação as demais espécies de *Rhinella*;

- Diferente do que ocorre em outras espécies do gênero, não foram visualizadas constrições secundárias por meio da coloração convencional;
- A localização das NORs deu-se no braço curto do sétimo par cromossômico, fato semelhante ao ocorrido em outras espécies pertencentes a *Rhinella*, porém com uma diferença apenas quanto a localização que deu-se de forma terminal em *R. jimi*. Essa característica é um indicativo de rearranjo estrutural no cromossomo, possivelmente quebra seguida de inversão, já que o número de cromossomos no cariótipo diploide permanece inalterado.
- Considerando a escassez de estudos com anfíbios no Nordeste brasileiro, os resultados apresentados nesse trabalho, tratando de anuros endêmicos da caatinga, subsidiarão estudos futuros na área.

REFERÊNCIAS

- ALEIXO, D. L. et al. Mapeamento da flora apícola arbórea das regiões pólos do estado do Piauí. **Revista Verde**. v. 9, n. 4, p. 262-270, 2014.
- AMARO-GHILARDI, R.C. et al. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). **Genetica**, v.134, p. 159-168. 2007.
- AMARO-GHILARDI, R.C.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence in situ hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus species* (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia**, v.57, p. 53- 65, 2004.
- ARZABE, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n. 3, p. 853-864, 1999.
- ANDRADE JÚNIOR, A. S. et al. **Atlas Climatológico do Estado do Piauí**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2004. 151 p. (Documentos, 101)
- BALDISSERA-JR, F.A.; BATISTIC, R.F.; HADDAD, C.F.B. Cytotaxonomic considerations with the description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo* (Anura: Bufonidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 20, n. 3, p. 413-420, 1999.
- BARBOSA, M. P. et al. Estudo da degradação das terras - município de Picos – PI .In : **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Florianópolis, 2007.
- BARBOSA, M. P. et al. Estudo da degradação das terras- município de Picos-PI. In: XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 8, 2007, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: INPE, 2007. p.4357- 4363.
- BARTH, A. et al. Molecular cytogenetics of nucleolar organizer regions in *Phyllomedusa* and *Phasmahyla* species (Hylidae, Phyllomedusinae): a cytotaxonomic contribution. **Genetics and Molecular Research**,v. 12, n. 3, p. 2400-2408, 2013.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**, v.21, n. 3, p. 191-208, jan. 1968.
- BENÍCIO, R. A; FONSECA, M.G. **Guia ilustrativo de anfíbios e répteis de Picos-PI**. 1 ed. Teresina: Edufpi, 2014, 126p.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, p. 103-120, 1978.
- BOGART, J.P. Karyotypes. In: BLAIR, W. F. (Ed). **Evolution in the genus *Bufo***. 1. ed. Austin: University Texas Press, 1972. p. 171-195.
- BRUM-ZORRILLA, N.; SÁEZ, F. A. Chromosomes of South American Bufonidae (Amphibia: Anura). **Caldasia**, v. 11, n. 52, p. 171–195, Feb. 1973.

CAMPLESI, A. C. **Avaliação clínicas e laboratoriais da intoxicação experimental por veneno de sapo e cães.** 2006. 112f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

CHAPARRO, J.C.; PRAMUK, J. B.; GLEUSENKAMP, A.G. 2007. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of Southeastern Peru. **Herpetologica**, v. 63, n. 2, p. 203-212, 2007.

COLE, C.J., LEAVENS C.R. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique// **Herpetological Review**. n. 3, p. 102-103,1971.

DAYTON, G.H. **Community assembly of xeric-adapted anurans at multiple spatial scales.** Dissertation, Office of Graduate Studies of Texas A&M University, 2005.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Normas climatológicas:** 1961-1990, Brasília, DF, 1992. 84p.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians.** 1 ed. Baltimore: McGraw-Hill, 1986, 670 p.

FERNANDES, C. A. et al. Cytogenetics studies comparing three Characidae fish species from the Iguatemi river basin, Brazil. **Cytologia**, v. 74, p. 329-333, 2010.

FIGUEIREDO-DE-ANDRADE, C.A.; SILVEIRA, L.S. Sapo pigmeu: *Rhinella pygmaea* (Myres & Carvalho, 1952). **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 6, n.12, p.2-5, 2013.

FONTANA, P. L. M. **Estudo morfológico comparativo do sistema de defesa química cutânea em duas espécies de sapos amazônicos (*Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus*).** 2012. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

FROST, D. R. Amphibian species of the world: an Online Reference. Version 3.0. Museum of Natural History, New York. 2004. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 01 ago. 2015.

FROST, D. R. Amphibian species of the world: an Online Reference. Version 6.0. Museum of Natural History, New York. 2009. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American>>. Acesso em: 02 out. 2015.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 . Museum of Natural History. New York. 2010. Disponível em <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

FROST, D. R. Amphibian Species of the world: an Online Reference. Version 5.5. Museum of Natural History. New York. 2011. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American>>. Acesso em: 18 set. 2015.

FROST, D. et al. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.297, p.1- 1370, 2006.

FUNDAÇÃO CENTRO DE PESQUISAS ECONÔMICAS E SOCIAIS DO PIAUÍ – FUNDAÇÃO CEPRO. **Atlas do Estado do Piauí.** Rio de Janeiro: IBGE, 1990. 26p.

- GALLEGO, L. F. K. **Análise citogenética de anfíbios simpátricos oriundos da floresta Atlântica**. 2008. 36f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- GAZONI, T. **Marcadores Citológicos no Cariótipo de Espécies de *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), Analisado com Técnicas de Citogenética Clássica e Molecular**. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Departamento de Biologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2011.
- GIULIETTI, A. M. et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA J. M.C; TABARELLI, M; FONSECA, M.T. (Org.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004, 403p.
- GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988, 142 p.
- GUNSKI, J. R. **Análise citogenética e algumas considerações biológicas da espécie *Rhea americana*- Ema (Aves-Rheidae)**. 1992. 119f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Animal)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1992.
- HERNANDO, A.B. **Estudios Cromosômicos em *Tupinambis merianae* y *Tupinambis rufescens* (Squamata; Teiidae)**. In: V CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HERPETOLOGIA. 1999, Montevideo. Disponível em: <<http://www.http://zvert.fcien.edu.uy/clh/resumen>> PDF. Acesso em 01 - Fev. 2016.
- HILLIS, M. H.; MORITZ C.; MABLE, B.K. **Molecular systematic**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1990, 655p.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Base de informações municipais**. 3 ed. Rio de Janeiro, 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo. 2010.
- JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. Anfíbios: biologia e seus venenos. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, W. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica**. 2. ed. São Paulo: Sauvier, 2009. p. 317-330.
- JARED, C. et al. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defense. **Toxicon**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 197-207, abr, 2009.
- KASAHARA, S; SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B. 1996. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p.237-242, 1996.
- KING, G.A.; WOOLLARD, D.C.; IRVING, D.E. Physiological changes in asparagus spear tips after harvest. **Physiologia Plantarum**, v. 80, p. 393–400, 1990.

- KING, M. Animal cytogenetics. In: JONH, B.; GWENT, C. (Ed.) **Chordata 2. Amphibia 4**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1990. p. 1-141 p.
- _____. The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In: GREEN, D.M.; SESSIONS, S. K. (Ed.). **Amphibian Cytogenetic and Evolution**. San Diego: Academic Press, 1991, p. 359-391.
- KURAMOTO, M. A List of Chromosome Numbers of Anuran Amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education**, v.39, n.3, p.83-127, 1990.
- KWET, A.; DI-BERNARDO, M. **Pró- Mata-Anfíbios**. 1. ed. Porto Alegre: Editora Edipucrs, 1999, 107 p.
- LANTYER- SILVA, A. S.F. et al. Análise citogenética de *Rhinella Boulengeri* (Anura: Bufonidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55, 2009, Águas de Lindóia. **Resumos**. Águas de Lindóia: SBG, 2009, p. 107.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. (1964). Nomenclature of centromeric position on chromosomes. **Heredity**, v. 52, p. 201-220, Dec., 1964.
- LOIOLA, M. I. B; ROQUE, A. DE A.; OLIVEIRA, A. C. P. de. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. **Revista Oecologia**. v. 4, p. 14-19, 2012.
- MACIEL, N. M. **Sistemática e biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae)**. 2008. 128f. Tese (Doutorado em Biologia Animal)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- MAGALHÃES- JÚNIOR, A. J.C. **Anurofauna de áreas da caatinga de Pernambuco**. 2009. 112f. Dissertação (Mestrado)- Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- MARES, M. A.; WILLIG, M. R.; LANCHER, JR. The Brazilian Caatinga in South American zoogeography: tropical mammals in a dry region. **Journal of Biogeography**. v. 12, p. 57-69.
- MATSUI, M. et al. Bearing of Chromosome C- banding patterns on the classification of Eurasian toads of the *Bufo bufo* complex. **Amphibia- Reptilia**, Netherlands, v. 6, n.1, p. 24-34, dez. 1985.
- MEDEIROS, L. R. **Estudo citogenético das espécies *Hyla nana* e *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae)**. 2000. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- _____. **Citogenética de *Dendropsophus* (Anura, Hylidae): caracterizações e comparações cromossômicas entre espécies relacionadas**. 2005. 110f. Tese (Doutorado em Biologia celular e estrutural)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.
- MEDEIROS, R. M. et. al. Metodologia de cálculo da temperatura média diária do ar: aplicação para os municípios de Parnaíba, Picos e Gilbués, PI. **Revista brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 6, n.4, p. 283-295, 2012.
- MIURA, I. Two differentiated groups of the Japanese toad, *Bufo japonicas japonicas*, demonstrated by C- banding analysis of chromosomes. **Caryologia**, v. 48, p. 123-136, 1995.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE- MMA. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação.** Brasília, 2004.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Monitoramento do bioma Caatinga 2008-2009-** Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite. Brasília, jun. 2011.

MONTI, R.; CARDELLO, L. Bioquímica do veneno de anfíbios. In: BARRAVIERA, B. (Ed.). **Venenos Animais: uma visão Integrada.** Rio de Janeiro: Editora de Publicações científicas, 1994. p. 225-221.

NUNES, R. R. A.; FAGUNDES, V. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hyllinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 23, p. 21-36, 2008.

OLIVEIRA, B. D. **Caracterização citogenética e morfométrica em populações de *Leptodactylus fuscus* SCHNEIDER, 1799 e *Leptodactylus latrans* STEFFEN, 1815 (Anura, Leptodactylidae) em áreas de caatinga do estado de Sergipe.** 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Núcleo de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Pró- Reitoria de Pós- Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

OLIVEIRA, H. H. P. **Diversidade genética de Hilídeos do Brasil Central.** 2012. 72f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

OLIVEIRA, J.C. D. et al. Frequência e ocorrência de vegetais na dieta de *Rhinella jimi* (Anura, Bufonidae) Cuité, Paraíba, Brasil. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 10, n.2, p. 90-95, abr- jun, 2014.

ORR, R. T. **Biologia dos vertebrados.** 5. ed. São Paulo: Editora Roca, 1986, 508 p.

PAULA, A. de. **Estrutura e dinâmica de uma comunidade de anuros no hotspot de biodiversidade do Cerrado.** 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

PERES, W. A. M.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 222-226, 2008.

PORTELA, G. L. F. et al. Zoneamento climático da cultura da mangueira no estado do Piauí. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.4, p. 1036-1039, 2008.

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

POUGH, F.H; JANIS, C.M; HEISER, J.B. 2008. **A vida dos vertebrados.** 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu , 2008, 684p.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.146, n. 3, p. 407-452, Mar. 2006.

PRAMUK, J. B., et al. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). **Global Ecology and Biogeography**, n. 17, p. 72-83. 2008.

RABER, S. C. **Caracterização cromossômica de *Hyla bischoffi* e *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae)**. 2000. 39f. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2000.

SANTANA, A.S.; JUNCÁ, F. A. Dieta de *Physalaemus* cf. *cicada* (Leptodactylidae) e *Bufo granulatus* (Bufonidae) em uma floresta semidecídua. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 125 – 131, 2007.

SANTOS, E. J. **Diversidade de anfíbios anuros em fragmentos de floresta estacional semidecidual**. 2013. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SANTOS, R.M.L. et al. Differential staining and microchromosomal variation in karyotypes of four Brazilian species of Tupinambinae lizards (Squamata: Teiidae). **Genetica**, v. 134, p. 261–266, 2008.

SCHIMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Consecutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, v. 66, p. 361-368. 1978.

SCHMID, M. et al. Chromosome banding in Birkhauser Verlag, 1990, p. 21-45.

SEGALLA, M. V. et al. List of species. SBH- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Hepertologia Brasileira**, v.3, n.2, p. 37-48. 2014. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2016.

SILVA, D. J. S. **Análise citogenética e morfométrica em populações de *Rhinella pombali* (Baldissera Jr., Caramaschi e Haddad, 2004) e *Rhinella crucifer* (Wied- Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae)**. 2010. 65f. Dissertação (*Magister Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA- SBH. **Lista de anfíbios do Brasil**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>> Acesso em: 10 out. De 2015.

STEVAUX, M.N. A new species of *Bufo* Laurenti (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, 2002, v.19, sup. 1, p.235-142,2002.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.74, p.304-306, 1972.

_____. **Chromosome banding**. 1. ed. London: Unwin Hyman, 1990, 434p.

VALENCIA, E. F. T. **Estudo citogenético do Jacaré de papo amarelo (*Caiman latirostris*, Daudin)**. 1993. 71f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1993.

VERONESE, L.B.; FREITAS, T.R.O.; KRAUSE, L. Cytogenetic studies of four Brazilian species of lizards (Squamata, Teiidae). **Caryologia**, v. 56, p. 107–114, 2003.

VIDAL, C. L. R. **Disponibilidade e gerenciamento Sustentável do Aquífero Serra Grande no Município de Picos- Piauí.** 2003. 208f. Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

VIEIRA, D.M.L. **Taxonomia e filogenia molecular de *Rhinella margaritifera* (Amphibia, Anura, Bufonidae) da Amazônia Brasileira.** 2010. 123f. Dissertação (Mestrado)-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
 () Dissertação
 (X) Monografia
 () Artigo

Eu, Maria Rita dos Santos Cândido,
 autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de
 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar,
 gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação
Caracterização cromossômica da espécie *Rhinella jimi*
(Stevaux, 2002) (Amura, Bufonidae) da região de Picos - Piauí
 de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título
 de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 19 de Abril de 2016.

Maria Rita dos Santos Cândido
 Assinatura

Maria Rita dos Santos Cândido
 Assinatura