

## CONSTITUIÇÃO CROMOSSÔMICA E MECANISMO DE DETERMINAÇÃO DO SEXO EM OFÍDIOS SUL-AMERICANOS. I. ASPECTOS CARIOTÍPICOS

WILLY BEÇAK

Secção de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Estudos sobre a constituição cromossômica dos ofídios são relativamente escassos. Dentre os trabalhos citológicos realizados em vários grupos de répteis, são poucos os que se referem especialmente às serpentes (Tabela 1).

### COLUBRIDAE

O primeiro trabalho referente à constituição cromossônica de ofídios é o de Thatcher (1922), que descreve a espermatogênese de *Tamnophis butleri*, onde encontrou células com número diplóide de 37 cromossomos. Os cromossomos sexuais no macho seriam XXY e na primeira divisão de maturação o duplo X separar-se-ia, por disjunção, do Y.

Em contraste com êsses resultados, Nakamura (1927, 1928, 1929) verificou em *Natrix tigrina*, *Elaphe quadrivirgata* e *Elaphe climacophora*, que o macho era homogamético em relação aos cromossomos sexuais (XX). Em *Natrix tigrina* encontrou  $2n = 40$  cromossomos, sendo 10 metacêntricos, 6 acrocêntricos e 24 microcromossomos. Em *Elaphe quadrivirgata* e *Elaphe climacophora* descreveu  $2n = 36$ , com 10 metacêntricos, 6 acrocêntricos e 20 microcromossomos.

Matthey (1931) descreveu os cariotípicos de *Tropidonotus natrix* (*Natrix natrix*), *Tropidonotus viperinus* (*Natrix maura*), *Zamenis gemonensis* (*Coluber gemonensis*), *Coronella austriaca* e *Tarbophis fallax* (*Telescopus fallax*), onde encontrou  $2n = 36$ , sendo 8 metacêntricos, 8 acrocêntricos e 20 microcromossomos. Segundo Nakamura, porém, existiriam 10 metacêntricos e não 8 em cada complexo. Em *Coelopeltis lacertina* (*Malpolon monspessulanus monspessulanus*) Matthey (1931) encontrou  $2n = 42$ , com 6 metacêntricos, 14 ou 16 acrocêntricos e 22 ou 20 microcromossomos.

Nakamura (1935) estudou os cariotípicos de *Dinodon rufozonatum* e *Macropistodon rufus carinatus*, que apresentam  $2n = 46$ , com 2 metacêntricos, 14 acrocêntricos e 30 microcromossomos. Em *Holarchus formosanus* e *Zaocys nigromarginatus oshimai* encontrou  $2n = 36$ , com 10 metacêntricos, 6 acrocêntricos e 20 mi-

TABELA 1 — RESUMO DAS CONSTITUIÇÕES CROMOSSÓMICAS (NÚMERO 2n)

Espécie *	Sexo estudado	2n
<b>COLUBRIDAE</b>		
<i>Coelopeltis lacertina</i> ( <i>Malpolon monspessulanus monspessulanus</i> ) .....	Macho	42
<i>Coronella austriaca</i> .....	Macho	36
<i>Dinodon rufozonatum</i> .....	Macho	46
<i>Elaphe quadrivirgata</i> .....	Macho	36
<i>Elaphe climacophora</i> .....	Macho	36
<i>Holarchus formosanus</i> .....	Macho	36
<i>Lycodon aulicus</i> .....	Macho	36
<i>Macropistodon rudis carinatus</i> .....	Macho	46
<i>Natrix rhombifera</i> .....	Macho e fêmea	36
<i>Natrix stolata</i> .....	Macho	36
<i>Natrix tigrina</i> .....	Macho	40
<i>Oligodon arnensis</i> .....	Macho	46
<i>Ptyas mucosus</i> .....	Macho	34
<i>Tarbophis fallax</i> ( <i>Telescopus fallax</i> ) .....	Macho	36
<i>Tamnophis butleri</i> .....	Macho	37
<i>Tropidonotus natrix</i> ( <i>Natrix natrix</i> ) .....	Macho	36
<i>Tropidonotus viperinus</i> ( <i>Natrix maura</i> ) .....	Macho	36
<i>Zamenis gemonensis</i> ( <i>Coluber gemonensis</i> ) .....	Macho	36
<i>Zaocys nigromarginatus oshimai</i> .....	Macho	36
<b>ELAPIDAE</b>		
<i>Bungarus caeruleus</i> .....	Macho	44
<i>Bungarus multicinctus</i> .....	Macho	36
<i>Naja naja atra</i> .....	Macho	38
<b>HYDROPHIDAE</b>		
<i>Laticauda semifasciata</i> .....	Macho	38
<b>VIPERIDAE</b>		
<i>Vipera aspis</i> .....	Macho	42
<i>Vipera berus sachaliensis</i> .....	Macho	36
	Macho e fêmea	36
<b>CROTALIDAE</b>		
<i>Agkistrodon acutus</i> .....	Macho	36
<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i> .....	Macho	36
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i> .....	Macho	36
<i>Trimeresurus gramineus stejnegeri</i> .....	Macho	36
<i>Trimeresurus flavoviridis</i> .....	...	36
<i>Trimeresurus okinawensis</i> .....	...	36

\* Os nomes de espécies que constam entre parênteses são os atualmente adotados em substituição aos originalmente descritos nos trabalhos mencionados (Hoge, 1964).

## E TIPOS) DE OFÍDIOS, RELATADAS NA LITERATURA

Macrocrossomos	Micro-cromossomos	Nº fundamental	Autores
20 ( 6 M + 14 A)	22	48	Matthey (1931)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Matthey (1931)
16 ( 2 m + 14 A)	30	48	Nakamura (1935)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Nakamura (1927, 1928, 1935)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Nakamura (1929, 1935)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Nakamura (1935)
16 (12 M + 4 A)	20	48	Bhatnagar (1961)
16 ( 2 M + 14 A)	30	48	Nakamura (1935)
34 (20 M + 14 A)	2	70 ou 72	Van Brink (1959)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Bhatnagar (1960)
16 (10 M + 6 A)	24	50	Nakamura (1927, 1928)
24 (24 A)	22	46	Bhatnagar (1959)
16 (8 M e S + 8 A)	18	42	Bhatnagar (1960)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Matthey (1931)
...	..	..	Thácher (1922)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Matthey (1931), Muldal (1948)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Matthey (1931)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Matthey (1931)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Nakamura (1935)
24 ( 2 M + 22 A)	20	46	Bhatnagar (1960)
22 ( 4 M + 18 A)	14	40	Nakamura (1935)
14 (10 M e S + 4 A)	24	48	Nakamura (1935)
14 ( 8 M + 6 A)	24	46	Nakamura (1935)
22 ( 4 M + 18 A)	20	46	Matthey (1928, 1929, 1931, 1933)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Makino & Momma (1949)
16	20		Köbel (1962)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Nakamura (1935)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Nakamura (1927, 1935)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Nakamura (1935)
16 (10 M + 6 A)	20	46	Nakamura (1935)
...	..	..	Momma (1948), Makino & Momma (1949)
...	..	..	Momma (1948), Makino & Momma (1949)

M = Cromossomos metacêntricos

S = Cromossomos submetacêntricos

A = Cromossomos acrocêntricos

crocromossomos. Van Brink (1959) descreveu em mitoses de embriões de *Natrix rhombifera*  $2n = 36$ , com 20 metacêntricos, 14 acrocêntricos e 2 microcromossomos. Bhatnagar (1959, 1960b, 1961) estudou os cariotípos de *Oligodon arnensis*  $2n = 46$ , com 24 acrocêntricos e 22 microcromossomos, *Ptyas mucosus*  $2n = 34$ , com 8 metacêntricos e submetacêntricos, 8 acrocêntricos e 18 microcromossomos, *Natrix stolata*  $2n = 36$ , com 10 metacêntricos, 6 acrocêntricos e 20 microcromossomos e *Lycodon aulicus*  $2n = 36$ , com 12 metacêntricos, 4 acrocêntricos e 20 microcromossomos.

Esses dados podem ser resumidos, classificando-se as espécies estudadas pela fórmula cromossômica, que compreende o número e forma dos cromossomos e pelo número fundamental (Matthey, 1949).

- 1) N.F. = 46;  $2n = 34$  ( $6 M + 2 S + 8 A + 18 m$ ), fórmula apresentada por *Ptyas mucosus*, representando M os macrocromossomos metacêntricos, S os submetacêntricos, A os acrocêntricos e m os microcromossomos.
- 2) N.F. = 46;  $2n = 36$  ( $10 M + 6 A + 20 m$ ), característica da maioria das espécies de ofídios estudados, cujo número de base N.B. é 36: *Coluber gemmensis*; *Coronella austriaca*; *Elaphe climacophora*; *Elaphe quadrivirgata*; *Holarchus formosanus*; *Natrix maura*; *Natrix natrix*; *Natrix stolata*; *Telescopus fallax*; *Zaocys nigromarginatus oshimai*.
- 3). N.F. = 46;  $2n = 46$  ( $24 A + 22 m$ ), característica de *Oligodon arnensis*.
- 4) N.F. = 48;  $2n = 42$  ( $6 M + 14 A + 22 m$ ), em *Malpolon monspessulanus monspessulanus*.
- 5) N.F. = 48;  $2n = 46$  ( $2 M + 14 A + 30 m$ ), apresentado por *Macropistodon rudis carinatus* e *Dinodon rufozonatum*.
- 6) N.F. = 50;  $2n = 40$  ( $10 M + 6 A + 24 m$ ), típica de *Natrix tigrina*.
- 7) N.F. = 70 ou 72;  $2n = 36$  ( $20 M + 14 A + 2 m$ ), descrita em *Natrix rhombifera*, apresenta N.F. marcadamente diferente e superior ao encontrado em outros ofídios e mesmo em espécies correlatas como *Natrix maura*, *Natrix natrix* e *Natrix tigrina*, com N.F. de 46 nas duas primeiras espécies e 50 na última. Essa diferença parece-nos, pelo menos em parte, devida ao fato dessas espécies terem sido estudadas só na meiose, enquanto que em *Natrix rhombifera* a determinação foi baseada no estudo de células mitóticas. Nas células somáticas, dependendo da técnica, os cromossomos metafásicos apresentam-se mais distendidos e a estrutura, relativamente mais delicada, permite uma localização mais precisa do centrômero. Na meiose é, às vezes, impossível distinguir nitidamente a presença do braço menor num acrocêntrico, enquanto que na mitose, geralmente, o braço menor é mais evidente. Essa diferença pode ser responsável pela discrepância do número fundamental determinado em *Natrix rhombifera* em relação ao descrito nas outras espécies de *Natrix*.

## ELAPIDAE

Nakamura (1935) descreveu o cariótipo de *Bungarus multicinctus* e *Naja naja atra*. Na primeira encontrou  $2n = 36$ , com 4 metacênicos, 18 acrocênicos e 14 microcromossomos e na segunda  $2n = 38$ , com 6 metacênicos, 4 submetacênicos, 4 acrocênicos e 24 microcromossomos. Bhatnagar (1960a) encontrou em *Bungarus caeruleus*  $2n = 44$ , com 2 metacênicos, 22 acrocênicos e 20 microcromossomos.

Resumindo, as espécies estudadas apresentam as seguintes fórmulas e números fundamentais:

- 1) N.F. = 40;  $2n = 36$  (4 M + 18 A + 14 m), apresentada por *Bungarus multicinctus*.
- 2) N.F. = 46;  $2n = 44$  (2 M + 22 A + 20 m), em *Bungarus caeruleus*.
- 3) N.F. = 48;  $2n = 38$  (4 M + 6 S + 4 A + 24 m), descrita em *Naja naja atra*.

## HYDROPHIDAE

Nakamura (1935) descreveu o cariótipo de *Laticauda semifasciata*, encontrando  $2n = 38$ , com 8 metacênicos, 6 acrocênicos e 24 microcromossomos.

- 1) A fórmula de *Laticauda semifasciata* é: N.F. = 46;  $2n = 38$  (8 M + 6 A + 24 m).

## VIPERIDAE

Matthey (1928, 1929), na espermatogênese de *Vipera aspis*, encontrou  $2n = 41$ , com 21 macrocromossomos e 20 microcromossomos. De suas preparações, conclui que a fórmula sexual do macho deveria ser XO, mas em 1931 estudando novas preparações renuncia a essa hipótese, concluindo que o número diplóide é de 42, com 4 metacênicos, 18 acrocênicos e 20 microcromossomos.

Makino e Momma (1949), em *Vipera berus sachaliensis*, observaram  $2n = 36$ , com 10 metacênicos, 6 acrocênicos e 20 microcromossomos, o que foi confirmado por Köbel (1962), que observou um par heteromórfico na fêmea.

Nessa família ocorrem, pois, 2 tipos de fórmulas:

- 1) N.F. = 46;  $2n = 36$  (10 M + 6 A + 20 m), que é a mais comum nos ofídios, sendo encontrada em *Vipera berus*.
- 2) N.F. = 46;  $2n = 42$  (4 M + 18 A + 20 m), em *Vipera aspis*.

## CROTALIDAE

Nakamura (1927, 1935) descreveu os cariótipos de *Agkistrodon halys blomhoffi*, *Agkistrodon acutus*, *Trimelerurus mucrosquamatus* e *Trimelerurus gramineus*

*stejnegeri*, tôdas com  $2n = 36$ , com 10 metacêntricos, 6 acrocêntricos e 20 microcromossomos. Makino e Momma (1949) também encontraram em *Trimeresurus flavoviridis* e *Trimeresurus okinawensis*  $2n = 36$ .

- 1) Tôdas as CROTALIDAE de cuja constituição cromossômica temos conhecimento apresentam a mesma fórmula já citada: N.F. = 46;  $2n = 36$  (10 M + 6 A + 20 m).

#### MATERIAL E MÉTODOS

**ANIMAIS** — Os ofídios provieram de várias localidades do Brasil, principalmente do sul, conforme discriminação no texto. Os exemplares classificados e identificados, após retirada do material, foram incorporados à Coleção do Instituto Butantan.

**MEIOS DE CULTURA E DROGAS** — Para as culturas de sangue usamos o meio 199 (Difco) liofilizado ou meio que preparamos com a seguinte composição: 0,5 g de hidrolisado de caseína; 0,1 g de glutamina; 0,01 g de cloreto de cisteína; 0,025 g de ácido ascórbico; 960 ml de solução de Earle; 1 ml de solução de complexo B (0,1% de nicotinamida, 0,1% de cloreto de piridoxina, 0,1% de tiamina, 0,1% de ácido paraaminobenzólico, 0,1% de pantotenato de cálcio, 0,1% de colina e 0,01% de riboflavina); 1 ml de biotina a 0,1%; 1 ml de ácido fólico a 0,1% em  $\text{NaHCO}_3$  a 2,8%. A êste meio adicionou-se 40 ml de vermelho de fenol a 0,05% em  $\text{NaHCO}_3$  a 0,55%.

Os meios foram esterilizados por filtração sob pressão, em Seitz EK, distribuídos em frascos e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de ser utilizado, acrescentou-se 100 U.I. de penicilina, 100  $\mu\text{g}$  de estreptomicina e 20  $\mu\text{g}$  de micostatina por ml de meio.

Outras drogas utilizadas: Heparina Vitrum, solução a 5% contendo 5.000 U.I. por ml, diluída a 1:25 em meio de cultura; Bacto-Phytohemagglutinin M e P, Difco, reidratada com água bidestilada; Colcemid Ciba, diluída a  $1 \times 10^{-4}$  M em água bidestilada.

**CULTURA TEMPORÁRIA DE LEUCÓCITOS** — Para o estudo dos cromossomos nas células somáticas de ofídios desenvolvemos um método baseado no utilizado para os cromossomos humanos (Beçak, Beçak e Nazareth, 1962a, b; 1963a, b).

Os animais eram sacrificados por inoculação intracerebral de álcool. O sangue, coletado com seringa heparinizada (0,1 mg por ml), era transferido para tubo de ensaio, misturado com fito-hemaglutinina (0,01 ml por ml), mantido em água gelada por 60 minutos e em seguida centrifugado a 400 rpm, durante 5 minutos. O plasma, contendo os leucócitos, era misturado ao meio de cultura de modo que o meio final contivesse 1 a  $2 \times 10^6$  células por ml e 30% de plasma. Quando a quantidade de plasma era insuficiente, procedímos a nova centrifugação do sangue a 2.000 rpm, durante 5 minutos e com o sobrenadante completávamos o volume. O pH era ajustado a 7,2 com gás carbônico ou solução de bicarbonato de sódio a 5%, fazendo-se então o controle de esterilidade. As culturas eram distribuídas em aliquotas de 10 ml em tubos de ensaio  $15 \times 16$ , fechados com rolhas não tóxicas, de látex puro, incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  e ajustadas quanto ao pH. As culturas eram feitas sempre simultaneamente em dois ou mais tubos, para controle de eventuais alterações *in vitro*. Após 72 horas de incubação, a atividade mitótica nas culturas encontrava-se no máximo. Adicionávamos então Colcemid na concentração final de  $1 \times 10^{-6}$  M. Após um período de seis horas, as culturas eram transferidas a

tubos siliconizados e centrifugadas a 900 rpm, durante cinco minutos. O sobrenadante era removido, deixando-se em cada tubo 1 ml de meio, no qual o sedimento era ressuspenso. A essa suspensão juntávamos 4 ml de água bidestilada, resultando uma solução hipotônica na qual as células eram mantidas durante dez minutos à temperatura ambiente. A suspensão era centrifugada a 700 rpm durante cinco minutos, sendo o sobrenadante removido. Ao sedimento era lentamente adicionado 2 a 4 ml de fixador fresco, constituído de três partes de álcool metílico e uma parte de ácido acético glacial. O material era fixado no mínimo durante uma hora, sendo a seguir ressuspenso com pipeta siliconizada. Após nova centrifugação a 900 rpm, durante cinco minutos, o sobrenadante era substituído por 0,5 a 1 ml de fixador novo. O material em tubo herméticamente arrolhado pode ser mantido por mais de um mês em geladeira sem alteração aparente. Ao utilizá-lo após certo tempo, porém, o fixador velho deve ser substituído por igual volume de fixador fresco. A suspensão final era gotejada em lâminas limpas e previamente imersas em água destilada gelada. Retirado o excesso de fluido com auxílio de um papel de filtro, as lâminas eram ligeiramente aquecidas para secagem do material, sendo depois submetidas a coloração.

**TÉCNICA DE ESMAGAMENTO** — Para o estudo citogenético das gônadas e eventualmente de outros tecidos utilizamos um método direto: uma solução de colchicina a 0,5% era injetada na serpente, na proporção de 1 ml por 100 g, por via subcutânea. Após 1 a 2 horas o animal era sacrificado, procedendo-se à retirada das gônadas e outros órgãos a serem estudados. O material, cortado em fragmentos de  $\pm$  2 mm, era imerso em água bidestilada gelada, durante 15 minutos. Após esse tratamento hipotônico, a fixação era feita numa solução de ácido acético glacial a 50%, durante 15 a 30 minutos. O material fixado era transferido para lâminas limpas, onde era distribuído homogêneamente. As lâminas eram cobertas com lamínulas siliconizadas 24 $\times$ 32 mm e o material esmagado por pressão sobre a lamínula. Após seleção das melhores preparações, em microscópio de contraste de fase, as lâminas eram resfriadas por meio de jatos de gás carbônico e as lamínulas destacadas com ajuda de uma lâmina de barbear. A siliconização prévia das lamínulas auxilia a dispersão e achatamento das células, assim como diminui a adesão das células às lamínulas, quando estas são destacadas. As lâminas, contendo o material, eram submetidas à coloração.

**INCLUSÃO EM PARAFINA** — Além dos métodos acima descritos, utilizamos também as técnicas clássicas de cortes histológicos, de material incluído em parafina. Cérebro e gônadas eram fixados numa solução de Bouin Allen durante duas horas a 37°C, passados na série de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos eram cortados na espessura de 3 e 5  $\mu$  e os cortes submetidos à coloração.

**COLORAÇÃO** — *Coloração sem hidrólise:*

- a) Hematoxilina eosina (fórmula de Harris) era utilizada para cortes histológicos de gônadas e cérebro.
- b) Orceína acética. Foi o método mais utilizado para o estudo de metáfases somáticas de células cultivadas. As lâminas eram imersas durante 30 minutos numa solução de orceína sintética (Merck) a 1%, em ácido acético a 65%. Após passagem rápida em álcool 95%, álcool absoluto e toluol, as lâminas eram montadas. Essa coloração é satisfatória para contagem e identificação dos cromossomos somáticos. Apresenta a vantagem de conservar-se por tempo relativamente longo; após dois anos as preparações apresentam-se ainda perfeitamente coradas.

*Coloração com hidrólise:*

As preparações eram hidrolisadas em HCl N a 60°C durante 8 a 10 minutos, lavadas em água destilada gelada e coradas, segundo o objetivo e o tipo de material.

a) Azul de toluidina. A fórmula é constituída de 1 g de azul de toluidina, 0,5 g de carbonato de lítio, 75 ml de água destilada, 20 ml de glicerina e 5 ml de álcool etílico a 95%. Após coloração durante 10 minutos, as lâminas eram enxaguadas em água destilada e sêcas à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Essa secagem evita a passagem pelo álcool, que retira parte do corante dos cromossomos. Em seguida as lâminas eram passadas rapidamente pelo toluol e montadas. Essa coloração permite boa resolução dos cromossomos, mas a descoloração é relativamente rápida.

b) Azul de Unna. Esse corante sob a forma de solução (R.A.L.-Paris) era diluído 1:4 em água destilada. Coradas durante 10 minutos, as lâminas eram sêcas por 10 minutos à temperatura ambiente, passadas em toluol e montadas. Essa coloração é delicada e aconselhável para o estudo morfológico dos cromossomos, mas descora rapidamente.

c) Fucsina básica ou vermelho Magenta. Solução aquosa a 0,25%. As preparações eram coradas durante 1 minuto, lavadas em água destilada e sêcas à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após passagem pelo toluol, as lâminas eram montadas. Essa coloração é intensa, o que facilita as contagens cromossômicas, mas grosseira e por isso foi utilizada só excepcionalmente.

d) Giemsa. A fórmula que utilizamos contém 0,5 g de Giemsa em pó, 33 ml de glicerina e 33 ml de metanol. Os recipientes usados devem estar isentos de umidade a qual alteraria o corante em poucos dias. As preparações eram coradas durante 10 minutos na solução prèviamente amadurecida por uma semana e filtrada. Após a coloração, as lâminas eram enxaguadas em água corrente, sêcas à temperatura ambiente por 10 minutos e após passagem pelo toluol eram montadas. Essa coloração é intensa e excelente para o estudo de material meiótico. Após alguns meses, no entanto, observa-se descoloração nas preparações.

e) Feulgen. As preparações eram tratadas durante 90 minutos no reativo de Schiff amadurecido (1 g de fucsina básica pulverizada (Merck), 200 ml de água destilada, 20 ml de HCl normal, 1 g de bissulfito de sódio anidro). Em seguida as lâminas eram passadas em três banhos (2 minutos cada) de água sulfurosa recentemente preparada (200 ml de água destilada, 10 ml de uma solução aquosa a 10% de bissulfito de sódio anidro e 10 ml de HCl normal). Após desidratação em álcool 90% e absoluto, as lâminas eram enxaguadas em toluol e montadas. Essa técnica é seletiva do ADN e portanto excelente para estudos citogenéticos, em especial no que se refere à heteropienose dos cromossomos. A reação de Feulgen produz coloração delicada, mas é, às vezes, pouco intensa, o que pode ser compensado com os recursos da microscopia de contraste de fase.

MICROFOTOGRAFIA — O material era examinado ao microscópio, selecionando-se as melhores metáfases que eram então desenhadas e fotografadas. O exame óptico foi realizado em microscópio Zeiss com objetiva de imersão Neofluar 100× e ocular 8×. Para as fotografias empregamos um fotomicroscópio Zeiss com objetiva de imersão apocromática 100×, ocular projetiva 3,2, Optovar 1,25×, contraste de fase, lâmpada de mercúrio, filtro verde VG9 e filme Microfile Kodak (35 mm). O aumento final nas ampliações fotográficas era de aproximadamente 3.000 vezes.

Após contagem e análise dos cromossomos nos desenhos e nas fotografias, as ampliações eram recortadas, os cromossomos dispostos em pares, ordenados em tamanho decrescente e montados em cartolina.

MEDIDAS — Os cromossomos de ofídios podem ser geralmente classificados em dois grupos. No primeiro, que consideramos como macrocromossomos, os cromossomos caracterizam-se pelo tamanho relativamente grande, o que permite a medida dos seus parâmetros, sendo fácil a disposição em pares. No segundo grupo, que consideramos como microcromossomos, estão os que, apesar do gradiente de tamanho, se caracterizam por terem dimensões muito reduzidas que dificultam a distinção entre os mesmos e torna praticamente impossível a medida de seus parâmetros.

A classificação em macrocromossomos e microcromossomos é fácil, na maior parte dos cariotipos estudados. No entanto, em certas espécies essa separação não é muito nítida, adotando-se nesses casos um critério arbitrário de classificação, por comparação com outras espécies.

Para efeito de caracterização e pareamento dos cromossomos utilizamos três medidas:

- A) Comprimento relativo do cromossomo. Percentagem expressa em função do comprimento total dos macrocromossomos duma célula diplóide contendo dois cromossomos Z. Os microcromossomos não foram considerados para efeito de medição devido a seu tamanho reduzido.

$$A = \frac{\text{comprimento do cromossomo} \times 200}{\text{comprimento total do genoma } (2n)}$$

- B) Proporção dos braços. Relação de tamanho entre os braços dos cromossomos. Varia de 1 a  $\infty$ , correspondendo 1 a um cromossomo metacêntrico e  $\infty$  a um cromossomo que fosse telocêntrico.

$$B = \frac{\text{comprimento do braço maior}}{\text{comprimento do braço menor}}$$

- C) Índice centromérico. Obtido pela proporção do braço curto em relação ao comprimento do cromossomo e indica a posição do centrômero. Varia de 0 a 0,50 correspondendo 0 a um centrômero que fosse terminal e 0,50 a um centrômero absolutamente mediano.

$$C = \frac{\text{comprimento do braço curto}}{\text{comprimento do cromossomo}}$$

Os dados que constam nas tabelas para cada espécie foram obtidos pela média aritmética das medidas lineares dos macrocromossomos de 10 metáfases somáticas, em geral, quando possível de 5 células de macho e 5 células de fêmea.

Adotamos o seguinte critério de classificação morfológica dos cromossomos: metacêntrico, mediocêntrico ou com centrômero mediano,  $B \leq 1,5$ ,  $C > 0,40$ ; submetacêntrico, submediocêntrico ou com centrômero submediano  $B = 1,5$  a 2,0,  $C = 0,33$  a 0,40; acrocêntrico ou com centrômero subterminal,  $B \geq 2,0$ ;  $C < 0,33$ .

Nas espécies que apresentam heteromorfismo dos cromossomos sexuais na fêmea, para possibilitar a uniformização e comparação dos índices referentes ao macho e a fêmea, o comprimento relativo dos cromossomos em ambos os sexos foi

expresso em função do comprimento total dos macrocromossomos de uma célula diplóide contendo dois Z.

### ANÁLISE CITOLÓGICA

Apresentamos a seguir os resultados do estudo cromossômico de vinte espécies de serpentes das famílias BOIDAE, CROTALIDAE e COLUBRIDAE.

#### BOIDAE

##### *Boa constrictor amarali* (Stull)

O estudo citogenético foi realizado em material obtido de culturas de sangue de dois machos e três fêmeas: Macho, Cultura n.º 127, sem procedência; Macho, Cultura n.º 294, Coleção I.B. n.º 22.661, procedente de Santa Cruz do Rio Pardo, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 177, sem procedência; Fêmea, Cultura n.º 201; Coleção I.B. n.º 21.529; procedente de Barra Bonita, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 209; Coleção I.B. n.º 21.591, procedente de Nogueira, Estado de Santa Catarina).

TABELA 2

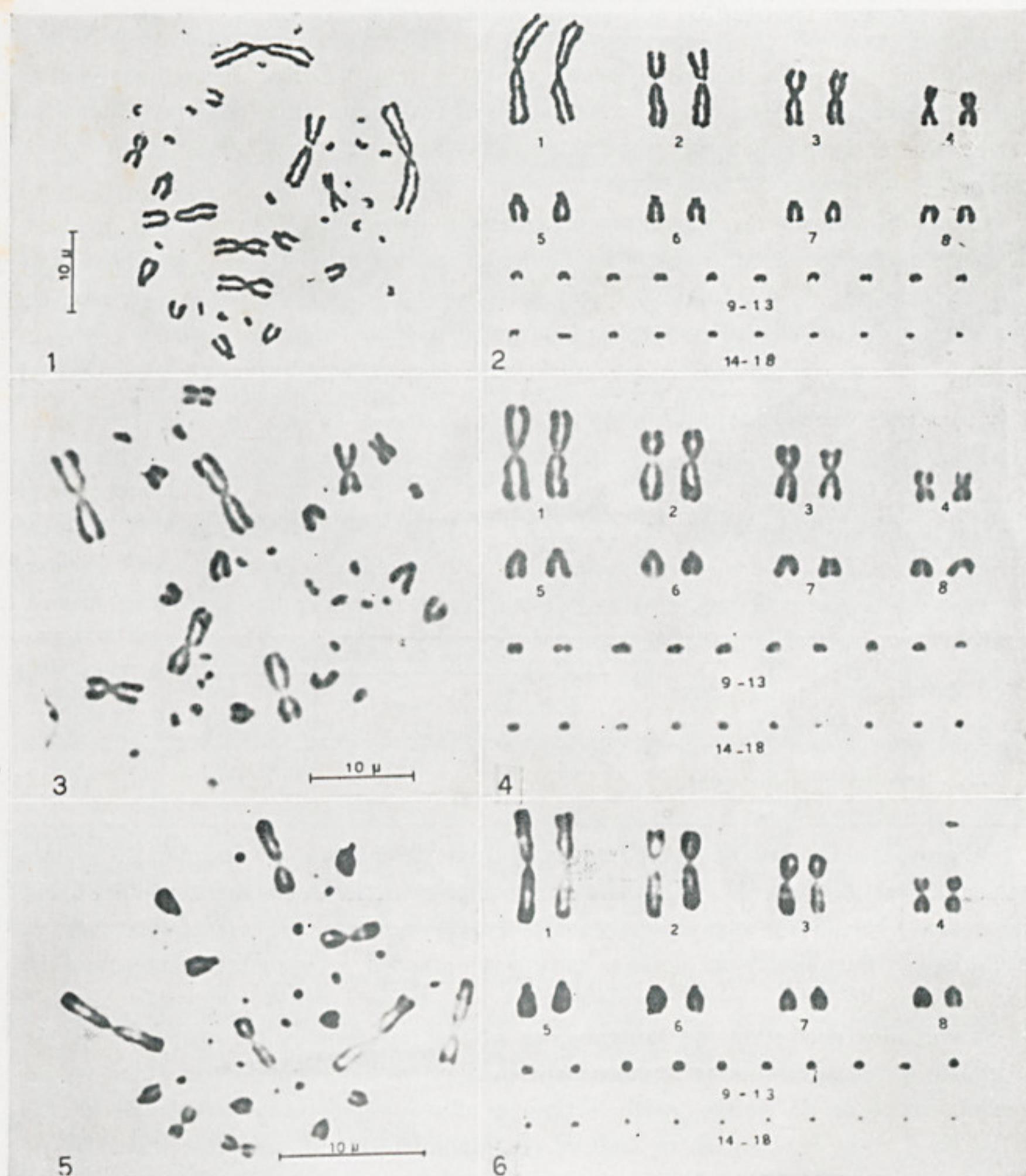
Cultura n.º	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		35	36	37	
127	Macho	1	26	—	27
294	Macho	2	15	—	17
177	Fêmea	—	6	—	6
201	Fêmea	2	30	—	32
209	Fêmea	—	29	—	29
Total .....		5	106	—	111

Foram selecionadas e examinadas nas preparações citológicas 111 metáfases mitóticas, sendo 44 células de machos e 67 de fêmeas (Tabela 2). A análise cariotípica demonstrou que nessa espécie, em ambos os sexos, ocorrem 36 cromossomos (Figs. 1, 3). Dêstes, 16 são macrocromossomos e 20 são microcromossomos. Os macrocromossomos são facilmente distinguidos em oito pares que foram ordenados pelo tamanho e numerados de um a oito. O primeiro, terceiro e quarto pares apresentam centrômero aproximadamente mediano, o segundo par tem o cen-

TABELA 3

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
Comprimento relativo (%) ....	26	21	16	10	9	7	6	5
Relação dos braços .....	1,0	1,5	1,1	1,1	4,2	5,9	6,4	7,0
Índice centromérico .....	0,49	0,40	0,47	0,49	0,20	0,16	0,14	0,13

PRANCHA I



*Legendas das ilustrações* — As fotografias foram obtidas num fotomicroscópio Zeiss, com objetiva de imersão apocromática  $100\times$ , ocular  $3,2\times$ , Optovar  $1,25\times$  e filtro verde VG9.

As figuras 1 a 68 são de células somáticas de culturas de sangue (figs. 61 a 65 são de células somáticas de testículo), coradas pela Orceína acética ou Giemsa e fotografadas em contraste de fase. As ampliações são indicadas pela escala em micra nas figuras de cada espécie e para cada sexo.

*Prancha I* — BOIDAE: — Figs. 1-4: *Boa constrictor amarali* (Jibóia). Fig. 1: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 2: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Fig. 3: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 4: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos.

Figs. 5-6: *Boa constrictor constrictor* (Jibóia). Fig. 5: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 6: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos.

trômero submediano e o quinto, sexto, sétimo e oitavo pares, apresentam centrômero subterminal (Figs. 2, 4). As medidas realizadas pelo critério já exposto correspondem às médias dos parâmetros obtidos de dez metáfases mitóticas de machos e de fêmeas (Tabela 3).

Pela observação dos cariotípos e avaliação quantitativa através das medidas descritas podemos concluir que aparentemente não existe em *Boa constrictor amarali* nenhum par de macrocromossomos morfológicamente distintos, que possam ser considerados como heterocromossomos, tanto no macho como na fêmea.

#### **Boa constrictor constrictor** (Linnaeus)

O estudo dessa subespécie foi baseado num exemplar de sexo masculino: Cultura n.º 246; Coleção I.B. n.º 22.285, procedente de Rondônia, Território de Rondônia.

TABELA 4

Cultura n.º	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
246	Macho	—	19	2	21

Foram analisadas, nas preparações obtidas da cultura de sangue, 21 metáfases somáticas (Tabela 4). O cariotípico de *Boa constrictor constrictor* tem 36 cromossomos (Fig. 5) e êstes apresentam-se quanto a morfologia e medidas, com características semelhantes às de *Boa constrictor amarali*. Os macrocromossomos são em número de 16 e os microcromossomos em número de 20. Quando dispostos e classificados em ordem de tamanho, os macrocromossomos do primeiro, terceiro e quarto pares apresentam-se como metacêntricos, os do segundo par como submetacêntricos, e os do quinto, sexto, sétimo e oitavo pares como acrocêntricos (Fig. 6). Na Tabela 5, constam os índices correspondentes aos tamanhos relativos dos macrocromossomos assim como a proporção dos braços e posição dos centrômeros, nos macrocromossomos.

TABELA 5

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
Comprimento relativo (%) ....	27	21	16	9	9	7	6	5
Relação dos braços .....	1,1	1,5	1,2	1,1	3,9	6,0	11,6	9,8
Índice centromérico .....	0,47	0,40	0,45	0,48	0,21	0,15	0,81	0,09

#### **Eunectes murinus** (Linnaeus)

Foram utilizados dois exemplares, um macho e uma fêmea: Macho, Cultura n.º 303; Coleção I.B. n.º 22.751, procedente de Colina, Estado de São Paulo; Fêmea,

mea, Cultura n.<sup>o</sup> 304; Coleção I.B. n.<sup>o</sup> 22.752, procedente de Barretos, Estado de São Paulo.

TABELA 6

Cultura n. <sup>o</sup>	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
303	Macho	—	28	—	28
304	Fêmea	—	8	—	8
Total .....		—	36	—	36

Foram selecionadas 36 células, 28 de macho e 8 de fêmea (Tabela 6). Em ambos os sexos o número diplóide é 36, dos quais 16 são macrocromossomos e 20 microcromossomos (Figs. 7, 9). Os macrocromossomos foram ordenados em pares, dispostos e numerados pela ordem de tamanho. O primeiro, terceiro e quarto pares são metacêntricos, o segundo par é submetacêntrico e o quinto, sexto, sétimo e oitavo pares são acrocêntricos (figs. 8, 10). Os índices correspondentes ao tamanho dos macrocromossomos, relação de braços e posição do centrómero constam da Tabela 7.

TABELA 7

Pares de cromossomos	N <sup>o</sup> 1	N <sup>o</sup> 2	N <sup>o</sup> 3	N <sup>o</sup> 4	N <sup>o</sup> 5	N <sup>o</sup> 6	N <sup>o</sup> 7	N <sup>o</sup> 8
Comprimento relativo (%) ....	25	21	16	9	9	7	6	6
Relação dos braços .....	1,1	1,5	1,1	1,1	3,9	3,8	2,8	2,4
Índice centromérico .....	0,48	0,40	0,48	0,47	0,21	0,21	0,27	0,30

Na espécie *Eunectes murinus*, à semelhança de *Boa constrictor*, a análise dos cariotípos e medidas permite concluir pela não existência, no que se refere aos cromossomos sexuais, de heterocromossomos em nenhum dos sexos.

#### **Epierates cenchria crassus (Cope)**

Foram escolhidos para estudo cariotípico três exemplares, sendo um macho e duas fêmeas: Macho, Cultura n.<sup>o</sup> 232; Coleção I.B. N.<sup>o</sup> 22.009, procedente de São José dos Campos, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.<sup>o</sup> 248; Coleção I.B.

TABELA 8

Cultura n. <sup>o</sup>	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
232	Macho	—	11	—	11
248	Fêmea	—	6	—	6
290	Fêmea		27	1	32
Total .....		4	44	1	49



Prancha II — BOIDAE: — Figs. 7-10: *Eunectes murinus* (Sucuri). Fig. 7: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 8: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Fig. 9: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 10: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos.

Figs. 11-12: *Epicrates cenchria crassus* (Salamanta). Fig. 11: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 12: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos.

n.º 22.441, procedente da Rodovia BR-29, Estado de Mato Grosso; Fêmea, Cultura n.º 290; Coleção I.B. n.º 22.657, procedente de Jardinópolis, Estado do Paraná.

Nas preparações citológicas selecionamos 49 células, 11 de macho e 38 de fêmeas (Tabela 8). O número diplóide é 36, compreendendo 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos (figs. 11, 13). Os macrocromossomos foram ordenados em pares homólogos e numerados por ordem de tamanho. À semelhança das espécies anteriores, os pares um, três e quatro têm centrômero mediano, o par dois tem centrômero submediano e os pares cinco, seis, sete e oito apresentam centrômero subterminal (figs. 12, 14). A média dos valores relativos obtidos pela medida dos macrocromossomos de células masculinas e femininas constam da Tabela 9. Também nessa espécie, assim como nas anteriores, não foi possível identificar, no que se refere à morfologia dos cromossomos sexuais, heteromorfismo, quer na fêmea, como no macho.

TABELA 9

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
Comprimento relativo (%) ....	26	21	16	9	9	7	7	6
Relação dos braços .....	1,1	1,5	1,1	1,1	4,4	4,6	3,6	3,4
Índice centromérico .....	0,48	0,40	0,48	0,47	0,20	0,19	0,23	0,24

#### **Corallus caninus (Linnaeus)**

Para o estudo citogenético foi utilizado um exemplar macho: Cultura n.º 243; Coleção I.B. n.º 22.220, procedente de Cametá, Estado do Pará.

TABELA 10

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		< 43	44	≥ 45	
243	Macho	—	16	—	16

Foram selecionadas nas preparações citológicas 16 células (Tabela 10), que revelaram, diferentemente das espécies de BOIDAE anteriormente descritas, número diplóide de 44 cromossomos (fig. 15). Quando dispostos em ordem de tamanho, os 24 maiores foram por nós considerados como macrocromossomos, sendo êstes ordenados em pares. Os outros 20 foram agrupados como microcromossomos. Caracteristicamente nessa espécie, todos os macrocromossomos são acrocêntricos (fig. 16). O comprimento relativo dos macrocromossomos, a proporção dos braços e os índices centroméricos constam da Tabela 11.

## PRANCHA III



Prancha III — BOIDAE: — Figs. 13-14: *Epicrates cenchria crassus* (Salamanta). Fig. 13: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 14: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos.

Figs. 15-16: *Corallus caninus* (Cobra papagaio). Fig. 15: Macho. Metáfase;  $2n = 44$  cromossomos. Fig. 16: Macho. Cariótipo com 24 macrocromossomos e 20 microcromossomos.

Infelizmente, não conseguimos obter exemplares do sexo feminino, não sendo, assim, possível tirar conclusões definitivas no que se refere aos cromossomos sexuais e sua morfologia em *Corallus caninus*.

TABELA 11

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8	Nº 9	Nº 10	Nº 11	Nº 12
Comprimento relativo (%) .....	14	13	12	9	8	8	8	7	7	6	5	4
Relação dos braços	9,8	13,9	8,9	4,0	8,7	5,1	3,7	3,1	4,1	3,1	2,5	2,6
Índice centromérico	0,10	0,09	0,10	0,21	0,11	0,19	0,24	0,26	0,24	0,26	0,29	0,29

## CROTALIDAE

*Bothrops jararaca* (Wied)

Foram utilizados um macho e três fêmeas para o estudo citogenético: Macho, Cultura n.º 233; Coleção I.B. n.º 22.010; procedente de Canoinhas, Estado de Santa Catarina; Fêmea, Cultura n.º 188, sem procedência; Fêmea, Cultura n.º 221; procedente de Sorocaba, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 234; Coleção I.B. n.º 22.032; procedente de Canoinhas, Estado de Santa Catarina.

TABELA 12

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
233	Macho	5	35	3	41
188	Fêmea	—	31	—	31
221	Fêmea	1	14	—	15
234	Fêmea	3	10	1	14
Total .....		9	90	4	101

Foram analisadas 101 células, 41 de machos e 60 de fêmeas (Tabela 12). O cariótipo apresenta em ambos os sexos  $2n = 36$  (figs. 17, 19), dos quais 16 são macrocromossomos e 20 são microcromossomos. Os 16 macrocromossomos do macho são facilmente dispostos em oito pares. Os pares um, três e quatro apresentam centrômero mediano, os pares dois, cinco e sete têm centrômero submediano e os pares seis e oito apresentam centrômero subterminal (fig. 18). Na fêmea, 14 dos macrocromossomos correspondem aos sete pares um, dois, três, cinco, seis, sete e oito encontrados no macho. Os dois macrocromossomos que restam diferem morfológicamente entre si, tendo um deles as características do metacêntrico número quatro encontrado no macho, enquanto que o outro é menor, equivalendo em tamanho aos cromossomos dos pares seis e sete. Além disso, a posição relativa do seu centrômero é diferente, localizando-se subterminalmente (fig. 20).

A constância desse aspecto em todas as células femininas permite-nos concluir que em *Bothrops jararaca* o par número quatro é constituído, na fêmea, de hetero-

cromossomos e que o mecanismo de determinação do sexo nessa espécie é macho-ZZ; fêmea-ZW, sendo, portanto, a fêmea heterogamética. O fato do cromossomo W, que aparece sómente na fêmea heterogamética, apresentar 7/10 do tamanho do Z, facilita a identificação citológica dos cromossomos sexuais.

As medidas que caracterizam os cromossomos dessa espécie foram obtidas pelo critério já descrito, mas, para possibilitar a comparação do macho e fêmea, o comprimento relativo dos cromossomos em ambos os sexos, foi expresso em função do comprimento total dos macrocromossomos duma célula diplóide contendo dois Z. As medidas realizadas encontram-se na Tabela 13.

TABELA 13

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	26	21	15	10	7	8	7	7	6
Relação dos braços .....	1,1	1,5	1,2	1,1	3,5	1,6	2,7	1,5	2,3
Índice centromérico .....	0,48	0,40	0,47	0,48	0,23	0,39	0,29	0,41	0,31

#### *Bothrops atrox* (Linnaeus)

Para o estudo citogenético foram utilizados dois exemplares, um macho e uma fêmea: Macho, Cultura n.º 235; Coleção I.B. n.º 22.033; procedente de Santo Anastácio, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 265; Coleção I.B. n.º 22.561; procedente de Araraquara, Estado de São Paulo.

TABELA 14

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
235	Macho	5	51	—	56
265	Fêmea	—	11	—	11
Total .....		5	62	—	67

Foram analisadas 67 células, 56 de macho e 11 de fêmea (Tabela 14). Os cariotípos em ambos os sexos apresentam número diplóide igual a 36 (figs. 23, 25), dos quais 16 são macrocromossomos e 20 são microcromossomos. Dispondo-se, no macho, os macrocromossomos homólogos em pares e ordenando-os pelo tamanho, observou-se que o primeiro, terceiro, quarto e sétimo pares são metacêntricos, o segundo, quinto e oitavo pares são submetacêntricos e o sexto par é acrocentrífico (fig. 24). Nas células femininas o aspecto geral do cariotípico é semelhante. Sete pares (primeiro, segundo, terceiro, quinto, sexto, sétimo e oitavo) correspondem aos do macho. No entanto, em todas as células restam dois macrocromossomos diferentes. Um deles é metacêntrico, semelhante ao do quarto par do macho. O outro é menor, equivalendo em tamanho aos cromossomos dos pares

PRANCHA IV

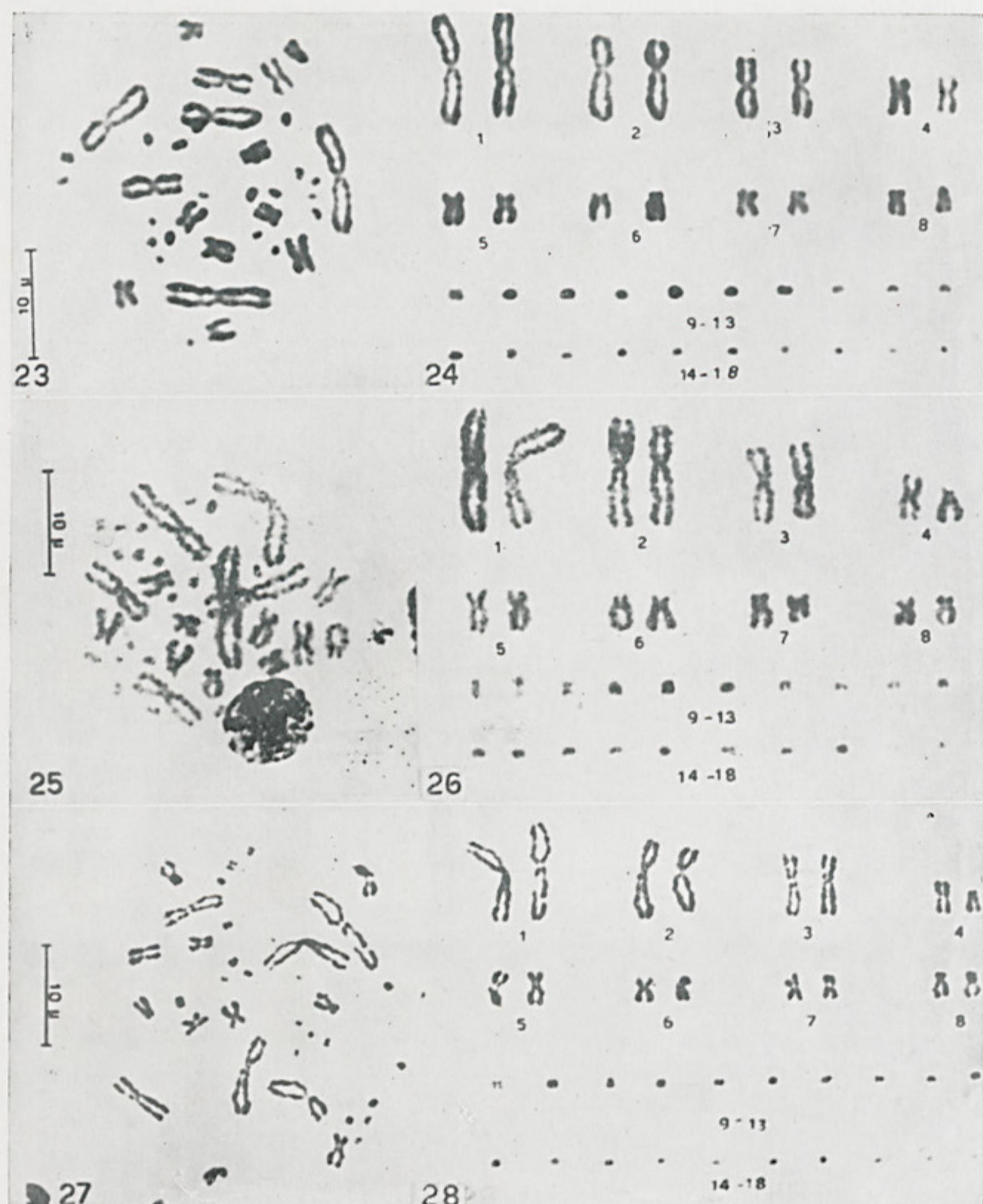


Prancha IV — CROTALIDAE: — Figs. 17-20: *Bothrops jararaca* (Jararaca). Fig. 17: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 18: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. O quarto par é constituído de cromossomos sexuais metacêntricos ZZ.

Fig. 19: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 20: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. O quarto par é constituído de cromossomos sexuais heteromórficos ZW, sendo o Z metacêntrico e o W acrocêntrico e menor.

Figs. 21-22: *Bothrops alternatus* (Urutú). Fig. 21: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 22: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais heteromórficos ZW, correspondem ao par número quatro.

## PRANCHA V



Prancha V — CROTALIDAE: — Figs. 23-26: *Bothrops atrox* (Caiçaca). Fig. 23: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 24: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais ZZ, correspondem ao quarto par. Fig. 25: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 26: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. O quarto par é constituído de cromossomos sexuais heteromórficos ZW.

Figs. 27-28: *Bothrops pradoi*. Fig. 27: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 28: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. O par número quatro é constituído de cromossomos sexuais heteromórficos ZW.

seis e sete, e tem o centrômero subterminal (fig. 26). Esse aspecto permitiu concluir que, à semelhança de *Bothrops jararaca*, o quarto par corresponde aos cromossomos sexuais e que êstes são homomórficos no macho (ZZ) e heteromórficos na fêmea (ZW).

As medidas relativas e índices dos macrocromossomos constam da Tabela 15.

TABELA 15

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	26	21	15	10	6	8	7	7	6
Relação dos braços .....	1,1	1,6	1,1	1,1	2,4	1,6	2,4	1,3	1,6
Índice centromérico .....	0,48	0,39	0,47	0,47	0,29	0,40	0,30	0,44	0,39

#### *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron e Duméril

O estudo citogenético foi realizado num exemplar do sexo feminino: Cultura n.º 354; Coleção I.B. n.º 22.913; procedente de Bebedouro, Estado de São Paulo.

TABELA 16

Cultura n.º	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
354	Fêmea	2	12	—	14

Foram selecionadas 14 células (Tabela 16), tendo sido determinado que o número diplóide dessa espécie é 36 (fig. 21). Dêstes, 16 são macrocromossomos e 20 são microcromossomos. Os macrocromossomos, quando dispostos em pares, constituem sete pares de homólogos, restando dois elementos diferentes. Um dêsses é o quarto em ordem de tamanho, tendo o centrômero mediano, enquanto que o outro é menor e tem centrômero mais terminal. Por analogia com as outras espécies estudadas, do gênero *Bothrops*, êsse par foi considerado como de cromossomos sexuais, heteromorfos, na fêmea (ZW). Quanto aos outros, o primeiro, terceiro e quinto pares apresentam centrômero mediano, o segundo e sétimo têm centrômero submediano e o sexto e oitavo têm centrômero subterminal (fig. 22).

Na Tabela 17 constam o comprimento relativo dos macrocromossomos, a proporção dos seus braços e os índices centroméricos.

TABELA 17

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	23	20	14	11	6	9	8	8	6
Relação dos braços .....	1,0	1,6	1,0	1,0	2,7	1,3	3,3	1,6	2,1
Índice centromérico .....	0,50	0,39	0,50	0,50	0,27	0,43	0,23	0,38	0,33

**Bothrops jararacussu** Lacerda

Foram utilizados dois exemplares, sendo um macho e uma fêmea: Macho, Cultura n.º 277; Coleção I.B. n.º 22.605; procedente de Araguaia, Estado do Espírito Santo; Fêmea, Cultura n.º 444; Coleção I.B. n.º 23.457; procedente de Piraju, Estado de São Paulo.

TABELA 18

Cultura n.º	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		$\leq 35$	36	$\geq 37$	
277	Macho	—	12	—	12
444	Fêmea	—	13	—	13
Total .....		—	25	—	25

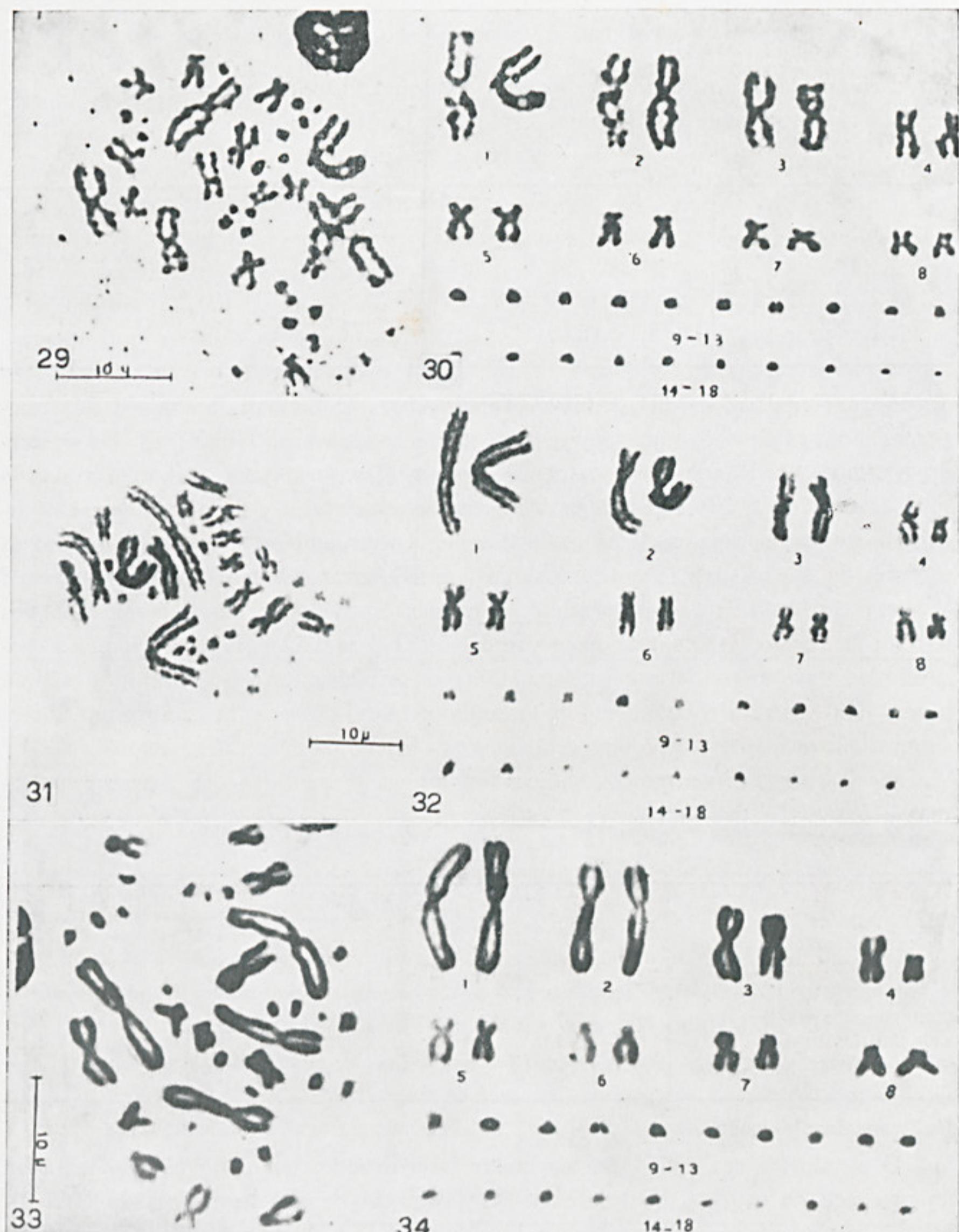
Foram selecionadas 25 metáfases somáticas obtidas em culturas temporárias de leucócitos, 12 de macho e 13 de fêmea (Tabela 18). O número diplóide nos cariotípos é 36, sendo 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos (figs. 29, 31). Os macrocromossomos foram dispostos em pares e ordenados em tamanho decrescente. No macho, os pares um, três e quatro são metacêntricos, os pares dois, cinco, sete e oito submetacêntricos e o par seis é acrocêntrico (fig. 30). Na fêmea observamos correspondência dos pares um, três, cinco, seis, sete e oito com os do macho. Os dois cromossomos restantes diferem entre si pelo tamanho e posição do centrômero. O maior ocupa o quarto lugar em ordem de tamanho, como os do quarto par do macho. O menor corresponde em tamanho aos do oitavo par e tem centrômero subterminal (fig. 32). Analogamente às outras espécies de *Bothrops*, concluímos que o quarto par de *Bothrops jararacussu* é constituído de cromossomos sexuais. No macho, que é o sexo homogamético, os dois metacêntricos correspondem aos dois ZZ; na fêmea, que é sexo heterogamético, o metacêntrico ímpar corresponde ao Z e o acrocêntrico ímpar ao W.

As médias dos comprimentos relativos dos macrocromossomos, assim como as relações entre seus braços e os índices centroméricos, são apresentados na Tabela 19.

TABELA 19

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	26	20	15	10	6	9	8	7	6
Relação dos braços .....	1,1	1,6	1,1	1,1	2,1	1,6	2,4	1,7	1,9
Índice centromérico .....	0,48	0,38	0,47	0,47	0,32	0,38	0,30	0,39	0,36

PRANCHA VI



Prancha VI — CROTALIDAE: — Figs. 29-32: *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu). Fig. 29: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 30: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais ZZ, correspondem ao quarto par. Fig. 31: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 32: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais heteromórficos ZW, correspondem ao par número quatro.

Figs. 33-34: *Bothrops insularis* (Jararaca ilhôa). Fig. 33: Intersexo. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 34: Intersexo. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. O par número quatro é constituído de cromossomos sexuais heteromórficos ZW.

**Bothrops pradoi** (Hoge)

Foi estudado um exemplar do sexo feminino: Cultura n.º 372; Coleção I.B. n.º 22.944; procedente de Colatina, Estado do Espírito Santo.

TABELA 20

Cultura n.º	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
372	Fêmea	3	27	1	31

Foram analisadas 31 metáfases (Tabela 20). O número diplóide é 36, compreendendo 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos (fig. 27). Os macrocromossomos, ordenados pelo tamanho, foram dispostos em sete pares, restando dois cromossomos diferentes. Dêstes, o maior, que ocupa o quarto lugar em ordem de tamanho, tem centrômero mediano e corresponde, por analogia às outras espécies de *Bothrops*, ao Z. O outro, que corresponde ao cromossomo sexual W, tem o centrômero mais terminal, é menor, equivalendo em tamanho aos dos pares sete e oito. Os outros macrocromossomos foram classificados quanto a posição do centrômero da seguinte maneira: o primeiro, terceiro, quinto e sétimo pares, têm centrômero mediano, o segundo e sexto pares apresentam centrômero submediano e o oitavo par tem centrômero subterminal (fig. 28).

Na Tabela 21 constam os índices referentes às medidas dos macrocromossomos e a posição do centrômero.

TABELA 21

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	26	21	15	10	6	8	8	6	6
Relação dos braços .....	1,0	1,6	1,0	1,1	3,5	1,2	1,8	1,2	2,2
Índice centromérico .....	0,49	0,38	0,49	0,48	0,24	0,46	0,36	0,46	0,31

**Bothrops insularis** (Amaral)

O estudo foi realizado num exemplar intersexuado, no qual observou-se, além da presença de ovários, bilateralmente, a existência de um hemipênis do lado direito e um hemipênis rudimentar do lado esquerdo: Cultura n.º 241; Coleção I.B. n.º 22.190; procedente da Ilha da Queimada Grande, Estado de São Paulo.

TABELA 22

Cultura n.º	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
241	Intersexo	6	18	1	25

Para o estudo citogenético selecionamos 25 metáfases mitóticas (Tabela 22). O número diplóide encontrado foi 36, compreendendo 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos (fig. 33). Ao dispor-se os macrocromossomos em pares obtivemos sete pares de homólogos e dois cromossomos diferentes. Dêstes, o maior é metacêntrico e ocupa o quarto lugar em ordem de tamanho. O outro é acrocêntrico e menor, equivalendo em tamanho aos do sétimo par. O primeiro e o terceiro pares são também metacênicos, o segundo, quinto e sétimo pares são submetacênicos e o sexto e oitavo pares, acrocênicos (fig. 34). A análise e a comparação com os cariotipos das outras espécies do gênero *Bothrops* permitiu concluir que os dois cromossomos diferentes são o Z e o W. O heteromorfismo dos cromossomos sexuais nas outras espécies do gênero *Bothrops* só foi encontrado no sexo feminino. Portanto, apesar de que não tivemos a oportunidade de analisar os cariotipos do macho e fêmea normais de *Bothrops insularis*, podemos concluir que essa serpente classificada por Hoge e col. (1959) como intersexuada é, sob o ponto de vista cromossômico, uma fêmea normal.

Os parâmetros referentes ao comprimento relativo dos macrocromossomos, proporção dos braços e índice centromérico encontram-se na Tabela 23.

TABELA 23

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	25	21	15	10	7	9	8	7	6
Relação dos braços .....	1,1	1,7	1,3	1,2	2,3	1,5	2,8	2,0	2,3
Índice centromérico .....	0,48	0,37	0,45	0,46	0,31	0,40	0,27	0,35	0,31

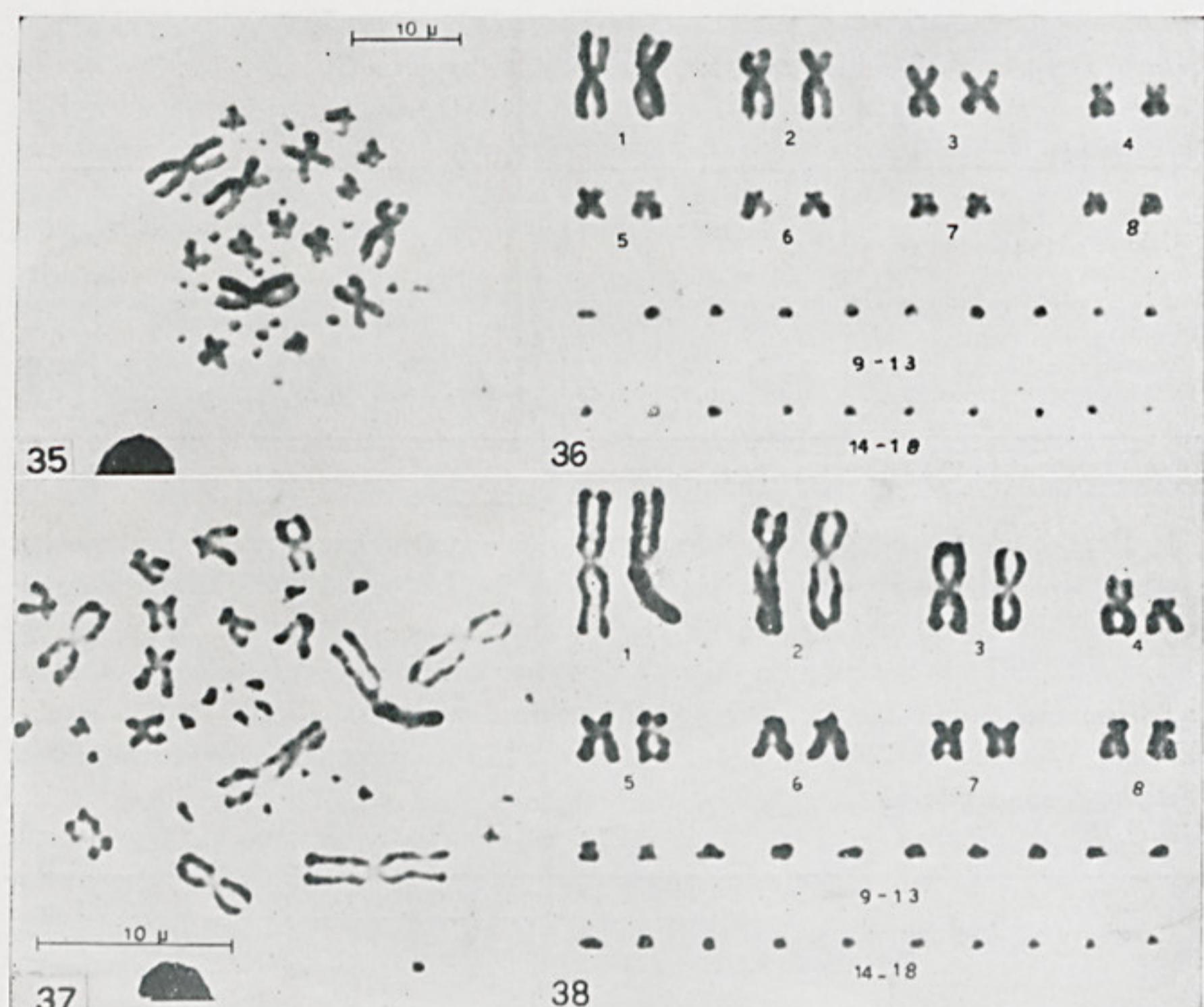
**Crotalus durissus terrificus (Laurentius)**

Para o estudo citogenético foram utilizados quatro exemplares, dois machos e duas fêmeas: Macho, Cultura n.º 273; Coleção I.B. n.º 22.585; procedente de São José do Curralinho, Estado de São Paulo; Macho, Cultura n.º 274; Coleção I.B. n.º 22.591; procedente de Alfenas, Estado de Minas Gerais; Fêmea, Cultura n.º 315; Coleção I.B. n.º 22.782; procedente de Araraquara, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 328; Coleção I.B. n.º 22.798; procedente de Itapetininga, Estado de São Paulo.

TABELA 24

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
273	Macho	—	10	—	10
274	Macho	—	15	—	15
315	Fêmea	1	3	—	4
328	Fêmea	—	10	—	10
Total .....		1	38	—	39

## PRANCHA VII



Prancha VII — CROTALIDAE: — Figs. 35-38: *Crotalus durissus terrificus* (Cascavel). Fig. 35: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 36: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais ZZ, correspondem ao par número quatro. Fig. 37: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 38: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais heteromórficos ZW, correspondem ao par número quatro.

Foram selecionadas 39 células, 25 de machos e 14 de fêmeas (Tabela 24). Em ambos os sexos o cariótipo apresenta  $2n = 36$ , dos quais 16 são macrocromossomos e 20 são microcromossomos (figs. 35, 37). Os 16 macrocromossomos foram dispostos em oito pares, dos quais no macho os pares um, três e quatro são metacêntricos, os pares dois, cinco e sete são submetacêntricos e os pares seis e oito são acrocêntricos (fig. 36). Na fêmea, 14 dos macrocromossomos correspondem aos pares um, dois, três, cinco, seis, sete e oito do macho. Os dois que restam são diferentes entre si, tendo um deles as características do número quatro do macho enquanto que o outro tem centrômero mais terminal e é menor, equivalendo em tamanho aos cromossomos do par número oito (fig. 38).

Por esse aspecto, foi possível concluir que o par número quatro, constituído de heterocromossomos na fêmea, corresponde aos cromossomos sexuais. Portanto, também em *Crotalus durissus terrificus* o macho é homogamético com complemento sexual ZZ e a fêmea heterogamética com complemento sexual ZW.

Na tabela 25 constam índices referentes ao comprimento relativo dos macrocromossomos, relação de braços e os índices centroméricos.

TABELA 25

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	26	21	15	10	6	9	7	7	6
Relação dos braços .....	1,1	1,6	1,0	1,2	2,2	1,6	2,6	1,5	2,2
Índice centromérico .....	0,49	0,39	0,49	0,45	0,31	0,39	0,28	0,40	0,31

**COLUBRIDAE****Spilotes pullatus anomalepis** Bocourt

Para o estudo citogenético foram utilizados quatro exemplares, dois machos e duas fêmeas: Macho, Cultura n.º 299; Coleção I.B. n.º 22.685; procedente de Paranaguá, Estado do Paraná; Macho, Cultura n.º 397; Coleção I.B. n.º 23.133; procedente de Antonina, Estado do Paraná; Fêmea, Cultura n.º 313; Coleção I.B. n.º 22.781; procedente de Cornélio Procópio, Estado do Paraná; Fêmea, Cultura n.º 322; Coleção I.B. n.º 22.794; procedente de Laranjeiras do Sul, Estado do Paraná.

TABELA 26

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		$\leq 35$	36	$\geq 37$	
299	Macho	2	38	—	40
397	Macho	—	16	—	16
313	Fêmea	—	40	2	42
322	Fêmea	4	14	1	19
Total .....		6	108	3	117

Foram analisadas 117 células, 56 de machos e 61 de fêmeas (Tabela 26). Em ambos os sexos o número diplóide é 36, sendo 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos (figs. 39, 41). No macho, os pares de cromossomos um, três, quatro e cinco são mediocêntricos, os pares dois, sete e oito têm centrômero submedianos e o par seis apresenta centrômero subterminal (fig. 40).

Na fêmea foram encontrados os mesmos cromossomos com exceção do quarto par. Em lugar de um par de mediocêntricos foram encontrados dois cromossomos de tamanho igual, cuja posição do centrômero era, no entanto, diferente. Um desses era, à semelhança do quarto par do macho, mediocêntrico, enquanto que o outro apresentava centrômero subterminal (fig. 42). Esse aspecto constantemente encontrado nos cariotípos, permitiu concluir que o quarto par, heteromorfo na fêmea, representa os cromossomos sexuais, sendo o Z metacêntrico e o W acrocêntrico, de tamanhos semelhantes.

As medidas relativas dos macrocromossomos, assim como os índices centroméricos são apresentados na Tabela 27.

TABELA 27

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	26	22	15	9	9	8	7	7	6
Relação dos braços .....	1,0	1,9	1,1	1,0	2,8	1,3	3,5	1,5	1,6
Índice centromérico .....	0,50	0,35	0,49	0,50	0,27	0,44	0,22	0,40	0,39

**Spilotes pullatus maculatus Amaral**

Nessa subespécie a análise cromossômica foi realizada num exemplar do sexo feminino: Cultura n.º 385; Coleção I.B. n.º 23.032; procedente de Cananéia, Estado de São Paulo.

TABELA 28

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		$\leq 35$	36	$\geq 37$	
385	Fêmea	1	9	—	10

Foram selecionadas 10 metáfases somáticas (Tabela 28). O cariotípico de *Spilotes pullatus maculatus* tem 36 cromossomos (fig. 43) e estes apresentam-se quanto a morfologia e medidas com características semelhantes às de *Spilotes pullatus anomalepis*. Os macrocromossomos são em número de 16 e os microcromossomos em número de 20. Quando classificados por ordem de tamanho, o primeiro, ter-

ceiro e quinto pares apresentam-se como metacêntricos, o segundo, sétimo e oitavo pares são submetacêntricos e o sexto par é acrocêntrico. Na fêmea o quarto par é formado por um metacêntrico e um cromossomo de igual tamanho, acrocêntrico (fig. 44). Concluímos, por analogia com a outra subespécie, que a fêmea é o sexo heterogamético e que o quarto par é constituído de cromossomos sexuais, sendo o Z metacêntrico e o W acrocêntrico.

A Tabela 29 apresenta os valores relativos encontrados para os comprimentos dos macrocromossomos e os índices centroméricos.

TABELA 29

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	24	22	16	9	9	8	8	8	6
Relação dos braços .....	1,0	1,6	1,0	1,0	2,6	1,5	3,3	1,9	1,8
Índice centromérico .....	0,49	0,39	0,50	0,50	0,28	0,41	0,23	0,35	0,36

#### **Philodryas olfersii olfersii (Lichtenstein)**

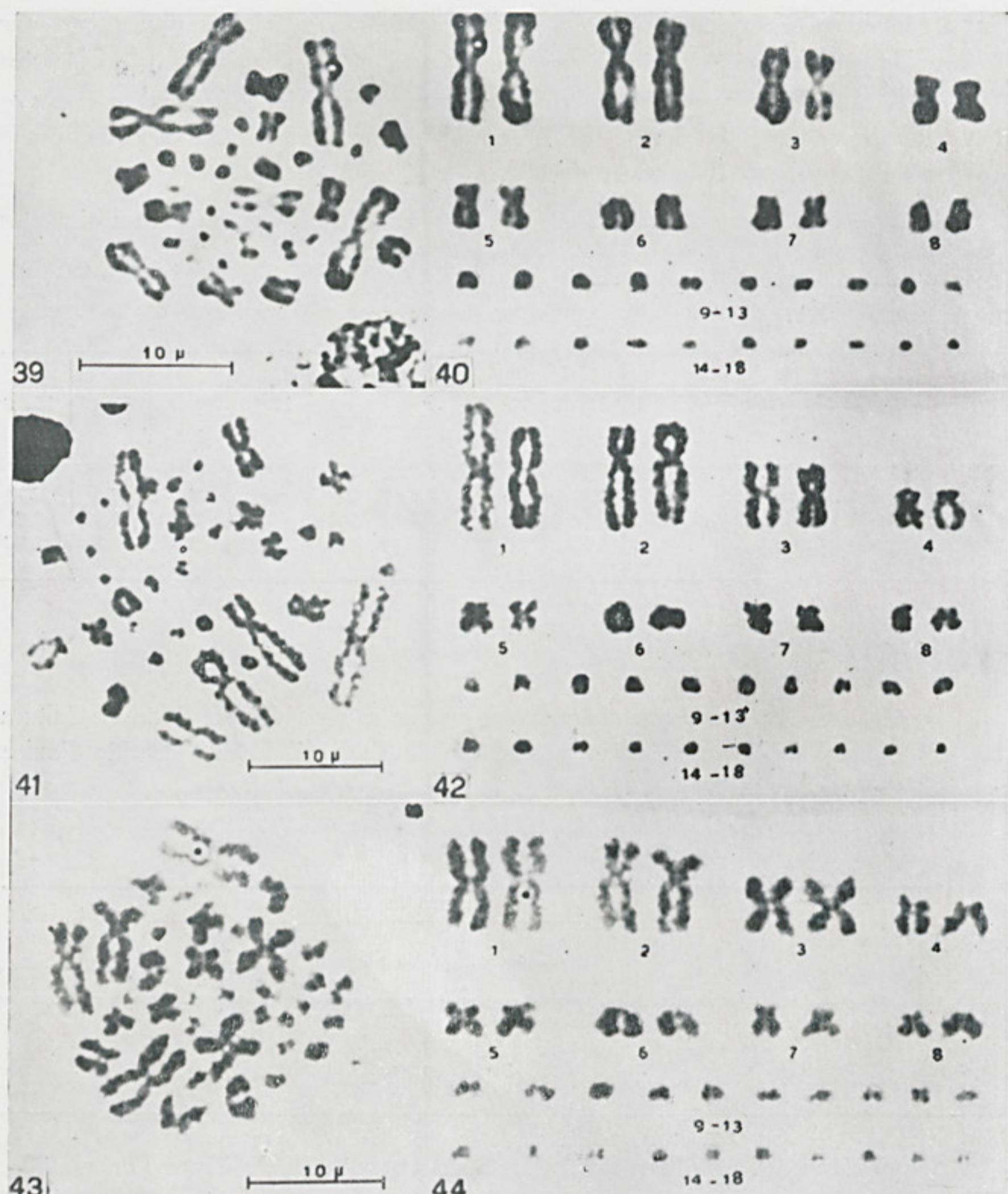
Foram estudados dois exemplares, um macho e uma fêmea: Macho, Cultura n.º 427; Coleção I.B. n.º 23.361; procedente de Taubaté, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 358; sem procedência.

TABELA 30

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
427	Macho	—	5	—	5
358	Fêmea	2	14	—	16
Total .....		2	19	—	21

Selecionamos 21 metáfases somáticas, 5 do macho e 16 da fêmea (Tabela 30). Em ambos os sexos o número diplóide é 36, macrocromossomos em número de 16 e microcromossomos em número de 20 (figs. 45, 47). Os macrocromossomos foram dispostos em pares de homólogos e ordenados pelo tamanho. À semelhança do que observamos no gênero *Spilotes*, também nessa espécie, no macho o primeiro, terceiro, quarto e quinto pares de macrocromossomos são metacêntricos, o segundo, sétimo e oitavo pares são submetacêntricos e o sexto par é constituído de acrocêntricos (fig. 46). Na fêmea verificamos existir concordância com o macho quanto ao tamanho e morfologia do primeiro, segundo, terceiro, quinto, sexto, sétimo e oitavo pares. Ao invés de um par de homólogos iguais, no quarto par, encontramos dois cromossomos semelhantes no tamanho, sendo, porém, um

## PRANCHA VIII



*Prancha VIII* — COLUBRIDAE: — Figs. 39-42: *Spilotes pullatus anomalepis* (Caninana). Fig. 39: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 40: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais metacêntricos ZZ, correspondem ao par número quatro. Fig. 41: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 42: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais heteromórficos ZW, correspondem ao par número quatro, sendo o Z metacêntrico e o W acrocêntrico, do mesmo tamanho.

Figs. 43-44: *Spilotes pullatus maculatus* (Caninana). Fig. 43: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 44: Fêmea. Cariótipo com 16 macromossomos e 20 micromossomos. O quarto par é constituído de cromossomos sexuais heteromórficos, ZW.

PRANCHA IX



Prancha IX — COLUBRIDAE: — Figs. 45-48: *Philodryas olfersii olfersii* (Cobra verde). Fig. 45: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 46: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais ZZ, correspondem ao quarto par. Fig. 47: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 48: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais heteromórficos ZW, correspondem ao par número quatro.

Figs. 49-50: *Dryadophis bifossatus bifossatus* (Jararacuçu do brejo). Fig. 49: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 50: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais ZZ, correspondem ao par número quatro.

dêles metacêntrico como o do macho e o outro acrocêntrico (fig. 48). Portanto, no macho, que é o sexo homogamético, o quarto par é constituído de cromossomos sexuais ZZ e na fêmea, que é o sexo heterogamético, o quarto par é formado por um metacêntrico Z e um acrocêntrico W.

Na tabela 31 são apresentadas as médias encontradas para o comprimento relativo dos macrocromossomos, a relação de braços dos mesmos e os índices centroméricos.

TABELA 31

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	24	20	15	12	11	10	7	7	6
Relação dos braços .....	1,0	1,5	1,1	1,4	16,6	1,3	8,7	1,6	1,8
Índice centromérico .....	0,49	0,40	0,49	0,42	0,08	0,44	0,13	0,38	0,36

#### Dryadophis bifossatus bifossatus (Raddi)

A pesquisa citogenética foi realizada em três exemplares, dois machos e uma fêmea: Macho, Cultura n.º 352; Coleção I.B. n.º 22.911; procedente de Caçapava, Estado de São Paulo; Macho, Cultura n.º 425; Coleção I.B. n.º 23.353; procedente de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais; Fêmea, Cultura n.º 386; Coleção I.B. n.º 23.044; procedente de Uberlândia, Estado de Minas Gerais.

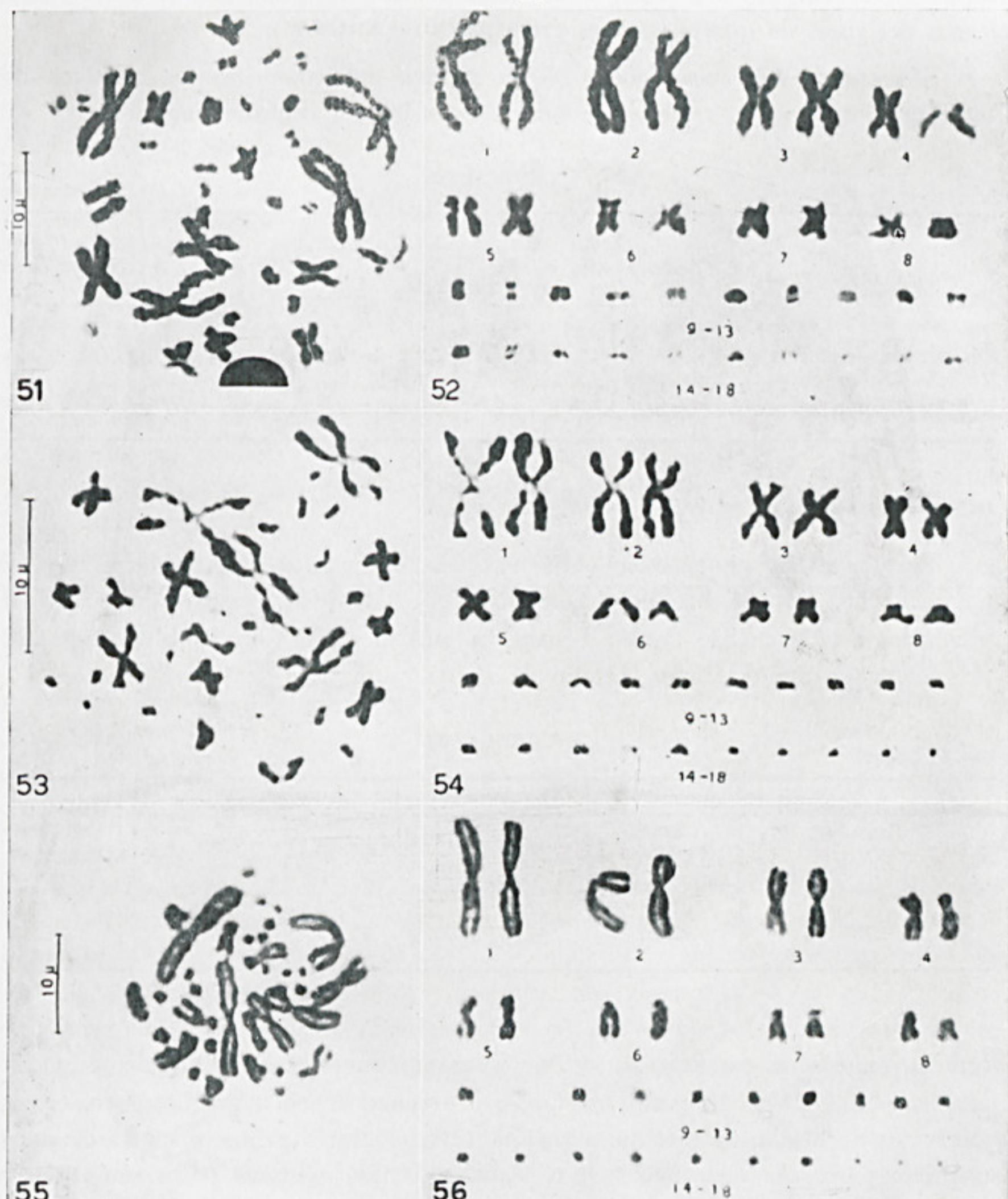
TABELA 32

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
352	Macho	—	8	—	8
425	Macho	—	7	—	7
386	Fêmea	1	8	1	10
Total .....		1	23	1	25

Selecionamos 25 metáfases, 10 de fêmea e 15 de macho (Tabela 32). O número diplóide é 36, macrocromossomos em número de 16 e microcromossomos em número de 20 (figs. 49, 51). O primeiro, terceiro, quarto, quinto, sexto e sétimo pares de macrocromossomos são metacênicos e o segundo e oitavo pares são submetacênicos (fig. 50).

Na fêmea, observamos correspondência com o primeiro, segundo, terceiro, quinto, sexto, sétimo e oitavo pares do macho. Restam, no entanto, dois cromossomos desiguais. Um dêles é semelhante ao metacêntrico do quarto par da célula masculina, o outro tem tamanho semelhante, mas a sua morfologia difere, pois é acrocêntrico (fig. 52). O estudo dos cariotípicos de ambos os sexos permite con-

PRANCHA X



Prancha X — COLUBRIDAE: — Figs. 51-52: *Dryadophis bifossatus bifossatus* (Jarara-cuçu do brejo). Fig. 51: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 52: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. O par número quatro é constituido de cromossomos sexuais, heteromórficos ZW.

Figs. 53-56: *Drymarchon corais corais* (Papa-pinto). Fig. 53: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 54: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Fig. 55: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 56: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. O par número quatro é constituido de cromossomos sexuais heteromórficos ZW.

cluir que o macho é o sexo homogamético e o quarto par corresponde aos cromossomos sexuais ZZ e a fêmea é heterogamética, correspondendo os dois cromossomos desiguais do quarto par aos cromossomos sexuais Z e W.

São apresentadas na Tabela 33 as médias dos comprimentos relativos dos macrocromossomos, as relações de braços e os índices centroméricos.

TABELA 33

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	23	21	15	10	10	9	8	7	6
Relação dos braços .....	1,0	1,5	1,0	1,1	5,0	1,5	1,5	1,2	1,6
Índice centromérico .....	0,50	0,39	0,50	0,48	0,20	0,41	0,41	0,45	0,39

#### Drymarchon corais corais (Boie)

Para o estudo citogenético obtivemos dois exemplares, um macho e uma fêmea: Macho, Cultura n.º 293; Coleção I.B. n.º 22.660; procedente de Álvares Machado, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 387; Coleção I.B. n.º 23.027; procedente de Santo Amaro, Estado da Bahia.

TABELA 34

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
293	Macho	3	11	—	14

Foram analisadas, após seleção, 20 metáfases (Tabela 34). Os cariotípos contém, em ambos os sexos  $2n = 36$ , 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos (figs. 53, 55). Dispostos em pares e ordenados pelo tamanho, os macrocromossomos do macho apresentam a seguinte morfologia: o primeiro, terceiro, quarto e quinto pares são metacêntricos; o segundo, sétimo e oitavo pares são submetacêntricos e o sexto par é acrocêntrico (fig. 54). Na fêmea há correspondência de todos os pares, com exceção do quarto que é constituído de cromossomos diferentes. Um deles é metacêntrico como no macho, enquanto que o outro, apesar de ter tamanho semelhante, difere pela posição do centrômero, sendo considerado como acrocêntrico (fig. 56). À semelhança das outras espécies de COLUBRIDAE com  $2n = 36$  que descrevemos, concluímos que também nessa espécie o quarto par em ordem de tamanho é constituído de cromossomos sexuais, ocorrendo no macho dois ZZ e na fêmea, que é o sexo heterogamético, um Z, metacêntrico e um W acrocêntrico.

As medidas relativas do comprimento dos macrocromossomos, a proporção entre os seus braços e os índices centroméricos são apresentados na Tabela 35.

TABELA 35

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	27	22	15	10	10	9	7	6	5
Relação dos braços .....	1,0	1,7	1,1	1,1	2,4	1,1	4,8	1,5	1,9
Índice centromérico .....	0,50	0,37	0,49	0,48	0,29	0,48	0,19	0,40	0,36

### Chironius bicarinatus (Wied)

No estudo citogenético foram utilizados dois exemplares, sendo um macho e uma fêmea: Macho, Cultura n.º 381; Coleção I.B. n.º 23.022; procedente de Miracatu, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 468; sem procedência.

TABELA 36

Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 35	36	≥ 37	
381	Macho	2	6	—	8
468	Fêmea	—	10	—	10
Total .....		2	16	—	18

Foram selecionadas 18 metáfases somáticas, sendo 8 de macho e 10 de fêmea (Tabela 36). Os cariótipos apresentam número diplóide igual a 36, 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos (figs. 57, 59). Os macrocromossomos têm aspecto semelhante ao das espécies descritas, dos gêneros *Spilotes*, *Philodryas*, *Dryadophis* e *Drymarchon*. No macho, o primeiro, terceiro, quarto, quinto e sétimo pares têm centrômero mediano, o segundo e sexto pares possuem centrômero submediano e o oitavo par apresenta centrômero sub-terminal (fig. 58). Na fêmea, o primeiro, segundo, terceiro, quinto, sexto, sétimo e oitavo pares são morfológicamente iguais aos do macho. No quarto par, porém, foram observados dois cromossomos de tamanho similar, mas num deles o centrômero é mediano, como no macho, enquanto que, no outro o centrômero é sub-terminal (fig. 60). O heteromorfismo desses macrocromossomos permite concluir que a fêmea é heterogamética e o quarto par corresponde aos cromossomos sexuais, sendo o Z metacêntrico e o W acrocêntrico. O macho é homogamético, sendo o quarto par constituído de dois cromossomos sexuais Z.

As médias dos parâmetros que indicam o comprimento relativo dos macrocromossomos, a relação entre seus braços e os índices centroméricos são apresentados na Tabela 37.

## PRANCHA XI



Prancha XI — COLUBRIDAE: — Figs. 57-60: *Chironius bicarinatus* (Cobra cipó). Fig. 57: Macho. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 58: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos do quarto par, correspondem aos cromossomos sexuais ZZ. Fig. 59: Fêmea. Metáfase;  $2n = 36$  cromossomos. Fig. 60: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Os cromossomos sexuais heteromórficos ZW, correspondem aos do quarto par.

Figs. 61-62: *Xenodon merremii* (Boipeva). Fig. 61: Macho. Metáfase;  $2n = 30$  cromossomos. Fig. 62: Macho. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 14 microcromossomos. Os cromossomos sexuais metacêntricos ZZ, correspondem ao quarto par.

TABELA 37

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	24	22	15	10	10	9	7	7	6
Relação dos braços .....	1,0	1,5	1,0	1,5	12,0	1,2	2,0	1,5	2,7
Índice centromérico .....	0,50	0,40	0,50	0,41	0,08	0,46	0,34	0,42	0,27

**Xenodon merremii** (Wagler)

Foram utilizados três exemplares, um macho e duas fêmeas: Macho, Cultura n.º 419; Coleção I.B. n.º 23.313; procedente de Alto Pimenta, Estado de São Paulo; Fêmea, Cultura n.º 326; sem procedência; Fêmea, Cultura n.º 340; sem procedência.

TABELA 38

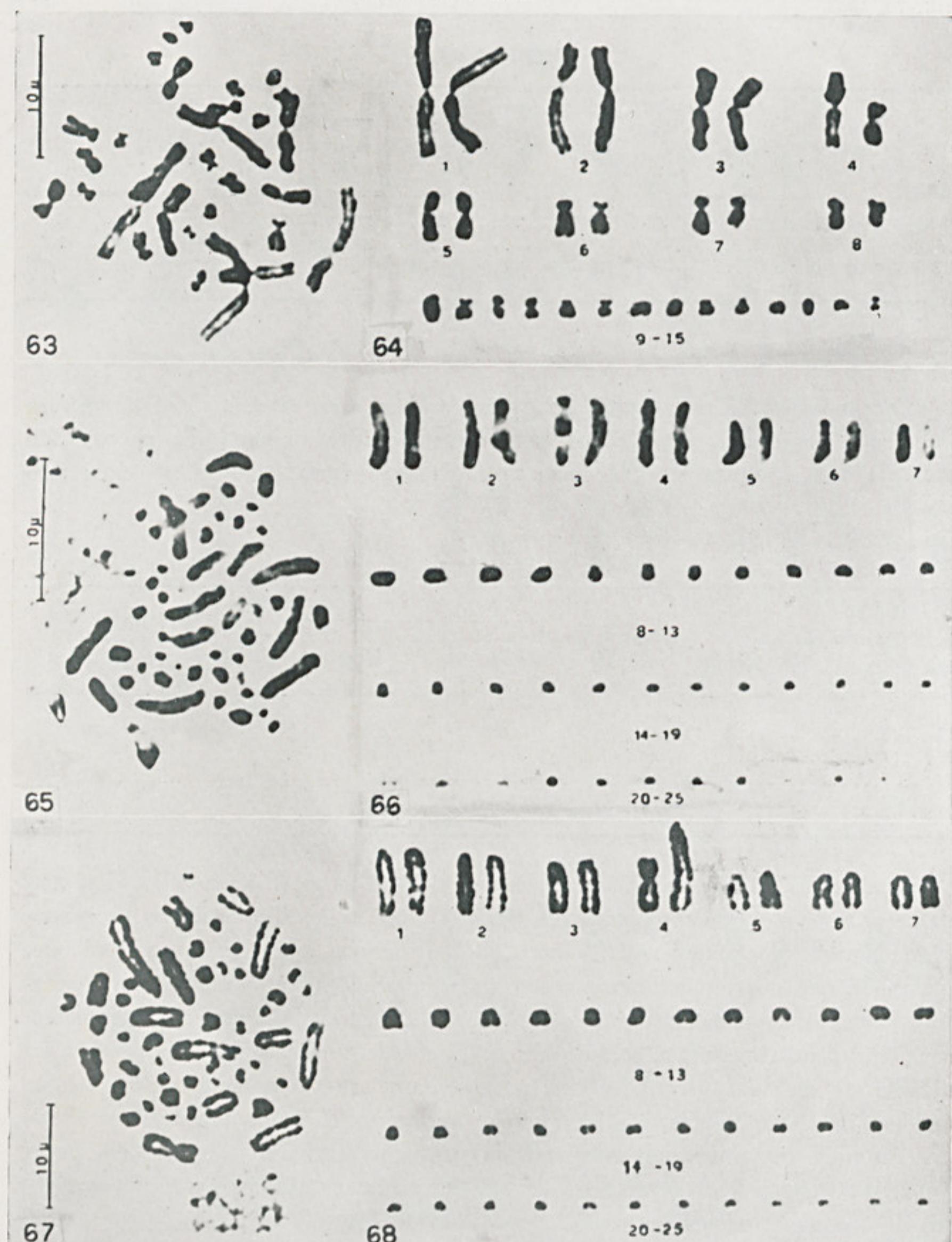
Cultura nº	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 29	30	≥ 31	
419 .....	Macho	—	10	—	10
326 .....	Fêmea	—	5	1	6
340 .....	Fêmea	3	34	—	37
Total .....		3	49	1	53

Analisamos 53 células, 10 de macho e 43 de fêmeas (Tabela 38). Em ambos os sexos o número diplóide é 30 (figs. 61, 63). Ao dispormos os cromossomos em ordem de tamanho verificamos que os mesmos apresentam um gradiente. Apesar de que ocorrem cromossomos grandes que são caracteristicamente macrocromossomos e cromossomos pequenos que são caracteristicamente microcromossomos, estes não apresentam solução de continuidade que permita uma separação evidente em dois grupos. Adotamos, portanto, um critério baseado na análise de grande número de células, considerando os primeiros 16 como macrocromossomos e os restantes como microcromossomos. O primeiro grupo foi disposto em pares e numerado em ordem decrescente de 1 a 8, constando os seus comprimentos relativos e os seus índices centroméricos da Tabela 39.

TABELA 39

Pares de macrocromossomos	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4		Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
				Z	W				
Comprimento relativo (%)	26	22	15	13	7	8	7	6	5
Relação dos braços .....	1,0	1,6	1,1	1,4	1,4	1,2	2,5	1,9	1,5
Índice centromérico .....	0,50	0,38	0,47	0,41	0,41	0,46	0,30	0,35	0,42

PRANCHA XII



Prancha XII — COLUBRIDAE: — Figs. 63-64: *Xenodon merremii* (Boipeva). Fig. 63: Fêmea. Metáfase;  $2n = 30$  cromossomos. Fig. 64: Fêmea. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 14 microcromossomos. O par número quatro é constituido de cromossomos sexuais heteromórficos, ZW, sendo o Z metacêntrico e o W metacêntrico e menor.

Figs. 65-68: *Clelia occipitalutea* (Muçurana). Fig. 65: Macho. Metáfase;  $2n = 50$  cromossomos. Fig. 66: Macho. Cariótipo com 14 macrocromossomos e 36 microcromossomos. Os cromossomos sexuais metacêntricos ZZ, correspondem ao par número quatro. Fig. 67: Fêmea. Metáfase;  $2n = 50$  cromossomos. Fig. 68: Fêmea. Cariótipo com 14 macrocromossomos e 36 microcromossomos. O par número quatro é constituido de cromossomos sexuais heteromórficos, sendo o Z metacêntrico e o W acrocêntrico e maior.

No macho, os pares número um, três, quatro, cinco e oito são metacêntricos, dois e sete são submetacêntricos e o par seis é acrocêntrico (fig. 62). Na fêmea há correspondência de todos os pares, com exceção do número quatro. Este é constituído de um par heteromorfo, um metacêntrico do mesmo tamanho que o encontrado no macho e um cromossomo também metacêntrico, porém menor (fig. 64). Concluímos que também em *Xenodon merremii* ocorre heteromorfismo dos cromossomos sexuais na fêmea, correspondendo êstes ao quarto par. No macho existem dois metacêntricos de igual tamanho (ZZ) e na fêmea dois metacêntricos de tamanho desigual (ZW), correspondendo o maior ao Z e o menor ao W.

#### **Clelia occipitolutea** (Duméril, Bibron e Duméril)

Utilizamos dois exemplares, um macho e uma fêmea: Macho, Cultura n.<sup>o</sup> 442; Coleção I.B. n.<sup>o</sup> 23.425; procedente de Cachoeira do Sul, Estado do Rio Grande do Sul; Fêmea, Cultura n.<sup>o</sup> 336; sem procedência.

TABELA 40

Cultura n. <sup>o</sup>	Sexo	Número de cromossomos			Total de células contadas
		≤ 49	50	≥ 51	
442 .....	Macho	—	8	—	8
336 .....	Fêmea	3	30	—	33
Total .....		3	38	—	41

Foram selecionadas 41 células, 8 de macho e 33 de fêmea (Tabela 40). Em ambos os sexos encontramos nos cariótipos 50 cromossomos (figs. 65, 67). Esse número diplóide é o maior descrito até o presente, em ofídios. Dispondo-se os cromossomos em ordem de tamanho, separamos dois grupos compreendendo o primeiro 14 elementos, que consideramos como macrocromossomos e o segundo 36 considerados como microcromossomos. Os microcromossomos apresentam, quando dispostos em ordem de tamanho, um decréscimo gradual, sendo relativamente grande a diferença entre os extremos.

TABELA 41

Pares de macrocromossomos	N. <sup>o</sup> 1	N. <sup>o</sup> 2	N. <sup>o</sup> 3	N. <sup>o</sup> 4		N. <sup>o</sup> 5	N. <sup>o</sup> 6	N. <sup>o</sup> 7
				Z	W			
Comprimento relativo (%)	18	17	16	16	27	12	11	10
Relação dos braços .....	18,3	15,3	14,0	1,4	16,5	10,4	9,4	9,3
Índice centromérico .....	0,06	0,07	0,07	0,41	0,06	0,10	0,10	0,11

Os índices referentes ao comprimento relativo dos macrocromossomos assim como a relação de braços e índices centroméricos são apresentados na Tabela 41.

No macho, todos os macrocromossomos são acrocêntricos, com exceção de um par, o quarto em ordem de tamanho, que é constituído de metacêntricos (fig. 66). Na fêmea ao invés de um par, encontramos sómente um cromossomo ímpar, metacêntrico. No entanto, nas células femininas ocorre também um acrocêntrico ímpar, o maior do cariótipo, inexistente nas células masculinas (fig. 68). A constância dessa característica em tôdas as células analisadas permitiu a conclusão de que o par de metacêntricos do macho representa o par sexual ZZ, enquanto que na fêmea, que é o sexo heterogamético, ocorre um Z metacêntrico semelhante ao do macho e um W acrocêntrico. Essa é a única espécie de serpente na qual encontramos um W maior que o Z. Nas outras espécies em que identificamos os cromossomos sexuais o Z e W apresentam tamanho equivalente, ou o W é menor, enquanto que em *Clelia occipitolutea* o W é aproximadamente duas vezes maior que o Z.

#### RESUMO

Foi desenvolvido um método de estudo de cromossomos de ofídios por cultura temporária de leucócitos do sangue periférico.

Foram investigados e descritos os cariótipos de 20 espécies de serpentes sul-americanas, peçonhentas e não peçonhentas, pertencentes às famílias BOIDAE, COLUBRIDAE e CROTALIDAE. A maioria possui  $2n = 36$ , sendo o cariótipo constituído de 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos. Na família BOIDAE, a única discordante é *Corallus caninus*, que apresenta  $2n = 44$ . Na família COLUBRIDAE, além das espécies com 36 cromossomos, existem duas cujos cariótipos mostram o menor e o maior número de cromossomos relatados até o presente nos ofídios; *Xenodon merremii* tem como número diplóide 30 cromossomos e *Clelia occipitolutea*, 50 cromossomos. Na família CROTALIDAE, tôdas as espécies apresentam  $2n = 36$ . Foram determinadas para tôdas as espécies o comprimento relativo, assim como a relação dos braços e o índice centromérico de cada macrocromossomo.

Quanto aos cromossomos sexuais, verificou-se a existência de digametia feminina, ZW e monogametia masculina ZZ nos ofídios. Nas famílias CROTALIDAE e COLUBRIDAE ocorre heteromorfismo dos cromossomos sexuais. Na família BOIDAE não foi detectado, ao nível microscópico, heteromorfismo cromossômico, que permitisse a identificação citológica de cromossomos sexuais, não existindo aparentemente diferenças morfológicas entre os cariótipos feminino e masculino.

Na família CROTALIDAE, em tôdas as espécies, a fêmea apresenta cromossomos sexuais ZW morfológicamente diferentes. O cromossomo Z corresponde ao quarto em ordem de tamanho, enquanto que o W é menor, equivalendo em tamanho aos pares seis e sete.

Num exemplar intersexuado de *Bothrops insularis* foram também identificados os cromossomos sexuais ZW. Sob o ponto de vista cromossômico, essa serpente é uma fêmea normal.

Na família COLUBRIDAE, todas as espécies investigadas apresentam heterogametia na fêmea. O cromossomo Z é metacêntrico e corresponde ao quarto, em ordem de tamanho. Em *Spilotes pullatus anomalepis*, *Spilotes pullatus maculatus*, *Philodryas olfersii olfersii*, *Dryadophis bifossatus bifossatus*, *Drymarchon corais corais* e *Chironius bicarinatus*, o cromossomo W tem tamanho semelhante ao Z, mas é acrocêntrico. Em *Xenodon merremii* o W equivale, em tamanho, aos cromossomos do sexto par. Em *Clelia occipitolutea* o W, excepcionalmente, é maior que o Z, constituindo também o maior cromossomo do cariótipo.

#### SUMMARY

A method for study of snake chromosomes by short-term cultures of peripheral blood leucocytes was developed.

Karyotypes of 20 species of South-American poisonous and non-poisonous, snakes of the families BOIDAE, COLUBRIDAE and CROTALIDAE were investigated. Most of them have a diploid number of 36 chromosomes, the karyotype including 16 macrochromosomes and 20 microchromosomes. In the family BOIDAE, the only discordant is the *Corallus caninus* with a diploid number of 44 chromosomes. In the family COLUBRIDAE, besides the species with  $2n = 36$ , there are two whose karyotypes show the smallest and largest number of chromosomes in ophidians described until now; *Xenodon merremii* has  $2n = 30$  and *Clelia occipitolutea*  $2n = 50$  chromosomes. In the family CROTALIDAE, all the species have 36 chromosomes. Relative length, arm ratio and centromere index of each macrochromosome were determined, for all species.

In the snakes, the existence of a female ZW-digamety and a male ZZ-monogamety was verified. Heteromorphism of the sex chromosomes in the families CROTALIDAE and COLUBRIDAE was detected. In the family BOIDAE, chromosomal heteromorphism was not observed. Apparently, there are no morphological differences between the male and the female karyotypes.

In the family CROTALIDAE, the female shows morphologically different ZW-chromosomes, in all the species. The Z-chromosome corresponds to the fourth, while the W-chromosome is smaller, corresponding in size to the sixth and seventh pairs.

The ZW-sex chromosomes were also identified in an intersex specimen of *Bothrops insularis*. As to the chromosomal point of view, this snake is a normal female.

All the investigated species, of the family COLUBRIDAE, present heteromorphic sex chromosomes in the female. The Z-chromosome is metacentric and corresponds to the fourth in size. The W-chromosome although similar to the Z in size is acrocentric in *Spilotes pullatus anomalepis*, *Spilotes pullatus maculatus*, *Philodryas olfersii olfersii*, *Dryadophis bifossatus bifossatus*, *Drymarchon corais corais* and *Chironius bicarinatus*. In *Xenodon merremii*, W corresponds in size, to the sixth pair. In *Clelia occipitolutea*, exceptionally, the W is larger than the Z, being also the biggest chromosome of the karyotype.

*Agradecimentos* — Nossos agradecimentos a M. L. Beçak e H. R. S. Nazareth pela dedicação e colaboração em todas as fases deste trabalho; a A. R. Hoge e H. E. Belluomini pela classificação do material estudado.

#### BIBLIOGRAFIA

As referências de sistemática constam do texto, não estando incluídas na bibliografia.

- Beçak, W., Beçak, M. L. e Nazareth, H. R. S. — Estudo de cromosomas de ofídios em culturas temporárias de leucócitos. *Ciência e Cultura*, **14**:210, 1962a.
- Beçak, W., Beçak, M. L. e Nazareth, H. R. S. — Karyotypic studies of two species of South American snakes (*Boa constrictor amarali* and *Bothrops jararaca*). *Cytogenetics*, **1**:305-313, 1962b.
- Beçak, W., Beçak, M. L. e Nazareth, H. R. S. — Chromosomes of snakes in short term cultures of blood leucocytes. *Amer. Naturalist*, **97**:253-256, 1963a.
- Beçak, W., Beçak, M. L. e Nazareth, H. R. S. — Karyotypic studies of South American snakes. *Proc. XI Internat. Congress Genetics. The Hague. Genetics Today*, **1**:278:1963b.
- Bhatnagar, A. N. — Studies on the structure and behaviour of chromosomes of *Oligodon arnensis* Shaw (Colubridae: Ophidia). *Cytologia*, (Tokyo), **24**:459-465, 1959.
- Bhatnagar, A. N. — Chromosomes of *Bungarus caeruleus* Schneider (Elapidae: Ophidia). *Cytologia*, (Tokyo), **25**:173-178, 1960a.
- Bhatnagar, A. N. — Studies on the structure and behaviour of chromosomes of two species of colubrid snakes (Colubridae: Ophidia). *Caryologia*, **12**:349-361, 1960b.
- Bhatnagar, A. N. — Chromosome cytology of a snake *Lycodon aulicus* L. (Colubridae: Ophidia). *Caryologia*, **14**:35-42, 1961.
- Brink, J. M. van — L'expression morphologique de la digamétie chez les Sauropsidés et les Monotrèmes. *Chromosoma* (Berl.), **10**:1-72, 1959.
- Hoge, A. R., Belluomini, H. E., Schreiber, G. e Penha, A. M. — Sexual abnormalities in *Bothrops insularis* (Amaral) 1921. *Mem. Inst. Butantan*, **19**:17-88, 1959.
- Kobel, H. R. — Heterochromosomen bei *Vipera berus* L. (Viperidae, Serpentes). *Experientia*, **18**:173-174, 1962.
- Makino, S. e Momma, E. — An idiogram study of the chromosomes in some species of Reptiles. *Cytologia*, (Tokyo), **15**:96-108, 1949.
- Matthey, R. — Les chromosomes de la Vipère (*Vipera aspis*). *C. R. séances Soc. Phys.*, Genève, **45**:1928.
- Matthey, R. — Les chromosomes de la Vipère mâle (*Vipera aspis* Lin.). *Biol. Zentralbl.*, **49**:1929.
- Matthey, R. — Chromosomes des Reptiles, Sauriens, Ophidiens, Cheloniens. L'évolution de la formule chromosomiale chez des Sauriens. *Rev. Suisse Zool.*, **38**:117-186, 1931.
- Nakamura, K. — Preliminary notes on reptilian chromosomes. I. The chromosomes of some snakes. *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, **3**:1927.
- Nakamura, K. — On the chromosomes of a snake (*Natrix tigrina*). *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B* **4**:1-8, 1928.
- Nakamura, K. — The chromosomes of *Elaphe climacophora* and *Elaphe quadrivirgata*. *Zool. Mag.*, (Japan), **41**:1929.
- Nakamura, K. — Studies on reptilian chromosomes. VI. Chromosomes of some snakes. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B* **10**:361-402, 1935.
- Thatcher, L. E. — Spermatogenesis of the garter snake. *Science*, **56**:372, 1922.