



**MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO EM ZOOLOGIA**

**ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM ANUROS DAS FAMÍLIAS
HYLIDAE RAFINESQUE, 1815 E LEPTODACTYLIDAE
WERNER, 1896 (AMPHIBIA: ANURA)**

PABLO SUÁREZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Curso de Doutorado, do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de doutor em Zoologia.

Orientador: Dr. Julio César Pieczarka

**BELÉM – PARÁ
2010**

PABLO SUÁREZ

**ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM ANUROS DAS FAMÍLIAS
HYLIDAE RAFINESQUE, 1815 E LEPTODACTYLIDAE
WERNER, 1896 (AMPHIBIA: ANURA)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Curso de Doutorado, do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de doutor em Zoologia

Orientador: Dr. Julio César Pieczarka

**BELÉM – PARÁ
2010**

PABLO SUÁREZ

**ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM ANUROS DAS FAMÍLIAS
HYLIDAE RAFINESQUE, 1815 E LEPTODACTYLIDAE
WERNER, 1896 (AMPHIBIA: ANURA)**

Banca examinadora

Dr. Julio César Pieczarka (Orientador)
ICB (Belém) – UFPa

Membros

Dra. Luciana Bolsoni Lourenço
IB/UNICAMP

Dr. Odair Aguiar Junior
Biociências/UNIFESP

Dr. Evonnildo Costa Gonçalves
ICB/UFPA

Dr. Marinus S. Hoogmoed
CZO/MPEG

DEDICATÓRIA

a minha família

AGRADECIMENTOS

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Universidade Federal do Pará (UFPA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do Projeto de Pesquisa;
- Ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) por conceder as licenças para a coleta dos animais estudados;
- Ao Laboratório de Citogenética Animal pelo fornecimento de toda a infraestrutura acadêmico-científica, sem as quais o trabalho não se realizaria;
- À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zoologia do Museu Paraense Emílio Goeldi pelo encaminhamento das questões burocrático-acadêmicas;
- Ao Dr. Júlio Pieczarka e a Dra. Cleusa Nagamashi por me darem todas as facilidades para a conclusão da Tese e por me agüentar todos estes anos;
- Aos colegas de laboratório Anderson, Danillo, Susana, Jorge, Cleusa, Paulinho, Liane, Naty-Celina, Aduino, Marlyson etc... pela colaboração com as técnicas e/ou por se afastarem enquanto eu atropelava com minhas urgências;
- Ao pessoal do Laboratório de Genética Evolutiva de Posadas, Diego, Dario, Martin, Ferro, Cotichelli, Boeris, entre outros, pelo valioso aporte de amostras, muitos pdf's e suas importantes sugestões.
- Ao Julian Faivovich, ao Diego Baldo e ao Victor Orrico, pelo importante aporte na hora de preencher buracos amostrais, tirar dúvidas e valiosas sugestões.

- A todos aqueles que colaboraram comigo durante as coletas: Gleomar, Selvino, Flavio, Ana Lima, Emil, Anderson, Danillo, Juca, Dany, Leandrinha, Youszef, Cleuton, Nancy, David etc, etc... Obrigado pela amena companhia e pelos gritos para espantar onças, jacarés, jararacas e sucuris;

- Aos meus amigos brasucas, muitos, e argentos, mais;

- A Dieguito e Carolina, pelo carinho, amor e apoio incondicional, minhas duas distrações preferidas; e a quem teremos o prazer de conhecer em 2011, azul ou rosa, pequeno dilema de nomes.

- A mis viejos por el cariño y el apoyo a lo largo de este camino, que sigue y sigue;

- A mi hermano Daniel, a Carolina e a Martina, que en algún momento conoceré y malcriaré.

A presente tese foi desenvolvida no Laboratório de Citogenética Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Guamá, Universidade Federal do Pará, Belém; e contou com o apoio financeiro do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG), Universidade Federal do Pará (UFPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
OBJETIVOS	10
CAPITULO I - REVISÃO CARIOLÓGICA DO GÊNERO <i>Leptodactylus</i>	
FITZINGER, 1826 (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)	11
RESUMO	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS	15
SUBGÊNERO <i>LEPTODACTYLUS</i>	15
Grupo <i>melanonotus</i>	15
Grupo <i>ocellatus</i>	21
Grupo <i>pentadactylus</i>	25
Grupo <i>fuscus</i>	33
SUBGÊNERO <i>LITHODYTES</i>	43
DISCUSSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
Apêndice 1	56
CAPITULO II - CHROMOSOME VARIATION IN THE TRIBE	
LOPHIOHYLINI MIRANDA-RIBEIRO, 1926 (ANURA, HYLIDAE)	59
ABSTRACT	60
INTRODUCTION	61
MATERIAL AND METHODS	63
RESULTS	64
DISCUSSION	75

ACKNOWLEDGEMENT	79
REFERENCES	79
Appendix 1	83
CAPITULO III - VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA NA TRIBO	
DENDROPSOPHINI FITZINGER, 1843 (ANURA: HYLIDAE)	84
RESUMO	85
INTRODUÇÃO	86
MATERIAL E MÉTODOS	88
RESULTADOS	89
<i>Pseudis</i> Wagler, 1830	89
<i>Scarthyla</i> Duellman & de Sá, 1988	91
<i>Sphaenorhynchus</i> Tschudi, 1838	94
<i>Xenohyla</i> Izecksohn, 1998	98
<i>Dendropsophus</i> Fitzinger, 1843	99
DISCUSSÃO	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
Apêndice 1	115
CONSIDERAÇÕES FINAIS e CONCLUSÕES	116
Capítulo I	116
Capítulo II	117
Capítulo III	118
ANEXO – METODOLOGIAS	120

RESUMO

Embora exista uma grande diversidade de complementos cromossômicos em Leptodactylidae ($2n = 18$ a $2n = 26$) e Hylidae ($2n = 20$ a $2n = 32$), a elevada fragmentação de dados limita o acesso a informações sobre as origens e os mecanismos responsáveis por esta diversidade. Isto provavelmente tem influenciado que os dados citogenéticos tenham sido principalmente utilizados na caracterização do *status* de espécies mais do que incluídos amplamente em análises filogenéticas. Este trabalho aborda, por meio de dados citogenéticos, aspectos evolutivos de três grandes grupos de anuros de ampla distribuição na região Neotropical.

O gênero *Leptodactylus* é agrupado com *Hydrolaetare*, *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys* na família Leptodactylidae. Os antecedentes cromossômicos neste gênero indicam variações nos números diplóides de $2n = 18$ a $2n = 26$, assim como variações nos números fundamentais (número de braços autossômicos, NF) e nas posições das Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR). Os resultados das análises de 26 espécies de *Leptodactylus* empregando diversas técnicas representa, provavelmente, a análise citogenética mais inclusiva realizada no gênero *Leptodactylus* até o momento, e os resultados constituem um marco para a proposição de hipóteses consistentes de evolução cromossômica no gênero.

A tribo Lophyiohylini agrupa atualmente 81 espécies distribuídas em 10 gêneros. A informação citogenética é escassa e restrita apenas a 12 espécies. São aqui apresentados comparativamente dados citogenéticos em espécies dos gêneros *Argenteohyla*, *Itapotihyla*, *Phyllodytes*, *Trachycephalus* e *Osteocephalus*. Os resultados indicam que, com exceção de *O. buckleyi* ($2n = 26$; NF = 50) e *P. edelmoi* ($2n = 22$; NF

= 44), todas as demais espécies analisadas coincidem com os dados citogenéticos disponíveis, que indicam um $2n = 24$ ($NF = 48$) na maioria das espécies cariotipadas, com NOR e constrições secundárias (CS) localizadas no par 11. Entretanto, em *Phyllodytes edelmoi* e *Argentohyla siemersi pedersenii*, essas regiões localizam-se nos pares 2 e 5, respectivamente. Blocos heterocromáticos foram associados às CS adicionais (sítios frágeis) em *Osteocephalus*, mas não em *Trachycephalus*. Dados citogenéticos nos gêneros *Nyctimantis* e *Tepuihyla*, assim como técnicas com maior poder de resolução e estudos mais inclusivos, são necessários para compreender melhor a evolução cromossômica da tribo.

A tribo Dendropsophini atualmente agrupa os gêneros *Scinax*, *Pseudis*, *Scarthyia*, *Sphaenorhynchus*, *Xenohyla* e *Dendropsophus*. Os dados citogenéticos registrados em todos os gêneros revelaram uma elevada diversidade cariotípica com grandes variações nos números diplóides ($2n = 22$ em *Scarthyia*; $2n = 24$ em *Scinax* e *Xenohyla*; $2n = 24, 24 + 1-2B$ e 26 em *Sphaenorhynchus*; $2n = 24$ e 28 em *Pseudis*; e, $2n = 30$ em *Dendropsophus*). O $2n = 24$ observado em *X. truncata* indica que o $2n = 30$ constitui uma sinapomorfia do gênero *Dendropsophus*. A localização das NOR no par 7 é uma característica compartilhada por espécies dos gêneros *Scarthyia*, *Xenohyla*, *Pseudis* e *Sphaenorhynchus*, com algumas exceções nos dois últimos (*P. caraya* e *S. carneus*). Entretanto, o gênero *Dendropsophus* exibe uma interessante diversidade em relação a número e localização das NOR. Por outro lado, a distribuição de heterocromatina apresentou padrões variáveis, particularmente gênero *Pseudis*. Embora exista uma excepcional variação cromossômica neste grupo, a informação fragmentária em alguns gêneros dificulta a formulação de hipóteses consistentes sobre o papel dos cromossomos na evolução do grupo.

ABSTRACT

Although there exists a large variety of chromosomal complements in Leptodactylidae ($2n = 18$ to $2n = 26$) and Hylidae ($2n = 20$ to $2n = 32$), the high fragmentation of data limits the access to the information about the origins and underlying mechanisms of its diversity. This, probably, had influence on the use of cytogenetic data on the characterization of species status more than been widely included in phylogenetic analyses. This work approaches, through cytogenetic data, some evolutionary aspects of three maior groups of anurans widely distributed in the Neotropical region.

The genus *Leptodactylus* is clustered with *Hydrolaetare*, *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* in the family Leptodactylidae. The chromosomal background in the genus indicates variation of the diploid numbers from $2n = 18$ to $2n = 26$, as well as, variation on the fundamental numbers (number of autosomic arms, FN) and on the position of Nucleolus Organizer Regions (NOR). Results of the analysis of 26 species of *Leptodactylus*, using several techniques, probably represents the most inclusive cytogenetic analyses on the genus *Leptodactylus* until now and its results provides appropriate bases to establish consistent relationships of chromosomal evolution on the genus *Leptodactylus*.

Actually the Lophyiohylini tribe cluster 81 species distributed in 10 genera. The cytogenetic information is scarce and restrict to only 12 species. In the present study, are presented, comparatively, cytogenetic data of species from *Argenteohyla*, *Itapotihyla*, *Phyllodytes*, *Trachycephalus* and *Osteocephalus* genera. With exception of *O. buckleyi* ($2n = 26$; NF = 50) and *P. edelmoi* ($2n = 22$; NF = 44), the results indicate

that all the others analyzed species coincide with cytogenetic data available, that indicates $2n = 24$ ($NF = 48$) on the majority of karyotyped species, with NOR and secondary constrictions (SC) located on the 11 pair. However, in *Phyllodytes edelmoi* and *Argentohyla siemersi pedersenii*, these regions are located on pairs 2 and 5, respectively. Heterochromatic blocks were associated to additional SC (fragile sites) in *Osteocephalus*, but not in *Trachycephalus*. Cytogenetic data on the *Nyctimantis* and *Tepuihyla* genera, techniques with techniques with higher resolution and more inclusive studies are necessary to better comprehend the chromosomal evolution of the tribe.

The Dendropsophini tribe actually clusters the *Scinax*, *Pseudis*, *Scarthyia*, *Sphaenorhynchus*, *Xenohyla* and *Dendropsophus* genera. The registered cytogenetic data of all the genera revealed high karyotype diversity with great variation on the diploid numbers ($2n = 22$ in *Scarthyia*; $2n = 24$ in *Scinax* and *Xenohyla*; $2n = 24, 24 + 1-2B$ e 26 in *Sphaenorhynchus*; $2n = 24$ and 28 in *Pseudis*; and, $2n = 30$ in *Dendropsophus*). The $2n=24$ observed in *X. truncata* indicates that $2n=30$ constitute a synapomorphy of the *Dendropsophus* genus. The NOR localization on the pair 7 is a characteristic shared by species of *Scarthyia*, *Xenohyla*, *Pseudis* and *Sphenorhynchus*, with some exceptions in the last two genera (*P. caraya* and *S. carneus*). However, the *Dendropsophus* genus displays an interesting diversity related to the number and its localization. On the other hand, the heterochromatin distribution presented standard variables, particularly on genus *Pseudis*. Although there is an exceptional chromosome variation in this group, fragmentary information in some genera made difficult to formulate consistent hypotheses about the role of chromosomes in the evolution of the group.

INTRODUÇÃO GERAL

As espécies apresentam geralmente apenas um cariótipo, ou seja, número e forma de cromossomos. A estabilidade do cariótipo em cada espécie pode, eventualmente, ser utilizada para identificação taxonômica, apesar de que espécies diferentes podem apresentar cariótipos semelhantes. O estudo comparativo dos cariótipos de diferentes espécies é útil não só para esclarecer problemas de ordem sistemática, como também auxiliar o conhecimento dos mecanismos cromossômicos evolutivos, que se desenvolvem durante a especiação, pois alterações cariotípicas comumente acompanham a evolução de uma espécie (King, 1993).

Número, forma e tamanho dos cromossomos são fatores que caracterizam as espécies e paralelamente modificam-se durante a dinâmica evolutiva. Análises citogenéticas extensivas, utilizando um grande número de espécies e gêneros, representam uma fonte de dados de importante utilidade na compreensão da história evolutiva dos anuros (Bogart & Wasseman, 1972; Morescalchi, 1973; Batistic *et al.*, 1975; Rasotto *et al.*, 1987; King, 1990; Bogart, 1991; Hillis, 1991).

Até algumas décadas atrás, acreditava-se que o cariótipo dos anuros era muito estável e que cada família possuía tipicamente um cariótipo muito similar (Barrio & De Chieri, 1971; Morescalchi, 1973). O atual acúmulo de informações não é compatível com tais teorias e revela que estes táxons constituem um grupo excelente para pesquisa de diversos aspectos da mutação cromossômica (Bogart, 1973; Bogart & Hedges, 1995; Hanada, 2002; King, 1980; Kuramoto, 1990; Mahony *et al.*, 1992; Northland *et al.*, 1990; Lourenço *et al.*, 1999; Odierna *et al.*, 2000; Schmid, *et al.*, 1988a-b; Supaprom & Baimai, 2002).

As primeiras pesquisas citogenéticas em anfíbios foram realizadas apenas

empregando técnicas de coloração convencional, onde o número e a morfologia cromossômica, assim como também o número e a localização das constrições secundárias foram os principais critérios de análise (Schmid, 1980). Posteriormente, com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico, foi possível realizar estudos mais detalhados a respeito das relações cariológicas inter-específicas, além de proporcionar informações precisas sobre a subestrutura cromossômica (Schmid, 1982).

Em anfíbios, tais técnicas revelam uma extensa diversidade na quantidade, tipos e distribuição da heterocromatina, nas regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e outras estruturas cromossômicas (Green & Sessions, 1991, 2007). O método habitual para localizar todas as regiões heterocromáticas em cromossomos metafásicos (independentemente de seu conteúdo de A-T ou C-G) é a técnica de Bandeamento C (Bostock & Sumner, 1978; Sumner, 1972). A mesma foi empregada para analisar um número relativamente alto de espécies de anuros e seus resultados indicam um importante grau de variação interespecífica em grupos de entidades próximas taxonomicamente (King, 1990). As técnicas com fluorocromos DNA-base específicos mostram padrões de Bandas tipo C (Schmid, 1982). Apesar destas técnicas terem sido amplamente usadas num vasto número de espécies de anuros, gerando importantes informações na determinação de diferenças inter- e intra-específicas, as mesmas têm-se mostrado ineficazes na determinação real das homologias cromossômicas.

Os fluorocromos DNA-base específicos produzem bandas transversas ao longo dos cromossomos metafásicos e têm sido amplamente utilizados na caracterização cariotípica dos vertebrados superiores. Embora em vertebrados inferiores (peixes e anfíbios) estas técnicas não sejam de ampla aplicação, os estudos até agora realizados indicam diferenças notáveis com respeito ao observado em vertebrados superiores (Schmid, 1982) e com certeza tais técnicas serão de grande utilidade para o estudo de

grupos de espécies próximas filogeneticamente. A comparação entre as bandas C e os bandeamentos com fluorocromos permitem estabelecer, além da distribuição exata, a composição química de tais bandas (Schmid, 1982).

As NORs são uma dos caracteres mais óbvios presentes nos cromossomos metafásicos dos anfíbios. Não apenas são grandes em tamanho, mas exibem também um enorme grau de variação estrutural (King, 1990). Seu número e posição são usualmente característicos de espécies e populações, além de variações interindividuais observadas em populações de diversos organismos. As técnicas de coloração com AgNO₃ (Goodpasture & Bloom, 1975; Howell & Black, 1980) como meio para determinar a localização das NOR ativas têm sido amplamente utilizadas em anfíbios e sua especificidade foi ressaltada por Schmid (1982). Devido à sua reação com proteínas não histônicas ricas em grupos sulfidrilo e disulfuro, a prata une-se ao rRNA recentemente transcrito (Varley & Morgan, 1978; Buys & Osinga, 1980), existindo evidência clara de que pode-se ligar também a outros sítios cromossômicos em anfíbios. Nardi *et al.*, (1978), combinando técnicas de coloração com prata e HIS demonstraram que em cromossomos metafásicos de *Lissotriton vulgaris* (Urodela) a prata unia-se tanto aos organizadores nucleolares como a outras regiões do cromossomo que hibridizaram com cístrons de rRNA 5S e a outras de função desconhecida. Tanto os estudos de HIS como os de coloração com prata, mostraram uma elevada frequência de heteromorfismos no tamanho das NORs (King, 1990; Schmid, 1982). Em Anura, as análises de NORs usando coloração com nitrato de prata (AgNO₃) mostraram que a maioria das espécies, tanto em famílias primitivas como derivadas, possuem somente um par de NORs em seus cariótipos diplóides (Lourenço *et al.*, 1998; Mahony & Robinson, 1986; Schmid, 1982). King *et al.* (1990) sugerem que a presença de um só par de NORs nos cariótipos diplóides representaria uma condição ancestral em Anura, considerando os pares

cromossômicos portadores de NOR múltiplos como condições derivadas. A origem evolutiva de NORs múltiplas em Anura provavelmente envolve eventos tais como inversões, translocações, transposição por elementos genéticos móveis, ampliações de cístrons tipo “orphan” de rDNA ou erros de inserção durante ampliações extracromossômicas de cístrons ribossomais (Wiley *et al.*, 1989; King *et al.*, 1990; Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1995, 1986; Lourenço *et al.*, 1998; 2000).

Embora exista uma grande diversidade de complementos cromossômicos em Leptodactylidae (de 9 até 13 pares de cromossomos) e Hylidae (de 10 até 16 pares cromossômicos) (Campos *et al.*, 2009; Green & Sessions, 1991, 2007; Lourenço *et al.*, 2008), pouco se conhece sobre a origem e os mecanismos responsáveis desta diversidade. Este tipo de inferência, como em muitos outros grupos de anuros, são dificultadas pela falta de evidências claras sobre a homologia entre os pares cromossômicos das distintas espécies analisadas, motivo que praticamente impossibilita estabelecer quais são os cromossomos envolvidos nas transformações numéricas e nos rearranjos cromossômicos (Dobigny *et al.*, 2004). Esta incerteza tem determinado que o conhecimento da evolução cariotípica em anuros em geral esteja centrado muito mais na diversidade cariotípica do que nos mecanismos geradores da mesma.

Descrições e análises cromossômicas detalhadas, interpretados no marco das filogenias robustas disponíveis, permitem dar coesão às interpretações sobre a evolução cromossômica e estabelecer claramente hipóteses sobre a mesma. Portanto a questão central a ser resolvida é: que eventos cromossômicos estiveram implicados na evolução cromossômica das famílias Leptodactylidae (com especial ênfase no Gênero *Leptodactylus*) e Hylidae (com especial ênfase nas Tribos Lophiohylini e Dendropsophini)? E como estes eventos estão distribuídos na estrutura filogenética de cada grupo?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrio, A., De Chieri, P.R. (1971): Contribución al esclarecimiento de la posición taxofiletica de algunos batracios patagónicos de la familia Leptodactylidae mediante el análisis cariotipico. *Physis* 30: 673–685.
- Batistic, R.F., Soma, M., Beçak, M.L., Beçak, W. (1975): Further studies on polyploid amphibians. *J Heredity* 66:160-162.
- Bogart, J.P. (1973): Evolution of anuran karyotypes. In: *Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems*. Vial JL (Ed.) University of Missouri Press, Missouri, pp 337-349.
- Bogart, J.P. (1991): The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Green DM and Sessions SK (eds.). Academic Press, San Diego, pp 233-255.
- Bogart, J.P., Hedges, S.B. (1995): Rapid chromosome evolution in Jamaican Frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *J Zool.* 235: 9-31.
- Bogart, J.P. Wasserman, A.O. (1972): Diploid-Polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics* 11: 7-24.
- Bostock, C.J., Sumner, A.T. (1978): *The eukaryotic chromosome*. North Holland Publishing Company: Amsterdam, New York, Oxford, 374 pp.
- Buys, C.H.C.M., Osinga, J. (1980): Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing regions. A cytochemical study on the selective silver staining of NORs. *Chromosoma* 77: 1-11.
- Campos, J.R.C., Ananias, F., Brasileiro, C.A., Yamamoto, M., Haddad, C.F.B., Kasahara, S. (2009): Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. *Hereditas*, 146: 104-111.

- Dobigny, G., Ducroz, J.-F., Robinson, T.J., Volobouev, V. (2004): Cytogenetics and Cladistics. *Systematic Biology*. 53:470-484.
- Foot, D.L., Wiley, J.E., Little, M.L., Mine, J. (1991): Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. *Cytogenet Cell Genet* 57:196-199.
- Goodpasture, C., Bloom, S.E. (1975): Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Green, D.M., Sessions, A.K. (1991): Amphibian cytogenetics and evolution. Green DM and Sessions SK (eds), Academic Press, San Diego, 432 pp.
- Green, D.M., Sessions, A.K. (2007): Karyology and Cytogenetics, pp. 2756-2841. In: *Amphibian Biology*. vol.7. H. Heatwole and M. Tyler (eds). Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton.
- Hanada, H.G. (2002): C banding show structural differences between the Z and W chromosomes in the frog *Buergeria buergeri*. *Hereditas* 136: 151-154.
- Hillis, D.M. (1991): The phylogeny of amphibians: Knowledge and the role of cytogenetics. In: *Amphibian Cytogenetics and Systematics*. Green DM and Sessions SK (eds.), Academic Press, San Diego, pp 7–31.
- Howell, W.N., Black, D.A. (1980): Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- King, M. (1980): C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191:217.
- King, M. (1990): Amphibia. In: *Animal Cytogenetics*. Vol. 4: Chordata 2. Gebrüder Borntraeger Berlin, Stuttgart, pp 13-24.
- King, M. (1993): *Species Evolution. The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press, Cambridge, 336 pp.

- King, M., Contreras, N., Honeycutt, R. L. (1990): Variation within ant between nucleolar regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S and 28S “in-situ” hybridization. *Genet.* 80: 17-29.
- Kuramoto, M. (1990): A list of chromosome numbers of anuran amphibians. *Bull Fukuoka Univ Educ* 39: 83-127.
- Lourenço, L.B., Bacci-Júnior, M., Martins, V.G., Recco-Pimentel, S.M., Haddad, C.F.B. (2008): Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica* 132:255–266.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C.A., Recco-Pimentel, S.M. (2000): Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. *Hereditas* 133: 201-209.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M., Cardoso, A.J. (1998): Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver-staining and fluorescence in situ hybridization. *Chrom. Res* 6: 621-628.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M., Cardoso, A.J. (1999): Two karyotypes, heteromorphic sex chromosomes and C-band variability in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). *Can J Zool* 77: 1-8.
- Mahony, M., Donnellan, S.C., Aplin, K. (1992): Karyotypes of Australo-Papuan Microhylid frogs (Anura: Microhylidae). *Herpetologica* 48: 184-192.
- Mahony, M.J., Robinson, E.S. (1986): Nucleolar organizer regions (NOR) location in karyotypes of Australian ground frogs (Family Myobatrachidae). *Genetica* 68: 119-127.
- Morescalchi, A. (1973): Amphibia. In: *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Chiarelli AB and Capanna E (eds.) Academic Press, London, pp 233-348.

- Nardi, I., De Lucchini, S., Barsacchi-Pilone, G., Andronico, F. (1978): Chromosome location of the ribosomal RNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). IV. Comparison between *in-situ* hybridization with 3H 18s + 28s rRNA and AS-SAT staining. *Chromosoma* 70: 91-99.
- Northland, I., Capetillo, J., Iturra, P., Veloso, A. (1990): Nuclear DNA content and karyosystematic relationships of species grouped in primitive tribes of Leptodactylidae (Amphibia-anura). *Rev. Bras. Genet.* 13: 247-254.
- Odierna, G., Andreone, F., Aprea, G., Arribas, O., Capriglione, T., Vences, M. (2000): Cytological and molecular analysis in the rare discoglossid species, *Alites muletensis* (Sanchiz and Adrover 1977) and its bearing on archaeobatrachian phylogeny. *Chrom. Res* 8: 435-442.
- Rasotto, M.B., Cardellini, P., Sala, M. (1987): Karyotypes of five Dendrobatidae (Anura, Amphibia). *Herpetologica* 43: 177-182.
- Schmid, M. (1980): Chromosome evolution in Amphibia. In: *Cytogenetics of Vertebrates*. Müller (ed.). Birkhäuser, Basel, Boston, pp 4-27.
- Schmid, M. (1982): Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis the structure and variability of NORs in anura. *Chromosoma* 87:327-344.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F., León, P. (1995): Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer region in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 69: 18-26.
- Schmid, M., Sims, S.H., Haaf, T., Macgregor, H.C. (1986): Chromosome banding in Amphibia. IX. 18s and 28s ribosomal RNA genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrotheca riobambae*. *Chromosoma* 94:139-145.

- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W., De Almeida, C.G., Duellman, W.E. (1988a): Chromosome banding in amphibia. XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 97: 33-42.
- Schmid, M., Steinlein, C., Friedl, R., De Almeida, C.G., Haaf, T., Hillis, D.M., Duellman, W.E. (1988b): Chromosome banding in Amphibia. XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 99: 413-423.
- Sumner, A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.
- Supaprom, T., Baimai, V. (2002): Mitotic karyotypes of eight species of microhylid frogs from Thailand (Anura: Mycrohylidae). *Amphib-reptil* 23: 510-516.
- Varley, J.M., Morgan, G.T. (1978): Silver staining of the lampbrush chromosomes of *Triturus cristatus carnifex*. *Chromosoma* 67: 233-244.
- Wiley, J.E., Little, M.L., Romano, M.A., Blount, D.A., CLINE, G.R. (1989): Polymorphism in the location of the 18s and 28s rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid tree frogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. *Chromosoma* 97: 481-487.

OBJETIVOS

Capítulo I

Analisar a variação cariotípica entre as espécies do gênero *Leptodactylus* e sugerir afinidades filogenéticas intra- e intergenéricas baseadas em dados cromossômicos.

Capítulo II

Analisar a variação cariotípica entre os gêneros da Tribo Lophiohylini e sugerir afinidades filogenéticas intra- e intergenéricas baseadas em dados cromossômicos.

Capítulo III

Analisar a variação cariotípica entre os gêneros da Tribo Dendropsophini e sugerir afinidades filogenéticas intra- e intergenéricas baseadas em dados cromossômicos.

CAPITULO I

REVISÃO CARIOLÓGICA DO GÊNERO *Leptodactylus*

FITZINGER, 1826 (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

RESUMO

Leptodactylus é um gênero muito diversificado de anuros neotropicais, agrupado junto com os gêneros *Hydrolaetare*, *Paratelmatobius* e *Scythrophrys* na família Leptodactylidae, que ocorrem em grande parte da região Neotropical. Os antecedentes cromossômicos para este gênero indicam variações nos números diplóides de 18 para *L. linneatus*, 24 e 26 para as espécies do antigo gênero *Adenomera* e *Leptodactylus silvanimbus* e 22 para todas as outras espécies do subgênero *Leptodactylus*, assim como variações nos números fundamentais e nas posições das Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs). Neste trabalho são analisados citogeneticamente mais de 150 espécimes de 26 espécies de *Leptodactylus* da Argentina e do Brasil. As análises cariológicas foram realizadas empregando técnicas de coloração convencional, bandeamento C, impregnação com AgNO₃, fluorocromos (CMA3 e DAPI) e hibridização *in situ* com sondas de telômeros e de rDNA 18S. Este aporte representa a análise citogenética mais inclusiva realizada no gênero *Leptodactylus* até o momento e seus resultados constituem um marco para a proporsição de hipóteses consistentes de evolução cromossômica na família Leptodactylidae.

INTRODUÇÃO

Leptodactylus é um gênero muito diversificado de anuros neotropicais, agrupado junto com os gêneros *Hydrolaetare*, *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys* na família Leptodactylidae, que ocorre no extremo sul da região neártico e em grande parte da região Neotropical (Frost, 2010; Grant *et al.*, 2006). Consiste atualmente de 88 espécies reconhecidas, que encontram-se divididas em dois subgêneros, *Leptodactylus* (que comporta as espécies tradicionalmente alocadas no gênero) e *Lithodytes* (composto pelas espécies dos antigos gêneros *Adenomera* e *Lithodytes*) (Frost *et al.*, 2006). A maioria das espécies do subgênero *Leptodactylus* são agrupadas, através de análises morfológicas e ecológicas, em quatro grupos de espécies: *melanonotus*, *ocellatus*, *pentadactylus* e *fuscus* (Heyer, 1969; Maxson & Heyer, 1988).

Barbieri (1950) relata pela primeira vez dados referidos a cromossomos e espermatozoides no gênero *Leptodactylus*, descrevendo um número cromossômico diplóide $2n = 22$ em *L. ocellatus*, *L. chaquensis*, *L. bufonius* e *L. prognathus* (= *L. latinus*). Posteriormente, Saez & Brum (1960) confirmam o $2n = 22$ para *L. latrans* (como *L. ocellatus*). Estudos cromossômicos posteriores em *Leptodactylus* indicam variações nos números cromossômicos ($2n$) de 18 para *L. lineatus* (Bogart, 1970), 24 e 26 para as espécies do antigo gênero *Adenomera* e *L. silvanimbus* (Amaro-Ghilardi, *et al.*, 2006; Bogart, 1974; Campos *et al.*, 2009) e 22 para todas as outras espécies do subgênero *Leptodactylus*, assim como variações nos números fundamentais e nas posições das NORs (Amaro-Ghilardi, *et al.* 2006; Beçak, 1968; Barrio & De Chieri, 1970; Bogart, 1970; 1974; Barrio, 1971; Denaro, 1972; Heyer & Diment, 1974; Silva *et al.*, 2004, 2006). O presente estudo representa a análise citogenética mais abrangente realizada no gênero *Leptodactylus* até o momento e seus resultados constituem um marco para a proporsição de hipóteses consistentes de evolução cromossômica na

família Leptodactylidae.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram analisados citogeneticamente mais de 150 espécimes de 26 espécies de *Leptodactylus* da Argentina e do Brasil. No Apêndice 1 encontram-se dados detalhados relacionados ao número de espécimes analisados em cada espécie, assim como protocolo de tombamento, localidade de coleta e sexo. Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de preparações citológicas diretas de medula óssea, epitélio duodenal e testículos (Schmid, 1978). Todos os espécimes foram pré-tratados com colchicina 0,1% (0,2 ml por cada 10 g de peso do espécime) antes de serem mortos por sobre-dosagem com anestésicos. As análises cariológicas foram realizadas empregando técnicas de coloração convencional com Giemsa 5%, bandeamentos C segundo Sumner (1972), impregnação com AgNO₃ (Howell & Black, 1980), coloração seqüencial com fluorocromos CMA3/DAPI segundo Schweizer & Ambros (1994); e hibridização *in situ* com sondas de telômeros e de rDNA 18S (Viégas-Péquignot, 1992). Os pares cromossômicos foram classificados em tamanhos decrescentes segundo a nomenclatura descrita por Levan *et al.* (1964). A caracterização morfométrica dos cromossomos foi realizada considerando tamanhos relativos e índices centroméricos calculados em pelo menos 10 metáfases completas de cada espécime analisado usando o programa MicroMeasure versão 3.2 (Reeves & Tear, 1999). Os números fundamentais (NF) foram calculados levando em consideração o número total de braços autossômicos.

RESULTADOS

São apresentados cariótipos de 26 espécies do gênero *Leptodactylus* (24 do subgênero *Leptodactylus* e duas agrupadas em *Lithodytes*), nove dos quais representam dados inéditos. Além disso, apresentam-se dados sobre os padrões de bandeamento C de 19 espécies; 12 dos mesmos constituem dados originais e sete correspondem a novas populações analisadas com esta técnica. Dá-se a conhecer a localização das NORs de 21 espécies (12 inéditas), sendo algumas das mesmas confirmadas através de experimentos de FISH com sonda 18S. Também são apresentados os resultados dos experimentos com sondas teloméricas em três espécies com diferentes constituições cariotípicas.

SUBGÊNERO *LEPTODACTYLUS*

Grupo *melanonotus*

Leptodactylus leptodactyloides (Andersson, 1945)

Os espécimes analisados apresentaram um cariótipo composto por 11 pares cromossômicos (NF = 36; Figura 1). Destes, os pares 1, 2, 5 e 6 apresentaram uma morfologia metacêntrica, o par 8 submetacêntrica, os pares 3 e 4 subtelocêntrica e acrocêntrica nos pares 7, 9, 10 e 11 (Tabela 1). O par portador da NOR é o par 8 (Figura 1). A localização do sinal fluorescente no braço longo do par 8, observado nas análises de FISH com sondas rDNA 18S, coincidem com as CS (Figura 1 e 2). O padrão de Bandeamento C revela blocos de heterocromatina na maioria das regiões centroméricas e distais; por outro lado, a NOR está associada a um bloco de heterocromatina intersticial. Nos experimentos com sondas teloméricas apenas sinais terminais foram observados em todos os cromossomos do complemento (Figura 2).

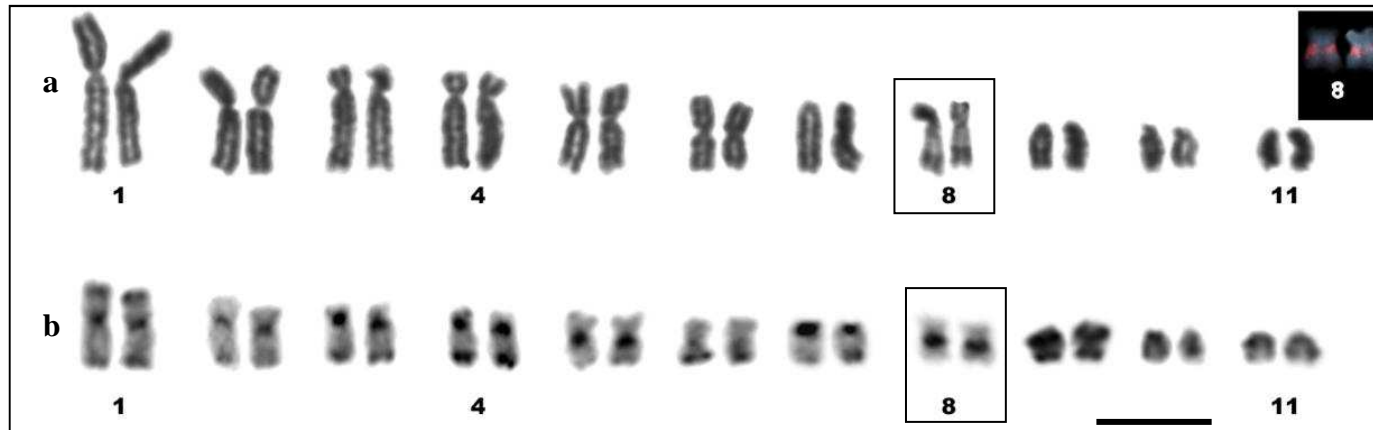
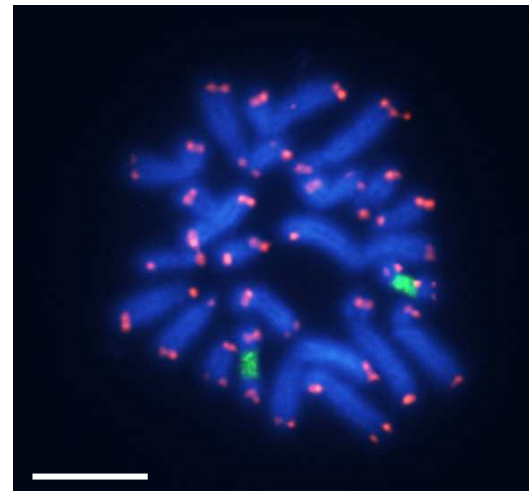


Figura 1. *Leptodactylus leptodactyloides*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de FISH com sondas de DNA_{r-18S}. Barra = 10 μm.

Figura 2. *Leptodactylus leptodactyloides*. FISH com sondas teloméricas (vermelho) e DNAr_{18S} (verde). Barra = 10μm.



Leptodactylus podicipinus (Cope, 1862)

Os cariótipos de espécimes desta espécie apresentaram 22 cromossomos (NF = 36; Figura 3). As análises morfométricas indicam as mesmas morfologias cromossômicas que as descritas em *L. leptodactyloides* (Tabela 1). Similarmente, o par portador da NOR também está localizado intersticialmente no braço longo do par 8 (Figura 3), e coincide com CS. Diferentemente, o padrão de bandeamento C obtido nesta espécie não apresenta heterocromatina associada aos telômeros.

Leptodactylus petersii (Steindachner, 1864)

A diferença das espécies descritas anteriormente, os cariótipos obtidos em espécimes desta espécie apresentaram um complemento composto apenas de cromossomos de dois braços ($2n = 22$, NF = 44; Figura 4). As características morfométricas dos mesmos encontram-se detalhadas na Tabela 1. A NOR está localizada na região intersticial do braço longo do par 8, e coincide com a CS observada.

Leptodactylus pustulatus (Peters, 1870)

Os espécimes analisados apresentaram um cariótipo composto por 11 pares cromossômicos de dois braços ($2n = 22$, NF = 44; Figura 5); sendo metacêntricos os pares 1, 2, 5-6 e 9-11, submetacêntricos os pares 3 e 8, e subtelo-cêntricos os pares 4 e 7 (Tabela 1). As NORs também estão localizadas no par 8, mas, diferentemente das espécies aqui analisadas do grupo *melanonotus*, as mesmas localizam-se no braço curto, o qual é corroborado nos experimentos de FISH com DNA_{r-18S} (Figura 6a).

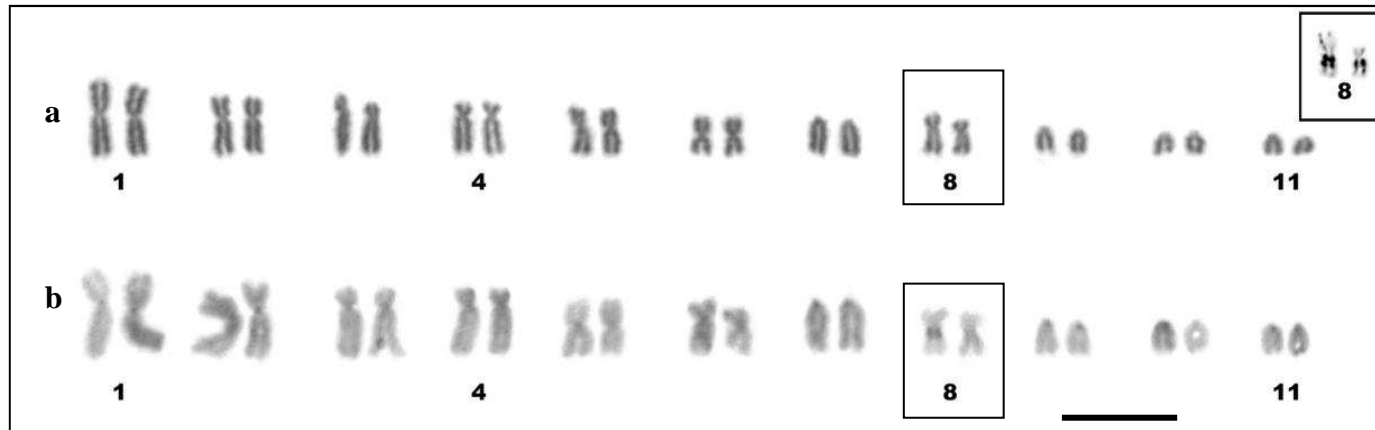


Figura 3. *Leptodactylus podicipinus*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO₃. Barra = 10 μm.

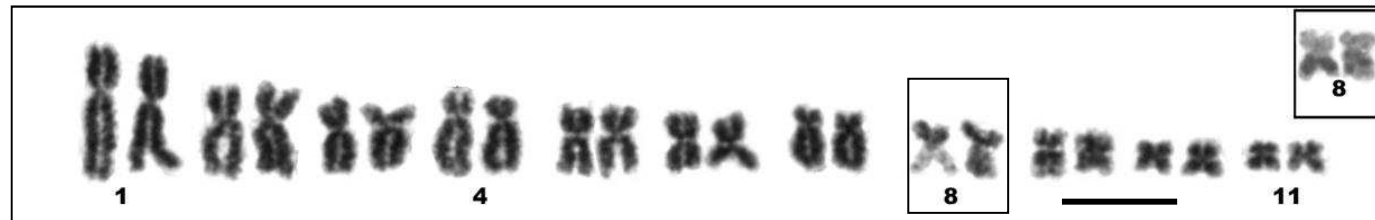


Figura 4. *Leptodactylus petersii*. Cariótipo com coloração convencional e localização das NOR (destaque) através de AgNO₃. Barra = 10 μm.

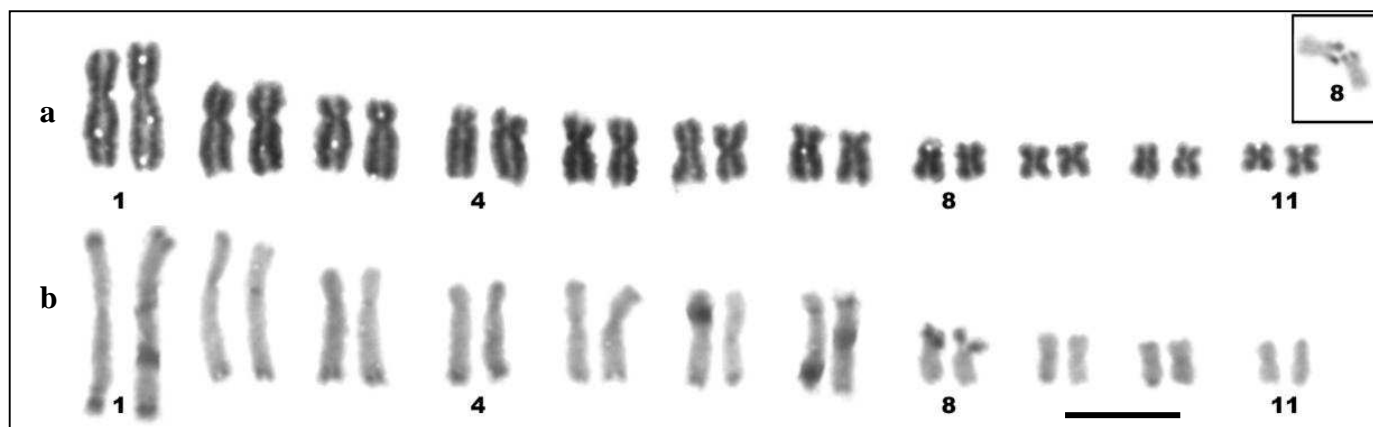
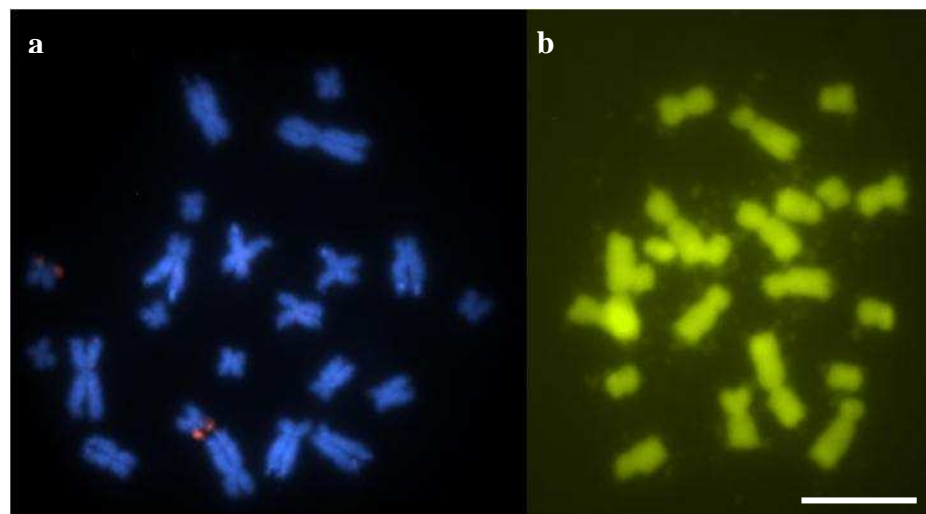


Figura 5. *Leptodactylus pustulatus*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO_3 . Barra = 10 μm .

Figura 6. *Leptodactylus pustulatus*. (a) Fish com sondas de DNAr_{18S}; (b) coloração com CMA3. Barra = 10 μm .



Associações das NORs foram comumente observadas nas células analisadas. O padrão de bandejamento C inclui pequenas marcações cêntricas e teloméricas em quase todos os pares cromossômicos; a associação das NORs com blocos heterocromáticos também é observada nas amostras analisadas desta espécie. O emprego de fluorocromos base específico (DAPI/CMA3) permitiu apenas caracterizar as bandas heterocromáticas teloméricas como regiões ricas em bases AT (Figura 6 a-b).

Tabela 1. Análise biométrica dos cromossomos das espécies do gênero *Leptodactylus* SUBGÊNERO *Leptodactylus* GRUPO *melanonotus* incluídas no presente trabalho. CR = comprimento porcentual relativo; IC = índice centromérico; Tipo: m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st: subteloentrico, t = telocêntrico; * = par portador da NOR.

ESPECIE		PAR CROMOSSÔMICO										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>L. leptodactyloides</i>	CR	17.4	12.2	11.6	10.7	10	8.6	7.8	7.4	5.2	4.8	4.3
	IC	0.38	0.37	0.22	0.23	0.4	0.46	0	0.31	0	0	0
	Tipo	m	m	st	st	m	m	t	sm*	t	t	t
<i>L. podicipinus</i>	CR	16.9	13.7	11	11	9.7	8.6	7.6	7.5	5.3	4.7	3.9
	IC	0.43	0.39	0.23	0.24	0.4	0.47	0	0.3	0	0	0
	Tipo	m	m	st	st	m	m	t	sm*	t	t	t
<i>L. petersii</i>	CR	19.1	12.6	10.5	10.2	9.2	8.3	7.6	7.4	6.5	4.4	4.1
	IC	0.34	0.38	0.42	0.26	0.42	0.44	0.29	0.42	0.4	0.47	0.48
	Tipo	sm	m	m	st	m	m	sm	m*	m	m	m
<i>L. pustulatus</i>	CR	18.9	13.7	11.5	10.4	9.8	8.9	7.9	5.5	4.9	4.5	4
	IC	0.38	0.39	0.32	0.24	0.42	0.42	0.24	0.35	0.5	0.38	0.44
	Tipo	m	m	sm	st	m	m	st	sm*	m	m	m

Grupo *ocellatus*

Leptodactylus chaquensis Cei, 1950

Os espécimes analisados apresentaram um cariótipo composto por 11 pares cromossômicos com dois braços (NF = 44; Figura 7). As análises morfométricas revelaram os pares 1, 5-6, 8 e 10-11 com morfologia metacêntrica, os pares 2-3, 7 e 9 submetacêntrica, e o par 4 subtelocêntrica (Tabela 2). O par portador da NOR é o par 8 (Figura 1). A localização do sinal fluorescente no braço curto do par 8, obtido mediante análises de FISH com sondas ribossômicas 18S, coincide com as CS distais observadas em algumas células (Figura 7b). O padrão de bandeamento C indica regiões ricas em heterocromatina em todos os centrômeros e marcas distais apenas em alguns pares. Por outro lado, a técnica também revelou um interessante padrão de marcas intersticiais, sendo observados blocos nos braços curtos dos pares 3-9 e 11 e no braço longo do par 8 (Figura 7b).

Leptodactylus latrans (Steffen, 1815)

Os cariótipos de espécimes desta espécie apresentaram 22 cromossomos (NF = 44; Figura 8). As análises morfométricas indicam grandes semelhanças morfológicas com os resultados obtidos em *L. chaquensis*, da qual se diferencia apenas na morfologia do par 2, metacêntrico neste caso (Tabela 2). O par portador da NOR também apresenta uma localização distal no braço curto do par 8 (Figura 8). Dificilmente CS foram visualizadas neste par. Associação entre as NORs foram comumente observadas nas células mitóticas analisadas. O bandeamento C revelou marcas intersticiais na maioria

dos centrômeros do complemento. Entretanto, o número de cromossomos portadores de marcas intersticiais e distais é menor em relação a *L. chaquensis*.

Leptodactylus macrosternum Miranda-Ribeiro, 1926

Os espécimes analisados apresentaram um cariótipo composto por 11 pares cromossômicos com dois braços ($2n = 22$, $NF = 44$; Figura 9), sendo metacêntricos os pares 1, 5-6 e 9-10, submetacêntricos os pares 2-3, 8 e 11, e subtelocêntrico o par 4 (Tabela 2). As NORs também estão localizadas na região distal no braço curto do par 8. Experimentos de FISH com sonda DNA_{r-18S} confirmam os resultados obtidos pela técnica da impregnação com $AgNO_3$. A presença de CS associadas às NORs não foi observada nas células analisadas. O padrão de bandeamento C apresentou regiões heterocromáticas associadas a todos os centrômeros e marcações escassas nas regiões distais. Entretanto, as características mais conspícuas reveladas pela técnica de bandeamento são as marcas intersticiais, as quais estão presentes nos braços curtos dos pares 4-5 e 6-11 e no braço longo dos pares 8-10 (Figura 9b).

Tabela 2. Análise biométrica dos cromossomos das espécies do gênero *Leptodactylus* SUBGÊNERO *Leptodactylus* GRUPO *ocellatus* incluídas no presente trabalho. CR = comprimento porcentual relativo; IC = índice centromérico; Tipo: m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, t = telocêntrico; * = par portador da NOR.

ESPÉCIE		PAR CROMOSSÔMICO										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>L. chaquensis</i> .	CR	16.3	13.2	10.7	10.6	9.9	9	8.2	6	6.2	5	4.7
	IC	0.5	0.37	0.32	0.24	0.43	0.47	0.35	0.48	0.31	0.48	0.5
	Tipo	m	sm	sm	st	m	m	sm	m*	sm	m	m
<i>L. latrans</i>	CR	17.4	13.7	11.3	10.3	9.9	9.2	8	5.3	5.6	4.9	4.3
	IC	0.49	0.39	0.29	0.18	0.42	0.47	0.3	0.47	0.31	0.47	0.38
	Tipo	m	m	sm	st	m	m	sm	m*	sm	m	m
<i>L. macrosternum</i>	CR	15.8	12	10.8	10.7	10	9.2	8.9	6	5.8	5.6	4.9
	IC	0.47	0.36	0.31	0.19	0.46	0.48	0.3	0.47	0.48	0.46	0.37
	Tipo	m	sm	sm	st	m	m	sm	m*	m	m	sm

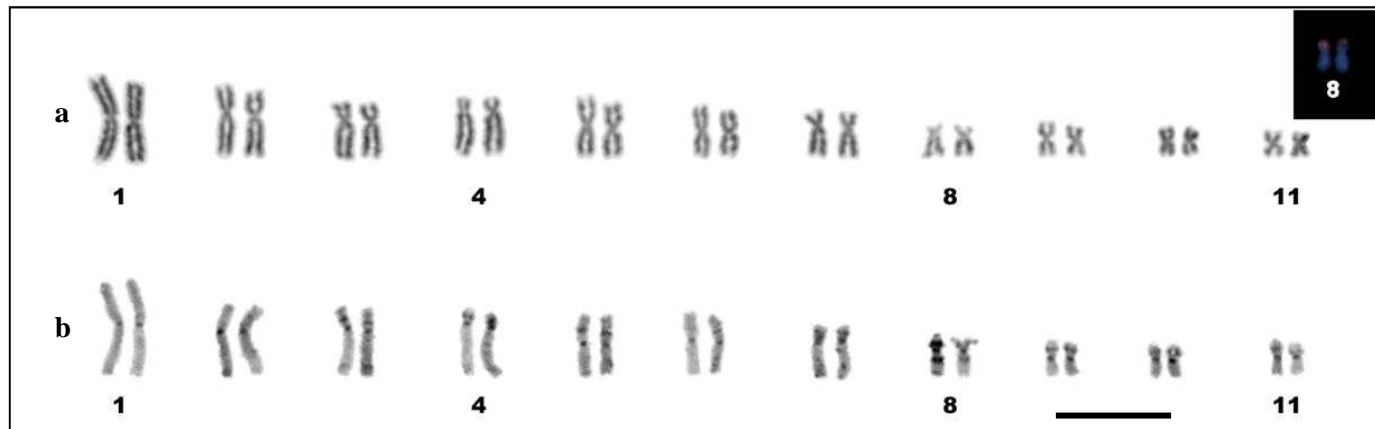


Figura 7. *Leptodactylus chaquensis*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de FISH com sondas de DNA_{r-18S}. Barra = 10 μm.

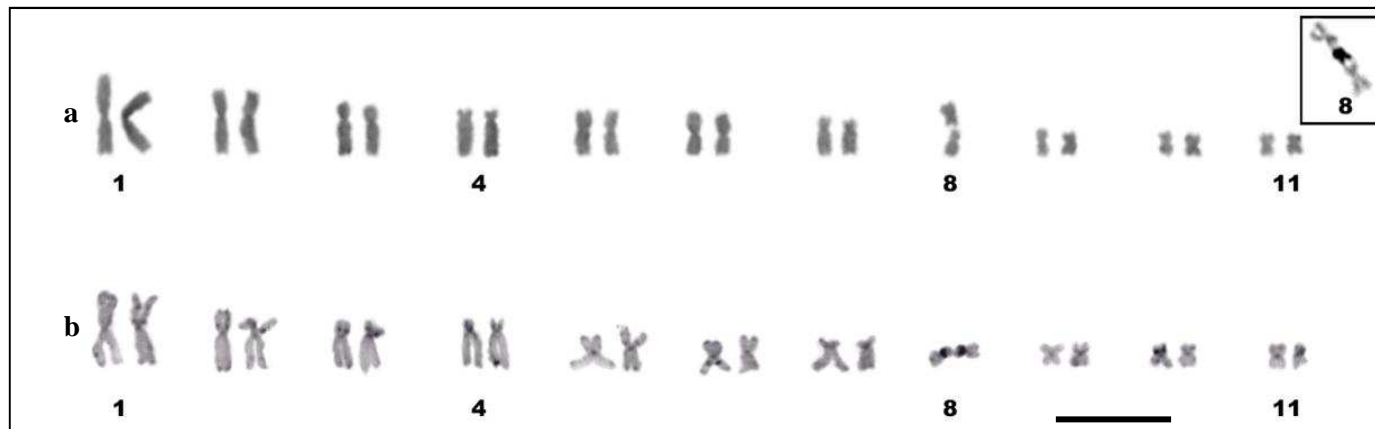


Figura 8. *Leptodactylus latrans*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO₃. Barra = 10 μm.

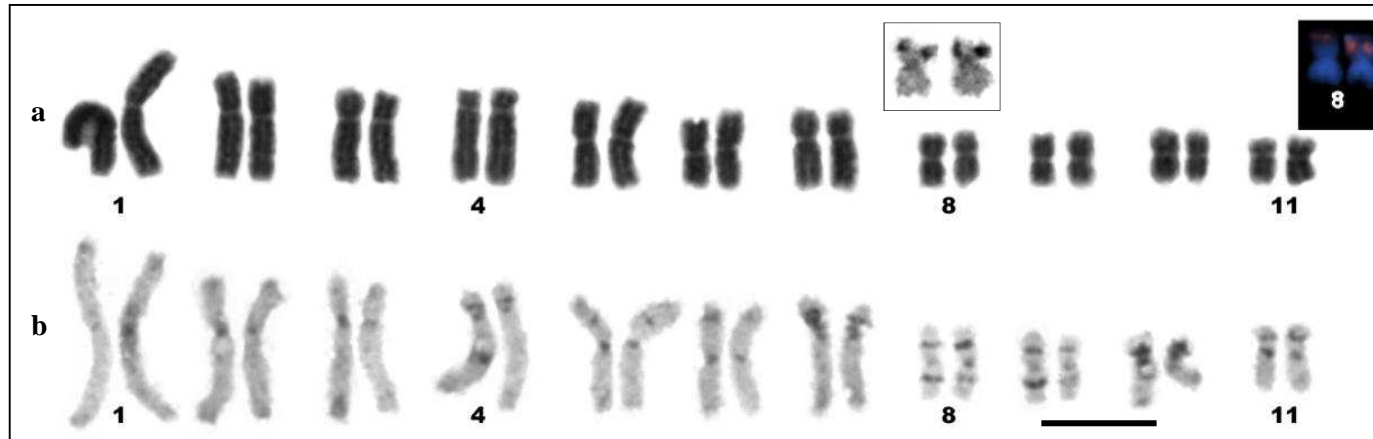


Figura 9. *Leptodactylus macrosternum*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandeamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO_3 e FISH com sondas de DNA_{r-18S} . Barra = 10 μm .

Grupo *pentadactylus*

Leptodactylus laticeps Boulenger, 1918

Os espécimes analisados apresentaram um complemento cromossômico composto por 11 pares cromossômicos (NF = 44; Figura 10). Análises morfométricas caracterizam como metacêntricos os pares 1-2, 5-6 e 9-11, submetacêntricos os pares 3 e 8, e como subtelocêntricos os pares 4 e 7 (Tabela 3). FISH com sonda DNA_{r-18S}, assim como impregnação com AgNO₃, indicam que as NORs se localizam na região intersticial do braço curto do par 2. CS associadas a estas regiões foram observadas na maioria das células analisadas (Figura 10). O padrão de bandeamento C se caracteriza por marcações em todas as regiões centroméricas; marcações distais nos braços longos dos pares 1-4, 6-7 e 10, e nos braços curtos dos pares 2, 5-6, 8 e 11, sendo este último braço completamente heterocromático; marcações intersticiais tênues observaram-se no braço curto dos pares 1 e 3, e no braço longo do par 5; finalmente, as NORs estão associadas a um bloco de heterocromatina pericentromérica (Figura 10b).

Leptodactylus siphax Bokermann, 1969

O cariótipo observado nesta espécie apresenta $2n = 24$ (NF = 44; Figura 11). A morfologia metacêntrica do par 8 representa a única diferença em relação a *L. laticeps* (Tabela 3). As NORs também foram observadas em posição intersticial no braço curto do par 2 (Figura 11). A técnica do bandeamento C revelou um interessante padrão, onde marcações intersticiais e centroméricas foram observadas em todos os pares cromossômicos; adicionalmente, os braços curtos dos pares 10 e 11 apresentaram-se integralmente heterocromáticos. A coloração com fluorocromos revela apenas que as NORs são regiões ricas em bases CG (Figura 12). Nos experimentos de FISH com

sondas teloméricas, sinais unicamente distais foram observados em todos os cromossomos do cariótipo (Figura 13).

Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824)

O complemento cromossômico desta espécie apresenta $2n = 22$ (NF= 44; Figura 14). As características morfométricas apresentam os pares 1, 6 e 9-10 como metacêntricos, submetacêntricos os pares 2, 5, 7 e 11, e os pares 3 e 4 como subtelocêntricos (Tabela 3). A região distal do braço curto do par 8 comporta as CS e a NOR. Associações entre elas foram observados freqüentemente nas células analisadas. O bandejamento C revela regiões heterocromáticas em todos os centrômeros e em alguns telômeros. Adicionalmente, as NORs apresentam-se associadas a um bloco heterocromático.

Leptodactylus knudseni Heyer, 1972

Os espécimes analisados apresentaram cariótipo composto por 11 pares cromossômicos (NF = 44; Figura 15). Análises morfométricas caracterizam como metacêntricos os pares 1, 5-6 e 9-10, submetacêntricos os pares 2, 7-8 e 11, e como subtelocêntricos os pares 3 e 4 (Tabela 3).

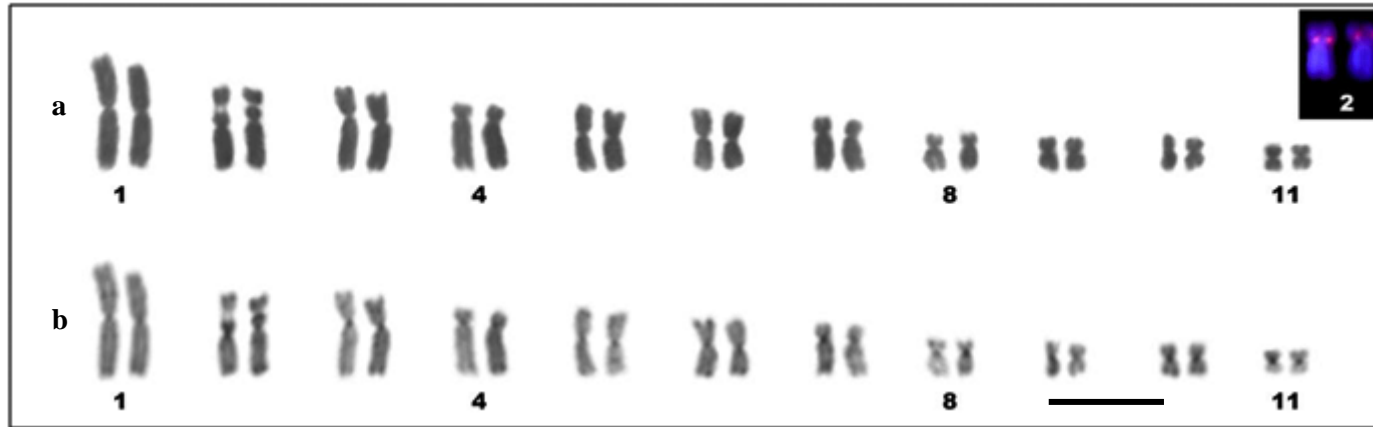


Figura 10. *Leptodactylus laticeps*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de FISH com sondas de DNA_{r-18S}. Barra = 10 μm.

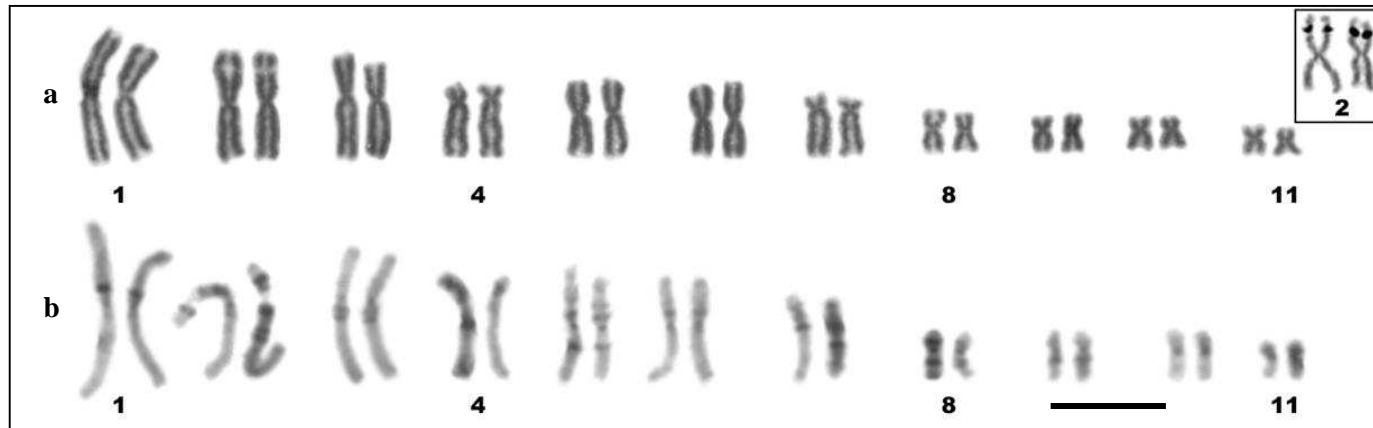


Figura 11. *Leptodactylus siphax*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO₃. Barra = 10 μm.

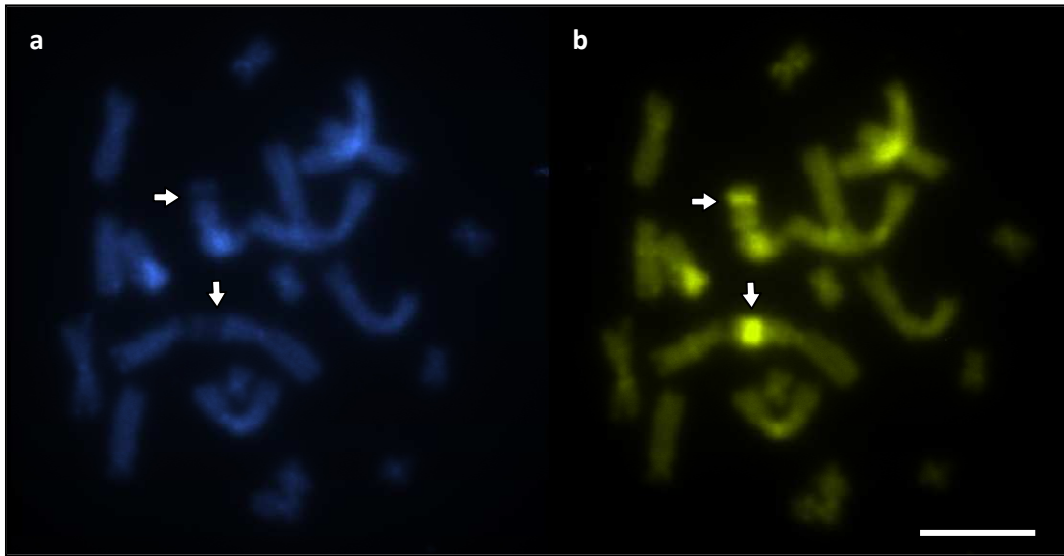
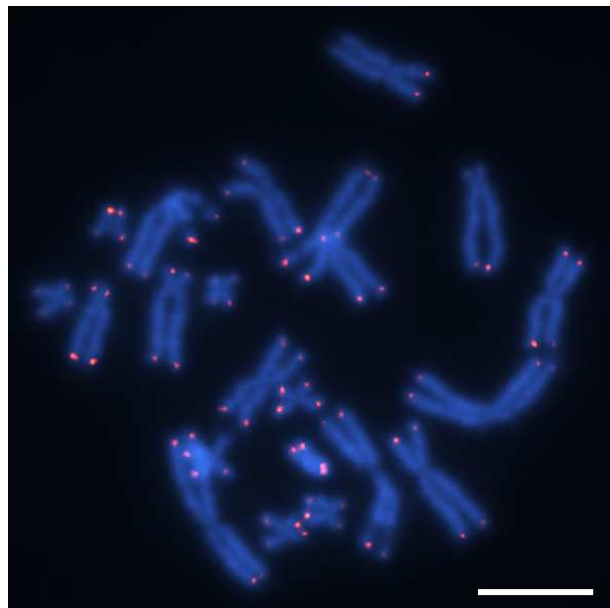


Figura 12. Padrão de coloração com os fluorocromos DAPI (a) e CMA3 (b) em *Leptodactylus siphax*. As regiões indicadas pelas setas junto às NORs demonstram que são ricas em pares de bases CG, pois estão apagadas em DAPI e brilhantes em CMA3. Barra = 10 μ m.

Figura 13. *Leptodactylus siphax*. FISH com sondas teloméricas (vermelho). Barra = 10 μ m



Leptodactylus paraensis Heyer, 2005

Os cariótipos observados nos espécimes analisados apresentaram $2n=24$ (NF = 44; Figura 16). Os pares cromossômicos nesta espécie apresentaram morfologia metacêntrica nos pares 1, 5-6 e 8-10, submetacêntrica nos pares 2 e 11, e subtelocêntrica nos pares 3-4 e 7 (Tabela 3). As NORs e as CS foram observadas em posição distal no braço curto do par 8 (Figura 16).

Leptodactylus pentadactylus (Laurenti, 1768)

Os espécimes analisados apresentaram complemento cromossômico composto por 11 pares cromossômicos (NF = 44; Figura 17). Análises morfométricas caracterizam como metacêntricos os pares 1, 5-6, 8-9 e 11, submetacêntricos os pares 2, 7 e 11, e como subtelocêntricos os pares 3 e 4 (Tabela 3). As CS e as NORs localizaram-se na região distal do braço curto do par 8. Dados sobre os padrões de bandeamento C nas populações analisadas no presente trabalho permanecem desconhecidos.

Leptodactylus rhodomystax Boulenger, 1884

Os cariótipos observados nos espécimes analisados apresentaram 11 pares de cromossomos de dois braços (NF = 44; Figura 18), dos quais os pares 1, 5-6, 8 e 10-11 são metacêntricos, os pares 2, 7 e 9 submetacêntricos, e os pares 3 e 4 apresentaram morfologia subtelocêntrica. A técnica da impregnação por AgNO₃ indicou que as NORs se localizam na região distal do braço longo do par 3. CS associadas a estas regiões foram observadas na maioria das células analisadas (Figura 18). O padrão de bandeamento C revelou apenas marcas distais no braço longo do par 1, no braço curto do par 8 e na região centromérica do par 10 (Figura 18b).



Figura 14. *Leptodactylus labyrinthicus*. Cariótipo com coloração convencional. Barra = 10 μ m.

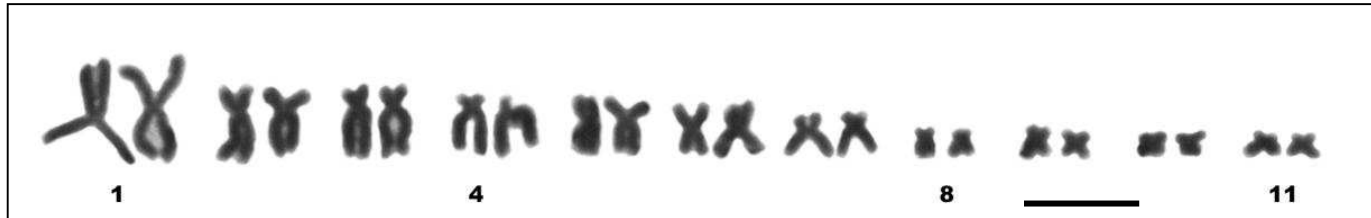


Figura 15. *Leptodactylus knudseni*. Cariótipo com coloração convencional. Barra = 10 μ m.

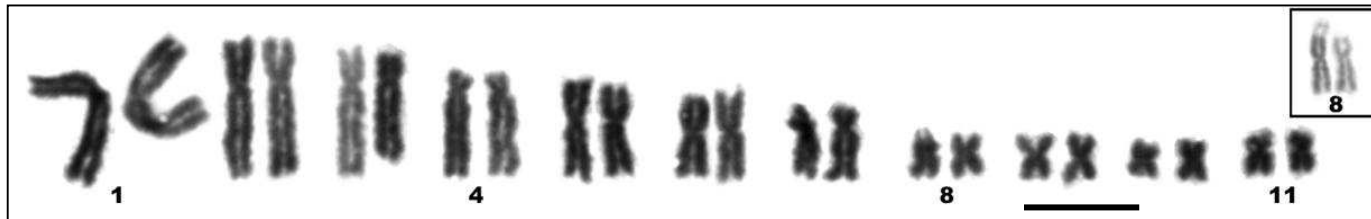


Figura 16. *Leptodactylus paraensis*. Cariótipo com coloração convencional e localização das NOR (destaque). Barra = 10 μ m.

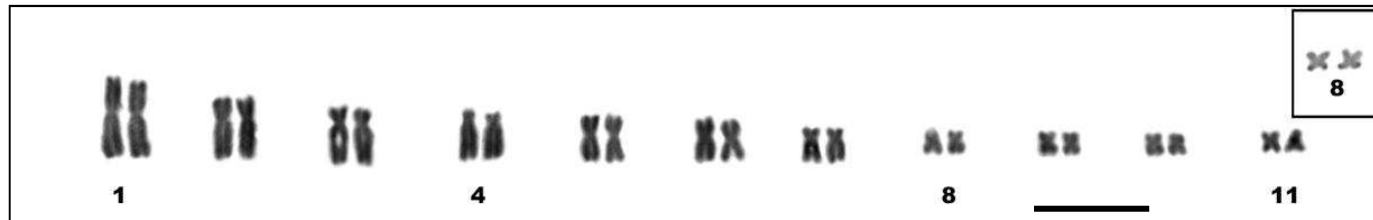


Figura 17. *Leptodactylus pentadactylus*. Cariótipo com coloração convencional e localização das NOR (destaque). Barra = 10 μ m.

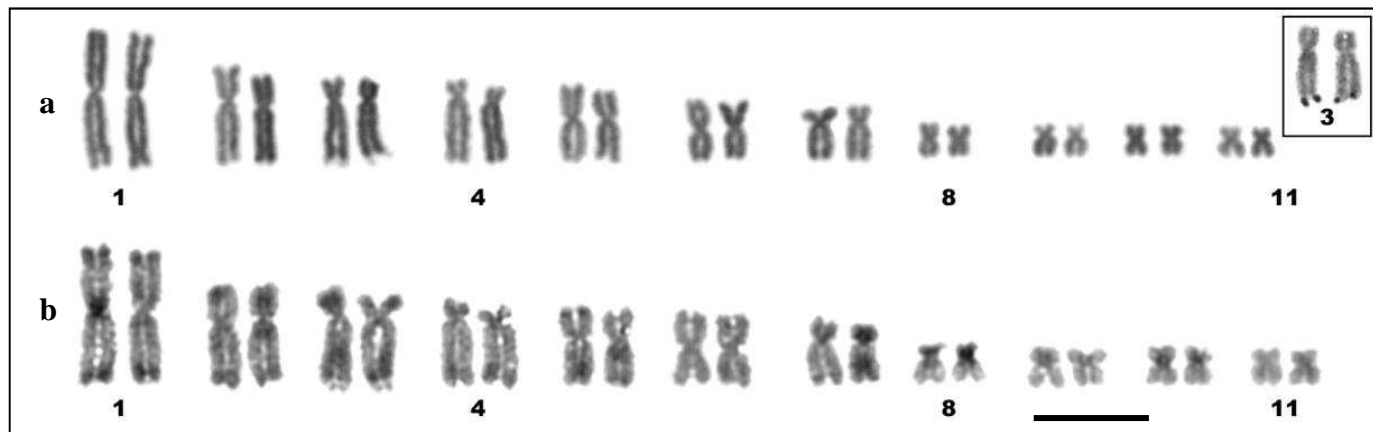


Figura 18. *Leptodactylus rhodomystax*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandeamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO_3 . Barra = 10 μ m.

Tabela 3. Análise biométrica dos cromossomos das espécies do gênero *Leptodactylus* SUBGÊNERO *Leptodactylus* GRUPO *pentadactylus* incluídas no presente trabalho. CR = comprimento porcentual relativo; IC = índice centromérico; Tipo: m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtlocêntrico, t = telocêntrico; * = par portador da NOR.

ESPÉCIE		PAR CROMOSSÔMICO										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>L. laticeps</i>	CR	17.2	12.8	12.8	10.3	10.3	9	8	5.7	5.2	4.6	3.8
	IC	0.44	0.45	0.35	0.21	0.42	0.46	0.26	0.33	0.44	0.46	0.46
	Tipo	m	m*	sm	st	m	m	st	sm	m	m	m
<i>L. syphax.</i>	CR	18	14.1	13.1	9.8	9.7	8.7	8	5.8	4.7	4.5	3.6
	IC	0.46	0.43	0.37	0.19	0.42	0.48	0.22	0.42	0.4	0.41	0.44
	Tipo	m	m*	sm	st	m	m	st	m	m	m	m
<i>L. labyrinthicus</i>	CR	18	13.6	12.6	10.9	9.8	9.6	7	5	4.9	4.3	4.3
	IC	0.46	0.31	0.27	0.21	0.37	0.47	0.3	0.44	0.46	0.42	0.37
	Tipo	m	sm	st	st	sm	m	sm	m*	m	m	sm
<i>L. knudseni.</i>	CR	19.5	13.2	11.8	10.7	10	8.7	7.9	5.1	5.3	4.1	3.6
	IC	0.48	0.33	0.27	0.22	0.43	0.41	0.34	0.35	0.4	0.48	0.36
	Tipo	m	sm	st	st	m	m	sm	sm*	m	m	sm
<i>L. paraensis</i>	CR	16.9	14.6	13.4	11	10	8.7	7.7	4.7	4.6	4.2	4.1
	IC	0.43	0.34	0.28	0.18	0.41	0.46	0.24	0.47	0.45	0.45	0.34
	Tipo	m	sm	st	st	m	m	st	m*	m	m	sm
<i>L. pentadactylus</i>	CR	16.8	13.1	12.5	10.7	10.2	9.4	7.5	5.1	5.4	4.7	4.6
	IC	0.46	0.34	0.27	0.19	0.45	0.42	0.33	0.4	0.44	0.37	0.5
	Tipo	m	sm	st	st	m	m	sm	m*	m	sm	m
<i>L. rhodomystax</i>	CR	18.8	13.5	12	11.3	10.4	8.6	7.7	4.6	4.4	4.3	4.2
	IC	0.45	0.37	0.27	0.2	0.44	0.5	0.29	0.47	0.36	0.47	0.38
	Tipo	m	sm	st*	st	m	m	sm	m	sm	m	m

Grupo *fuscus*

Leptodactylus bufonius Boulenger, 1894

Os espécimes analisados apresentaram complemento cromossômico composto por 11 pares cromossômicos (NF = 44; Figura 19). As análises morfométricas caracterizam como metacêntricos os pares 1-2, 5-6 e 8-11, submetacêntricos os pares 3 e 7, e como subtelocêntrico o par 4 (Tabela 4). FISH com sonda DNA_{r-18S}, assim como impregnação com AgNO₃ indicaram que as NORs se localizam na região intersticial do braço longo do par 8. CS associadas a estas regiões foram observadas na maioria das células analisadas (Figura 19). O padrão de bandeamento C se compõe de marcações em todas as regiões centroméricas; marcações distais intersticiais no braço curto dos pares 1-8 e 10, e no braço longo dos pares 2-9 (Figura 19b).

Leptodactylus elenae Heyer, 1978

Os cariótipos observados nos espécimes analisados desta espécie apresentaram 11 pares de cromossomos bibraqueados (2n = 22, NF = 44; Figura 20) sendo metacêntricos os pares 1, 3-4, 6, 8 e 10-11, e submetacêntricos os pares 2, 5, 7 e 9 (Tabela 4). CS e NORs foram observadas na região intersticial do braço longo do par 8. A técnica do bandeamento C revelou marcações em todos os centrômeros, nas regiões pericentroméricas dos pares 1, 4 e 7-8, em posição distal no braço longo do par 3, e no braço curto do par 11 que se mostrou inteiramente heterocromático (Figura 20b).

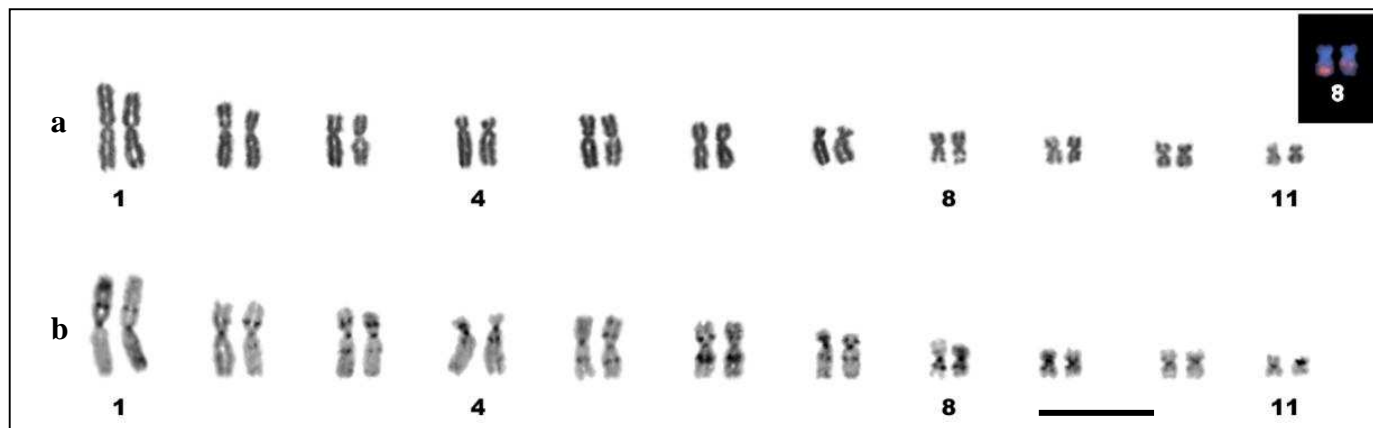


Figura 19. *Leptodactylus bufonius*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de FISH com sondas de DNA_{r-18S}. Barra = 10 μm.

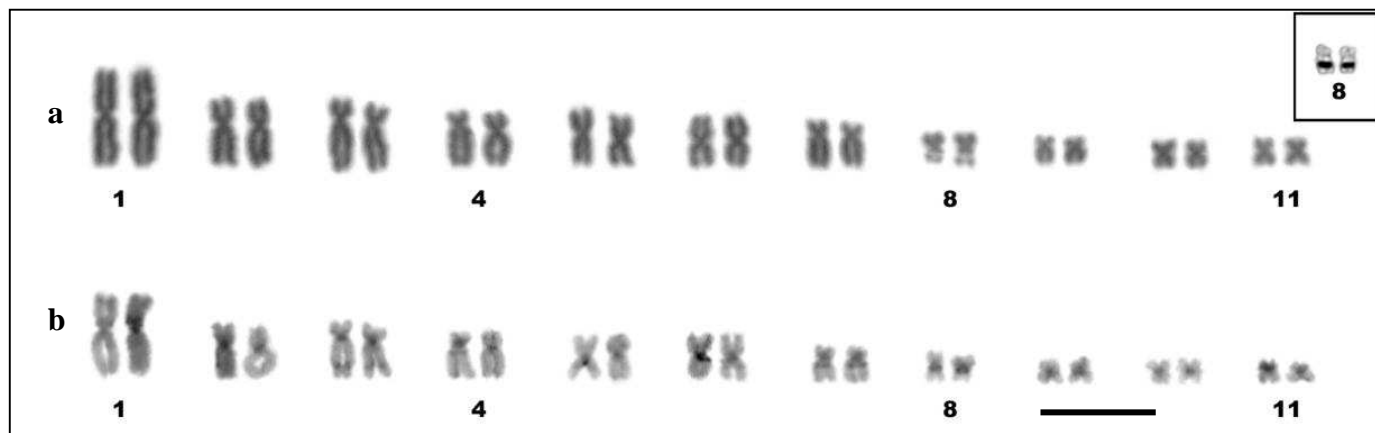


Figura 20. *Leptodactylus elenae*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO₃. Barra = 10 μm.

Leptodactylus furnarius Sazima & Bokermann, 1978

Os espécimes analisados apresentaram complemento cromossômico composto por 11 pares cromossômicos (NF = 44; Figura 21). Análises morfométricas caracterizam como metacêntricos os pares 1-2, 5-6, 8-9 e 11, submetacêntricos os pares 3, 7 e 10, e como subtelocêntrico o par 4 (Tabela 4). As CS e as NORs localizaram-se na região intersticial do braço longo do par 8. O bandeamento C revela regiões heterocromáticas em todos os centrômeros, nos telômeros dos braços curtos dos pares 1 e 3. Adicionalmente, o braço curto do par 4 apresentou-se completamente heterocromático (Figura 21b).

Leptodactylus fuscus (Schneider, 1799)

Os cariótipos dos espécimes analisados apresentaram $2n = 22$; NF = 44 (Figura 22). Nestes os pares 1, 5-6, 8 e 10-11 são metacêntricos, os pares 2-3, 7 e 9 submetacêntricos, e o par 4 subtelocêntrico (Tabela 4). As NORs e as CS se localizaram na região intersticial do braço longo do par 8 (Figura 22). O padrão de bandeamento C se compõe de marcações em todas as regiões centroméricas e um bloco heterocromático pericentromérico associados às NORs (Figura 22b).

Leptodactylus gracilis (Duméril & Bibron, 1840)

Os espécimes analisados exibem cariótipo composto por 22 cromossomos bibraneados (Figura 23), dos quais os pares 1-2, 5-7 e 9-11 são metacêntricos, os pares 3 e 8 submetacêntricos e o par 4 subtelocêntrico (Tabela 4). A região intersticial

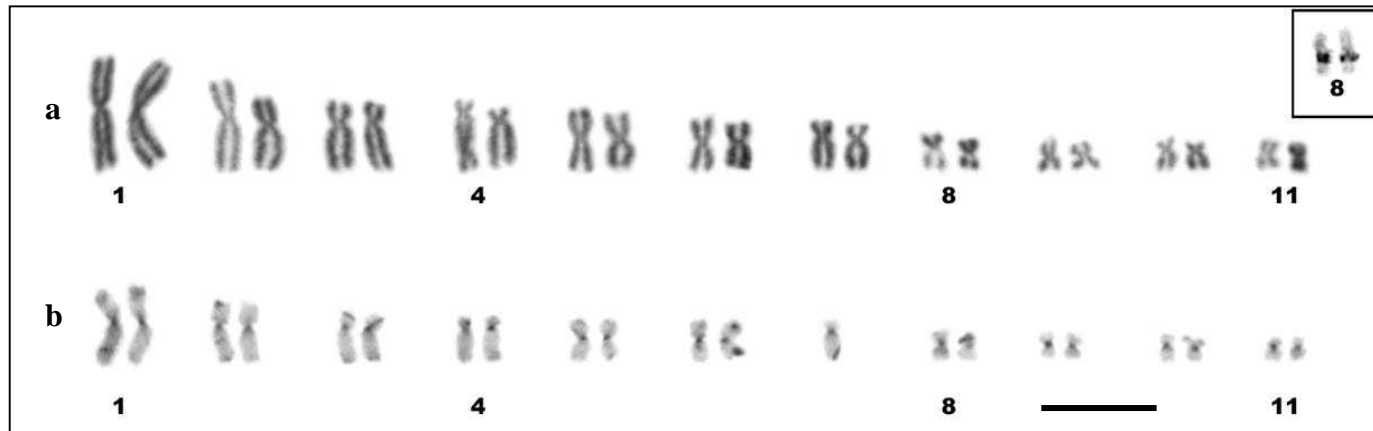


Figura 21. *Leptodactylus furnarius*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO₃. Barra = 10 μm.



Figura 22. *Leptodactylus fuscus*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO₃. Barra = 10 μm.

do braço longo do par 8 comporta as CS e a NOR. A técnica do bandejamento C revelou marcas nas regiões centroméricas de todos os pares cromossômicos (Figura 23b).

Leptodactylus latinasus Jiménez de la Espada, 1875

Os espécimes analisados apresentaram cariótipo composto por 11 pares cromossômicos bibraveados (NF = 44; Figura 24); destes, os pares 1, 6 e 9-10 possuem morfologia metacêntrica, os pares 2-3, 7 e 11 submetacêntrica, os pares 4 e 5 subtlocêntrica, e o par 8 acrocêntrica (Tabela 4). A marcação obtida através da técnica de impregnação com AgNO₃ coincide com as CS, localizando as NORs na região pericentromérica do par 8. O padrão de bandejamento C revelou regiões ricas em heterocromatina em todos os centrômeros (Figura 24b).

Leptodactylus mystaceus (Spix, 1824)

Os cariótipos de espécimes desta espécie apresentaram 22 cromossomos (NF = 44; Figura 25). As análises morfométricas indicam que os pares 1-2, 5-6, 8 e 11 são metacêntricos, os pares 3, 7 e 9-10 submetacêntricos, e o par 4 subtlocêntrico (Tabela 4). O par portador da NOR, coincidentemente com as CS, apresentou uma localização intersticial no braço longo do par 8. Marcações tênues foram observadas em todas as regiões centroméricas. Adicionalmente, as NORs estão associadas a um bloco heterocromático (Figura 25b).

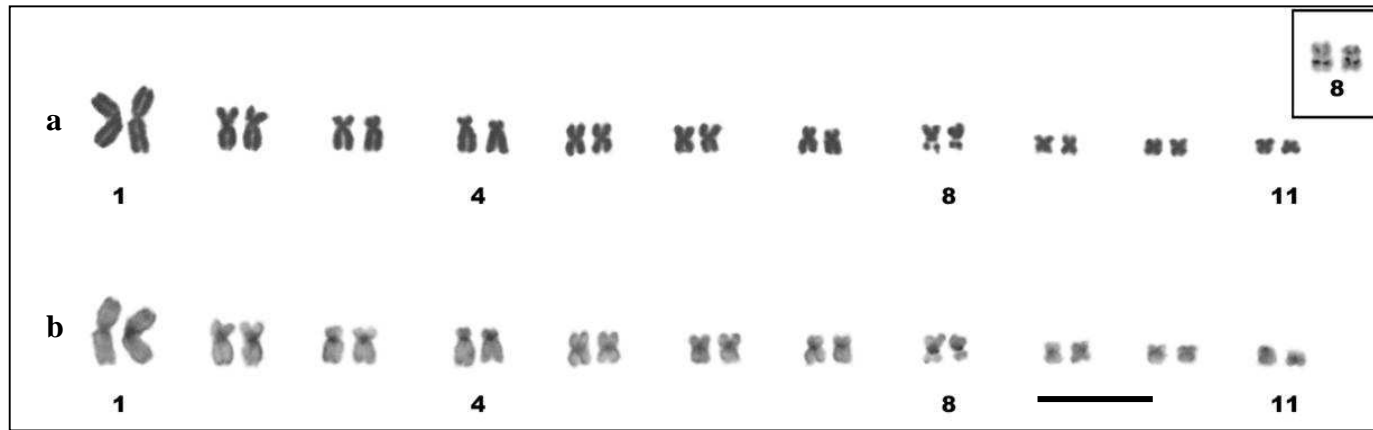


Figura 23. *Leptodactylus gracilis*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO₃. Barra = 10 μm.

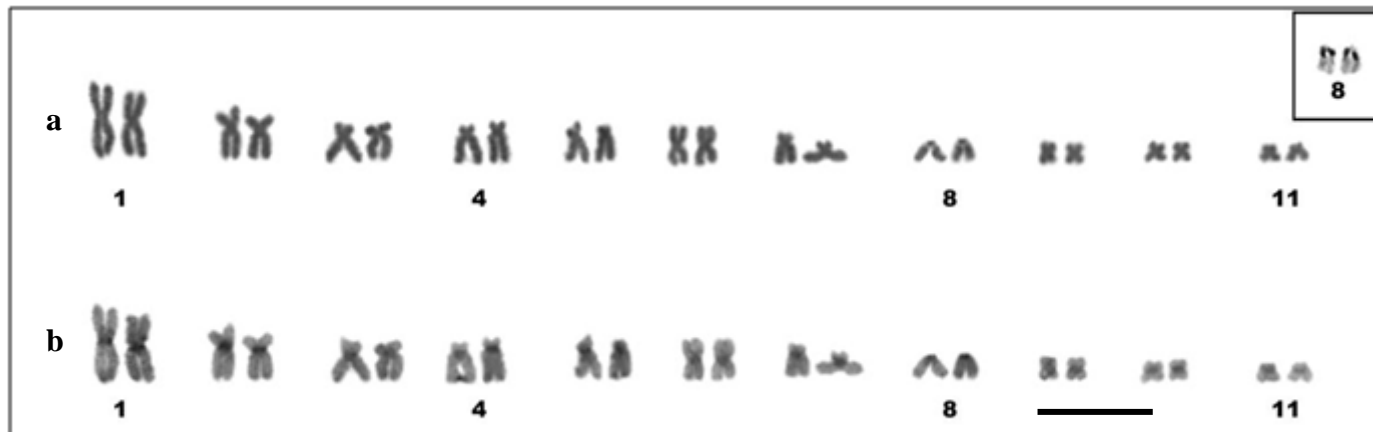


Figura 24. *Leptodactylus latinasus*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO₃. Barra = 10 μm.

Leptodactylus mystacinus (Burmeister, 1861)

O complemento cromossômico observado apresentou $2n = 22$ (NF = 44; Figura 26). As medidas cromossômicas indicam que os pares 1, 5-6 e 9-11 possuem morfologia metacêntrica, os pares 2-3 e 8 submetacêntrica, e os pares 4 e 7 subtelocêntrica (Tabela 4). As NORs e as CS neste caso se localizaram na região distal do braço curto do par 4. Experimentos de FISH com sonda rDNA 18S confirmam estes resultados. O padrão de distribuição de heterocromatina incluiu marcações nos centrômeros de todos os pares, assim como em algumas regiões teloméricas; destas, destacam-se as marcações conspícuas no braço curto do par 1 (Figura 26b).

Leptodactylus plaumanni Ahl, 1936

Os espécimes analisados apresentaram cariótipos compostos de 22 pares de cromossomos de dois braços (NF = 44; Figura 27). Análises morfométricas dos mesmos caracterizam como metacêntricos os pares 1, 3, 5-6 e 8-11, submetacêntricos os pares 2 e 7, e subtelocêntrico o par 4 (Tabela 4). A técnica da impregnação com AgNO_3 posiciona as NORs no braço longo do par 8, coincidindo com as CS. O bandeamento C revela marcações tênues em todos os centrômeros (Figura 27b)

Leptodactylus troglodytes Lutz, 1926

O cariótipo desta espécie apresentou 11 pares de cromossomos bibraqueados (NF= 44; Figura 28), destes, sete pares são metacêntricos (1-2, 6 e 8-11), três são submetacêntricos (3-4 e 7) e o par 5 é subtelocêntrico (Tabela 4). As NORs e o padrão de bandeamento C permanecem desconhecidos nesta espécie.

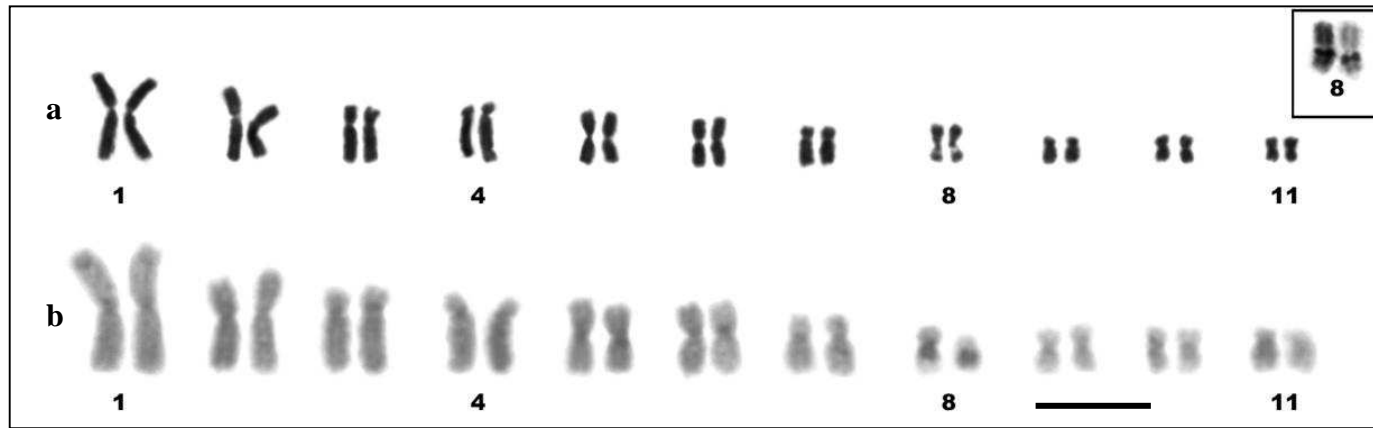


Figura 25. *Leptodactylus mystaceus*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO_3 . Barra = 10 μm .

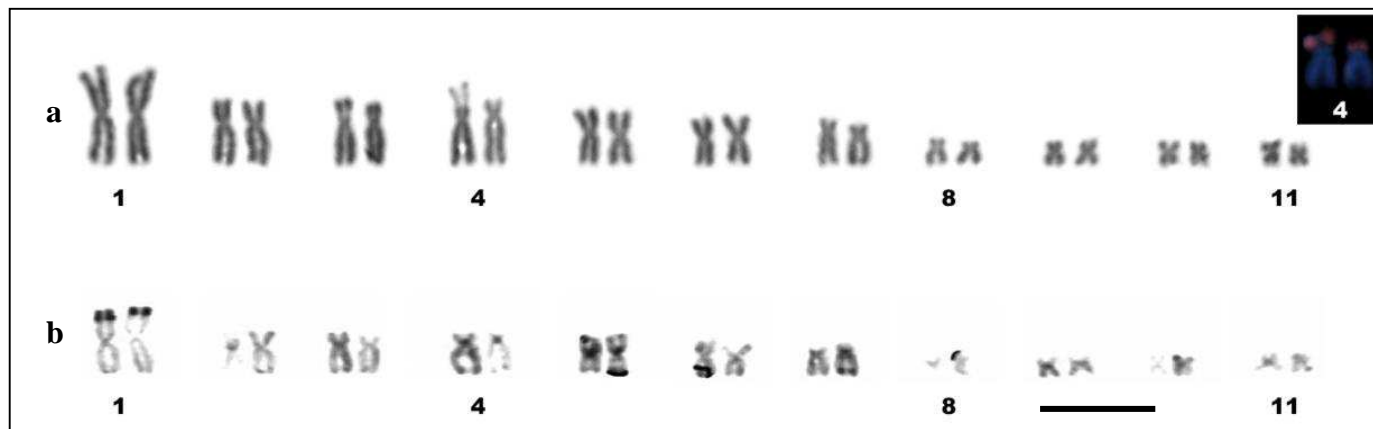


Figura 26. *Leptodactylus mystacinus*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de FISH com sondas de $\text{DNA}_{\text{r-18S}}$. Barra = 10 μm .

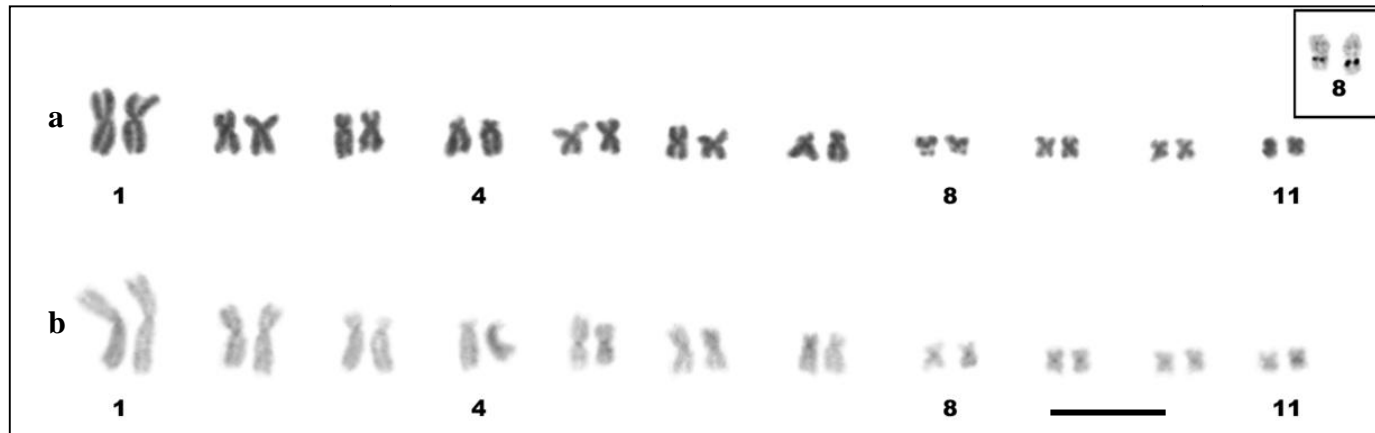


Figura 27. *Leptodactylus plaumanni*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO_3 . Barra = 10 μm .

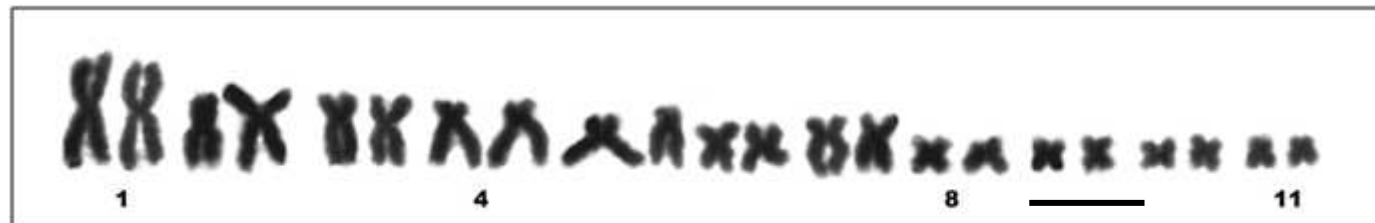


Figura 28. *Leptodactylus troglodytes*. Cariótipos com coloração convencional. Barra = 10 μm .

Tabela 4. Análise biométrica dos cromossomos das espécies do gênero *Leptodactylus* SUBGÊNERO *Leptodactylus* GRUPO *fuscus* incluídas no presente trabalho. CR = comprimento porcentual relativo; IC = índice centromérico; Tipo: m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, t = telocêntrico; * = par portador da NOR.

ESPÉCIE		PAR CROMOSSÔMICO										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>L. bufonius.</i>	CR	17.6	13	10.6	10.4	10.9	9.6	7.8	5.9	5.8	4.8	3.6
	IC	0.49	0.4	0.35	0.23	0.42	0.42	0.29	0.45	0.43	0.46	0.42
	Tipo	m	m	sm	st	m	m	sm	m*	m	m	m
<i>L. elenae.</i>	CR	17.9	12	12.9	9.7	9.9	9	8.5	5.6	5.2	4.7	4.6
	IC	0.48	0.27	0.39	0.44	0.27	0.49	0.31	0.41	0.31	0.44	0.42
	Tipo	m	sm	m	m	sm	m	sm	m*	sm	m	m
<i>L. furnarius.</i>	CR	17.9	14.6	11	11.4	9.8	8.4	7.6	5.6	4.8	4.7	4.2
	IC	0.44	0.41	0.35	0.17	0.46	0.48	0.33	0.38	0.49	0.31	0.42
	Tipo	m	m	sm	st	m	m	sm	m*	m	sm	m
<i>L. fuscus</i>	CR	15.4	13.1	10.9	10.2	10.4	9.8	7.8	7.8	5.1	5.1	4.4
	IC	0.43	0.37	0.33	0.24	0.46	0.44	0.31	0.39	0.36	0.5	0.43
	Tipo	m	sm	sm	st	m	m	sm	m*	sm	m	m
<i>L. gracilis.</i>	CR	19.8	13.1	10.6	10.5	9.1	7.9	7.5	7.8	4.9	4.5	4.1
	IC	0.46	0.4	0.32	0.23	0.48	0.48	0.4	0.33	0.48	0.42	0.43
	Tipo	m	m	sm	st	m	m	m	sm*	m	m	m
<i>L. latinasus</i>	CR	18.6	12.5	1.5	10	9.8	10	8.2	5.8	5.3	4.8	4.6
	IC	0.46	0.34	0.27	0.23	0.23	0.45	0.32	0	0.43	0.45	0.33
	Tipo	m	sm	sm	st	st	m	sm	t*	m	m	sm
<i>L. mystaceus</i>	CR	17.4	13.9	10.8	10.7	9.8	9.1	7.4	6.8	4.9	4.6	4.3
	IC	0.43	0.39	0.32	0.18	0.47	0.46	0.27	0.39	0.29	0.36	0.49
	Tipo	m	m	sm	st	m	m	sm	m*	sm	sm	m
<i>L. mystacinus</i>	CR	18.5	12	12.2	11.9	10.5	8.9	8.5	4.9	4.3	4.3	3.7
	IC	0.48	0.34	0.37	0.23	0.44	0.43	0.25	0.31	0.41	0.44	0.39
	Tipo	m	sm	sm	st*	m	m	st	sm	m	m	m

Tabela 4. *Continuação...*

ESPÉCIE		NÚMERO CROMOSSÔMICO										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>L. plaumanni</i>	CR	18.7	11.8	11.8	10.2	9.2	9.2	7.9	5.9	5.7	5.2	4.3
	IC	0.45	0.29	0.38	0.24	0.47	0.45	0.3	0.46	0.45	0.46	0.46
	Tipo	m	sm	m	st	m	m	sm	m*	m	m	m
<i>L. troglodytes</i>	CR	16.8	12	11.4	10.4	9.6	8.9	9.2	5.8	5.4	5.2	5
	IC	0.47	0.42	0.35	0.27	0.25	0.47	0.32	0.47	0.45	0.39	0.43
	Tipo	m	m	sm	sm	st	m	sm	m	m	m	m

SUBGÊNERO *LITHODYTES**Leptodactylus diptyx* Boettger, 1885

O complemento cromossômico observado nesta espécie caracteriza-se por apresentar $2n = 26$ ($NF = 34$; Figura 29). Os pares 1 e 2 são submetacêntricos, o terceiro é subtlocêntrico, o par 4 é metacêntrico, e os restantes pares (5-13) apresentaram morfologia telocêntrica (Tabela 5). As NORs e as CS localizaram-se na região proximal do par 8. A heterocromatina revelada pelo bandeamento C está presente em todos os centrômeros do complemento cromossômico (Figura 29b).

Leptodactylus lineatus (Schneider, 1799)

Os espécimes analisados apresentaram um cariótipo composto de 9 pares de cromossomos de dois braços ($2n = 18$ e $NF = 36$; Figura 30). A caracterização morfométrica indica que cinco são metacêntricos (pares 4 e 6-8), três submetacêntricos

(1-3), e o par 5 subtelocêntrico (Tabela 5). A região pericentromérica do braço curto do par 2 apresentou CS. Não foi observada sua associação a NORs. O padrão de distribuição de heterocromatina é desconhecido nesta espécie. Experimentos de FISH com sondas teloméricas revelam marcações distais em todos os braços cromossômicos (Figura 30b).

Tabela 6. Análise biométrica dos cromossomos das espécies do gênero *Leptodactylus* SUBGÊNERO *Lithodytes* incluídas no presente trabalho. CR = comprimento porcentual relativo; IC = índice centromérico; Tipo: m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtelocêntrico, t = telocêntrico; * = par portador da NOR.

ESPÉCIE		NÚMERO CROMOSSÔMICO												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>L. dyptix.</i>	CR	13.9	13	11.4	9.6	9.4	6.7	6.2	6.1	5.8	5.5	4.7	4.3	3.4
	IC	0.33	0.36	0.25	0.43	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tipo	sm	sm	st	m	t	t	t	t*	t	t	t	t	t
<i>L. lineatus</i>	CR	19.6	14	13.5	12.9	11.3	9.8	8	6.5	4.4				
	IC	0.33	0.31	0.3	0.47	0.23	0.46	0.49	0.5	0.45				
	Tipo	sm	sm	sm	m	st	m	m	m	m				

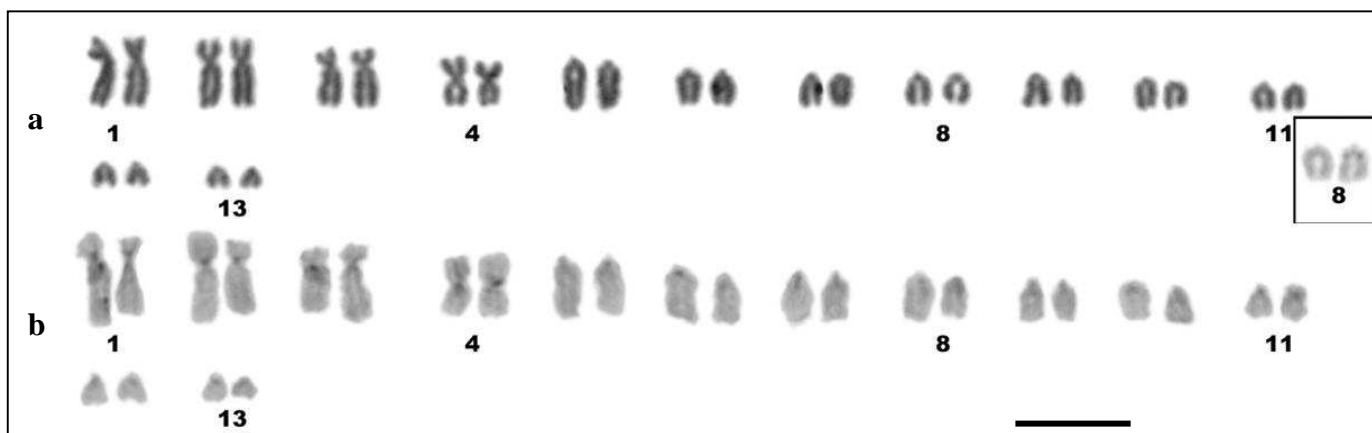


Figura 29. *Leptodactylus dyptix*. Cariótipos com coloração convencional (a); Padrão de Bandejamento C (b); Em destaque a localização das NORs através de impregnação com AgNO_3 . Barra = 10 μm .

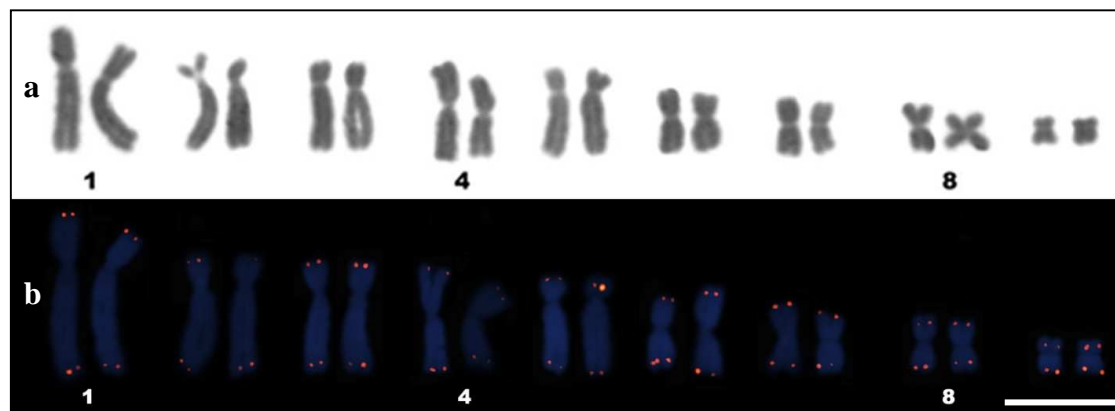


Figura 30. *Leptodactylus lineatus*. Cariótipos com coloração convencional (a) e FISH com sondas teloméricas (vermelho) (b). Barra = 10 μm .

DISCUSSÃO

As espécies analisadas revelaram diferenças interessantes, tanto em número como na morfologia cromossômica observada. A presença de um elevado número de cromossomos telocêntricos é uma característica aparentemente compartilhada pela maioria das espécies do subgênero *Lithodytes*, sendo, *L. lineatus* ($2n = 18$; $NF = 36$) a única espécie do mesmo que possui um cariótipo que se compõe exclusivamente de cromossomos bibraqueados. Eventos de fusões cromossômicas poderiam ser os responsáveis pela diminuição no complemento diplóide observada nesta espécie (Bogart 1974; Heyer & Diment, 1974; Campos *et al.* 2009), entretanto, os experimentos de FISH realizados com sondas teloméricas não fornecem dados conclusivos que permitam identificar os pares cromossômicos envolvidos nestes eventos.

A maioria das espécies contidas no subgênero *Leptodactylus* apresenta uma constituição cariotípica muito semelhante ($2n = 22$; $NF = 44$). As diferenças mais conspícuas observadas em algumas espécies pertencentes ao grupo *L. melanonotus*: *L. podicipinus* e *L. leptodactyloides* ($2n = 22$; $NF = 36$), devem-se à presença de cromossomos telocêntricos, característica compartilhada por pelo menos outras três espécies do grupo (*L. natalensis*, *L. griseigularis* e *L. wagneri*) (Bogart, 1974; Heyer & Diment, 1974; Silva *et al.* 2000b). A presença de sequências teloméricas intersticiais indicaria que eventos de inversão pericêntrica seriam os responsáveis por estas diferenças cromossômicas, entretanto, os experimentos de FISH com sondas teloméricas realizados em espécies com cromossomos telocêntricos não forneceram dados que sustentem esta hipótese. Outra variação cromossômica neste grupo foi relatada em *L. silvanimbus*, com um $2n = 24$ (Amaro-Ghilardi *et al.*, 2006).

A técnica do bandeamento C também revelou diferenças inter-populacionais em *L. podicipinus*. Dados de Silva e colaboradores (2000) em populações de Rio Claro (São Paulo) apresentam um padrão de marcas centroméricas e distais. Entretanto, as amostras aqui analisadas apresentam exclusivamente marcações centroméricas. Outra fonte de variações entre populações é observada na localização das NORs em *L. petersii*. Amaro-Ghilardi *et al.* (2006) situam estas regiões no par 4. Porém, nas amostras aqui analisadas, o par portador das mesmas é o par 8.

Em menor magnitude, diferenças na morfologia cromossômica também estão presentes em *L. latinasus* (espécie do grupo de *L. fuscus*). Nesta espécie, a morfologia subtlocêntrica do par 5, pode ser considerada uma possível autapomorfia, já que espécies próximas (*L. fragilis* e *L. mystacinus*), segundo a topologia filogenética disponível (Ponssa *et al.*, 2008), apresentam a morfologia metacêntrica típica deste par (Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Bogart, 1974; Silva *et al.* 2006). A morfologia telocêntrica do par portador da NOR em *L. latinasus* também é considerada aqui como uma possível autapomorfia da mesma. Entretanto, estudos citogenéticos em espécies próximas, como *L. caatingae*, são necessários para confirmar o estado destes caracteres em *L. latinasus*. Outra variação relacionada a cromossomos portadores da NOR em espécies do grupo *L. fuscus* observou-se em *L. mystacinus*, devido à existência de populações com NOR no par 4 e outras com NOR no par 8, com regiões de contacto no estado de São Paulo (Brasil) (Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Silva *et al.* 2006).

Diferenças inter-populacionais relacionadas ao padrão de bandeamento C são encontradas na espécie *L. fuscus*. As amostras aqui analisadas apresentam o mesmo padrão descrito por Silva *et al.* (2000) em populações de São Paulo (Rio Claro e Itirapina), sendo diferente do padrão com marcas distais relatado para populações do

Rio Grande do Sul (Santa Maria). Estes dados apóiam a hipótese levantada a partir de dados moleculares por Camargo *et al.* (2006), na qual uma serie de espécies crípticas estariam agrupadas dentro deste táxon.

Já entre as espécies do Grupo *L. pentadactylus*, as diferenças mais significativas observadas referem-se ao par portador das NOR. A localização no par 3 representa uma característica apenas observada em *L. rhodomystax*. Por outro lado, sua presença no par 2 parece ser uma provável sinapomorfia compartilhada por *L. siphax* e *L. laticeps*. Bogart (1974) relata CS nos pares 2 e 8 em *L. rhodonotus*, neste caso o estado deste caracter poderia ser devido à proximidade filogenética entre estas espécies. A presença destas regiões no par 8 é compartilhada pelas demais espécies analisadas (ver Tabela 7), nas quais, geralmente, os cromossomos portadores dos genes ribossomais aparecem associados na metáfase.

Entre as espécies do grupo *ocellatus* avaliadas até o presente, as diferenças observadas referem-se apenas ao padrão de bandeamento C. O padrão diferencial no par 1, associado ao sexo nas amostras examinadas por Barale *et al.* (1990), não foi observado nos espécimes aqui analisados de *L. chaquensis*. O padrão descrito em *L. macrosternum* é muito semelhante ao observado em *L. chaquensis*. Por outro lado as variações heterocromáticas mais conspícuas são as observadas em espécimes de *L. latrans*. Silva *et al.* (2000) descrevem três padrões diferentes entre populações do Brasil, sendo as portadoras de um grau intermediário de heterocromatina as mais semelhantes com relação aos resultados obtidos nas populações Argentinas.

A ausência de hipóteses de relações intra-genéricas inclusivas limitam o estabelecimento de hipóteses sobre a evolução cromossômica. As diferenças cariotípicas notáveis entre os dois subgêneros dificultam o estabelecimento correto de homeologias

cromossômicas e, conseqüentemente, não permitem estabelecer hipóteses sobre a origem de tais diferenças. A aplicação de técnicas com um maior poder de resolução ajudariam a identificar os processos envolvidos na diversificação cariotípica do gênero *Leptodactylus* e sua interpretação num marco filogenético apropriado permitirá compreender de maneira mais precisa sua evolução cariológica.

Tabela 7. Relação dos números diplóides registrados em espécies pertencentes ao gênero *Leptodactylus*.

Grupo	Espécie	2n	FN	CS/NOR	Referência
	<i>L. albilabris</i>	22	44	8/?	Bogart, 1974.
	<i>L. bufonius</i>	22	44	8/8	Bogart, 1974; Heyer & Diment, 1974; Presente trabalho.
	<i>L. elenae</i>	22	44	8/8	Heyer, 1978; Presente trabalho.
	<i>L. furnarius</i>	22	44	8/8	Presente trabalho.
	<i>L. fuscus</i>	22	44	8/8	Beçak <i>et al.</i> , 1970; Bogart, 1974; Heyer & Diment, 1974; Silva <i>et al.</i> , 2000b; Presente trabalho.
	<i>L. gracilis</i>	22	44	8/8	Brum-Zorrilla & Saez, 1968; Denaro, 1972; Barrio, 1973; Bogart, 1974; Silva <i>et al.</i> , 2004; Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , 2006; Presente trabalho.
<i>fuscus</i>	<i>L. latinasus</i>	22	42	8/8	Barbieri, 1950 (= <i>L. prognathus</i>); Brum-Zorrilla & Saez, 1968 (= <i>L. prognathus</i>); Bogart, 1974; Presente trabalho.
	<i>L. mystaceus</i>	22	44	8/8	Bogart, 1974; Heyer & Diment, 1974; Presente trabalho.
	<i>L. mystacinus</i>	22	44	4, 8, 11/4, 8	Bogart, 1974 (= <i>L. labialis</i>); Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , 2006; Silva <i>et al.</i> , 2006; Presente trabalho.
	<i>L. notoaktites</i>	22	44	8/8	Silva <i>et al.</i> , 2000b.
	<i>L. plaumanni</i>	22	44	8/8	Barrio, 1973 (= <i>L. geminus</i>); Silva <i>et al.</i> , 2004; Presente trabalho.
	<i>L. troglodytes</i>	22	44	?/?	Presente trabalho.
<i>melanonotus</i>	<i>L. griseigularis</i>	22	36	8/?	Bogart, 1974 (= <i>L. wagneri</i>).
	<i>L. leptodactyloides</i>	22	36	8/8	Presente trabalho.
	<i>L. melanonotus</i>	22	44	8/?	Bogart, 1967; 1974; Heyer & Diment, 1974.
	<i>L. natalensis</i>	22	38	10/?	Bogart, 1974.

Grupo	Espécie	2n	FN	CS/NOR	Referência	
ocellatus	<i>L. petersii</i>	22	44	4, 8/4, 8	Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , 2006; Presente trabalho.	
	<i>L. podicipinus</i>	22	36	8/8	Denaro, 1972; Bogart, 1974; Silva <i>et al.</i> , 2000b; Presente trabalho.	
	<i>L. pustulatus</i>	22	44	8/8	Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , 2006; Presente trabalho.	
	<i>L. discodactylus</i>	22	42	?/?	Heyer & Diment, 1974.	
	<i>L. silvanimbus</i>	24	48	8/8	Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , 2006.	
	<i>L. bolivianus</i>	22	44	8/?	Bogart, 1974 (= <i>L. insularum</i>); Heyer & Diment, 1974.	
	<i>L. chaquensis</i>	22	44	8/8	Brum-Zorrilla & Saez, 1968; Heyer & Diment, 1974; Barale <i>et al.</i> , 1989; Presente trabalho.	
	<i>L. macrosternum</i>	22	44	8/8	Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , 2006; Presente trabalho.	
	<i>L. latrans</i>	22	44	8/8	Saez & Brum, 1960; Beçak, 1968; Brum-Zorrilla & Saez, 1968; Borgart, 1974; Lisanti <i>et al.</i> , 1990; Silva <i>et al.</i> , 2000b; Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> 2006; = <i>L. ocellatus</i> ; Presente trabalho.	
	<i>L. flavopictus</i>	22	44	8/8	Silva <i>et al.</i> , 1995.	
pentadactylus	<i>L. knudseni</i>	22	44	8/8	Heyer, 1972; Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , (2004); Presente trabalho.	
	<i>L. labyrinthicus</i>	22	44	8/8	Denaro, 1972; Silva <i>et al.</i> , 2000b; Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , 2006; Presente trabalho.	
	<i>L. laticeps</i>	22	44	2/2	Brum-Zorrilla & Saez, 1968; Presente trabalho.	
	<i>L. paraensis</i>	22	44	8/8	Presente trabalho.	
	<i>L. pentadactylus</i>	22	44	8/8	Brum-Zorrilla & Saez, 1968; Morescalchi & Gargiulo, 1968 <i>apud</i> Kuramoto 1990; Borgart, 1974; Heyer & Diment, 1974; Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , (2004); Presente trabalho.	
	<i>L. rhodomystax</i>	22	44	3/3	Presente trabalho.	
	<i>L. rhodonotus</i>	22	44	2, 8/?	Bogart, 1974.	
	<i>L. siphax</i>	22	44	2/2	Presente trabalho.	
	Subgênero <i>Lithodytes</i>	<i>L. andreae</i>	26	40	9/?	Bogart, 1974.
		<i>L. dyptix</i>	26	34	8/8	Presente trabalho.
<i>L. hylaedactylus</i>		26	34	7, 8/7	Bogart, 1974; Campos <i>et al.</i> (2009).	
<i>L. marmoratus</i>		24	34	4/?	Bogart, 1974.	
<i>L. cf marmoratus</i>		24	34	6/6	Campos <i>et al.</i> (2009).	
<i>Leptodactylus</i> sp. (aff. <i>bokermanni</i>)		23	36	11/11	Campos <i>et al.</i> (2009).	
<i>L. lineatus</i>		18	36	3/?	Bogart, 1970; Heyer, 1974b; Presente trabalho.	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaro-Ghilardi, R.C., Rodrigues, M.T., Yonenaga-Yassuda, Y. (2004): Chromosomal studies after differential staining and fluorescence in situ hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). *Caryologia*, 57 (1): 53-65.
- Amaro-Ghilardi, R.C., Skuk, G.O.S., De Sá, R., Rodrigues, M.T., Yonenaga-yassuda, Y. (2006): Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. *Phyllomedusa* 5:21-35.
- Baldissera Jr, F.A., Oliveira, P.S.L., Kasahara, S. (1993): Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia- Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Rev. Bras. Genet.* 16: 335-345.
- Barale, G.D., Ortiz, M.I., Lisanti, J.A. (1989): Cariotipo y organizador nucleolar de *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). *Rev. UNRC* 8: 83-88.
- Barale, G. D., Pinna Senn, E., Lisanti, J.A. (1990): Polimorfismo de banda C ligado al sexo en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). *Rev. UNRC*, 10(1):51-53.
- Barbieri, F.D. (1950): Observaciones sobre los cromosomas y espermatozoides en algunos batracios del género "*Leptodactylus*". *Acta Zool. Lilloana* 9: 455-463.
- Barrio, A., De Chieri, P.R. (1971): Contribución al esclarecimiento de la posición taxofiletica de algunos batracios patagónicos de la familia Leptodactylidae mediante el análisis cariotipico. *Physis* 30: 673-685.
- Barrio, A. (1973): *Leptodactylus geminus* una nueva especie del grupo *fuscus* (Anura, Leptodactylidae). *Physis* 32:199-206.
- Beçak, M.L. (1968): Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia* 21:191-208.
- Bogart, J.P. (1973): Evolution of anuran karyotypes. In: Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems. Vial JL (Ed.) University of Missouri Press, Missouri, pp 337-349.

- Bogart, J.P. (1974): A karyoystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae). *Copeia* 3: 728-737.
- Bogart, J.P. (1991): The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Green DM and Sessions SK (eds.). Academic Press, San Diego, pp 233-255.
- Bogart, J.P. Wasserman, A.O. (1972): Diploid-Polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics* 11: 7-24.
- Bostock, C.J., Sumner, A.T. (1978): *The eukaryotic chromosome*. North Holland Publishing Company: Amsterdam, New York, Oxford, 374 pp.
- Brum-Zorrilla, N., Sáez, F.A. (1968): Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Experientia* 24: 969.
- Campos, J.R.C., Ananias, F., Brasileiro, C.A., Yamamoto, M., Haddad, C.F.B., Kasahara, S. (2009): Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. *Hereditas*, 146: 104-111.
- Cole, C.J., Levans, C.R. (1971): Chromosome Preparations of Amphibians and Reptiles: Improved Technique. *Herpetol. Rev.* 3 (6): 102, 1971.
- De Lucca, E.J., Jim, J., Foresti, F. (1974): Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia* 27: 183-192.
- Denaro, L. (1972): Karyotypes of Leptodactylidae anurans. *J. Herpetol* 6: 71-74.
- Donlon, T.A., Magenis, R.E. (1983): Methyl green is a substitute for distamycin A in the formation of distamycin A/DAPI C-bands. *Hum. Genet.* 65:144-146.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B, Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A., Wheeler, W.C. (2005): Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 294: 1-240.
- Ford, C., Hamerton, J. (1956): A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain. Technology* 31: 247-251.

- Frost, D.R. (2010): Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., de Sá, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., Wheeler, W.C. (2006): The amphibian tree of life. *Bull Am Mus Nat Hist* 297:1–371
- Goodpasture, C., Bloom, S.E. (1975): Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Grant, T., Frost, D.R., Caldwell, J.P., Gagliardo, R., Haddad, C.F.B., Kok, P.J.R., Means, D.B., Noonan, B.P., Schargel, W.E., Wheeler, W.C. (2006): Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bull Am Mus Nat Hist* 299:1–262
- Green, D.M., Sessions, A.K. (1991): Amphibian cytogenetics and evolution. Green DM and Sessions SK (eds), Academic Press, San Diego, 432 pp.
- Heyer, W.R. (1969): The adaptative ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Evolution* 24: 421-428.
- Heyer, W.R. (1972): The status of *Leptodactylus pumilio* Boulenger (Amphibia, Leptodactylidae) and the description of a new species of *Leptodactylus* from Ecuador. *Contrib. Sci., Los Angeles County Mus.*, 231: 1-8.
- Heyer, W.R. (1974a): Relationships of the marmoratus species group (Amphibia, Leptodactylidae) within the subfamily Leptodactylinae. *Contrib. Sci. Los Angeles Co. Mus.*, 253: 1-46.
- Heyer, W.R. (1974b): *Vanzolinius*, a new genus proposed for *Leptodactylus discodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Proc. Biol. Soc. Washington*, 87 (11): 81-90.
- Heyer, W.R. (1975): A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. *Smitsonian Contrib. Zool.*, 199: 1-55.

- Heyer, W.R. (1978): Systematics of the *fuscus* Group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Sci Bull Nat Hist Mus of Los Angeles County*, 29:1-85.
- Heyer, W.R., Diment, M.J. (1974): The karyotype of *Vanzolinius discodactylus* and comments on usefulness of karyotypes in determining relationships in the *Leptodactylus*-complex (Amphibia, Leptodactylidae). *Proc Biol Soc Wash* 87:327-336.
- Howell, W.N., Black, D.A. (1980): Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Kasahara, S., Silva, A.P.Z., Gruber, S.L. (1998): Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). *Genet Molec Biol.* 21(4): 471-476.
- Kuramoto, M. (1990): A list of chromosome numbers of anuran amphibians. *Bull Fukuoka Univ Educ* 39: 83-127.
- Lisanti, J.A., De Barale, G.D., Pinna-Senn, E., Sockert, J.C. (1990): A specimen of *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) heterocygous for a deletion on the nucleolar organizing region. *Comunicaciones Biológicas* 9: 127-131.
- Lynch, J.D. (1971): Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. *Miscellaneous Publication, Mus. Nat. Hist., Univ. Kansas, Lawrence*, 53: 1-238.
- Maxson, L.R., Heyer, W.R. (1988): Molecular systematics of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae). *Field. Zool.* 41: 1-13.
- Northland, I., Capetillo, J., Iturra, P., Veloso, A. (1990): Nuclear DNA content and karyosystematic relationships of species grouped in primitive tribes of Leptodactylidae (Amphibia-anura). *Rev. Bras. Genet.* 13: 247-254.
- Sáez, F.A., Brum, N. (1960): Chromosomes of South American amphibians. *Nat.* 185: 945.
- Schmid, M. (1982): Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis the structure and variability of NORs in anura. *Chromosoma* 87:327-344.

- Schweizer, D., Ambros, P., Andrie, M. (1978): Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. *Experimental Cell Research* 111: 327-332.
- Silva, A.P.Z., Garcia, P.C.A., Martins, V.G., Bacci, M., Kasahara, S. (2004): Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. *Amphib-reptil* 25: 185-196.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Galassi, G.G., Kasahara, S. (2006): Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica* 127:35–44
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Kasahara, S. (2000): Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. *Cytobios* 103: 25-38.
- Silva, A.P.Z., Kasahara, S., Haddad, C.F.B. (1995): Caracterização cariotípica dos anfíbios anuros *Physalaemus olfersii* e *Leptodactylus flavopictus* (Familia Leptodactylidae). *Rev. Brasil. Genet.*, 18 (Suppl) 477.
- Souza, M.B., Haddad, C.F.B. (2003): Redescription and reevaluation of the generic status of *Leptodactylus dantasi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), and description of its unusual advertisement call. *J. Herpetol.*, 37 (3): 490-497.
- Sumner, A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.
- Schweizer, D.; Ambros, P.F. (1994) Chromosome banding. In: *Methods in Molecular Biology*. Gosden JR, Ed. Humana Press, Totowa pp. 97-112.

Apêndice 1.

SUBGÊNERO *Leptodactylus*

GRUPO *L. melanonotus*

Leptodactylus leptodactyloides. — **BRASIL**: *Pará*: Município Ananindeua, Ananindeua (Levylandia), PS 327; Município Belém, Belém (Parque Ambiental Utinga), PS 507, 554, 558, 566-8;

Leptodactylus petersii. — **BRASIL**: *Pará*: Município Ananindeua, Ananindeua (Levylandia), PS 754, 756-7; Município Belém, Belém (Campus UFPa), PS 8, 37, 225; Município Igarapé-miri, Vila Maiuata, PS 12-14, 21-22.

Leptodactylus podicipinus. — **ARGENTINA**. *Corrientes*: Dto. Capital: 1.4 Km NE de CECOAL-CONICET, MLP-DB 1572-3. *Misiones*: Dto. Candelaria, Cerro Corá, A° San Juan, MLP-DB 1646; Depto. Capital, Posadas, MLP-DB 1645, Villa Lanús (Campus UNaM), MLP-DB 1647-52, 1471-4, 4370, Avenida Costanera, MLP DB 4292-3, 4300.

Leptodactylus pustulatus — **BRASIL**: *Pará*: Município Marabá, Marabá, PS 844-5; *Piauí*: Município de José de Freitas, Fazenda Nazareth, PS 104, Município Piracuruca, PNSC, PS 77.

GRUPO *L. ocellatus*

Leptodactylus chaquensis. — **ARGENTINA**. *Chaco*: Depto. San Fernando, Resistencia, MLP-DB 1715-8, 1766, 1671, 1767-9; Ruta provincial N° 63 Antequera camino Isla el Cerrito, MLP DB 5605; Depto. 9 de Julio, Las Breñas, MLP DB 2768; *Corrientes*: Depto. Curuzú Cuatiá, Perugorria Estancia El Oscuro, MLP DB 2904

Leptodactylus macrosternum. — **BRASIL**: *Pará*: Município Belém, Belém (Campus UFPa), PS 505; Município Soure, Soure, PS 533, 540-1, 551; Município Tomé-açú, Tomé-Açú (Olaría), PS 162-3; Rio Acará-miri, PS 219.

Leptodactylus ocellatus. — **ARGENTINA**. *Buenos Aires*: Depto. Luján, Ruta provincial N° 47 Luján, MLP DB 4190; *Corrientes*: Ituzaingó, Reserva provincial Rincón Santa María Ituzaingó MLP DB 4250; *Misiones*: Depto. Candelaria, Profundidad, MLP-DB 1638; Depto. Capital, Destacamento Prefectura de Nemesio Parma, MLP-DB1720-1, Fachinal, MLP-DB 1636, 1639, Posadas Villa Blosset, MLP DB 3030, Villa Lanús, Campus UNaM, MLP-DB 1633; Depto. Concepción, Barra Concepción, MLP-DB 1635, 1637, 1640; Depto. Eldorado, Colonia Delicia, MLP-DB 1634; Depto. Gral. Manuel Belgrano, Reserva privada Yacutinga, MLP-DB 1205, Depto. San Javier, Destacamento Prefectura de Itacaruaré, MLP-DB 1719.

GRUPO *L. pentadactylus*

Leptodactylus knudseni — **BRASIL**: *Pará*: Município Carajas, Salobo, PS 697; Município Jurutí, Barroso, PS 392, 397-99, 512.

Leptodactylus labyrinthicus — **ARGENTINA**. *Misiones*: Dto. Concepción, Santa María, MLP-DB 1712. **BRASIL**. *Piauí*: Município Piracuruca, PNSC, PS 76.

Leptodactylus laticeps — **ARGENTINA**. *Chaco*: Dpto. Almirante Brown, Madrejones MLP DB 3733; Dpto. General Güemes, El Sauzalito, MLP DB 7397; *Formosa*: Dpto. Matacos, Ingeniero Juárez, MLP DB 8756-7; *Salta*: Coronel Juan Solá (Estación Morillo), MLP DB 5584.

Leptodactylus paraensis — **BRASIL**. *Pará*: Município Carajás, Serra Sul, PS 783-4, 795.

Leptodactylus pentadactylus — **BRASIL:** *Pará:* Município Belém, Parque Ambiental Utinga, PS 481; Município Igarapé-miri, Vila Maiauata, PS 36; Município Juruti, Barroso, PS 298, 302, 304, 316, 377, 380, 516;

Leptodactylus rhodomystax — **BRASIL:** *Pará:* Município Juruti, Barroso, PS 279-81, 451, 468

Leptodactylus syphax — **BRASIL:** *Pará:* Município Carajás, Serra Sul, PS 789, 793-4, 797.

GRUPO *L. fuscus*

Leptodactylus bufonius — **ARGENTINA.** *Corrientes:* Depto. Capital, Paraje Perichón, MLP-DB 1274, 1574; Depto. Curuzú Cuatiá, Perugorría Estancia El Oscuro, MLP DB 5331; *Santiago del Estero:* Depto. Loreto, Laprida, MLP DB 8007.

Leptodactylus elenae — **ARGENTINA.** *Santa Fé:* Depto. Vera, Ruta provincial N° 40 proximidades de Reconquista, MLP DB 4577. *Misiones:* Depto Cainguas, Aristobulo del Valle, Balneario del Arroyo Cuña Pirú, Arroyo Cuña Pirú Chico, MLP DB 4415; Depto. Candelaria, Reserva Privada Campo San Juan, MLP-DB 1535-8, 4403, 4417; Depto. Capital, Barra Garupá, FML 09326, 09590-1; Depto. General Manuel Belgrano, San Sebastián de la Selva, MLP DB 4633.

Leptodactylus furnarius — **ARGENTINA:** *Misiones:* Depto. Candelaria, Candelaria (Ruta nacional N° 12 y Ruta provincial N° 3), MLP DB 5933-5.

Leptodactylus fuscus — **ARGENTINA.** *Misiones:* Dto. Apóstoles, Azara, A° Chimiray, MLP-DB 1665-6; Dto. Cainguas, Balneario del A° Cuña Pirú, FML 09583, FML 09588-9; Dto. Candelaria, Campo San Juan, MLP-DB 1539-40, MLP-DB 1714; Dto. Capital, Barra Garupá, FML 09584-5; Posadas FML 09586, MLP-DB 1713; Villa Lanús, Refugio Don Lorenzo, MLP-DB 1018; Villa Lanús: Campus UNaM, MLP-DB 1749; Dto. Concepción, Barra Concepción, FML 09666, FML 09674; Dto. Gral. Manuel Belgrano, Reserva privada Yacutinga, MLP-DB 1206; Dto. Oberá, San Martín, FML 09587; Dto. Guaraní, A° Aguas Blancas, FML 09581. **BRASIL:** *Pará:* Município Ananindeua, Ananindeua (Levylândia), PS 221-2, 328; Município Belém, Belém (Campus UFPa), PS 3-4, 148; Município Carajás, Serra Sul, PS 765, 771, 775-6, 790, 798, 801; Município Curuçá, Ilha de Ipomonga, PS 229-30, 246-7; Município de Salvaterra, Salvaterra, PS 65; Município de Santa Barbara, Reserva GUNMA, PS 473, 4.

Leptodactylus gracilis — **ARGENTINA.** *Corrientes:* Depto. Ituzaingó, Reserva provincial Rincón Santa María Ituzaingó, MLP DB 4249; *Misiones:* Depto. Candelaria, Ñu Pyahú, Ruta provincial N° 3, a 3,5 kilómetros de Ruta nacional N° 12, MLP DB 5177, 5788, Reserva Privada Campo San Juan, MLP DB 4254, Ruta provincial N° 204, entre Profundidad y Fachinal, FML 09344.

Leptodactylus latinasus. — **ARGENTINA.** *Buenos Aires:* Depto. Luján, uta nacional N° 47 Km. 5 Luján, MLP DB 2629; *Corrientes:* Depto. Capital, Paraje Perichón, MLP-DB 1277-80, 1575-78. *Córdoba:* Depto. Colón, Jesús María, MLP-DB 1675-6; *Entre Ríos:* Depto Chajarí, Chajarí, MLP DB 6082; *Jujuy:* Dto. Gral. Manuel Belgrano, Dique Los Molinos, margen izquierda Río Grande, MLP-DB 1484-6.

Leptodactylus mystaceus. — **BRASIL:** *Pará:* Município Carajás, Salobo, PS 614, 700, 714, 747. Serra Sul, PS 796, 804; Município Juruti, Juruti (Barroso), PS 265-6, 443, 449-50.

Leptodactylus mystacinus. — **ARGENTINA:** *Córdoba:* Depto. Colón, Jesús María, MLP-DB 1674. *Misiones:* Depto. Cainguas, Balneario del A° Cuña Pirú, FML 09582 MLP DB 2643; Depto. Candelaria, Ruta provincial N° 3 a 3.5 Km. de la ruta nacional N° 12 y a 7 Km de Cerro Corá, MLPDB 1259-62; Depto. General Manuel Belgrano, Arroyo Yacuy Peninsula Andresito, MLP DB 3035, Estancia La Blanquita Andresito, MLP DB 3218-9, 3233, 3244-5, Reserva privada Yacutinga, MLPDB 1207; Depto. Guaraní, San Vicente, Ruta Nacional N° 14 Km. 1272, INTA, MLPDB 1670, Depto. Iguazú, Puerto Iguazú, MLP DB 4158, Depto. San Pedro, Parque Provincial Moconá, MLP DB 4166-7. *Salta:* Dto. Anta, Estación Biológica Los Colorados, MLP- DB 1672. *Tucumán:* Dto. Lules, el Ceibal, San Pablo, MLP-DB 1673.

Leptodactylus plaumanni. — **ARGENTINA.** *Misiones:* Depto. San Pedro, Piñalito sur, Parque provincial El Piñalito, MLP-DB 1093, 1121-3, Depto. 25 de Mayo, Puerto Londero, Arroyo Los Muertos y Ruta Provincial N° 2, MLP DB 5881.

Leptodactylus troglodytes — **BRASIL**: Piauí: Município Piracuruca, PNSC, PS 78-9.

SUBGÉNERO *Lithodytes*

Leptodactylus dyptix — **ARGENTINA**. *Corrientes*: Dpto. Capital, Paraje Perichón, MLP-DB 1644; *Chaco*: Dpto. San Fernando, Ruta provincial N° 63 Antequera caminho Isla el Cerrito, MLP-DB 2029-30; *Formosa*: Dpto. Pilcomayo, Ruta provincial N° 88 3 Km. ao leste de Palma Sola, MLP DB 6223-4; Dpto. Matacos, Los Matacos Ruta Nacional N° 81, MLP DB 6285, 6301.

Leptodactylus lineatus — **BRASIL**: *Pará*: Município Juruti, Mutum, PS 293, 453, 466; Capiranga PS 457; Município Carajás, Salobo, PS 607, 619, 729.

CAPITULO II

CHROMOSOME VARIATION IN THE TRIBE LOPHIOHYLINI

MIRANDA-RIBEIRO, 1926 (ANURA, HYLIDAE)

CHROMOSOME VARIATION IN THE TRIBE LOPHIOHYLINI MIRANDA-RIBEIRO, 1926

(ANURA, HYLIDAE)

Suárez P.^{1,2}; Cardozo, D.^{4,7}; Baldo D.^{4,5}; Faivovich, J.⁶; Nagamachi C.Y.^{1,3}; Pieczarka J. C.^{1,3}.

¹ Laboratório de Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pará, Tv. Augusto Correia 1 Belém, 66075-900, Pará, Brazil. Email: psuarez@ufpa.br

² Bolsista de CNPq de doutorado em Zoologia, MPEG, Brazil;

³ Pesquisador do CNPq, Brazil;

⁴ Laboratorio de Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Félix de Azara 1552, Posadas, N3300LQH, Misiones, Argentina.

⁵ Instituto de Herpetología, Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, T4000JFE, Tucumán, Argentina.

⁶ División Herpetología, Museo Argentino de Ciencias Naturales – CONICET, Av. Angel Gallardo 470, C1405DJR, Buenos Aires, Argentina

⁷ CONICET (consejo nacional de investigaciones científicas y técnicas).

ABSTRACT

The Lophiohylini tribe is actually composed by 81 species grouped in 12 genera; it has a wide distribution in Central and South America. Cytogenetic information is scarce, being restricted to only 12 species. The present article presents comparative data of chromosomal morphology, C-banding patterns, NOR's positions and ultrastructural characteristics of *Argenteohyla siemersi pedersenii*, *Itapotihyla langsdorsffii*, *Phyllodytes edelmoi*, three species of *Trachycephalus* (*T. hadroceps*, *T. dibernardoii* and *T. venulosus*), and four species of *Osteocephalus* (*O. taurinus*, *O. buckleyi*, *Osteocephalus* sp. and *O. oophagus*). Chromosomal preparations were obtained from bone marrow, testis and duodenal epithelium. All species analysed present $2n = 24$, FN = 48, with exception of *Osteocephalus buckleyi*, with $2n = 26$, FN = 50, and *Phyllodytes*

edelmoi, with $2n = 22$, $FN = 44$. Ours findings are coincident with previous reports where, from 13 species previously studied, eleven had a karyotype with $2n = 24$, $FN = 48$. Only two species of *Osteopilus* diverge with $2n = 24$ (*O. wilderi* with $2n = 28$, $FN = 52$ and *O. brunneus* $2n = 34$, $FN = 48$). Associated NORs and SC were observed in pair 11 in most species. However, in *Phyllodytes edelmoi* and *Argentohyla siemersi pedersenii*, these regions were observed in chromosome pairs 2 and 5, respectively. In all case, the NOR position was coincident with location of ribosomal 18S sequences evidenced by FISH analyses. Additional positions of this sequence were observed in some specimens of *Trachycephalus*, but in any case were coincident with additional SC (FS, fragile sites) observed in some individuals. Differently, these FS were associated to heterochromatic blocks in *Osteocephalus* species. C-banding patterns show scarce heterochromatin restricted to centromeric regions in mostly species analyzed. Only in *Osteocephalus* the C-bands show centric, interstitial and distal C-bands with differential pattern in each taxon. The absence of data in *Nyctimantis* and *Tepuihyla*, the use of techniques with more resolution and more inclusive analysis is needed to the correct establishment of chromosome homeology, which could contribute to understand the chromosome evolution in the Lophyhylini tribe.

INTRODUCTION

The family Hylidae is the most species-rich among anurans, with 636 recognized species included in three subfamilies (Hylinae, Phyllomedusinae and Pelodyadinae, Frost, 2010). In the taxonomic review by Faivovich, *et al.* (2005) the subfamily Hylinae was arranged in four tribes: Cophomantini, Dendropsophini, Hylini and Lophiohylini, the last two being sisters tribes. The tribe Lophiohylini, with 81 species grouped in 8

genera, has a widely distribution in Central and South America (Frost, 2010), and this natural group is only supported by molecular sinapomorphies, being the presence of at least four posterior labial tooth rows in the larval oral disc a possible morphologic synapomorphy (Faivovich *et al.*, 2005).

The chromosome information about this tribe is scarce, with only 12 species with available karyological data (Duellman and Cole, 1965; Rabello, 1970; Bogart and Bogart, 1971; Bogart, 1973; Cole, 1974; Schmid, 1978, 1980; Anderson, 1996; Morando and Hernando, 1996; Kasahara *et al.*, 2003; Nunez and Fagundes, 2008). In most previous work, only the diploid number and chromosome morphology is described, with the longest chromosome number, like in others hylids, $2n = 2x = 24$ chromosomes and $FN = 48$. However, Anderson (1996) reported two cases of *Osteopilus* species with distinctive diploid number and chromosomal morphology (*O. wilderi*, $2n = 2x = 28$, $NF = 52$ and *O. brunneus* $2n = 2x = 34$, $NF = 48$). Also, it has been suggested that karyotypes of this tribe, with the exception of *Osteocephalus taurinus*, are characterized by a discontinuity between the first five chromosomal pairs and the remaining chromosomes (Anderson, 1996; Kasahara *et al.*, 2003; Faivovich *et al.*, 2005).

The aim of this work is provide new information about chromosome characters useful for the study of chromosome evolution in Lophiohylini, using as evidence, standard stained karyotypes and the ultrastructural chromosomal characteristics obtained by differential staining (C-banding, Ag-NORs, DAPI, CMA3/MG, FISH). The results are discussed in the light of current phylogenetic knowledge (Faivovich *et al.*, 2005).

MATERIAL AND METHODS

We analyzed 50 specimens belonging to *Argenteohyla siemersi pedersenii*, *Itapotihyla langsdorffii*, *Osteocephalus taurinus*, *O. oophagus*, *O. sp.*, *O. buckleyi*, *Phyllodytes edelmoi*, *Trachycephalus hadroceps*, *T. venulosus* and *T. dibernardoi*. The list of specimens analyzed, collecting sites, sex and voucher numbers are detailed in Appendix I.

Chromosome spreads were prepared directly from bone marrow, testis or intestinal epithelium according Schmid, (1978).

Mitotic and meiotic chromosome preparations were stained with a Giemsa-PBS solution, and with differential staining methods: silver-staining of nucleolar organizer region (Ag-NOR) according Howell and Black (1980); C-banding was carried out by the technique performed by Sumner (1972), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and Chromomycin A₃/methylc (CMA₃/MG) following Pieczarka *et al.* (2006) and Sahar and Latt (1980), respectively. FISH with a biotin-labeled rDNA probe was carried out following Viégas-Péquignot (1992) and for telomeric regions were used commercial telomeric probes of all-human telomere (Oncor P4097-DG5), according to the manufacturer's protocol.

We used X (basic chromosome number), N (gametic chromosome number), 2N (somatic chromosome number), and FN (fundamental number) as suggested by White (1954). The relative length, centromeric index (CI) and centromeric ratio (CR) of the mitotic chromosomes were obtained using the software Micromeasure 3.3 (Reeves and Tear, 2000). The karyotypes were arranged in decreasing size, following the nomenclature of Green and Sessions (1991, 2007) of metacentric, submetacentric or subtelocentric for biarmed chromosomes, preserving the primary homeology.

RESULTS

Most species analyzed show a karyotype with $2n = 24$ banded chromosomes (FN = 48), with exception of *Osteocephalus buckleyi* with $2n = 26$, FN = 50, and *Phyllodytes edelmoi* $2n = 22$, FN = 44. Morphological features of chromosome pairs are detailed in Table 1.

In all case only one staining place was detected with the Ag-NOR technique, coincident with a secondary constrictions (SC). These regions located in pairs 11 in all the species analyzed, with the exception of *P. edelmoi*, which presents NORs in the 2q terminal and *Argentohyla siemersi pedersenii* in the 5q interstitial (Fig. 1). Additional SC, not associated with NOR (Fragile Sites, FS), were detected in *Osteocephalus* species (pair 12) and some specimens of *Trachycephalus venulosus* (pair 3). NORs associations were observed in *T. venulosus* and *T. hadroceps* (Fig. 4 and 6). NORs positions were confirmed by FISH experiments with rDNA 18S probes. Additional Nucleolus Organizer Regions were detected in one individual of *T. venulosus* (pairs 7 and 10; Fig. 4-5) and *T. hadroceps* (pairs 2 and 8; Fig. 6)

The fluorochrome base specific staining shown that *A. s. pedersenii* has centromeric and pericentromeric block of heterochromatin in all chromosome complement, been also CMA3 positive in all cases (CG-rich) (Fig. 1). In *Itapotihyla langsdorffi* the heterochromatin was centromeric in almost all the chromosome complement, with additional telomeric bands over pairs 1, 2 and 3. In this case, heterochromatic regions do not show any fluorochrome selective binding (Fig. 2). In *Trachycephalus* species the heterochromatin was located interstitially, with some telomeric bands in *T. dibernardoii* (Fig. 3) and *T. venulosus* (Fig. 4). Only *T. hadroceps* showed positive centromeric marks with CMA3, and no mark was detected with DAPI

staining (Fig 5). Karyotypes of *P. edelmoi* also showed scarce heterochromatin, restricted to centromeric regions of pairs 2, 3, 5 and 7-11, which presented the same pattern of fluorochrome affinities described to *T. hadroceps*. Additionally, NOR regions were CMA3 positive (Fig. 7). However, the heterochromatin patterns observed in *Osteocephalus* species (Fig. 8-11) was more heterogeneous, with centric, interstitial and telomeric bands, with differential pattern and base specific composition at each taxon. The centric heterochromatin was CMA3 positive, while the interstitial one usually had affinities to DAPI or CMA3, when were associated to the NOR-bearer chromosome pair, and the telomeric heterochromatin do not shown any differential affinities with fluorochrome base specific staining. Differences at fragile sites were observed in some *Trachycephalus* specimens, while in *Osteocephalus* these sites were associated to AT-rich regions.

Telomeric probes (ONCOR) were tested in *Osteocephalus* species and *P. edelmoi*. In *Osteocephalus*, only distal marks were observed in species with FN = 48, while in *O. buckleyi* (FN = 50) an additional mark was detected at the centromeric region of short arm second pair (Figure 12). In the specimens belonging to *Phyllodytes* analyzed Interstitial Telomeric Sequences (ITS) were observed on both arms of pairs 1 and 2 (Figure 7e).

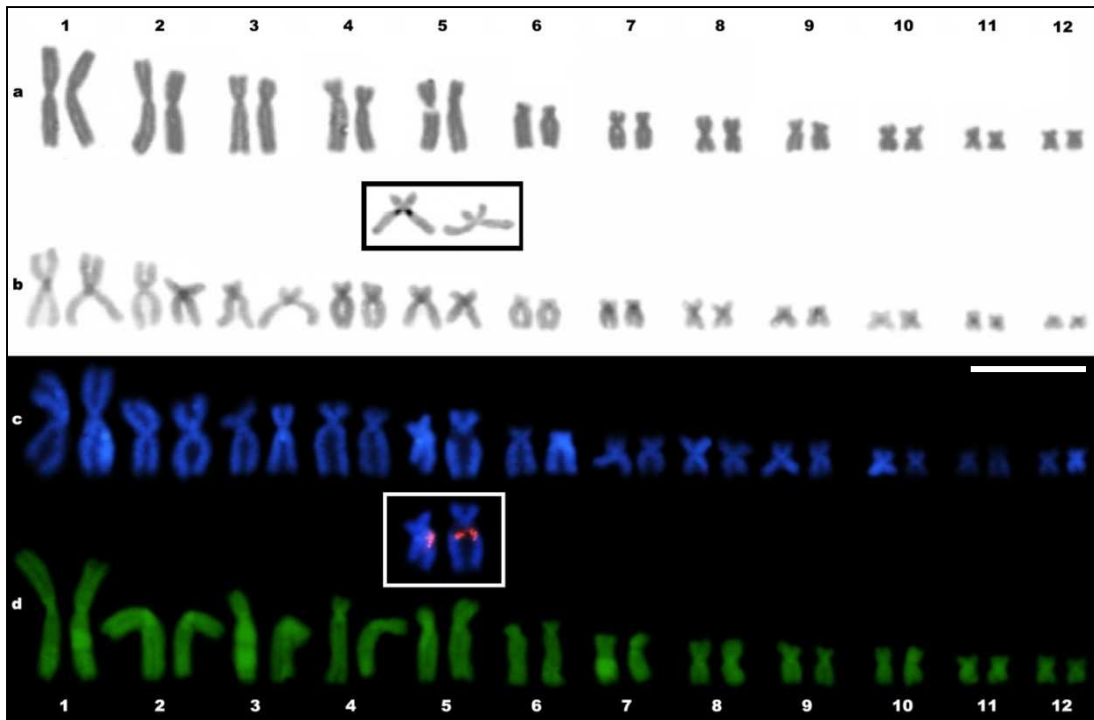


Figure 1. – Karyotypes of *Argentohyla siemersi pedersenii*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Black square: NOR-bearer pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

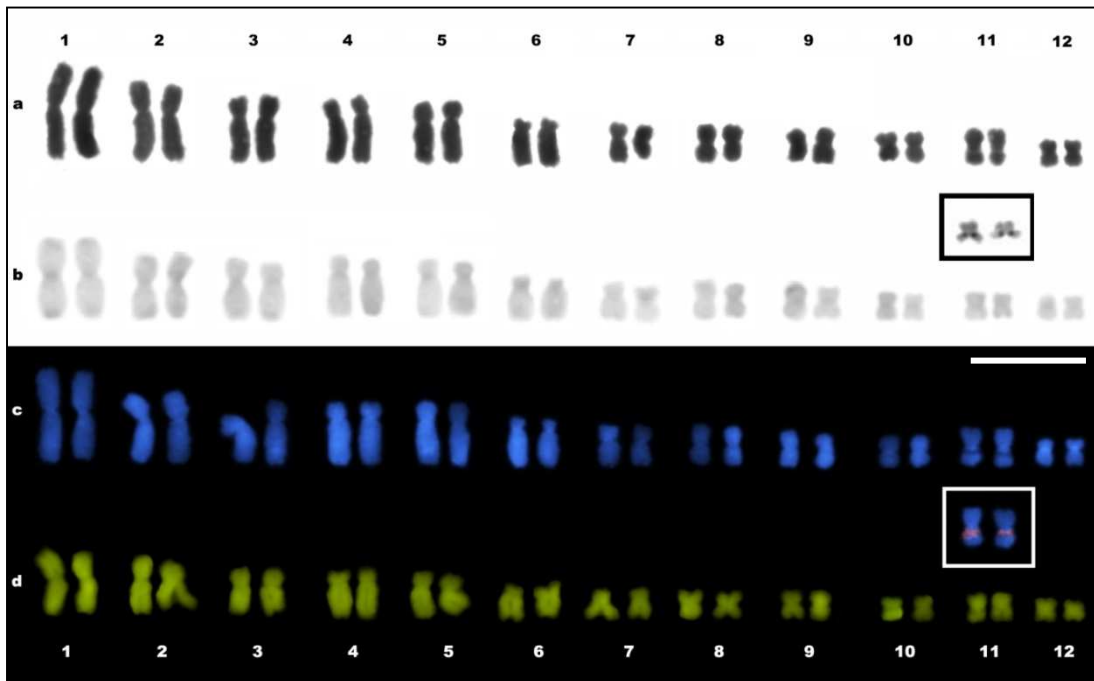


Figure 2. – Karyotypes of *Itapotihyla langsdorffi*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Black square: NOR-bearer pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

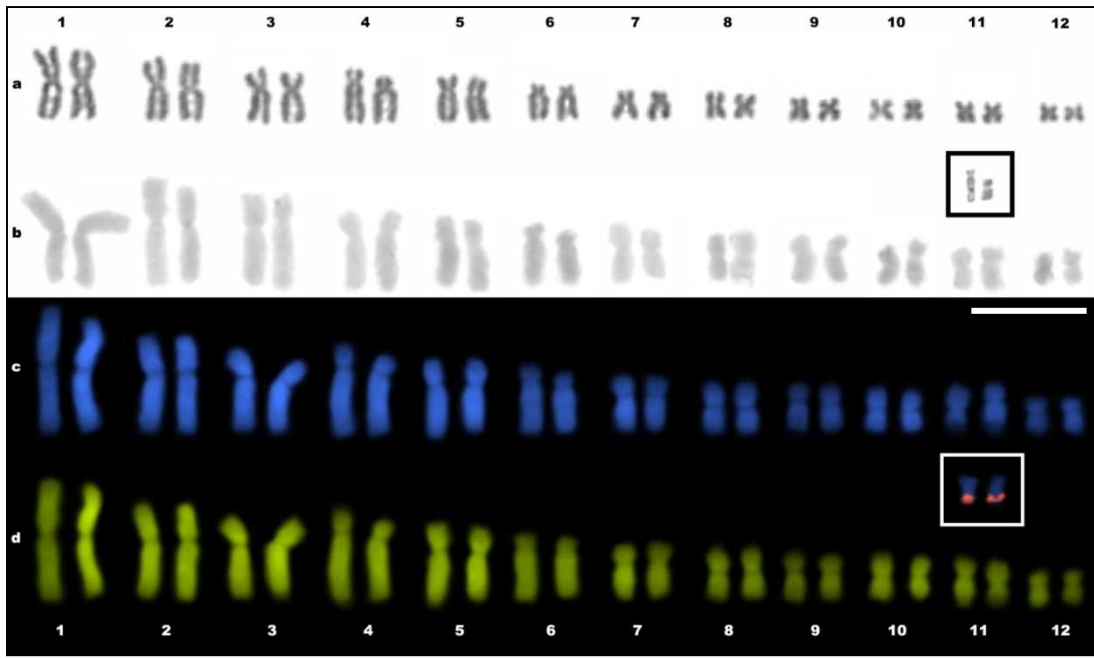


Figure 3. – Karyotypes of *Trachycephalus dibernardoi*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Black square: NOR-bearer pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

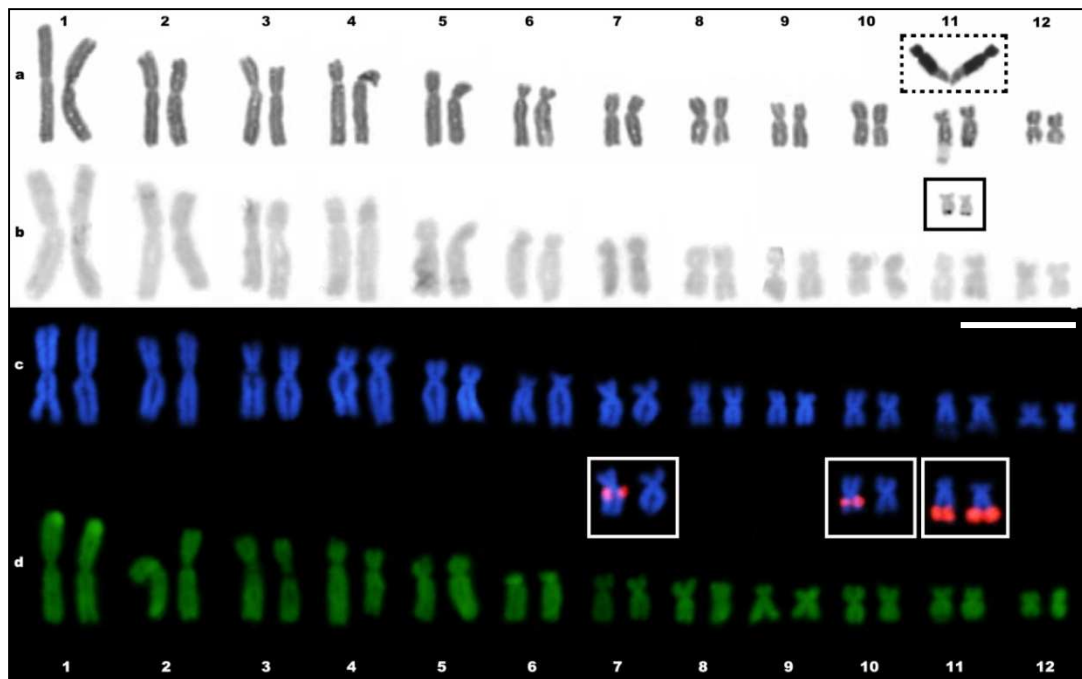


Figure 4. – Karyotypes of *Trachycephalus venulosus*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Dotted square: NOR association. Black square: NOR-bearer pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

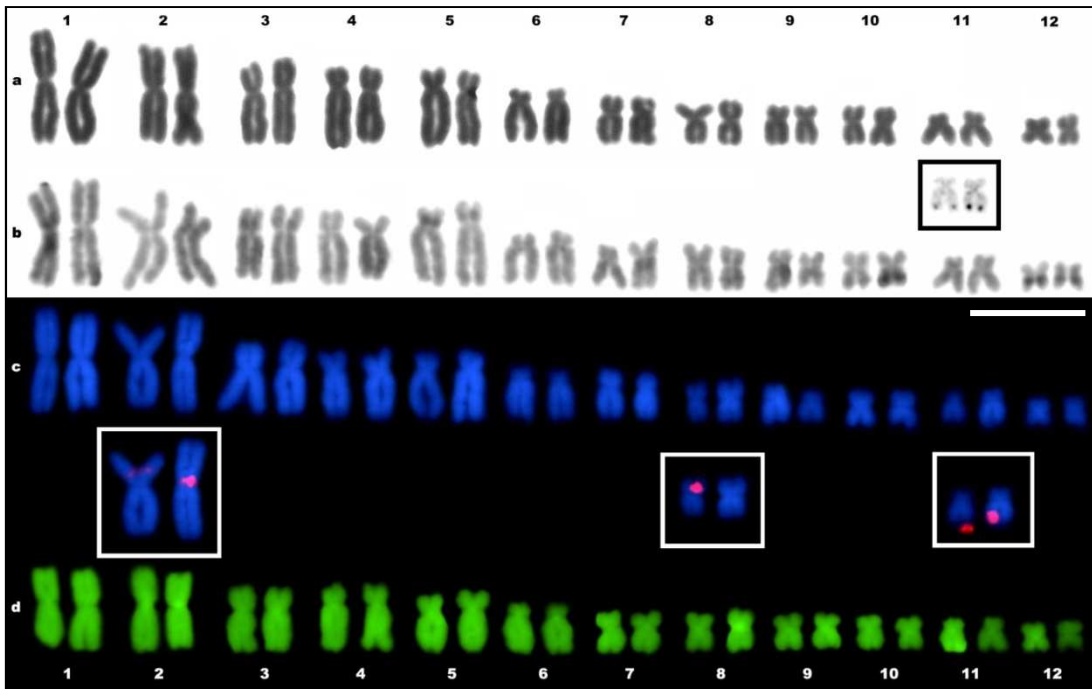


Figure 5. – Karyotypes of *Trachycephalus hadroceps*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Black square: NOR-bearing pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

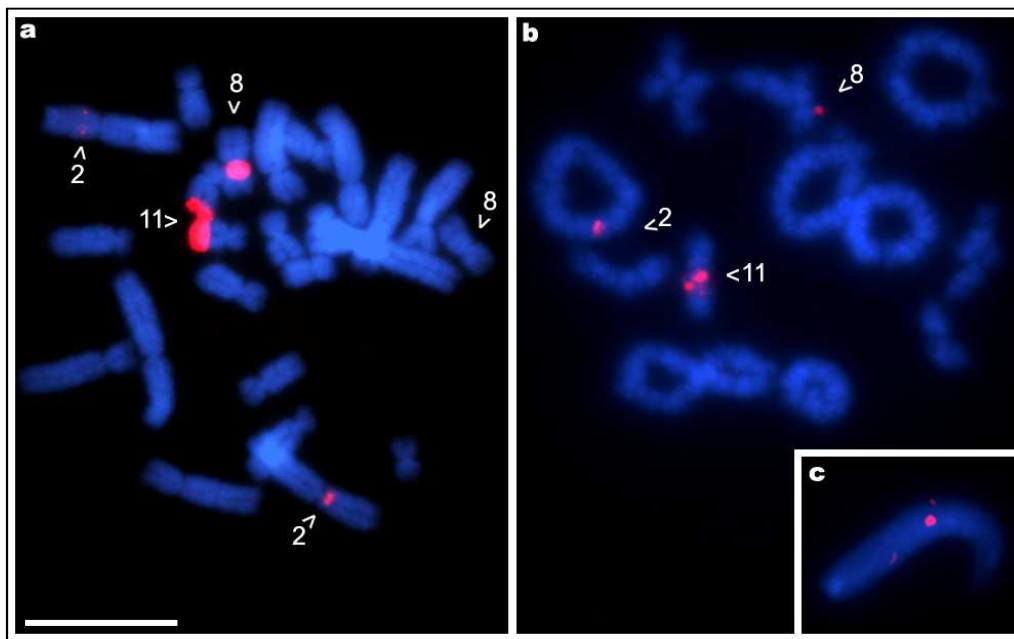


Figure 6. Fish with 18S rDNA probe in *Trachycephalus hadroceps*. a: mitoses; b: meiosis; and, c: sperm head. Arrowheads indicated hybridization on pairs 2, 8 and 11. Bar = 10 μ m.

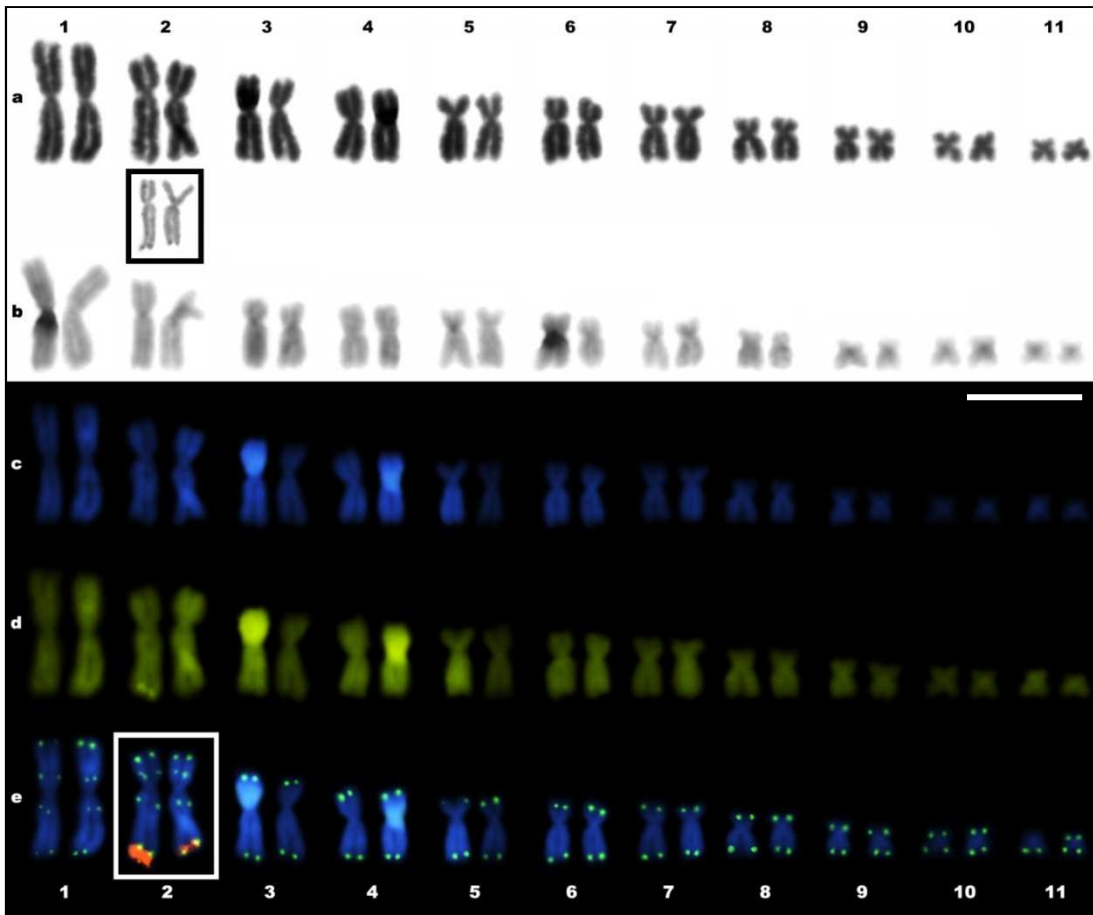


Figure 7. – Karyotypes of *Phyllodytes edelmoi*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining; and, e: Fish with ribosomal 18S rDNA probe (red mark) and telomere probe (green marks). Bar = 10 μ m.

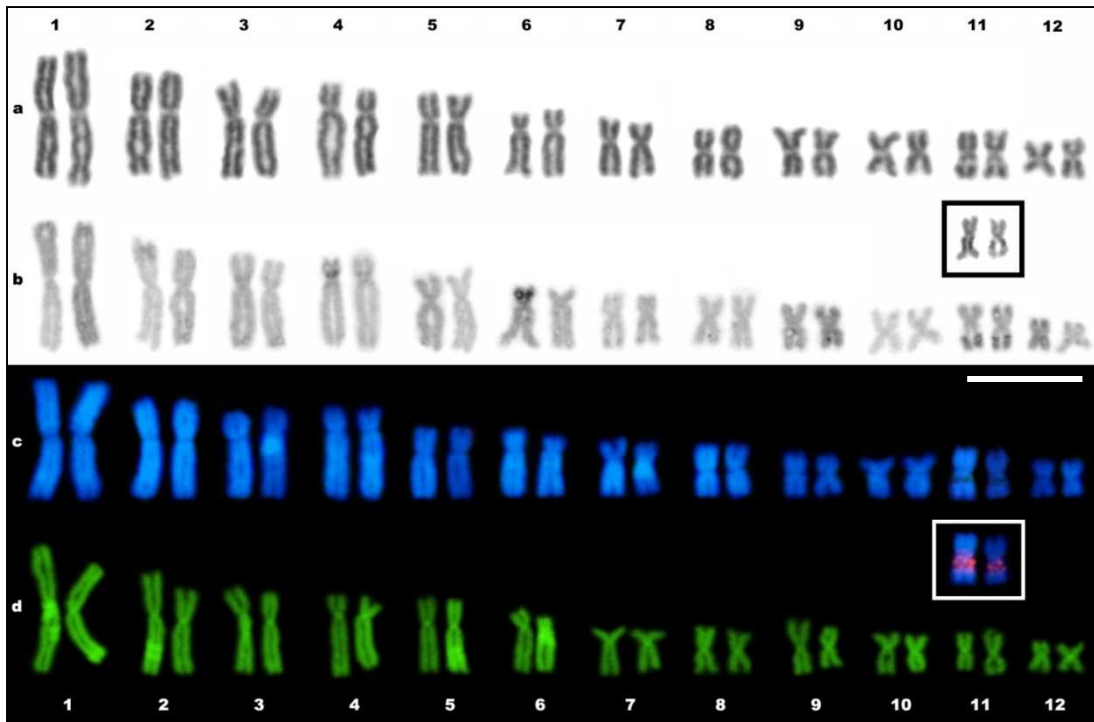


Figure 8. – Karyotypes of *Osteocephalus taurinus*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Black square: NOR-bearer pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

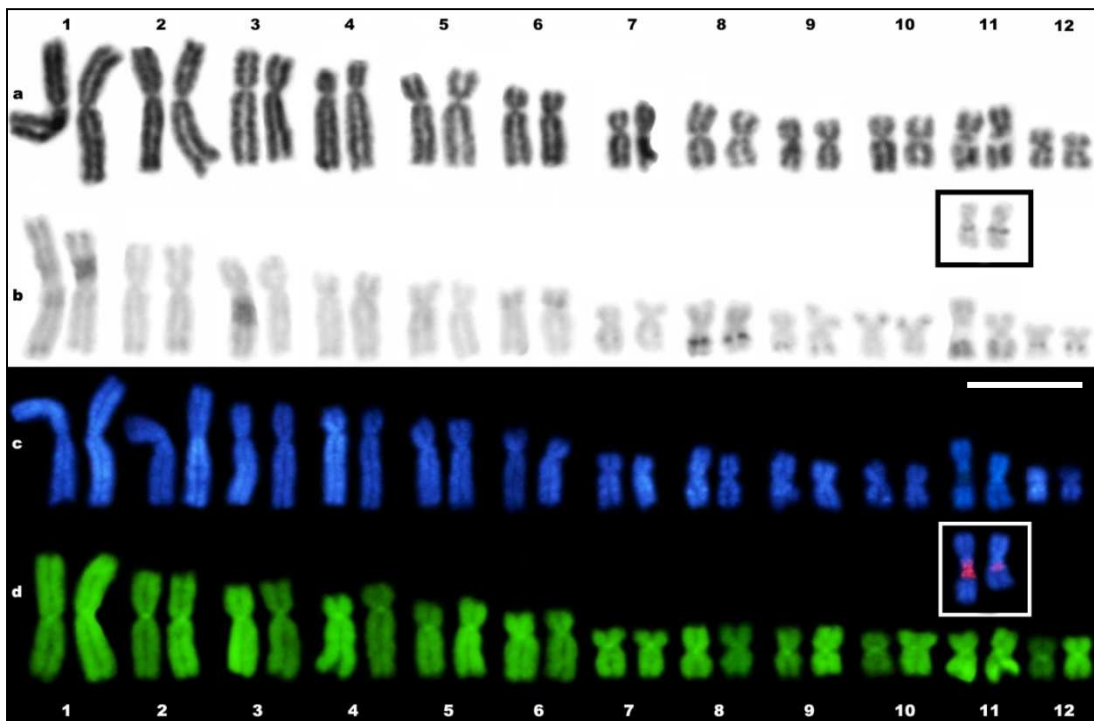


Figure 9. – Karyotypes of *Osteocephalus oophagus*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Black square: NOR-bearer pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

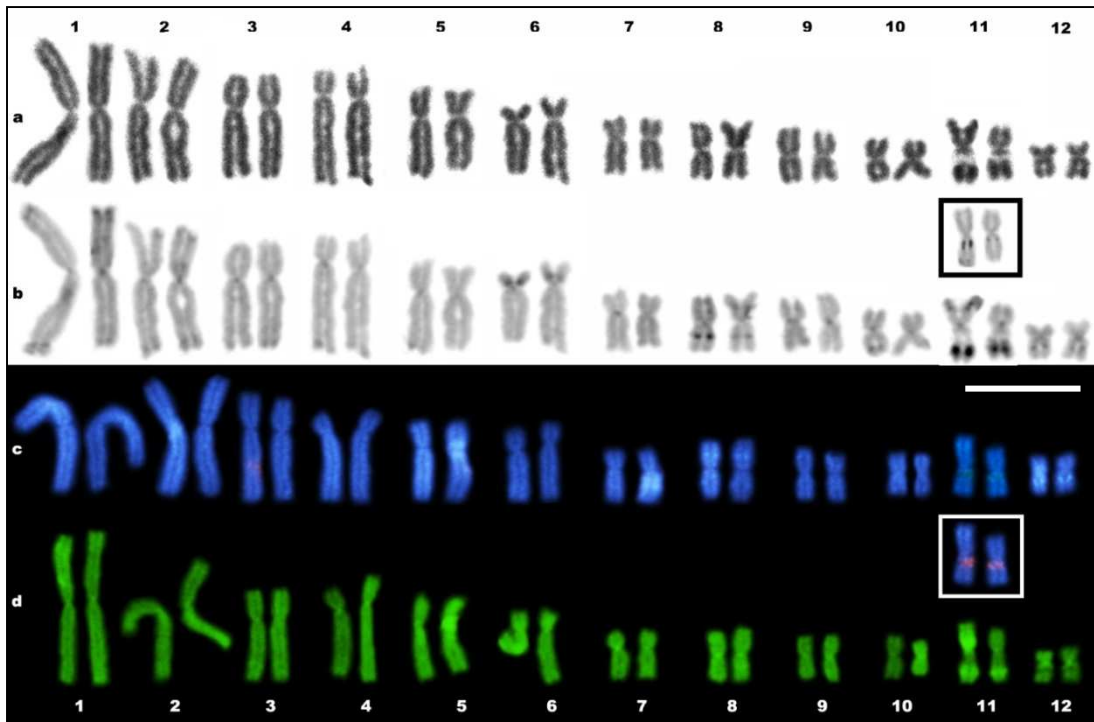


Figure 10. – Karyotypes of *Osteocephalus sp. nov.* a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Black square: NOR-bearer pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

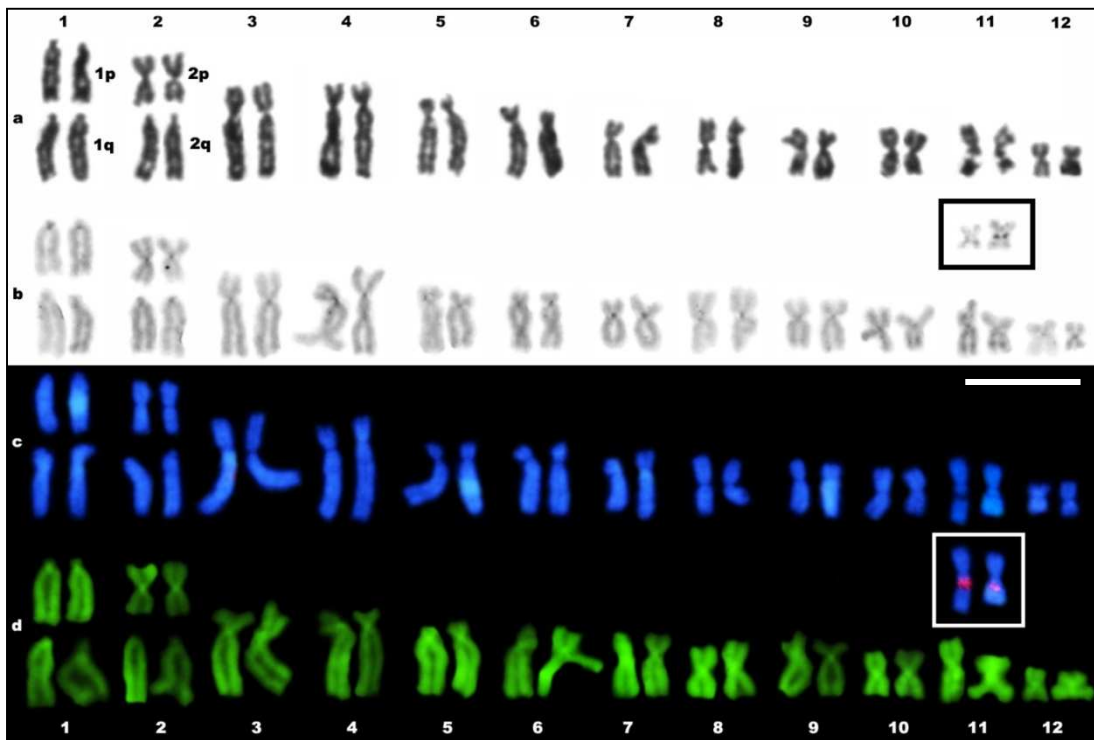


Figure 11. – Karyotypes of *Osteocephalus buckleyi*. a: Conventional staining; b: C-banding; c: DAPI staining; d: CMA3 staining. Black square: NOR-bearer pair. White square: 18S probe hybridization. Bar = 10 μ m.

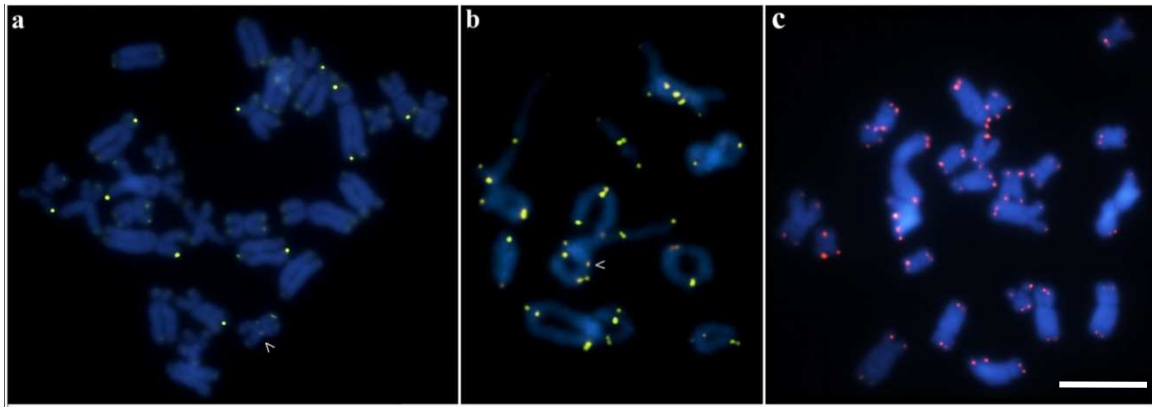


Figure 12. Mitotic (a) and meiotic (b) FISH of telomere probes in *Osteocephalus buckleyi*. Arrowheads indicated interstitial signal on pair 2p. (c) Mitotic FISH with telomere probes in *O. taurinus*. Bar = 10 μ m.

Table 1. Biometric analyses of the chromosomes of species from tribe Lophiohylini included in this work. AR= arm ration; CI= centromeric index; RL = relative length; SD = standart deviation; Type: m = metacentric, sm = submetacentric, st = subtelocentric, t = telocentric; * = Ag-NOR-bearer chromosome pair.

Chromosome Number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<i>Argenteohyla siemersi pedersenii</i>	%Set	17,65	14,71	11,69	9,82	10,64	7,41	6,54	5,98	4,77	3,27	4,43	3,09		
	AR ± SD	1,23 ± 0,10	1,44 ± 0,16	2,03 ± 0,14	3,44 ± 0,26	2,38 ± 0,18	3,80 ± 0,34	2,41 ± 0,20	1,33 ± 0,04	1,97 ± 0,16	1,84 ± 0,15	1,35 ± 0,12	1,79 ± 0,13		
	CI ± SD	0,45 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,33 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,36 ± 0,02		
	Type	m	m	sm	st	sm*	st	sm	m	sm	sm	m	sm		
<i>Itapotihyla langsdorffii</i>	%Set	15,40	12,59	10,78	10,80	9,85	7,49	6,45	6,45	6,05	4,62	5,54	3,98		
	AR ± SD	1,21 ± 0,06	1,57 ± 0,06	2,05 ± 0,19	3,02 ± 0,23	2,21 ± 0,18	4,19 ± 0,38	1,79 ± 0,12	1,58 ± 0,11	1,60 ± 0,08	1,34 ± 0,10	1,50 ± 0,07	1,42 ± 0,15		
	CI ± SD	0,45 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,03		
	Type	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	m*	m		
<i>O. buckleyi</i>	%Set	8,36	9,43	5,95	7,67	9,15	7,26	8,68	7,64	7,21	7,34	6,32	5,60	5,54	3,85
	AR ± SD	9,50 ± 1,23	11,46 ± 1,50	1,27 ± 0,17	12,17 ± 3,30	2,16 ± 0,24	3,05 ± 0,47	2,83 ± 0,36	3,43 ± 0,62	1,80 ± 0,20	1,20 ± 0,15	1,89 ± 0,21	1,18 ± 0,16	1,33 ± 0,18	1,35 ± 0,14
	CI ± SD	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,44 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,43 ± 0,04	0,43 ± 0,02
	Type	t	t	m	t	sm	st	sm	st	sm	m	sm	m	m*	m
		p arm	q arm	p arm	q arm										
<i>O. oophagus</i>	%Set	14,27	13,26	11,77	10,32	8,98	8,06	5,58	5,60	6,07	5,45	6,55	4,09		
	AR ± SD	1,15 ± 0,08	1,41 ± 0,12	1,93 ± 0,14	3,08 ± 0,24	2,15 ± 0,10	2,42 ± 0,20	1,26 ± 0,26	1,12 ± 0,12	1,36 ± 0,21	1,56 ± 0,28	1,63 ± 0,14	1,15 ± 0,15		
	CI ± SD	0,47 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,45 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,43 ± 0,04	0,40 ± 0,04	0,38 ± 0,02	0,47 ± 0,03		
	Type	m	m	sm	st	sm	sm	m	m	m	m	m*	m		
<i>O. taurinus</i>	%Set	15,34	12,01	10,93	10,68	8,99	7,35	6,67	6,17	6,07	5,64	6,03	4,12		
	AR ± SD	1,15 ± 0,06	1,53 ± 0,15	1,93 ± 0,13	3,08 ± 0,35	1,98 ± 0,15	3,14 ± 0,38	1,51 ± 0,17	1,23 ± 0,12	1,29 ± 0,17	1,29 ± 0,15	1,49 ± 0,26	1,11 ± 0,08		
	CI ± SD	0,47 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,41 ± 0,04	0,47 ± 0,02		
	Type	m	m	sm	st	sm	st	m	m	m	m	m*	m		
<i>Osteocephalus</i> sp. nov.	%Set	16,03	12,91	11,47	9,67	9,14	8,13	5,60	6,34	6,99	4,40	5,09	4,23		
	AR ± SD	1,17 ± 0,07	1,46 ± 0,08	2,12 ± 0,15	3,56 ± 0,29	1,99 ± 0,25	2,73 ± 0,22	1,84 ± 0,14	1,06 ± 0,04	1,13 ± 0,11	1,18 ± 0,09	1,17 ± 0,16	1,74 ± 0,23		
	CI ± SD	0,46 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,34 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,37 ± 0,03		
	Type	m	m	sm	st	sm	sm	sm	m	m	m	m*	sm		

Table 1. continuation.

Chromosome Number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Phyllodytes edelmoi</i>	%Set	16,65	13,91	11,09	10,96	9,89	8,45	7,92	6,67	5,19	4,85	4,42	
	AR ± SD	1,17 ± 0,09	1,78 ± 0,24	1,83 ± 0,22	1,36 ± 0,15	1,88 ± 0,19	1,77 ± 0,18	1,67 ± 0,19	1,84 ± 0,20	1,24 ± 0,19	1,22 ± 0,09	1,23 ± 0,14	
	CI ± SD	0,46 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,45 ± 0,04	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,03	
	Type	m	sm*	sm	m	sm	sm	m	sm	m	m	m	m
<i>Trachycephalus dibernardoi</i>	%Set	14,88	11,62	11,26	10,95	10,74	7,98	7,10	5,88	5,77	4,38	5,12	4,32
	AR ± SD	1,24 ± 0,08	1,49 ± 0,06	1,74 ± 0,09	3,22 ± 0,24	2,21 ± 0,14	4,25 ± 0,26	2,35 ± 0,17	1,31 ± 0,08	1,75 ± 0,11	2,01 ± 0,17	1,47 ± 0,08	1,82 ± 0,15
	CI ± SD	0,45 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,36 ± 0,02
	Type	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	sm	sm	m*	sm
<i>T. hadroceps</i>	%Set	15,02	12,94	11,23	11,04	9,92	7,31	6,86	5,91	5,54	4,67	5,31	4,25
	AR ± SD	1,25 ± 0,11	1,22 ± 0,06	1,88 ± 0,13	3,06 ± 0,31	2,51 ± 0,29	3,80 ± 0,29	1,86 ± 0,18	1,13 ± 0,13	1,61 ± 0,21	1,77 ± 0,37	1,32 ± 0,15	1,19 ± 0,11
	CI ± SD	0,45 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,38 ± 0,03	0,37 ± 0,05	0,43 ± 0,03	0,46 ± 0,02
	Type	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	sm	m*	m
<i>T. venulosus</i>	%Set	15,07	12,26	10,70	10,32	9,45	8,12	6,83	6,58	5,70	5,28	5,67	4,03
	AR ± SD	1,20 ± 0,07	1,52 ± 0,08	1,84 ± 0,08	3,16 ± 0,26	2,09 ± 0,15	3,96 ± 0,32	1,98 ± 0,12	1,38 ± 0,14	1,84 ± 0,15	1,94 ± 0,17	1,38 ± 0,14	1,37 ± 0,14
	CI ± SD	0,45 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,02
	Type	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	sm	sm	m*	m

DISCUSSION

The comparative data present here expand our knowledge about karyological aspects of species included by Faivovich *et al.* (2005) in Lophiohylini tribe. Only *Tepuihyla* and *Nyctimantis rugriceps* remain without any chromosomal information. The diploid number of 24 bivalent chromosomes (FN = 48) is the typical situation observed in mostly analyzed species of the differential diploid number present in *Osteopilus wilderi* ($2n = 28$; FN = 52) and *O. brunneus* ($2n = 34$; FN = 48) can be explained by chromosomal fission, followed by a pericentric inversions, which is the putative responsible for the FN variation (Anderson, 1996). In the same manner, this assumption explains the $2n$ observed in *O. buckleyi*; telocentric chromosome morphologies (pairs 1p, 1q and 2q) and centromeric signal of telomere sequence on pair 2p support this hypothesis (Figure 12a-b). These chromosomal rearrangements correspond to a putative autoapomorphy for *O. buckleyi*, and could be scored as fission of first pair, fission followed by a pericentric inversion at second pair, as independent events (character states).

Nevertheless, the diploid number observed in *Phyllodytes edelmoi* could be explained by tandem chromosome fusion between the NOR bearing chromosome pair and some other intermedial-length chromosome pair. This hypothesis is supported by the Interstitial Telomeric Sequences (ITS); however, the chromosome morphology and morphometric differences do not explain the differences observed only by fusion events. The ITS on pair 1 and the difficult to establish pair to pair homeological correlations with another Lophiohylini karyotypes are evidences of a major chromosome restructuration in this karyotype. Additional chromosomal studies in *Phyllodytes* species, and more powerful techniques, like chromosome painting, may resolve this question. However, the $2n = 22$ presented by this basal genus of Lophiohylini tribe

could be interpreted as a putative synapomorphy for *Phyllodytes*. The analysis of the remaining species included in *Phyllodytes* could confirm this assumption. Anderson (1996) mentioned the existence of grouping size karyotypes in *Osteopilus* species with 24 banded chromosomes, as a result of a clear discontinuity in chromosome lengths between the first five (*O. dominiensis* and *O. septentrionalis*) or six (*O. marianae*) chromosomes pairs with the remaining chromosomes, with the exception of *Osteocephalus taurinus* karyotypes. Faivovich *et al.* (2005) extend these observations for another Lophiohylini species: *Aparasphenodon brunoi*, *Corythomantis greeningi*, and *I. langsdorffii* reported by Kasahara *et al.* (2003); *Argentohyla siemersi pedersenii* (Morand & Hernando, 1996); and *T. venulosus* (Bogart, 1973). Nevertheless the chromosome measures presented here do not show any consistent grouping size between karyotypes of the Lophiohylini species (Table 1). Differences in relative size between pairs 5 and 6 ranked from 0,92% (*O. oophagus*) to 3,23% (*A. s. pedersenii*), and between pairs 6 and 7 from 0,43% in (*O. buckleyi*) to 2,53% in (*Osteocephalus* sp nov.).

The location of NORs in most species of Lophiohylini was described in different positions between the smallest chromosome pairs of the complement (see Table 2). This assumption may be interpreted as different character states. Alternatively, because almost all of the small chromosomes of the complement are very similar in size and morphology, these differences may be just a sign of difficulty to establish correct homeologies and/or different approaches for the chromosome classification. Based on these, we prefer to place all NORs bearing pairs with similar size and/or morphology in the same position (pair 11). Moreover, similar morphology, size and presence of NOR are the only signal of a possible homeology between these chromosome pairs.

Table 2: Chromosomal studies in Lophiohylini species.

Species	2n	FN	NOR	References
<i>Itapotihyla</i>				
<i>I. langsdorffii</i>	2x = 24	48	10q/11q*	Kasahara et al., 2003 (<i>Osteocephalus langsdorffii</i>); Nunes and Fagundes, 2008.
<i>Osteocephalus</i>				
<i>O. taurinus</i>	2x = 24	48	12p/11q*	Anderson (1996); Present work
<i>O. buckleyi</i>	2x = 28	50	11q*	Present work
<i>Osteocephalus sp nova</i>	2x = 24	48	11q*	Present work
<i>O. oophagus</i>	2x = 24	48	11q*	Present work
<i>Osteopilus</i>				
<i>O. dominicensis</i>	2x = 24	48	9p	Anderson, 1996.
<i>O. marianae</i>	2x = 24	48	?	Anderson, 1996.
<i>O. septentrionalis</i>	2x = 24	48	9p	Duellman and Cole, 1965; Cole, 1974; Schmid, 1978; Anderson, 1996.
<i>O. wilder</i>	2x = 28	58	9p	Anderson, 1996.
<i>O. brunneus</i>	2x = 34	48	17q	Cole, 1974; Anderson, 1996.
<i>Corythomantis</i>				
<i>C. greening</i>	2x = 24	48	10p/11q*	Kasahara et al., 2003.
<i>Aparasphenodon</i>				
<i>A. brunoi</i>	2x = 24	48	10q	Bogart, 1973; Foresti, 1972; Kasahara et al., 2003; Nunes and Fagundes, 2008.
<i>Trachycephalus</i>				
<i>T. dibernardoii</i>	2n = 24	48	11q*	Present work
<i>T. hadroceps</i>	2x = 24	48	11q*	Present work
<i>Trachycephalus sp</i>	2x = 24	48	11q	Bogart, 1973
<i>T. venulosus</i>	2x = 24	48	11q	Duellman & Cole, 1965 and Rabello, 1970 (<i>Phrynohyas spilomma</i>); Present work.
<i>Phyllodytes</i>				
<i>P. edelmoi</i>	2x = 22	44	2q*	Present work
<i>Argenteohyla</i>				
<i>A. siemersi pedersenii</i>	2x = 24	48	4q/5q*	Morando & Hernando (1996); Present work

*position suggested here.

In *Osteopilus brunneus* the telocentric chromosome pair 17 is the NOR carrier, which may be a consequence of fission chromosome events suggested by Anderson (1996) for the rearrangements of this karyotype.

Differently, *Phyllodytes edelmoi* and *Argentohyla s. pederseni*, presents Ag-NORs over chromosome pairs 2 and 5, respectively. In both cases the NORs position is a putative autapomorphy. The analysis of the remaining species included in *Phyllodytes* could confirm this assumption.

In almost all species with chromosome data available, the NORs position was confirmed by FISH experiences with rDNA 18S probes (Anderson, 1996; Kasahara et al., 2003; present work). Additional NORs sites were observed by FISH in specimens of *T. hadroceps* and *T. venulosus*. FS observed in some population of *T. venulosus* was not coincident with these additional sites of rDNA 18S sequences. Similarly, FS observed in *Osteocephalus* species were not associated with ribosome genes location; alternatively, AT-rich heterochromatics regions could be responsible for this FS in *Osteocephalus* species.

C-banding patterns show that most species had little heterochromatin, frequently restricted to centromeric regions. This pattern was here observed in *A. s. pederseni*, and in *A. brunoi*. As well, *C. greeningi* and *I. langsdorffii* had shown a similar pattern with some additional interstitial or telomeric bands, respectively (Kasahara et al., 2003). Anderson (1996) reported centromeric and telomeric heterochromatic region for almost all chromosome pairs in *Osteopilus* species. On the other hand, *Trachycephalus* species showed the poorest C-banding pattern which just a few interstitial bands to be noticed. Only in *Osteocephalus* species, all of this C-bands kind were observed, which follow a differentially distribution pattern in each studied taxon. The chromosome

characterization carried out with base-specific fluorochrome showed banding in almost all C positive bands (DAPI +/- CMA₃ +) and NORs position CMA3 (+). Only two species of *Osteocephalus* (*O. oophagus* and *Osteocephalus* sp. nov.) had shown DAPI positive interstitial bands. These heterochromatic regions were associated with the FS observed in pair 12 of these species.

Techniques with more resolution power are needed for the correct establishment of chromosome primary homology between species with different chromosomal traits. This analysis will stimulate the continuity of studies in Lophiohylini karyological data in order to understand the chromosome evolution of this group.

ACKNOWLEDGEMENT

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) for providing the permission for sample collection 020/2005 (IBAMA registration: 207419). This research was supported by CNPq, MPEG and UFPa.

REFERENCES

- Anderson, K. 1996. A karyological perspective on the monophyly of the hyliid genus *Osteopilus*, In R. Powell and R.W. Henderson (eds), Contributions to west Indian herpetology: A tribute to Albert Schwartz. Society for the Study of amphibians and reptiles, Ithaca (New York). 12: 157-168.
- Baldissera Jr, F.A.; Oliveira, P.S.L.; Kasahara, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia- Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. Rev. Bras. Genet. 16: 335-345.

- Bogart, J.P. 1973. Evolution of anuran karyotypes. In: Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems. Vial JL (Ed.) University of Missouri Press, Missouri, pp 337-349.
- Bogart, J.P.; Bogart, J.E. 1971. Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. *Herpetologica*, v.27, n.3, p. 229-235, 1971.
- Cole, C.J. 1974. Chromosome evolution in selected Treefrogs, including Casque-Head species (*Pterohyla*, *Triprion*, *Hyla* and *Smilisca*). *American Museum novitates*, 2541: 1-10.
- Duellman, W.E.; Cole, C.J. 1965. Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Systematic Zoology*, 14: 139-143.
- Faivovich, J.; Haddad, C.F.B; Garcia, P.C.A.; Frost, D.R.; Campbell, J.A.; Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 294: 1-240.
- Frost, D. R. 2010. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA
- Green D.M.; Sessions S.K. 1991. Nomenclature for chromosomes, pp. 431-432. In Amphibian Cytogenetics and Evolution D. M. Green and S. K. Sessions (Eds):. Academic Press, San Diego.
- Green D.M.; Sessions S.K. 2007. Karyology and Cytogenetics, pp. 2756-2841. In: Amphibian Biology. vol.7. H. Heatwole and M. Tyler (eds). Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton.

- Howell, W.N.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Kasahara, S.; Zamperi Silva, A.P.; Gruber, S.L.; Haddad, C.F.B. 2003. Comparative cytogenetic analyses on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brasil. *Cytogenet. Genome Res.*, 103: 155-162.
- Morando, M; Hernando, A. 1996. Cariotipo y región organizadora del nucleolo en *Argenteohyla siemersi pedersenii* (Anura: Hylidae). *Facena*, 12: 141-143.
- Levan A.; Fredga, k.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Nunes, R.R.A.; Fagundes, V. 2008. Cariótipo de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 23: 21-33.
- Pieczarka, J. C.; Nagamachi, C. Y. ; Souza, A. C. P.; Milhomem, S. S. R; Castro, R.R.; Nascimento, A. L. 2006. An adaptation to DAPI-banding to fishes chromosomes. *Caryologia* (Firenze), Itália, 59 (1): 43-46.
- Rabello, M.N. 1970. Chromosomal studies in brazilian anurans. *Caryologia*, 23 (1): 45-59.
- Reeves, A.; Tear, J. 2000. MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>.
- Sahar, E.; Latt, S.A. 1980. Energy transfer and binding competition between dyes used to enhance staining differentiation in metaphase chromosomes. *Chromosoma* 79: 1-28.

- Schmid, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388.
- Schmid, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77 (1): 83-103.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Weimer, R.; Mais, C.; Bolaños, F.; León, P. 1995. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer region in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 69: 18-26.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.
- Viegas-Pequignot, E. 1992. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: *In situ* Hybridization: Practical Approach (Willman, D., ed.). Oxford University Press, IRL Press, England.

APPENDIX 1. Specimens analyzed.

Argenteohyla siemersi pederseni.—ARGENTINA: Corrientes: Dept. Ituzaingó: Ituzaingó, Reserva Santa Maria, MLP DB 4208-11 (2 males, 2 female).

Itapotihyla langsdorffii.—ARGENTINA: Misiones: Dept. Iguazú: Puerto Iguazú, MLP DB 4149 (male).

Osteocephalus buckleyi.—BRAZIL: Pará: Dept. Juruti: Barroso camp, PS 442, 517, 519 (2 male, 1 female); Mutum camp., 463, 465, 508-9, 513, 582 (3 male, 2 female, ?)

Osteocephalus oophagus.—BRAZIL: Pará: Dept. Juruti: Barroso camp, PS 431, 458 (male, ?); Capiranga Plateau, PS 432, 570 (female, ?); Mutum camp, PS 574 (male); Pacoval, PS 579 (male); Prudencio river, PS 587 (male).

Osteocephalus sp..—BRAZIL: Pará: Dept. Juruti: Mutum camp, PS 439 (female); Capiranga Plateau, PS 464 (female); Pacoval, PS 583 (female).

Osteocephalus taurinus.—BRAZIL: Pará: Dept. Juruti: Barroso camp, PS 430, 467, 571 (2 male, 1 female); Capiranga Plateau, PS 452 (?); Mutum camp, PS 584, 588 (1 female, ?); Prudencio River, PS 589 (male).

Phyllodytes edelmoi.—BRAZIL: Alagoas: Dept. Maceio: Serra da Saudinha, PS 924 (male).

Trachycephalus dibernardoi.—ARGENTINA: Misiones: Dept. Guaraní: El Soberbio, Refugio Tangará, MLP DB 2645 (female); Dept. 25 de Mayo: Puerto Londero, Arroyo Los Muertos y Ruta Provincial N° 2, DB 5873 (male/female).

Trachycephalus hadroceps.—BRAZIL: Pará: Dept. Juruti: Barroso camp, PS 294-5 (2 male).

Trachycephalus venulosus.—ARGENTINA: Misiones: Dept. Capital: Villa Lanús, Refugio Don Lorenzo, MLP DB 2950 (female); Posadas, Tiro Federal, MLP DB 1977 (male); Dept. Gral. Belgrano: Bernardo de Irigoyen, MLP DB 5213 (macho); Dept. Iguazú: Puerto Iguazú, MLP DB 4150, 5015 (2 machos); Dept. Obera: San Martín, MLP 5891 (?); Santa Fe: Dept. Capital: Ruta provincial N° 1, próximo a San José del Rincón, MLP DB 4457 (male). BRAZIL: Pará: Dept. Belém: Cotijuba island, PS 46-51-55-56 (2 male, 2 female); Belém, PS 498 (female); Dept. Tome Açú: Fzda Inada PS 161 (female); Dept. Curuçá: Ipomonga island, PS 232 (male); Dept. Peixe Boi: Peixe Boi-3km norte, PS 499 (female).

CAPITULO III

VARIAÇÃO CROMOSSÔMICA NA TRIBO DENDROPSOPHINI

FITZINGER, 1843 (ANURA: HYLIDAE)

RESUMO

A tribo Dendropsophini atualmente agrupa os gêneros *Scinax*, *Pseudis*, *Scarthyla*, *Sphaenorhynchus*, *Xenohyla* e *Dendropsophus*, amplamente distribuídos na região Neotropical. Estudos filogenéticos, principalmente baseados em dados moleculares, apontaram uma monofília bem apoiada de cada um dos gêneros, assim como relações filogenéticas bem estabelecidas entre os mesmos. Neste trabalho são apresentados comparativamente dados citogenéticos de nove espécies pertencentes aos gêneros *Pseudis* (*P. laevis*), *Scarthyla* (*S. goinorum*), *Sphaenorhynchus* (*S. lacteus*, *S. carneus*, *S. caramaschii* e *S. dorisae*), *Xenohyla* (*X. truncata*), e *Dendropsophus* (*D. marmoratus* e *D. melanargyreus*). Os dados citogenéticos registrados em todos os gêneros revelam uma elevada diversidade cariotípica com grandes variações nos números diplóides ($2n = 22$ em *Scarthyla*; $2n = 24$ em *Scinax* e *Xenohyla*; $2n = 24$, $24+1-2B$ e 26 em *Sphaenorhynchus*; $2n = 24$ e 28 em *Pseudis*; e, $2n = 30$ em *Dendropsophus*). O $2n = 24$ observado em *X. truncata* confirma que o $2n = 30$ constitui uma sinapomorfia do gênero *Dendropsophus*. Embora todas as espécies estudadas em *Dendropsophus* apresentem o mesmo número diplóide, existe uma enorme variação em relação ao número de pares telocêntricos ($NF = 50$ a 60). A localização das regiões organizadoras dos nucléolos (NOR) no par 7 é provavelmente uma sinapomorfia do ramo *Pseudis* + *Scarthyla*. Similarmente, *Xenohyla* e a maioria das espécies de *Sphaenorhynchus* as NOR também se localizam no par 7. Entretanto, no gênero *Dendropsophus* existe uma interessante diversidade em relação a número e localização. Por outro lado, a distribuição de heterocromatina apresentou padrões variáveis, sendo especialmente informativa no gênero *Pseudis*. Embora exista uma excepcional variação cromossômica neste grupo, a formulação de hipóteses consistentes sobre aspectos referentes à evolução cromossômica do grupo se vê dificultada pela informação

fragmentada em alguns gêneros. O advento de novas técnicas que permitam acessar com maior precisão as homeologias cromossômicas possibilitaram ampliar nosso conhecimento sobre estas características genético-evolutivas dos cromossomos na evolução do grupo.

INTRODUÇÃO

A família Hylidae encontra-se dividida em três subfamílias: Hyalinae; Pelodryadinae e Phyllomedusinae. Hyalinae é a subfamília com o maior número de espécies reconhecidas e está dividida em quatro tribos: Cophomantini, Dendropsophini, Hylini e Lophiohylini. Destas, Dendropsophini é quem agrupa o maior número de espécies descritas, com 218 das 891 espécies alocadas em Hylidae (Faivovich *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 2006; Frost, 2010). Os gêneros dentro de Dendropsophini apresentam uma monofilia bem apoiada, principalmente baseados em dados moleculares (Faivovich *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2005; Aguiar Jr *et al.*, 2007) e as relações filogenéticas entre seus gêneros estão bem estabelecidas.

Embora, de maneira geral, dados citogenéticos não tenham sido incluídos em análises cladísticas (Dobigny *et al.*, 2004), historicamente dentro de Hylidae o número cromossômico é considerado um importante caractere taxonômico usado na caracterização do *status* de espécies e suas relações filogenéticas (Duellman, 1970; Bogart, 1973; Faivovich *et al.* 2005; Haddad *et al.*, 1994; Pombal & Haddad, 1992). Possivelmente, uns dos melhores exemplos de como número e diversidade cromossômica é utilizado como uma evidência de relação filogenética dentro da tribo é o caso do gênero *Dendropsophus* (Duellman & Cole, 1965; Bogart, 1973; Duellman, 1967; 1970; 1982; Skuk & Langone, 1992; Kaiser *et al.*, 1996; Medeiros *et al.*, 2003;

Gruber *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2006). Este gênero é o segundo mais diversificado da tribo e inclui todas as espécies neotropicais antigamente alocadas dentro do gênero *Hyla* onde eram conhecidas ou suspeitas de possuir 30 cromossomos (Faivovich *et al.*, 2005). Porém, apenas 27 espécies do gênero possuem dados referentes aos seus números diplóides, ainda há certos grupos de espécies (*D. minimus* e *D. garagoensis*) dos quais não se possuem dados citogenéticos (Bogart, 1973, Gruber *et al.*, 2005, Skuk & Langone 1992, Kaiser *et al.*, 1996, Nunes & Fagundes, 2008)

Relações entre as espécies deste gênero, baseadas em números cromossômicos, são suspeitadas desde os anos 60 (Duellman & Cole, 1965; Duellman, 1967). Em anos mais recentes, o número cromossômico de $2n = 30$, é considerado como uma provável sinapomorfia do gênero, devido a que, o cariótipo de *Xenohyla* permanece desconhecido (Faivovich *et al.*, 2005), gênero que tem sido consistentemente relatado como grupo irmão de *Dendropsophus* (Faivovich *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2006).

Discutir evolução cromossômica é difícil devido à diminuta certeza de homeologia (Dobigny *et al.*, 2004). Apesar disto, os Dendropsophini resultam num excelente modelo para discursar sobre evolução de números diplóides. Os dois gêneros dos quais se carece de informações citogenéticas, *Scarthyla* e *Xenohyla*, são a chave para discutir sobre homeologia entre espécies com diferentes números diplóides. Neste trabalho são apresentados dados citogenéticos previamente desconhecidos de *Xenohyla* e *Scarthyla*, assim como novos dados cariológicos de espécies dos gêneros *Dendropsophus*, *Sphaenorhynchus* e *Pseudis*.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho são apresentados comparativamente dados citogenéticos obtidos a partir de análises de 40 espécimes pertencentes às espécies *Dendropsophus marmoratus*, *D melanargyreus*, *Pseudis laevis*, *Scarthyla goinorum*, *Sphaenorhynchus caramaschii*, *S. carneus*, *S. dorisae*, *S. lacteus* e *Xenohyla truncata*. Dados referentes ao número de espécimes, sítios de coleta, sexo e registro de tombo encontram-se detalhados no Apêndice I.

As preparações cromossômicas foram obtidas diretamente a partir de medula óssea e testículos (Baldissera Jr *et al.* 1993) ou a partir de epitélio duodenal (Schmid, 1978). As análises cariológicas foram realizadas empregando-se técnicas de coloração convencional com Giemsa-Tampão fosfato (pH 6,8) 5%; e técnicas de coloração diferencial: impregnação com AgNO₃ de acordo com Howell & Black (1980); bandeamento C segundo descrição de Sumner (1972); coloração com fluorocromos CMA3/DAPI de acordo com (Schweizer & Ambros, 1994); e hibridização *in situ* com sondas de DNA_{r-18S}. (Viégas-Péquignot, 1992). A localização das regiões teloméricas foi levada a cabo com sondas de telômero humanas (Oncor P4097-DG5) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

O padrão de coloração com os fluorocromos CMA3/DAPI foi observado em três situações: células sem pré-tratamento, células previamente submetidas a procedimentos de bandeamento C e células previamente submetidas a procedimentos de FISH. O padrão de coloração foi interpretado segundo os resultados obtidos por Barros *et al.* (2009), segundo os quais marcações (+)/(+) e (+)/(-) caracteriza regiões ricas em CG, e (-)/(+) caracteriza regiões ricas em AT.

O comprimento porcentual relativo (CR) e o índice centromérico (CI) foram considerados na caracterização morfométrica dos pares cromossômicos. Os cromossomos mitóticos foram classificados em tamanhos decrescentes segundo a nomenclatura sugerida por Green & Sessions (1991, 2007), entretanto, este critério de ordenamento foi alterado no intuito de maximizar a homeologia entre os cariótipos aqui descritos e os descritos por outros autores. As medidas cromossômicas foram tomadas usando o programa MicroMeasure versão 3.2 (Reeves & Tear, 1999). O número total de braços cromossômicos foram considerados para calcular o Número Fundamental (NF).

RESULTADOS

São apresentados dados citogenéticos de nove espécies pertencentes aos gêneros *Pseudis* (*P. laevis*), *Scarthyla* (*S. goinorum*), *Sphaenorhynchus* (*S. lacteus*, *S. carneus*, *S. caramaschii* e *S. dorisae*), *Xenohyla* (*X. truncata*), e *Dendropsophus* (*D. marmoratus* e *D. melanargyreus*); oito dos quais representam dados inéditos. As localizações de NOR, os padrões de bandeamento C, o padrão de coloração com fluorocromos e a localização das seqüências teloméricas (TTAGGG) em todas as espécies analisadas constituem dados inéditos em cada uma das constituições cariotípicas descritas. O resultado da análise morfométrica dos cariótipos de cada uma das espécies analisadas encontra-se resumido na Tabela 1.

***Pseudis* Wagler, 1830**

As células mitóticas dos espécimes analisados de *P. laevis* possuem um $2n = 24$ (NF = 48) com CS e NOR localizadas na região intersticial do braço longo do par 7 (Figura 1). A análise meiótica revelou 12 bivalentes em todas as células observadas. O

padrão de bandeamento C observado nas amostras apresentou apenas marcas intersticiais e teloméricas. A caracterização da heterocromatina com CMA3 indica que as mesmas são ricas em bases GC. As NOR também apresentaram marcação com CMA3 (+). Entretanto, em procedimentos de FISH, as regiões centroméricas da maioria dos pares cromossômicos resultaram DAPI (+). O resultado dos experimentos de FISH com sondas teloméricas indicou que as seqüências teloméricas (TTAGGG) restringiram-se apenas às regiões distais em todos os cromossomos do complemento.

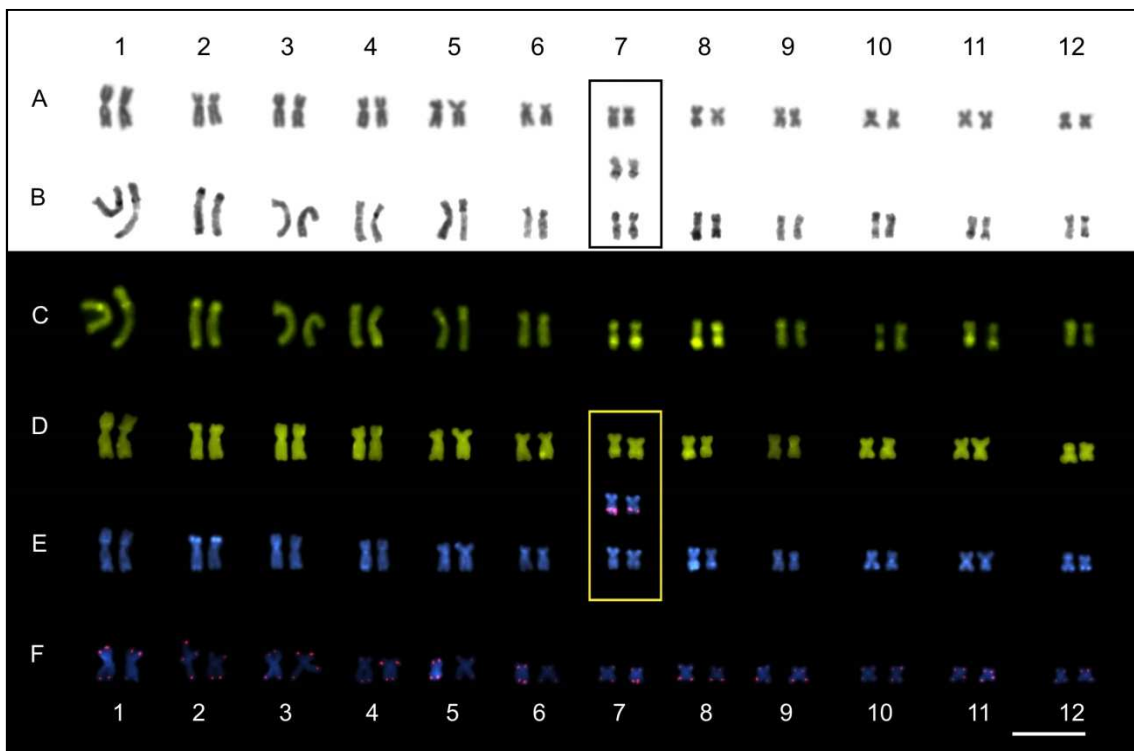


Figura 1. Cariótipos de *Pseudis laevis*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandamento C. (C) Padrão de coloração com CMA3 após desnaturação com $(OH)_2Ba$. (D-E) Padrão de coloração com CMA3/DAPI após desnaturação com formamida. (F) FISH com sondas teloméricas (ONCOR). Par portador da NOR em destaque. Barra = 10 μm .

Scarthyia Duellman & de Sá, 1988

O cariótipo de *S. goinorum* apresentou um $2n = 22$ (NF = 48) (Figura 2). Diascinesis meióticas nos espécimes machos caracterizaram-se por apresentar 11 bivalentes em todas as células. Todos os espécimes apresentaram CS no braço longo do par 7. As CS coincidem com as marcas observadas nos experimentos de FISH com sondas de rDNA 18S, uma marca adicional no braço longo do par 4 foi observada em um dos espécimes (Figura 4 E-F). A técnica do bandeamento C mostrou marcas centroméricas em todos os pares cromossômicos, caracterizadas como CMA₃ (+), e marcas intersticiais nos pares 3 e 4, sendo as primeiras CMA₃ (+) e as últimas DAPI (+). As NORs foram CMA₃ (+).

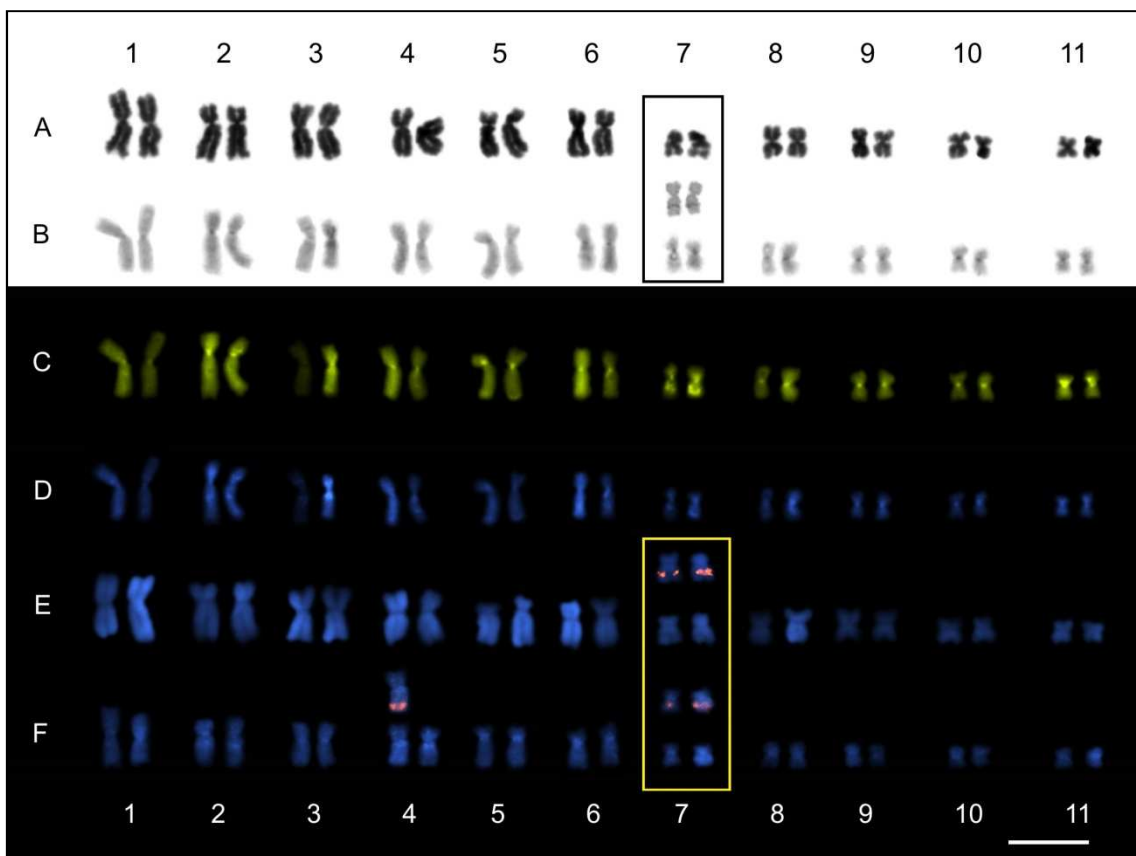


Figura 2. Cariótipos de *Scarthyia goinorum*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandeamento C. (C-D) Padrão de coloração com CMA₃/DAPI apos desnaturaçao com (OH)₂Ba. (E-F) FISH com sondas de DNA_{18S} em espécimes com 2 e 3 marcações. Par portador da NOR em destaque. Barra = 10 μ m.

Tabela 1. Análise morfométrico dos cromossomos das espécies analisadas da tribo Dendropsophini. *Pl*: *Pseudis laevis*; *Sg*: *Scarthyla goinorum*; *Scm*: *Sphaenorhynchus caramaschii*; *Sd*: *S. dorisae*; *Sl*: *S. lacteus*; *Scn*: *S. carneus*; *Xt*: *Xenohyla truncata*; *Dma*: *Dendropsophus marmoratus*; e, *Dme*: *D. melanargyreus*. RB = relação de braços; IC = índice centromérico; %set = tamanho relativo; Tipo: m = metacêntrico, sm = submetacêntrico, st = subtlocêntrico, t = telocêntrico; * = par cromossômico portador da NOR. # = cromossomo B.

		<i>Pl</i>	<i>Sg</i>	<i>Scm</i>	<i>Sd</i>	<i>Sl</i>	<i>Scn</i>	<i>Xt</i>	<i>Dma</i>	<i>Dme</i>
Par 1	% set	14,00%	14,21%	14,50%	15,23%	15,80%	12,52%	16,29%	10,97%	10,77%
	RB	1,19±0,09	1,31±0,23	1,22±0,09	1,24±0,13	1,13±0,16	1,57±0,16	1,10±0,07	2,88±0,51	2,41±0,29
	IC	0,46±0,02	0,44±0,04	0,45±0,02	0,45±0,02	0,47±0,03	0,39±0,02	0,48±0,02	0,26±0,04	0,30±0,03
	tipo	m	m	m	m	m	m	m	sm	sm
Par 2	% set	10,88%	12,71%	12,01%	11,90%	13,37%	12,04%	12,05%	10,01%	9,31%
	RB	2,37±0,21	2,04±0,36	1,55±0,09	1,60±0,20	1,85±0,16	1,70±0,25	1,55±0,19	2,14±0,17	2,04±0,36
	IC	0,30±0,02	0,33±0,04	0,39±0,01	0,39±0,03	0,35±0,02	0,37±0,03	0,39±0,03	0,32±0,02	0,33±0,04
	tipo	sm	sm	m	m	sm	sm	m	sm	sm
Par 3	% set	11,45%	11,56%	11,03%	10,88%	11,23%	10,56%	10,47%	9,59%	9,20%
	RB	1,42±0,12	1,58±0,29	1,94±0,31	2,00±0,43	2,04±0,28	2,98±0,47	1,65±0,23	1,65±0,37	1,30±0,25
	IC	0,41±0,02	0,39±0,04	0,34±0,03	0,34±0,04	0,33±0,03	0,27±0,05	0,38±0,03	0,38±0,05	0,44±0,04
	tipo	m	m	sm	sm	sm	sm	m	m	m
Par 4	% set	10,10%	11,10%	10,88%	10,38%	10,11%	9,79%	9,61%	7,99%	8,32%
	RB	1,71±0,14	1,81±0,35	2,67±0,38	2,13±0,43	3,35±0,93	2,09±0,25	2,24±0,63	2,96±0,54	2,12±0,46
	IC	0,37±0,02	0,36±0,04	0,27±0,03	0,33±0,04	0,24±0,06	0,33±0,03	0,32±0,05	0,26±0,04	0,33±0,05
	tipo	sm	sm	sm	sm	st	sm	sm	sm	sm
Par 5	% set	9,51%	11,10%	9,79%	9,90%	9,95%	9,01%	9,13%	7,01%	7,33%
	RB	1,55±0,15	2,40±0,50	1,97±0,16	1,68±0,23	1,95±0,41	2,18±0,37	1,84±0,27	16,78±4,38	7,22±2,80
	IC	0,39±0,02	0,30±0,04	0,34±0,02	0,38±0,03	0,34±0,04	0,32±0,04	0,36±0,03	0,06±0,01	0,13±0,04
	tipo	m	sm	sm	m	sm	sm	sm	t	t
Par 6	% set	8,09%	10,09%	8,20%	8,07%	7,74%	8,05%	8,60%	6,58%	6,94%
	RB	2,96±0,45	1,92±0,45	3,62±0,44	2,55±0,39	3,68±1,32	1,88±0,35	2,42±0,46	16,27±6,58	7,62±1,74
	IC	0,26±0,03	0,35±0,05	0,22±0,02	0,28±0,03	0,23±0,05	0,35±0,04	0,30±0,04	0,07±0,03	0,12±0,03
	tipo	sm	sm	st	sm	st	sm	sm	t	t
Par 7	% set	7,10%	6,98%	6,57%	6,25%	6,60%	7,34%	6,52%	6,04%	6,47%
	RB	1,73±0,59	1,49±0,27	1,39±0,21	1,28±0,18	2,13±0,33	2,42±0,48	1,52±0,27	12,93±4,13	8,08±1,95
	IC	0,38±0,07	0,41±0,04	0,42±0,04	0,45±0,03	0,32±0,03	0,30±0,05	0,40±0,04	0,08±0,03	0,12±0,03
	tipo	m*	m*	m*	m*	sm*	sm	m*	t	t
Par 8	% set	6,88%	6,31%	6,25%	6,31%	5,93%	6,33%	6,11%	6,85%	7,13%
	RB	1,30±0,29	1,42±0,20	1,71±0,21	1,33±0,22	2,31±0,51	1,78±0,34	1,34±0,29	1,45±0,18	1,40±0,19
	IC	0,44±0,05	0,42±0,03	0,37±0,03	0,43±0,04	0,31±0,05	0,36±0,04	0,43±0,05	0,41±0,03	0,42±0,04
	tipo	m	m	sm	m	sm	sm*	m	m	m
Par 9	% set	6,70%	5,88%	5,89%	6,04%	5,57%	6,34%	5,74%	6,27%	6,49%
	RB	1,36±0,22	1,52±0,26	1,10±0,07	1,27±0,17	1,37±0,19	1,54±0,26	1,44±0,35	1,46±0,40	1,18±0,15
	IC	0,43±0,04	0,40±0,04	0,48±0,02	0,44±0,03	0,42±0,03	0,40±0,04	0,42±0,05	0,42±0,06	0,46±0,03
	tipo	m	m	m	m	m	m	m	m*	m*
Par 10	% set	6,59%	5,48%	5,51%	5,63%	5,16%	5,95%	5,35%	6,22%	6,26%
	RB	1,22±0,20	1,38±0,27	1,41±0,22	1,39±0,32	1,42±0,42	1,20±0,17	1,54±0,21	1,50±0,31	1,22±0,21
	IC	0,45±0,04	0,43±0,05	0,42±0,04	0,43±0,05	0,42±0,04	0,46±0,03	0,40±0,03	0,40±0,05	0,45±0,04
	tipo	m	m	m	m	m	m	m	m	m

Tabela 1. Continuação...

		<i>Pl</i>	<i>Sg</i>	<i>Scm</i>	<i>Sd</i>	<i>Sl</i>	<i>Scn</i>	<i>Xt</i>	<i>Dma</i>	<i>Dme</i>
Par 11	% set	6,57%	5,06%	5,28%	5,43%	5,02%	4,97%	5,29%	5,36%	5,20%
	RB	1,43±0,45	1,42±0,27	1,37±0,16	1,28±0,18	1,44±0,24	1,26±0,17	1,51±0,31	1,24±0,16	1,27±0,12
	IC	0,42±0,07	0,42±0,04	0,42±0,03	0,44±0,03	0,41±0,04	0,44±0,03	0,40±0,05	0,45±0,03	0,44±0,02
	tipo	m	m	m	m	m	m	m	m	m
Par 12	% set	6,13%		4,60%	4,72%	4,21%	4,52%	4,83%	4,95%	5,01%
	RB	1,41±0,35		1,71±0,18	1,43±0,23	1,74±0,26	1,27±0,15	1,45±0,24	1,25±0,16	1,22±0,16
	IC	0,42±0,05		0,37±0,03	0,41±0,04	0,37±0,03	0,44±0,03	0,41±0,04	0,45±0,03	0,45±0,03
	tipo	m		sm	m	sm	m	m	m	m
Par 13	% set				1,44%		3,72%		4,39%	5,16%
	RB				∞		1,69±0,23		8,62±3,39	4,58±1,06
	IC				0,00		0,37±0,03		0,13±0,09	0,18±0,03
	tipo				t #		sm		t	st
Par 14	% set								4,30%	4,73%
	RB								1,52±0,29	1,27±0,18
	IC								0,40±0,05	0,44±0,03
	tipo								m	m
Par 15	% set								3,48%	4,54%
	RB								7,62±1,67	4,18±1,40
	IC								0,12±0,03	0,21±0,05
	tipo								t	st

Sphaenorhynchus Tschudi, 1838

Três das quatro espécies analisadas do gênero (*S. caramaschii*, *S. dorisae* e *S. lacteus*) apresentaram um cariótipo composto por 12 pares de cromossômicos com dois braços ($2n = 24$; $NF = 48$) (Figuras 3, 4 e 6). Já os espécimes de *S. carneus* apresentaram um cariótipo compostos de 26 cromossomos ($2n = 26$; $NF = 52$) (Figura 7). Em alguns espécimes de *S. dorisae* foram observados um ou dois cromossomos B; de morfologia telocêntrica e com heteropicnoses (-) (Figura 7). Nas diacineses dos espécimes com 2 B, os mesmos foram encontrados como univalentes, associados ou como bivalentes; não foi observada a acumulação destes cromossomos nas células em metáfase II meiótica (Figura 5). Nas espécies com $2n=24$ as CS e as NOR foram identificadas na região intersticial do braço longo do par 7. Entretanto, em *S. carneus* as NOR se localizaram na região pericentromérica do par 8 (Figura 7, em destaque).

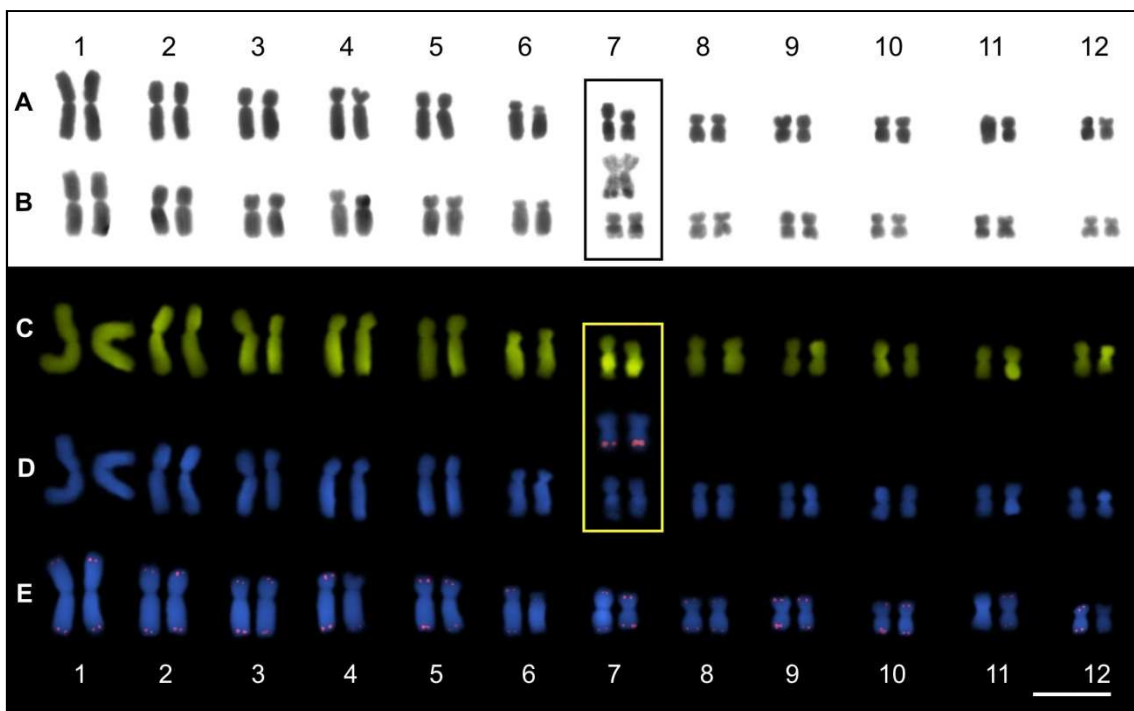


Figura 3. Cariótipos observados em *Sphaenorhynchus caramaschii*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandeamento C. (C-D) Padrão de coloração com CMA3/DAPI: apos desnaturação com $(OH)_2Ba$. (E) FISH com sondas teloméricas (ONCOR). Par portador da NOR em destaque. Barra = $10\mu m$.

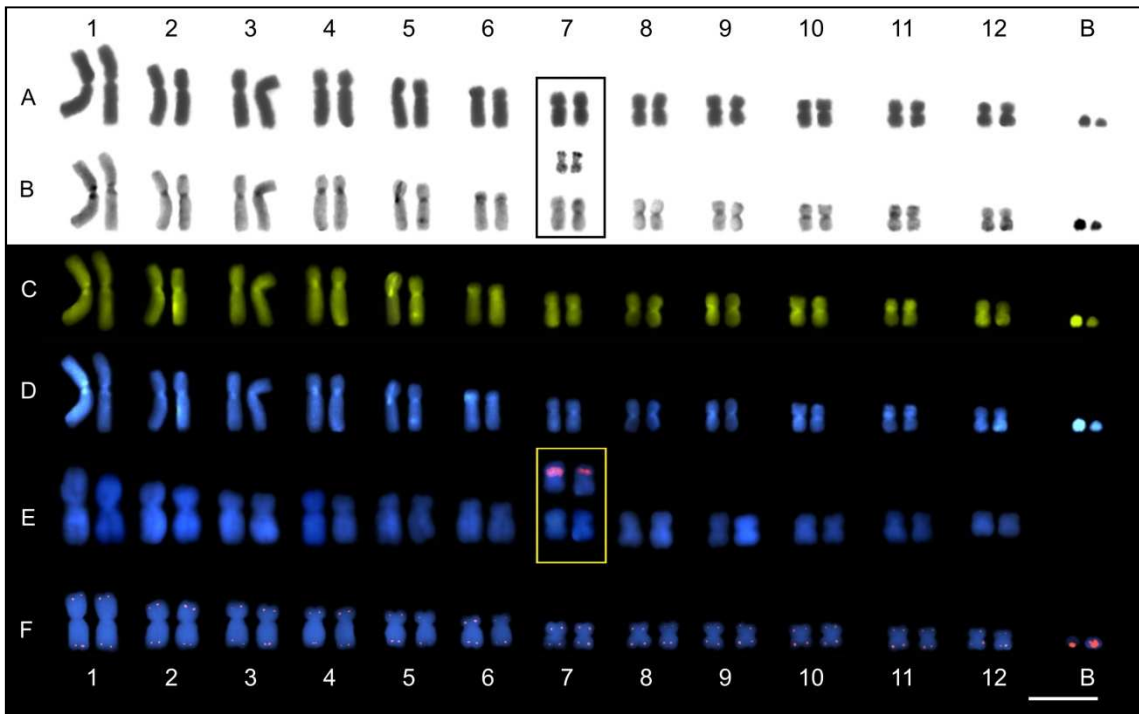


Figura 4. Cariótipos de *Sphaenorhynchus dorisae*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandejamento C. (C-D) Padrão de coloração com CMA3/DAPI após desnaturação com $(OH)_2Ba$. (E-F) FISH com sondas de DNA_{18S} e com sondas teloméricas (ONCOR). Par portador da NOR em destaque. Barra = 10 μm .

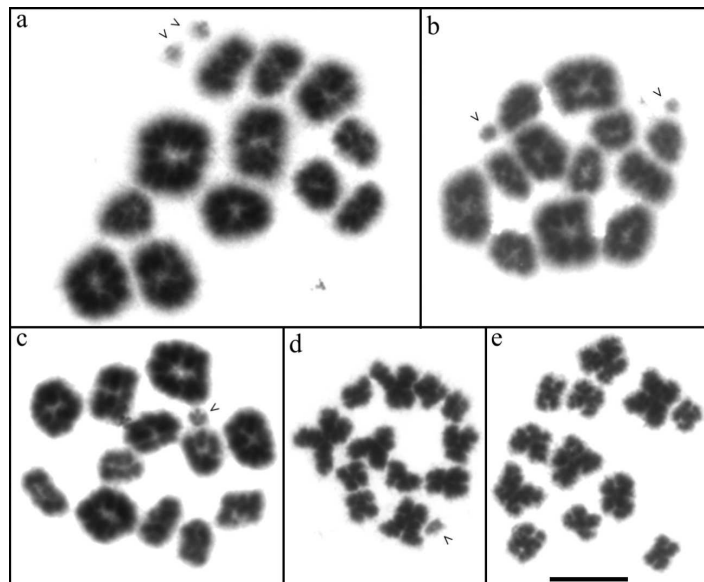


Figura 5. *Sphaenorhynchus dorisae*. Comportamento meiótico em indivíduos com dois cromossomos B em diascinesis [associação (a), univalentes (b) ou bivalentes (c)] e Metáfase II [1B (d); 0B (e)]. Barra = 10 μm .

O padrão de distribuição de heterocromatina mostrou interessantes diferenças entre as espécies analisadas. Em *S. caramaschii* apenas foi evidenciado um bloco de heterocromatina associado às NOR, o qual apresentou marcação CMA₃/DAPI (+) (rico em bases CG). Em *S. carneus* e *S. dorisae* a heterocromatina é predominantemente centromérica (Figura 4 e 7). Marcas adicionais foram observadas na região intersticial do braço curto do par 12 de *S. carneus* e no telômero do braço curto do par 11 de *S. dorisae*. Os cromossomos B desta última são completamente heterocromáticos. A coloração com fluorocromos caracterizou todas estas regiões como ricas em CG. Por outro lado, em *S. lacteus* foi detectado um rico padrão de distribuição de heterocromatina, com marcação em todos os centrômeros, marcas intersticiais nos braços curtos dos pares 5 e 12, e nos braços longos dos pares 2-3, 7, 10 e 12, e marcas teloméricas nos braços longos dos pares 2-8. A caracterização dos tipos de heterocromatina com fluorocromos identifica às regiões centroméricas e NOR como ricas em CG, e as marcações intersticiais e distais como regiões ricas em AT (Figura 8). Os experimentos de FISH com sondas teloméricas marcam as regiões distais de todos os pares cromossômicos em todas as espécies analisadas. Interessantemente, sinais em blocos ao longo do braço curto do par 2 foram observados em *S. lacteus* (Figura 6I). Por outro lado, os cromossomos B encontrados em *S. dorisae* apresentam na região distal intensos sinais de seqüências teloméricas (Figura 4F).

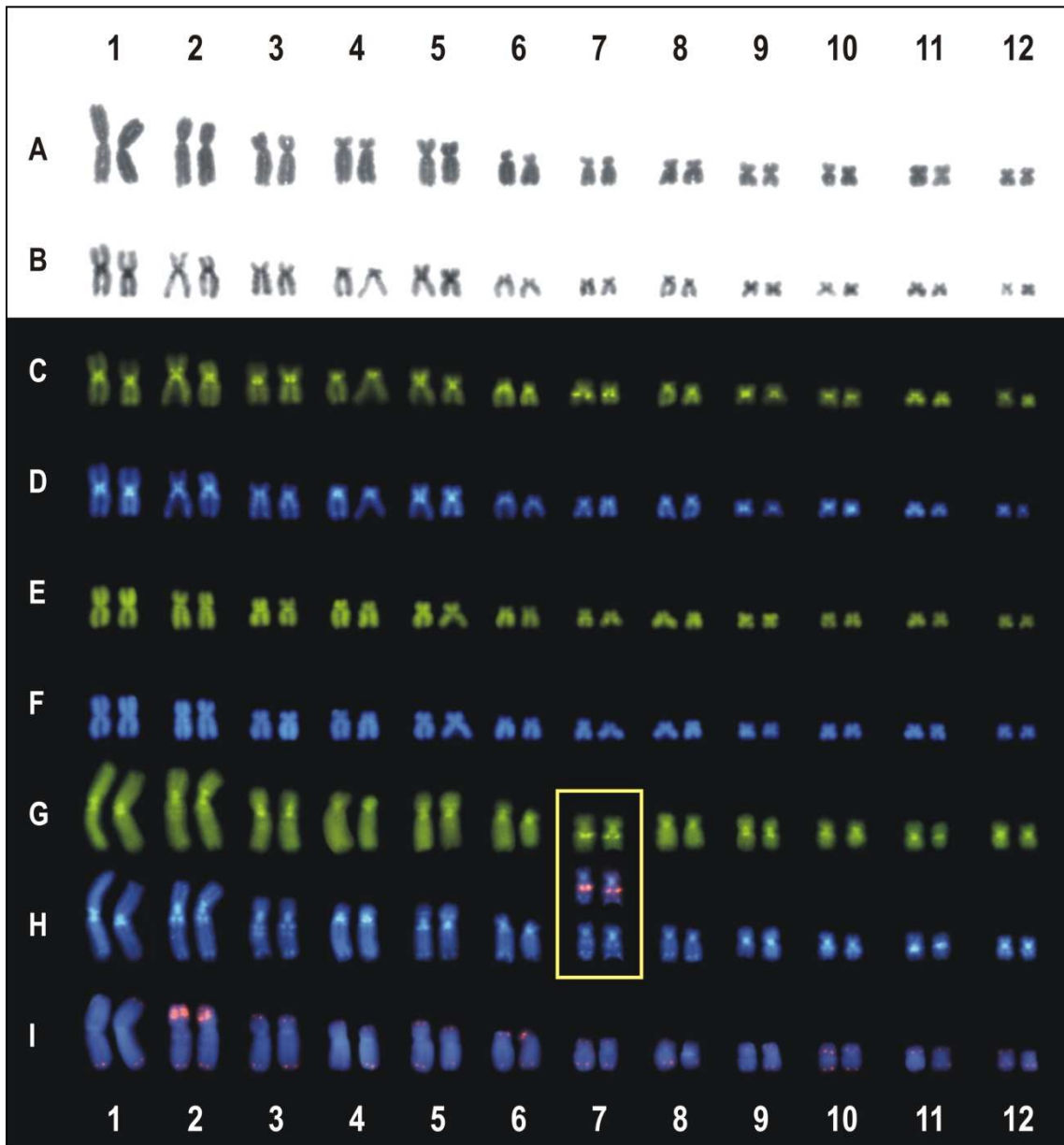


Figura 6. Cariótipos observados em *Sphaenorhynchus lacteus*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandeamento C. (C-H) Padrão de coloração com CMA3/DAPI: (C-D) após desnaturação com $(OH)_2Ba$, (E-F) sem pre-tratamento, e (G-H) após desnaturação com formamida em procedimentos de FISH. (I) FISH com sondas teloméricas (ONCOR). Par portador da NOR em destaque. Barra = 10µm.

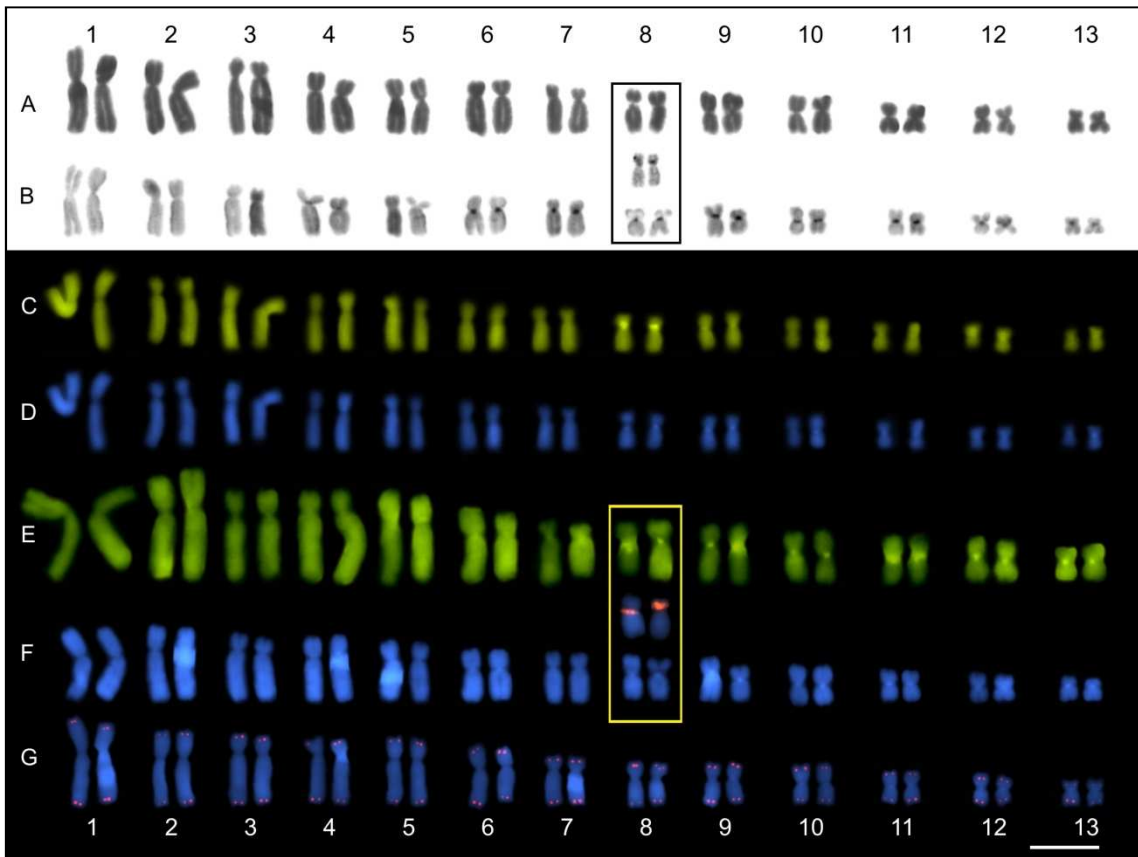


Figura 7. Cariótipos de *Sphaenorhynchus carneus*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandeamento C. (C-F) Padrão de coloração com CMA3/DAPI: (C-D) após desnaturação com $(OH)_2Ba$, e (E-F) após desnaturação com formamida. (G) FISH com sondas teloméricas (ONCOR). Par portador da NOR em destaque. Barra = 10 μm .

Xenohyla Izecksohn, 1998

Os espécimes analisados de *X. truncata* apresentaram um cariótipo composto por 24 cromossomos com dois braços (NF = 48) (Figura 8; Tabela 1). CS e NOR foram identificadas em posição distal no braço longo do par 7. A técnica do bandeamento C revelou heterocromatina em todas as regiões centroméricas. A caracterização com fluorocromos indicou que estas regiões são ricas em bases CG. Marcas adicionais DAPI (+) foram observadas no braço curto do par 11. Nos experimentos de FISH com sondas teloméricas apenas sinais distais em todos os braços cromossômicos foram observados.

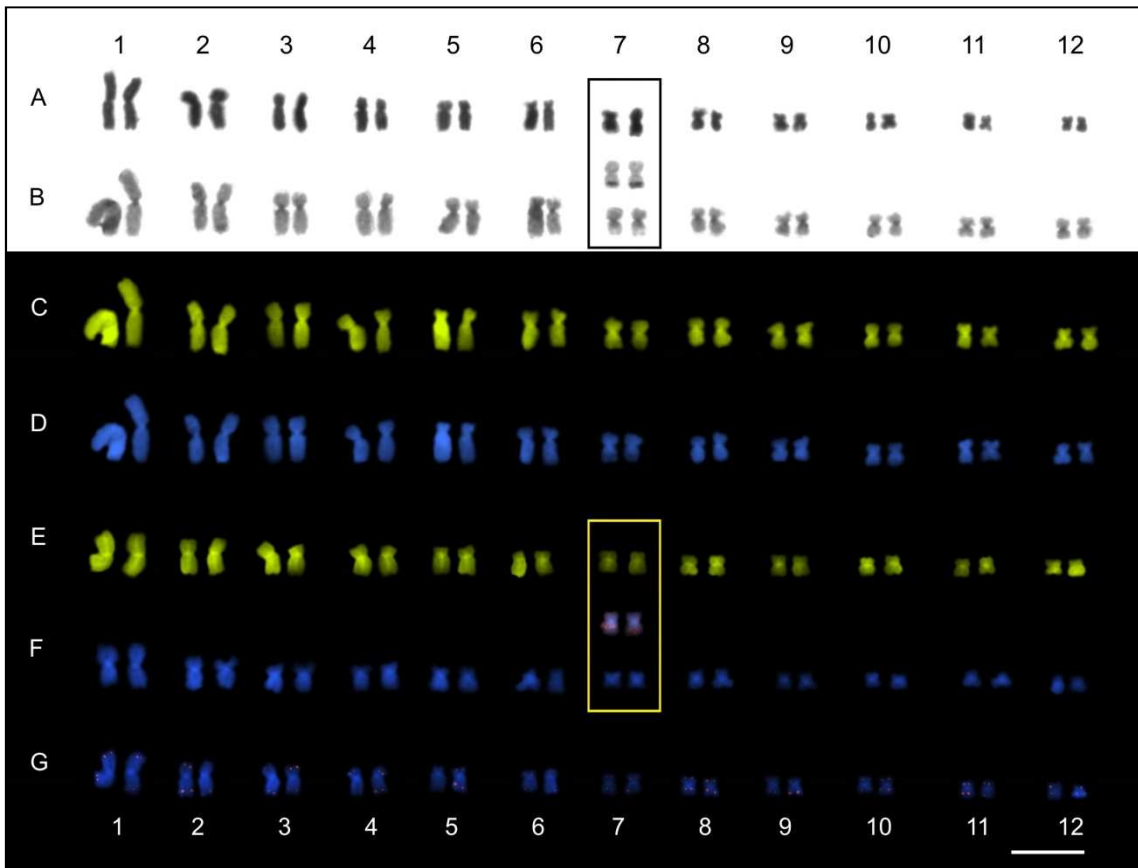


Figura 8. Cariótipos de *Xenohyla truncata*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandeamento C. (C-F) Padrão de coloração com CMA3/DAPI: (C-D) após desnaturação com $(OH)_2Ba$, e (E-F) após desnaturação com formamida. (G) FISH com sondas teloméricas (ONCOR). Par portador da NOR em destaque. Barra = 10 μm .

Dendropsophus Fitzinger, 1843

As duas espécies aqui analisadas, *D. marmoratus* e *D. melanargyreus*, apresentaram um cariótipo composto por 30 cromossomos ($2n = 30$, $NF = 50$) (Figuras 9 e 10). As diascineses meióticas nos espécimes machos apresentaram 15 bivalentes. Constrições secundárias (CS) localizaram-se no braço longo do par 9. A impregnação com $AgNO_3$ e experimentos com FISH indicam que as NORs são coincidentes com as CS (Figuras 9 e 10, em destaque). Ambas as espécies apresentaram heterocromatina

predominantemente centromérica, com bandas intersticiais adicionais em *D. marmoratus* (Figuras 9B e 10B). A caracterização da heterocromatina com os fluorocromos CMA3/DAPI ((+)/(+) e (+)/(-)) indicou que estas regiões são ricas em CG. Marcas de CMA3 não associadas a marcas do bandamento C foram observadas nas NOR em ambas as espécies. Os experimentos com sondas teloméricas localizaram as mesmas nas regiões distais em todos os pares cromossômicos.

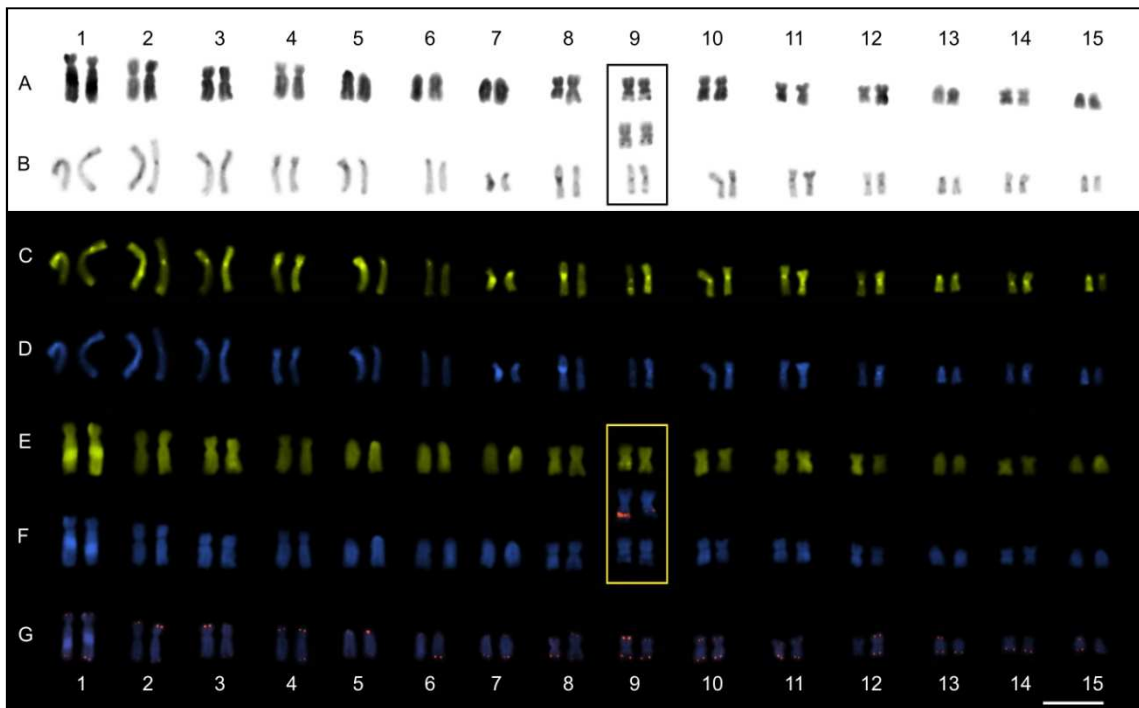


Figura 9. Cariótipos de *Dendropsophus marmoratus*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandamento C. (C-F) Padrão de coloração com CMA3/DAPI: (C-D) após desnaturação com $(OH)_2Ba$, e (E-F) após desnaturação com formamida. (G) FISH com sondas teloméricas (ONCOR). Par portador da NOR em destaque. Barra = 10 μm .

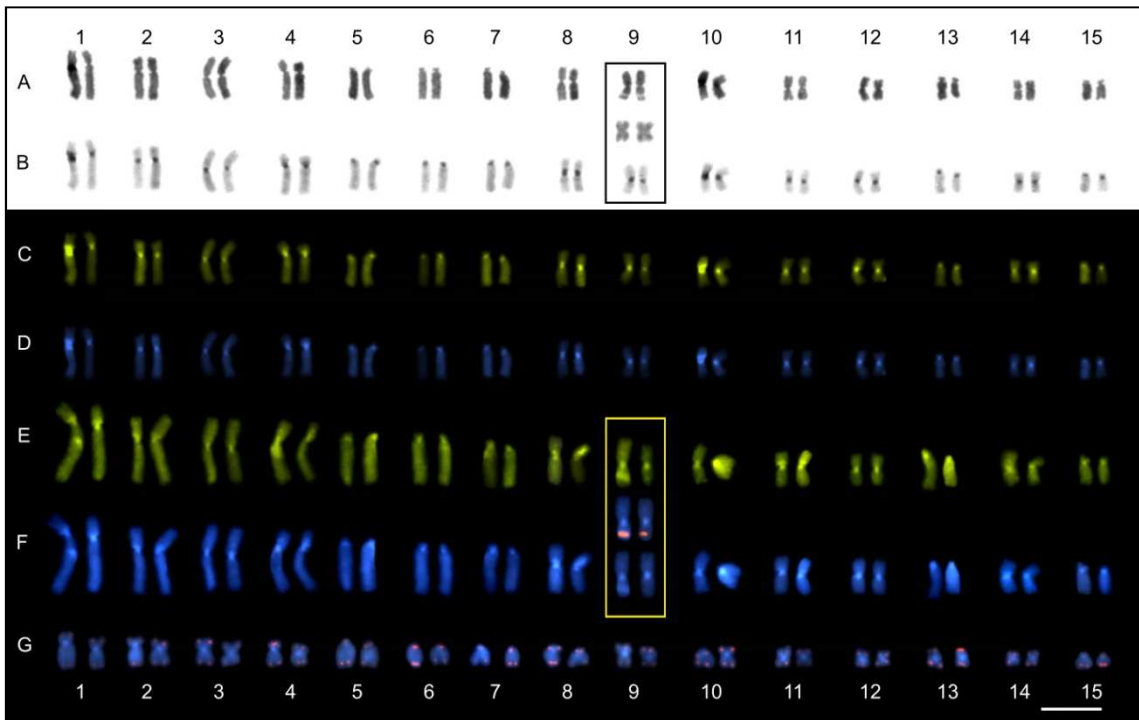


Figura 10. Cariótipos de *Dendropsophus melanargyreus*. (A) Coloração convencional; (B) Padrão de Bandeamento C. (C-F) Padrão de coloração com CMA3/DAPI: (C-D) após desnaturação com $(OH)_2Ba$, e (E-F) após desnaturação com formamida. (G) FISH com sondas teloméricas (ONCOR). Par portador da NOR em destaque. Barra = 10 μm .

DISCUSSÃO

Os dados citogenéticos registrados em todos os gêneros que compõem a Tribo Dendropsophini revelam uma grande diversidade cariotípica. Atualmente se conhecem dados citogenéticos de 66 das 218 espécies que compõem o grupo. A variação nos números diplóides vão desde $2n = 22$ em *Scarthyla goinorum* a $2n = 30$ nas espécies estudadas do gênero *Dendropsophus* (Bogart, 1973; Gruber *et al.* 2005; Nunes & Fagundes, 2008).

No gênero *Scinax*, 19 das mais de 90 espécies foram estudadas, a maioria delas apenas com técnicas convencionais (Barrio & Pistol de Rubel, 1970; Baldissera, *et al.*, 1993; Bogart, 1973; Duellman, 1967; Nunes & Fagundes, 2008; Pombal *et al.*, 1995; Rabello *et al.*, 1971). Os dados citogenéticos indicam um $2n = 24$, com cariótipos muito semelhantes entre as espécies estudadas. Embora análises filogenéticas que empregaram alguns caracteres citogenéticos evidenciaram a existência de diferenças cromossômicas discretas (morfologia do par 1 e posição da NOR) entre os principais ramos (*S. ruber* e *S. catharinae*) que agrupam as espécies do gênero *Scinax* (Faivovich, 2002), é necessário uma avaliação mais abrangente com técnicas de bandeamento cromossômico nas espécies que compõem este gênero.

De todas as espécies reconhecidas no gênero *Pseudis*, apenas *P. cardosoi* apresenta um número diplóide divergente de $2n = 24$, a origem do $2n = 28$ observado nesta espécie foi explicada por dois eventos de fissões cêntricas a partir de um cariótipo de 12 pares cromossômicos (Busin *et al.* 2001, 2008). A maioria das espécies apresenta as NOR no par 7. A posição em *P. cardosoi* no par 5 deve ser considerado homeólogo já que deve-se aos reordenamentos antes mencionados. Entretanto, a localização da NOR no par 6 observada em *P. caraya* é uma autapomorfia da mesma (Busin *et al.*,

2006). Localizações adicionais dos genes ribossômicos foram observadas em *P. bolivianus* (1q e 8q) e *P. caraya* (7q) (Busin *et al.* 2006). Os dados aqui apresentados mostraram que *Scarthyla goinorum* compartilha com a maioria das espécies de *Pseudis* a localização destas regiões no braço longo do par 7.

O bandeamento C nas espécies dos gêneros *Scarthyla* e *Pseudis* (exceto *P. laevis*) apresenta marcas céntricas em todos seus pares cromossômicos (Busin *et al.*, 2001, 2006, 2008). Marcas intersticiais e distais adicionais presentes nos pares cromossômicos maiores dos cariótipos das espécies de *Pseudis* apresentam uma distribuição coincidente com a hipótese filogenética levantada por Aguiar Jr *et al.* (2007). Segundo esses autores existem três grupos bem definidos. O ramo formado pelas espécies *P. minuta* + *P. cardosoi* apresentam um bloco heterocromático intersticial no braço 2p, não observado nas demais espécies (Busin *et al.*, 2001). Embora o ramo que contém às espécies antigamente alocadas no gênero *Lysapsus* (*P. laevis* + [*P. caraya* + [*P. limellum* + *P. bolivianus*]]) apresentam padrões com muitas marcas teloméricas e intersticiais, a marcação intersticial no braço 1p e terminal no braço 2p estão presentes apenas nestas espécies (Busin *et al.*, 2006). Finalmente o ramo que contém as espécies restantes ([*P. fusca* + *P. tocantins*] + [*P. bolbodactyla* + [*P. platensis* + *P. paradoxa*]]) apresenta um padrão que inclui, além das marcas centroméricas, bandas teloméricas nos pares 2q, 3q e 6p em todos seus integrantes (Busin *et al.*, 2008).

Outra particularidade citogenética observada no gênero *Pseudis* é a presença de um sistema cromossômico de determinação sexual de tipo ZZ/ZW em *P. tocantins* (Busin, *et al.*, 2008). Embora tenham sido relatados heteromorfismos de tamanho, relacionados a ampliações de seqüência ribossômicas ou da heterocromatina

associada, no mesmo par cromossômico em outras espécies do gênero, estas diferenças não se correlacionam ao sexo dos espécimes analisados (Busin *et al.*, 2001, 2006, 2008). Contudo, novas populações e amostras com proporções sexuais equitativas precisam ser avaliadas para corroborar esses dados.

O gênero *Sphaenorhynchus*, no qual se conhecem dados de cinco das 14 espécies descritas, apenas *S. carneus* ($2n = 26$) difere das demais espécies estudadas que apresentam um $2n = 24$ (Foresti, 1972). As origens destas diferenças de número diplóide não são evidentes a partir dos resultados obtidos com as técnicas aqui empregadas, por tanto, são necessárias técnicas mais resolutivas para identificar a origem das mesmas. De *S. planicola* se conhece apenas o cariótipo convencional, composto de 24 cromossomos de dois braços, não existindo dados sobre a localização das CS, NOR e o padrão de bandeamento C (Foresti, 1972). Similarmente ao observado nos gêneros *Scarthyla* e *Pseudis*, as espécies de *Sphaenorhynchus* com $2n = 24$ estudadas no presente trabalho também apresentam NOR localizadas no par 7 (7q em *S. caramaschii* e *S. lacteus*, e 7p em *S. dorisae*). Entretanto, em *S. carneus* esta região se localiza pericentromericamente no par 8q. A partir dos dados aqui apresentados é difícil determinar homeologias deste par em *S. carneus*, por tanto, resulta necessário estudos em mais espécies ou técnicas de maior poder de resolução, como pintura cromossômica, para poder compreender a origem desta diferença.

Os padrões de distribuição de heterocromatina observados apresentam grandes diferenças entre as espécies estudadas. Em *S. caramaschii* observou-se apenas um bloco de heterocromatina associado à NOR; em *S. carneus* marcas centricas nos pares 6-13; em *S. dorisae* marcas centricas em todos os cromossomos; e, finalmente, *S. lacteus* com um rico padrão que inclui marcas centricas em todos os cromossomos e marcas

intersticiais e/ou teloméricas em muitos deles. Embora a caracterização com os fluorocromos CMA3/DAPI nesta última espécie gera muita informação sobre os tipos e distribuição da heterocromatina, a pouca heterocromatina presente nos cariótipos das outras espécies estudadas impede uma análise comparativa profunda. Novos estudos nas demais espécies do gênero provavelmente fornecerão dados que permitam levantar hipóteses baseados nestes caracteres.

A presença de cromossomos supranumerários em *Dendropsophini* foi observada em uma das populações estudadas de *Dendropsophus nanus*, de morfologia telocêntrica e eucromático (Medeiros, *et al.*, 2006; Green, 2004). Os cromossomos B presentes em alguns espécimes de *S. dorisae* também apresentam uma morfologia telocêntrica, mas com um elevado grau de heterocromatinização (CMA3/DAPI +/+, rico em bases CG) e blocos distais de seqüências teloméricas (TTAGGG). Em ambos os casos, a origem destes cromossomos extras permanece desconhecida.

Os dados citogenéticos para o gênero *Xenohyla* indicam um complemento cromossômico composto de 12 pares de cromossomos de dois braços em espécimes de *X. truncata*, muito semelhante aos observados em espécies com cariótipos $2n = 24$ presentes na maioria das espécies estudadas dos gêneros *Sphaenorhynchus* e *Pseudis* (Busin *et al.*, 2001, 2006, 2008, Foresti, 1972). Similarmente, as NOR também se localizam no par 7.

No gênero *Dendropsophus* se conhecem dados citogenéticos de 26 das 91 espécies que atualmente o compõem (Anderson, 1991; Bogart, 1973; Duellman & Cole, 1965; Foresti, 1972; Gruber *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 1996; Medeiros, *et al.*, 2003, 2006; Rabello; 1970; Skuk & Langone, 1992). Apenas dois dos nove grupos de espécies nos quais estão distribuídas a maioria das espécies do gênero não possuem dados

citogenéticos publicados (Grupos de *D. columbianus* e *D. gargorensis*). Todos os dados disponíveis, junto aos dados aqui apresentados do grupo irmão (*Xenohyla*) apontam o $2n = 30$ como uma sinapomorfia de *Dendropsophus* (Faivovich, et al., 2005; Wiens, et al., 2005). Embora todas as espécies de *Dendropsophus* estudadas apresentem o mesmo número diplóide, existe uma grande variação em relação ao número de pares cromossômicos com morfologia telocêntrica, o qual implica variações nos NF de 50 (cinco pares telocêntricos) a 60 (apenas cromossomos de dois braços). Em cinco grupos de espécies foram observados cariótipos apresentando o mesmo NF. Cariótipos com cinco pares de cromossomos telocêntricos (NF = 50) foram observados nas espécies dos grupos *D. labialis* (*D. labialis*) e *D. marmoratus* (*D. marmoratus*, *D. melanargyreus* e *D. nahdereri*) (Bogart, 1973; Gruber et al., 2005). Na situação oposta, cariótipos compostos apenas de cromossomos de dois braços, foram observadas em espécies dos grupos *D. minimus* (*D. leali*) e *D. minutus* (*D. minutus*) (Bogart, 1973; Gruber et al., 2005; Rabello, 1970). No grupo *D. parviceps* as duas espécies estudadas (*D. parviceps* e *D. microps*) apresentaram quatro pares de cromossomos telocêntricos, com NF = 52 (Bogart, 1973; Gruber et al., 2005). Uma situação mais complexa é observada nos grupos *D. leucophyllatus* e *D. microcephalus*, que possuem o maior número de descrições cariotípicas. No primeiro deles, estudos citogenéticos revelaram complementos cromossômicos com NF = 52 em *D. elegans* (Gruber et al., 2005), NF=54 em *D. leucophyllatus* (Bogart, 1973; Foresti, 1972), e NF = 58 em *D. anceps* e *D. ebraccatus* (Bogart, 1973; Foresti, 1972; Kaiser et al., 1996). Finalmente, no grupo *D. microcephalus*, que reúne o maior número de espécies do gênero e o maior número de espécies com descrições cariotípicas, as variações no NF incluem variações tanto inter como intraespecíficas. Neste grupo as diferenças intraespecíficas foram registradas nas espécies *D. bipunctatus* (Bogart, 1973; Foresti, 1972) e *D. microcephalus*

(Anderson, 1991; Bogart, 1973; Kaiser *et al.*, 1996) que apresentam um NF = 58; *D. meridianus* (Bogart, 1973), *D. phlebodes* (Kaiser *et al.*, 1996) e *D. rhodopeplus* (Kaiser *et al.*, 1996) um NF = 56; *D. branneri* (Foresti, 1972; Skuk & Langone, 1992), *D. cruzi* (Gruber *et al.*, 2005), *D. decipiens* (Bogart, 1973; Foresti, 1972), *D. elianae* (Gruber *et al.*, 2005), *D. oliverai* (Foresti, 1972), e *D. rubicundulus* (Bogart, 1973; Gruber *et al.*, 2005) um NF = 54. Entretanto, em *D. berthaltutzae* foram registrados NF = 54 (Skuk & Langone, 1992) e NF = 52 (Gruber *et al.*, 2005) em diferentes populações. Finalmente, em *D. nanus* e *D. sanborni* foram descritos cariótipos com NF = 50 e 52 (Bogart, 1973; Gruber *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2003, 2006; Rabello; 1970; Skuk & Langone, 1992). Neste caso, prováveis identificações errôneas devidas às grandes semelhanças morfológicas entre ambas as espécies, somado ao fato de serem simpátricas em grande parte da sua distribuição (Langone & Basso, 1987), podem ser as origens de tais discrepâncias.

De acordo com a diversidade de NF observada nas espécies estudadas, as NOR em *Dendropsophus* também apresentam uma interessante diversidade em relação a número e localização. No grupo *D. marmoratus* estas regiões foram observadas no par 1 (*D. nahdereri*) e no par 9 (*D. marmoratus* e *D. melanargyreus*); no grupo *D. minutus* no par 13 (*D. minutus*); no grupo *D. parviceps* foram observadas no par 10 (*D. microps*); no grupo *D. leucophyllatus* nos pares 10 (*D. elegans* e *D. ebraccatus*) e 13 (*D. ebraccatus*); e, no grupo *D. microcephalus* no par 7 (*D. rubicundulus*), 11 (*D. elianae*), 12 (*D. sanborni*), 13 (*D. microcephalus*, *D. oliverai*, *D. phlebodes* e *D. nanus*), 14 (*D. cruzi*), e no par 15 (*D. berthaltutzae*) (Gruber *et al.*, 2005). Diferenças interpopulacionais nos pares 10 e 13 foram observadas em *D. ebraccatus* (Kaiser *et al.*, 1996). NOR múltiplas foram observadas em *D. elegans* (pares 10 e 14) e em *D. nanus* (pares 1, 5, 6, 12 e 14) (Gruber *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2003).

Embora um menor número de espécies tenha sido avaliado com técnicas de bandeamento C, os padrões de distribuição de heterocromatina apresentam uma menor diversidade, sendo predominantemente centromérica em todas as espécies estudadas (Gruber *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 1996). O emprego de fluorocromos base-específicos tem caracterizado estas regiões como ricas em bases CG (Kaiser *et al.*, 1996).

Considerando a excepcional variação cromossômica observada neste grupo, a formulação de hipóteses consistentes sobre os aspectos referentes à evolução cromossômica do grupo precisa do preenchimento de dois aspectos fundamentais: por um lado um maior número de táxons terminais precisam ser avaliados conjuntamente, e, por outro, técnicas que permitam identificar com maior precisão as homeologias cromossômicas, como pintura cromossômica, GISH (hibridização genômica *in situ*), entre outros. Isto permitirá ampliar nosso conhecimento sobre estas características genético-evolutivas dos cromossomos na diversificação do grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar Jr, O., M. Bacci Jr, A. P. Lima, D. C. Rossa-Feres, C. F. B. Haddad & S. M. Recco-Pimentel. 2007. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Cladistics*. 23:455-463.
- Anderson, K. 1991. Chromosome evolution in holartic *Hyla* treefrogs. In *Amphibian Cytogenetics and Evolution* (Green, D.M. & Sessions, S.K., eds). Academic press, San Diego, 299-331.
- Baldissera, F.A., P.S. Lopez de Oliveira & S. Kasahara. 1993. Cytogenetics of four brazilian *Hyla* species (Amphibia, Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Rev. Brasil. Genet.*, 16 (2): 335-345.
- Barrio & Pistol de Rubel, 1970. Características del cariotipo de los Pseudidos (Amphibia, Anura). *Physis*; 28: 505-510.
- Bogart, J. E. 1973. Evolution of anuran karyotypes, p. 329-349. *In: Evolutionary biology of the anurans. Contemporary research on major problems.* J. L. Vial (ed.). University of Missouri Press, Columbia, MO.
- Busin, C. S., G. V. Andrade, J. Bertoldo, M. L. D. Grande, M. Uetanabaro, and S. M. Recco-Pimentel. 2008. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genetica*.
- Busin, C. S., G. Vinciprova, and S. M. Recco-Pimentel. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica*. 110:131-141.

- Busin, C.S., A. Pimentel Lima, C. Peralta de Almeida Prado, C. Strümann, S. Sequeira Jr. & S.M. Recco-Pimentel. 2006. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus* and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). *Micron*, 37: 355-362.
- Dobigny, G., J.-F. Ducroz, T. J. Robinson, and V. Volobouev. 2004. Cytogenetics and Cladistics. *Systematic Biology*. 53:470-484.
- Duellman, W. E. 1967. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Systematic Zoology*. 16:38-43.
- . 1970. Hylid frogs of Middle America. Monographs of the Museum of Natural History, University of Kansas. 1-2:1-753.
- . 1982. A new species of small yellow *Hyla* from Peru (Anura: Hylidae). *Amphibia-Reptilia*. 3:153-160.
- Duellman, W.E., Cole, C.J. 1965. Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Systematic Zoology*. 14:139-143.
- Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18: 367–393.
- Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A. Garcia, D. R. Frost, J. A. Campbell, and W. C. Wheeler. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 294:1-240.

- Foresti, F. 1972. Aspectos cromosomicos da familia Hylidae (Amphibia- Anura). Tese apresentada a escola superior de agricultura “Luis de queiroz”, da universidad de Sao Paulo, 1-77.
- Frost, D. R. 2010. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D. R., T. Grant, J. Faivovich, R. Bain, A. Haas, C. F. B. Haddad, R. O. de Sá, A. Channing, M. Wilkinson, S. C. Donnellan, C. J. Raxworthy, J. A. Campbell, B. L. Blotto, P. Moler, R. C. Drewes, R. A. Nussbaum, J. D. Lynch, D. Green, and W. C. Wheeler. 2006. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 297:1-370.
- Green, D.M. 2004. Structure and evolution of B Chromosomes in amphibians: *Cytogenet. Genome Res.*, 106: 235-242.
- Green, D.M. & S.K. Sessions. 1991. *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Academic Press, San Diego, 1-456.
- Green, D.M. & S.K. Sessions. 2007. Karyology and Cytogenetics. In: Heatwole, H.; Tyler, M. *Amphibian Biology*. v.7. Australia: Surrey Beatty and Sons,. 2756-2841.
- Gruber, S. L., Haddad C. F. B., and S. Kasahara. 2005. Evaluating the karyotypic diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with $2n = 30$ chromosomes based on the analysis of ten species. *Folia biologica*. 51:68-75.

- Haddad, C. F. B., Pombal Jr., J.P., Batistic, R.F. 1994. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). *Journal of Herpetology*. 28:425-430.
- Howell, W.N., Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Kaiser, H., C. Mais, F. Bolanos, C. Steinlein, W. Feichtinger, M. Schmid. 1996. Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. *Genetica (Dordrecht)*. 98:95-102.
- Langone, J.A., Basso, N.G. 1987. Distribución geográfica y sinonimia de *Hyla nana* Boulenger, 1989 y de *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura: Hylidae) y observaciones sobre formas afines. *Com. Zool. Mus. Montevideo*, 11 (164): 1-17.
- Medeiros, L.R., Rossa-Feres, D.C., Recco-Pimentel, S.M. 2003. Chromosomal Differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) With a Description of NOR Polymorphism in *H. nana*. *Journal of Heredity*. 94:149–154.
- Medeiros, L.R., Rossa-Feres, D.C., Jim, J., Recco-Pimentel, S.M. 2006. B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). *Genetics and Molecular Biology*. 29:257-262.
- Menzies, J.I., Tippett, J. 1976. Chromosome numbers of Papuan hylid frogs and the karyotype of *Litoria infrafrenata* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology*. 10:167-173.

- Nunes, R.R.A., Fagundes, V. 2008. Cariótipo de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 23: 21-33.
- Pombal Jr, J. P., Jr., Haddad, C.F.B. 1992. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 52:217-229.
- Pombal Jr., J. P., Haddad, C. F. B., Kasahara, S. 1995. A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from Southeastern Brazil, with comments on the genus. *Journal of Herpetology*, 29: 1-6.
- Rabello, M. N. 1970. Chromosomal studies in Brazilian anurans. *Caryologia*, 23: 45-59.
- Rabello, M. N., Beçak, M.L., Beçak, W. 1971. Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. *Arquivos do Museu Nacional* 54:285-286.
- Reeves, A., Tear, J. 2000. MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>.
- Schmid, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361-388
- Skuk, G., Langone, J.A. 1992. Los cromosomas de cuatro especies del género *Hyla* (anura, Hylidae) con un número diploide de $2n = 30$. *Acta Zoologica Lilloana*, 41: 165-171.

Schweizer D, Ambros P.F. (1994): Chromosome banding. Em: *Methods in Molecular Biology*. Gosden JR, Ed. Humana Press, Totowa pp. 97-112.

Viegas-Pequignot, E. (1992): In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes. Em: *In situ Hybridization: Practical Approach* (Willman, D., ed.). Oxford University Press, IRL Press, England.

Wiens, J. J., Fetzner, J.W., Parkinson, C.L., Reeder, T.W. 2005. Hylid Frog Phylogeny and Sampling Strategies for Speciose Clades. *Systematic Biology*. 54:778 - 807.

Wiens, J.J., Graham, C.H., Moen, D.S., Smith, S.A., Reeder, T.W. 2006. Evolutionary and Ecological Causes of the Latitudinal Diversity Gradient in Hylid Frogs: Treefrog Trees Unearth the Roots of High Tropical Diversity. *The American Naturalist*. 168: 579–596.

Apêndice 1. Especimens analisados da Tribo Dendropsophini.

Dendropsophus marmoratus.— BRASIL: Pará: Município Juruti, Acampamento Barroso, PS 429, 437-8, 456; Platô Capiranga, PS 524-5; Igarapé Prudêncio, PS 586.

Dendropsophus melanargyreus.— BRASIL: Pará: Município Belém, Ilha de Cotijuba, PS 45, 47-8; Município Carajás, Serra Sul, PS 763.

Pseudis laevis.—BRASIL: Pará: Ilha de Marajo, Município Soure, Soure, PS 529, 532, 536, 542-4, 546-50.

Scarthyla goinorum.—BRASIL: Acre: Município Cruzeiro do Sul, Comunidade Praia Grande: PS 892, 895, 898.

Sphaenorhynchus caramaschii.—BRASIL: São Paulo: PS 925.

Sphaenorhynchus carneus.—BRASIL: Acre: Município Cruzeiro do Sul, Comunidade Praia Grande: PS 893, 897.

Sphaenorhynchus dorisae.—BRASIL: Acre: Município Cruzeiro do Sul, Comunidade Praia Grande: PS 891, 894, 896, 899.

Sphaenorhynchus lacteus.—BRASIL: Pará: Município Ananindeua, Conj. Levylândia, PS 753, 868; Município Santa Barbara, Santa Barbara, PS 40. Município Marabá, Marabá, PS 856, 859.

Xenohyla truncata.—BRASIL: Rio de Janeiro: Município Maricá, Restinga de Maricá: CFBH 23532-3, 24625.

CONSIDERAÇÕES FINAIS e CONCLUSÕES

De maneira geral, os dados cromossômicos levantados em cada um dos grupos abordados neste trabalho, apontam à existência de uma elevada diversidade cariotípica em cada um dos mesmos (*Leptodactylus*: $2n = 18-26$ e $NF = 36-48$; Lophiohylini: $2n = 22-28$ e $NF = 44-52$; e, Dendropsophini: $2n = 22-30$ e $NF = 44-60$). As técnicas citogenéticas empregadas foram concluintes em relação aos mecanismos responsáveis desta diversidade apenas em situações pontuais, todos eles decorrentes de eventos de fissões cromossômicas (*Pseudis cardosoi* e *Osteopilus brunneus*), seguidas em alguns casos de inversões pericêntricas (*Osteocephalus buckleyi* e *Osteopilus wilderi*). Porém, na maioria dos casos, as possíveis explicações sobre os mecanismos responsáveis pelas diferenças cromossômicas observadas e, conseqüentemente, o estabelecimento dos estados de caracter, ficaram limitadas pela falta concreta de evidências sobre homeologia cromossômica entre cariótipos com grandes diferenças morfológicas. Portanto, a formulação de hipóteses não especulativas sobre aspectos referentes à evolução cromossômica nestes grupos depende de um maior número de táxons terminais avaliados conjuntamente e/ou técnicas que permitam identificar com maior precisão as homeologias cromossômicas, como pintura cromossômica, GISH (hibridização genômica *in situ*), entre outros.

Capítulo I

- A presença de cromossomos telocêntricos é uma característica aparentemente compartilhada pela maioria das espécies do subgênero *Lithodytes*, sendo, *L. lineatus* a única espécie sem cromossomos telocêntricos. A origem destas diferenças permanece desconhecida.

- A maioria das espécies contidas no subgênero *Leptodactylus* apresentam uma constituição cariotípica muito semelhante ($2n = 22$; NF = 44), sendo que as diferenças cromossômicas mais conspícuas se referem à presença de cromossomos telocêntricos em algumas espécies do grupo *melanonotus* ($2n = 22$; NF = 36).
- Em *L. latinasus*, a morfologia subteloentrica do par 5 e a morfologia telocêntrica do par portador da NOR são possíveis autapomorfias da mesma. Entretanto, estudos citogenéticos em espécies próximas, como *L. caatingae*, são necessários para confirmar o estado destes caracteres.
- Em espécies do grupo *pentadactylus*, a localização da NOR no par 3 é uma possível autapomorfia de *L. rhodomystax*. Por outro lado, sua presença no par 2 parece ser uma provável sinapomorfia compartilhada por *L. siphax* e *L. laticeps*.
- Em *L. fuscus*, diferenças inter-populacionais relacionadas ao padrão de bandeamento C sugerem que uma série de espécies crípticas estariam agrupadas dentro deste táxon.

Capítulo II

- O $2n = 24$ (NF = 48) constitui a situação mais comum observada em Lophiohylini.
- Mais espécies do gênero *Osteocephalus* precisam ser analisadas com o intuito de corroborar se o rearranjo cromossômico identificado em *O. buckleyi* é uma autapomorfia da mesma ou uma característica compartilhada por outras espécies.
- Os dados inéditos aqui apresentados para o gênero *Phyllodytes*, considerado o grupo mais basal da tribo nas hipóteses filogenéticas disponíveis, apontam um $2n = 22$

em *P. edelmoi*. Esta característica poderia representar uma possível sinapomorfia do gênero, ou alternativamente, uma autapomorfia de *P. edelmoi*. Mais espécies do gênero precisam ser avaliadas para determinar o significado dos dados aqui apresentados.

- As NOR e as CS na maioria das espécies analisadas se localizam no par 11. Entretanto, em *P. edelmoi* e *Argentohyla siemersi pedersenii*, essas regiões localizam-se nos pares 2 e 5, respectivamente. Em *Argentohyla* a posição das NOR pode ser considerada uma autapomorfia. Entretanto, análises em mais espécies de *Phyllodytes* são necessárias para confirmar o estado deste carácter.

- As CS adicionais observadas em espécies de *Osteocephalus* e *Trachycephalus* não estão associadas a posições suplementares de genes ribossômicos. Entretanto, blocos heterocromáticos DAPI (+) foram associados às CS adicionais (sítios frágeis) em *Osteocephalus*, mas não em *Trachycephalus*.

- Na maioria das espécies analisadas, o padrão de bandeamento C apresenta escassa heterocromatina, freqüentemente restrita às regiões centroméricas. Apenas em *Osteocephalus* existem padrões de distribuição de heterocromatina diferenciais entre os táxons analisados.

Capítulo III

- Os dados citogenéticos registrados em todos os gêneros que compõem a Tribo Dendropsophini revelam uma elevada diversidade cariotípica. Variação nos números diplóides que vão desde $2n = 22$ *Scarthyta*; $2n = 24$ em *Scinax* e *Xenohyla*; $2n = 24, 24 +1-2B$ e 26 em *Sphaenorhynchus*; $2n = 24$ e 28 em *Pseudis*; e, $2n = 30$ em *Dendropsophus*.

- A descrição do cariótipo de *Xenohyla* (gênero irmão de *Dendropsophus*) com $2n = 24$, e a descrição de cariótipos de espécies do ramo mais basal de *Dendropsophus* (grupo *D. marmoratus*) sugere que o $2n = 30$ é uma sinapomorfia de *Dendropsophus*. No qual, a avaliação de caracteres cromossômicos relacionados ao número de pares telocêntricos e localização das NOR, num maior número de espécies poderá fornecer informações filogenéticas importantes no esclarecimento das relações entre os diversos grupos de espécies do gênero.

- A localização das regiões organizadoras dos nucléolos (NOR) no par 7 é uma característica compartilhada pelas espécies estudadas dos gêneros *Scarthyla* e *Xenohyla*, e pela maioria das espécies analisadas dos gêneros *Pseudis* e *Sphaenorhynchus*.

- O gênero *Sphaenorhynchus* apresenta uma interessante diversidade cromossômica, com padrões variáveis de distribuição de heterocromatina, presença de blocos intersticiais de seqüências teloméricas (par 2 de *S. lacteus*), diferenças de número diplóide ($2n = 24$ a $2n = 26$) e a presença de cromossomos B com seqüências teloméricas amplificadas. A inclusão de mais espécies de *Sphaenorhynchus* em estudos citogenéticos será de grande interesse para esclarecer as relações filogenéticas entre as espécies do gênero, assim como para identificar a origem das diferenças cromossômicas observadas.

- Análises populacionais sobre o comportamento dos cromossomos B encontrados em *S. dorisae* serão de grande interesse no intuito de determinar a dinâmica populacional destes elementos, assim como, fornecer indícios que possam ajudar no esclarecimento das origens dos mesmos.

ANEXO - METODOLOGIAS

PROCESSAMENTO CITOGENÉTICO DAS AMOSTRAS

Obtenção direta de cromossomos a partir de medula óssea

Os cromossomos foram obtidos pela técnica de Ford & Hamerton (1956), com modificações. Primeiramente, injetou-se intraperitonealmente colchicina 0,5% aquosa 0,1 mL x 5 g de peso do animal, por 2-4 horas antes da morte do mesmo. Após este período, o animal foi morto por sobre-dosagem de lidocaína (20 mg/mL) injetada intraperitonealmente. Utilizando material cirúrgico extraiu-se um fêmur, que foi colocado em uma placa de Petri contendo 5 mL de uma solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl, 0,075M). As epífises foram cortadas e a medula extraída por jatos da solução hipotônica. Uma vez que a medula óssea foi separada, esta foi colocada em um homogeneizador a fim de obter uma correta desagregação da mesma. Após a completa separação celular, incubou-se à temperatura ambiente por 50 minutos. Após o período de hipotonia foi acrescentado 1 mL de fixador *Carnoy* gelado (metanol e ácido acético glacial em proporção 3:1). Posteriormente, o material foi centrifugado a 1000 rpm por 7 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso com pipeta Pasteur em 5 mL de fixador (3:1). Este procedimento de fixação progressiva foi repetido mais duas vezes, sendo que na última vez, após desprezar o sobrenadante, acrescentou-se uma pequena quantidade de fixador (3:1) para que a suspensão celular apresentasse uma concentração adequada.

Preparação de cromossomos mitóticos de intestino

O protocolo usado nesta técnica é o proposto por Schmid (1978), com

modificações. Do espécime previamente colchicinizado (vide método para obtenção direta de cromossomos) extraiu-se o intestino e abriu-se o mesmo em placa de Petri, lavando-o em água destilada. Posteriormente, colocou-se em uma placa de Petri contendo solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl, 0,075M) por 40 minutos, após o que transferiu-se para eppendorff contendo fixador Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético glacial). Após duas lavagens com fixador, o material foi preservado a -8°C.

Preparação de cromossomos meióticos

A técnica descrita na continuação segue basicamente a metodologia proposta por Balsissera-Jr *et al.* (1993). Após a morte induzida do animal (vide método obtenção direta de cromossomos) ambos os testículos foram retirados e colocados em uma placa de Petri contendo solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl) 0,06 M. Posteriormente, realizam-se vários cortes com tesoura a fim de dispersar o conteúdo interno do órgão na solução, após o que o material foi colocado em um homogeneizador de vidro para obter uma suspensão celular homogênea. Finalmente, após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, procedeu-se segundo o protocolo descrito na preparação direta de medula óssea, com fixação progressiva.

TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

Preparação citológica de lâminas

As lâminas foram vigorosamente lavadas com solução de detergente Extran 2% e mantidas refrigeradas na geladeira em uma solução de álcool etílico e éter etílico (em proporção 1:1). Visando obter uma distensão cromossômica ótima na superfície da lâmina, foram usados diversos métodos de preparação, dependendo do grau de

hipotonia alcançado na preparação das suspensões celulares, o tamanho cromossômico e o número diplóide da espécie. Gotejo em frio, quente, em metanol, em ácido acético são algumas das metodologias utilizadas.

Em cada uma das técnicas a suspensão celular foi gotejada uma ou várias vezes por cada lâmina, dependendo do índice mitótico da suspensão celular. As lâminas foram devidamente identificadas, guardadas em caixas plásticas apropriadas, e mantidas em refrigerador até o procedimento de análise.

Para a preparação de lâminas citológicas a partir de intestinos o procedimento incluiu a desagregação de um minúsculo fragmento de tecido em ácido acético 50% durante 5 minutos. Após este período, uma gota do material foi desejada sobre lâminas limpas a 60°C, sendo dispersa na lâmina com a ajuda de um bastão de vidro. Deixou-se secar e repetiu-se a operação 3 a 4 vezes.

Coloração convencional por GIEMSA

A fim de realizar a análise convencional das células em divisão celular mitótica e meiótica, as lâminas com o material fixado e devidamente identificado foram colocadas sobre um suporte e coradas com uma solução de Giemsa a 5 % (Merck) diluída em tampão fosfato (10,6794 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 8,1654 g de KH_2PO_4 para 1 litro de água destilada, pH 6,8), por 5-8 minutos. Depois de transcorrido o tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente.

Técnicas de Bandeamento C

A detecção da heterocromatina constitutiva dos cromossomos foi realizada seguindo a técnica proposta por Sumner (1972), com modificações.

Lâminas com o material citológico fixado foram envelhecidas em estufa a 37 °C, durante 48 horas. Após o envelhecimento, tratou-se a lâmina em Ácido Clorídrico (HCl) 0,2 N a temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida lavou-se com água destilada e deixou-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente, incubou-se a lâmina em solução aquosa de Hidróxido de Bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$, 5% filtrada), a uma temperatura de 60 °C em Banho Maria, durante 40 a 60 segundos. A seguir, imergiu-se imediatamente em HCl 0,2 N para interromper a ação da solução de Hidróxido de Bário e lavou-se com água destilada. Incubou-se a lâmina em solução salina 2 x SSC à temperatura de 60 °C durante 30 minutos, em seguida lavou-se em água destilada e deixou-se secar à temperatura ambiente. Finalmente, corou-se com solução de Wright diluído em tampão fosfato pH 6,8 na proporção de 3 mL de tampão e 1 mL de solução de Wright, por 10 a 15 minutos.

Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR)

Para possibilitar a detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) foi utilizada a técnica de impregnação pelo Nitrato de Prata, segundo a técnica descrita por Howell & Black (1980), com modificações. Primeiramente, colocou-se sobre a lâmina duas gotas de solução aquosa de gelatina 2% e uma gota de solução aquosa de Nitrato de Prata (AgNO_3 50 %, pH 3,5) sobre as de gelatina, cobriu-se com lamínula 24 x 50 mm. Após uma incubação de 5 a 8 minutos em banho-maria a 60 °C em câmara escura

úmida lavou-se a lâmina com jatos de água de forma a remover a lamínula e todo o excesso dos reagentes. Deixou-se secar à temperatura ambiente. Nos casos em que o contraste dos cromossomos não foi ótimo, procedeu-se à coloração das lâminas em Giemsa 2 %, diluído em tampão fosfato pH 6,8 durante 5 a 10 segundos.

Técnica de coloração pelo fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃)

Na detecção de regiões ricas em pares de base GC utilizou-se a técnica proposta por Schweizer (1980) e Donlon & Magenis (1983), com modificações. Primeiramente, despejou-se 50 µL de solução de Cromomicina A₃ (CMA₃) 0,5 mg/mL sobre uma lâmina citologicamente preparada, cobrindo-se posteriormente com lamínula de plástico 24 x 50 mm. A lâmina assim montada foi mantida em câmara escura. Posteriormente, incubou-se o material em estufa 37 °C durante 30-45 minutos. Em seguida, lavou-se a lâmina com jatos de tampão McIlvaine pH 5,6 para remover a lamínula e retirar o excesso de fluorocromos. Deixou-se secar, dentro de câmara escura, à temperatura ambiente, após do qual imergiu-se a lâmina seca em um borel para lâminas contendo solução de Verde Metil, deixando-se corar por 15-20 minutos. Após a incubação foram feitas as mesmas lavagens que na primeira incubação. Montou-se a lâmina com 50 µL de solução de *antifade*, cobrindo posteriormente com lamínula de vidro 24 x 50 mm. Antes da visualização no microscópio de fluorescência, o material foi mantido em câmara escura a temperatura 2-8°C durante 1 semana para a estabilização da CMA₃.

Técnica de coloração pelo fluorocromo DAPI (4'6-Diamidino-2-fenil-indol)

A fim de realizar a detecção de regiões ricas em pares de base AT utilizou-se a técnica proposta por Schweizer *et al.* (1978) e Schweizer (1980), com modificações.

Primeiramente, imergiu-se a lâmina contendo a preparação cromossômica em borel contendo solução aquosa de DAPI (tampão McIlvaine pH 5,6 em concentração 1×10^{-4} mg/ml), deixando-se agir por 40 minutos 37°C . Posteriormente, retirou-se a lâmina e deixando-a secar em câmara escura, sem lavar. Colocou-se 50 μL de Antifade Vectashield H-1000 (Vector), cobrindo-se em seguida com uma lamínula de vidro 20 x 50 mm. Após retirar o excesso de antifade observou-se ao microscópio em seguida.

Técnica de coloração dupla DAPI/CMA3

Para a coloração simultânea de regiões ricas em AT e CG foi empregado o protocolo proposto por Schweizer & Ambros (1994), como modificações. Primeiramente, despejou-se 50 μL de solução de CMA₃ (0,5mg/mL diluído em tampão *McIlvaine* pH=7) sobre uma lâmina com material citológico. Cobriu-se com lamínula de plástico 24 x 32 mm, incubou-se em câmara úmida escura a 37°C durante 30-45 minutos. Após incubação, lavou-se a lamina com jatos de tampão *McIlvaine* (pH=5,6) e, em seguida, com jatos de água destilada. Deixou-se secar a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, montou-se a lamina com 20 μl de meio de montagem Vectashield/DAPI (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A lâmina assim montada foi analisada no microscópio de fluorescência com os filtros adequados para estes fluorocromos.

Técnica de hibridização *in situ* (FISH)

Foram realizados experimentos de hibridização simples e dupla, combinando-se sondas marcadas com biotina e detectadas com Avidina conjugada com Cy3 ou sondas marcadas com digoxigenina e detectadas com degoxigenina conjugada com

Fluoresceína. A contra-coloração foi feita com DAPI (4'6-Diamidino-2-fenil-indol). O procedimento, independentemente da sonda utilizada, foi realizado de acordo com o protocolo descrito abaixo (Viegas-Pequignot, 1992).

1.- **Preparação da lâmina:** foram usadas lâminas rigorosamente limpas, estocadas em éter-etanol 1:1. Secou-se a lâmina com um papel macio e limpo. Neste momento, pingou-se o material sobre a lâmina, deixando-se secar. Posteriormente, foi feita a desidratação da lâmina em uma série de etanol (2x (70%), 2x (90%) por 2 minutos cada, 1x (100%) por 4 minutos). Deixou-se posteriormente envelhecer em estufa a 60° C por 1 h, ou a 37° C por 24 h.

2.- **Desnaturação dos cromossomos:** mergulhou-se a lâmina em solução de desnaturação (Formamida Merck 70% em 2xSSC) a 62° C durante 60 segundos. Esta lâmina foi imediatamente transferida para uma cubeta de Etanol 70% gelado por 4 minutos. Finalmente, passou-se em série de etanol (1x (70%), 2x (90%) por 2 minutos cada, 1x (100%) por 4 minutos).

3.- **Preparação das Sondas (Mistura de hibridização):** misturou-se em um tubo 13 µl de solução de hibridização + 2 µl da sonda empregada, com concentração de 100ng/µl. Em seguida, agitou-se rapidamente no vortex e deixou-se flutuar em banho Maria a 70° C por 15 minutos para desnaturar a sonda.

4.- **Hibridização:** pingou-se os 15 µl da mistura de hibridização sobre a lâmina, estourando as bolhas e cobrindo com lamínula (24x24mm) rigorosamente limpa. Selou-se a lamínula com cola de tubo pvc (Cola Vinil – Brascola). Por último, incubou-se em câmara escura a 37° C por 48-72h.

5.- **Lavagens de estringência:** retirou-se a lamínula e incubou-se a lâmina em

solução de Formamida 50% em 2xSSC a 42°C por 5 minutos, duas vezes. Posteriormente, incubou-se em 2xSSC a 42° C por 5 minutos, duas vezes. Finalmente, incubou-se em Tween 20, 0,2% em 4xSSC (Tween/4xSSC) a 42°C por 4 minutos, sem deixar a lâmina secar em nenhuma das etapas de lavagem e detecção.

6.- Detecção (Marcação direta): incubou-se a lâmina em solução de DAPI (70µg/ml em Tween/4xSSC) a 37° C por 6 minutos. Transcorrido este período, escoou-se o excesso de DAPI e sem deixar secar, pingou-se um gota de anti-fading Vectashield. Cobriu-se finalmente com lamínula 24x50mm, pressionando com papel absorvente para retirar o excesso de líquido. Analisou-se a preparação ao microscópio de epifluorescência.

7.- Detecção (Hibridização Indireta): pingou-se sobre a lâmina a solução de detecção (0,4 µl de Avidina-Cy3 + 200 µl de Tween/4xSSC). Em seguida, cobriu-se com lamínula de plástico e incubou-se a 37° C por 30 minutos. Posteriormente, retirou-se a lamínula e foram realizados 3 lavagens com Tween/4xSSC, 4 minutos em cada. Deste ponto em diante, seguiu-se como descrito na Hibridização direta.

ANÁLISE DAS PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As análises das preparações citológicas convencionais (Giemsa, Banda C e marcação Ag-NOR) foram realizadas em microscópio óptico Zeiss Axiostar utilizando a objetiva de imersão de 100 vezes de aumento e ocular com 10 vezes de aumento, com uma ampliação final de 1000 vezes. As melhores metáfases foram marcadas em lâmina branca, para posterior localização das mesmas. A determinação do número diplóide de cada exemplar da amostra foi realizada analisando os números modais das 10 melhores metáfases marcadas.

Captura e análise de imagens de preparações fluorescentes

As lâminas com preparações devidamente coradas pelas técnicas de coloração com fluorocromos foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot II, com objetiva de aumento de 100 vezes, ocular com aumento de 10 vezes. Foram utilizados filtros específicos dependendo do fluorocromo a ser analisado, sendo usados, por exemplo, os filtros Zeiss BP 436, FT 460 e LP 470 nas preparações marcadas com CMA₃ e Zeiss G 365, FT 395 e LP 420 para observação das lâminas coradas com DAPI.

As imagens de FISH foram digitalizadas, diretamente, por uma câmera CCD AxioCam MRm (Zeiss) acoplada ao microscópio de Epifluorescência Axiophot 2 (Zeiss) conectado a um computador Intel Pentium IV 1700MHz com Sistema Operacional Windows 2000 e 523MB de memória RAM. O processo de captura foi intermediado pelo programa Axiovision 3.1 (Zeiss). As imagens foram capturadas em preto e branco e posteriormente pseudocoloridas pelo programa, de acordo com as cores correspondentes aos fluorocromos utilizados. Nos experimentos de FISH que envolveram vários fluorocromos foram tomadas tantas imagens como fluorocromos usados, cada uma com um jogo de filtros específico.

As imagens formadas no computador são compostas de 3 canais (azul, vermelho e verde). Quando os canais são sobrepostos é possível ter uma visão simultânea do padrão de hibridização gerado pelas duas sondas. Após a composição, as imagens foram armazenadas no formato ZVI, que é a extensão padrão do software Axiovision. Como estes arquivos não podem ser lidos por outros programas de edição de imagens, todas as imagens armazenadas foram convertidas para edição no formato TIFF.

ANALISES DOS CARIÓTIPOS

Para um melhor aproveitamento dos dados, as fotografias foram editadas nos programas Corel Photo-Paint 11 e Adobe Photoshop CS3. No intuito de organizar o cariótipo dos espécimes analisados, os cromossomos foram organizados dispostos em pares (prováveis homólogos) de acordo com a aparente morfologia cromossômica (metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e telocêntricos) e colocados em ordem decrescente de tamanho.

Para a caracterização morfométrica dos cromossomos, foi utilizado o programa Micromasure v3.3 software (Reeves & Tear, 2000). Os pares cromossômicos foram organizados em ordem decrescente de tamanho e classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) ou acrocêntricos segundo a nomenclatura proposta por Green & Sessions (1991, 2007). Para isto, foram calculados o comprimento relativo (CR), índice centromérico (IC) e relação de braços (RB) (Tabela 1). O termo homeologia foi utilizado para designar homologia entre cromossomos de diferentes espécies que descendem de um cromossomo ancestral comum (Huskins, 1932). O ordenamento por tamanho decrescente foi alterado em algumas espécies de forma de maximizar um arranjo que leve em consideração o máximo de homeologia possível entre os pares cromossômicos de cada espécie. Tamanho, morfologia e presença de marcadores cromossômicos (NORs, blocos heterocromáticos, etc) foram determinantes no ordenamento dos pares.

Em cada espécime a análise morfométrica foi realizada a partir de 10 metáfases ótimas. As medições e cálculos destes caracteres são:

- 1 Comprimento de braço curto (p) e longo (q).
- 2 Comprimento total de cada cromossomo (c), onde $c = p + q$.

- 3 Comprimento total do complemento cromossômico (C).
- 4 Índice centromérico (IC), onde $IC = p / c$.
- 5 Relação de braços (RB), onde $RB = q / p$.

Os tamanhos cromossômicos relativos e a morfologia de cada um dos pares cromossômicos levaram em consideração as médias de cada uma das medidas tomadas, abrangendo a todas as células analisadas de todos os exemplares da espécie em consideração, sempre que apresentam um mesmo cariótipo.

Tabela 1. Tipos cromossômicos de acordo com a posição centromérica, de acordo com Green & Sessions (1991, 2007).

Relação de Braços	Índice Centromérico	Classificação Cromossômica
1,00 – 1,67	0,500 – 0,375	Metacêntrico (m)
1,68 – 3,00	0,374 – 0,250	Submetacêntrico (sm)
3,01 – 7,00	0,249 – 0,125	Subtelocêntrico (st)
7,01 – ∞	0,124 – 0,000	Telocêntrico (t)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ANEXO

- Baldissera Jr, F.A., Oliveira, P.S.L., Kasahara, S. (1993): Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia- Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Rev. Bras. Genet.* 16: 335-345.
- Donlon, T.A., Magenis, R.E. (1983): Methyl green is a substitute for distamycin A in the formation of distamycin A/DAPI C-bands. *Hum. Genet.* 65:144-146.
- Ford, C., Hamerton, J. (1956): A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain. Technology* 31: 247-251.
- Green, D.M., Sessions, S.K. (1991): Nomenclature for chromosomes, pp. 431-432. Em: *Amphibian Cytogenetics and Evolution* D. M. Green and S. K. Sessions (Eds):. Academic Press, San Diego.
- Green, D.M., Sessions, S.K. (2007): Karyology and Cytogenetics, pp. 2756-2841. Em: *Amphibian Biology*. vol.7. H. Heatwole and M. Tyler (eds). Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton.
- Howell, W.M., Black, D.A. (1980): Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Huskins, C. L. (1932): A cytological study of Vilmorin's unfixable dwarf wheat. *Journal of Genetics* 25:113-124.
- Reeves, A., Tear, J. (2000): Micromesure version 3.3. Disponível em <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>.
- Schmid, M. (1978): Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388.

- Schweizer, D. (1980): Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI Bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 27: 190-193.
- Schweizer, D., Ambros, P., Andrie, M. (1978): Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. *Experimental Cell Research* 111: 327-332.
- Schweizer D, Ambros P.F. (1994): Chromosome banding. Em: *Methods in Molecular Biology*. Gosden JR, Ed. Humana Press, Totowa pp. 97-112.
- Sumner, A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75:304-306.
- Viegas-Pequignot, E. (1992): *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. Em: *In situ* Hybridization: Practical Approach (Willman, D., ed.). Oxford University Press, IRL Press, England.