

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Yeda Rumi Serra Douglas Quinderé

**“Citogenética de populações e espécies de *Physalaemus*
do grupo "cuvieri" (Anura, Leiuperidae)”**

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
Título de Mestre em Biologia
Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço

Co-Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Q43c	Quinderé, Yeda Rumi Serra Douglas Citogenética de populações e espécies de <i>Physalaemus</i> do grupo "cuvieri" (Anura, Leiuperidae) / Yeda Rumi Serra Douglas Quinderé. – Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientadores: Luciana Bolsoni Lourenço, Shirlei Maria Recco-Pimentel. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Citogenética. 2. Cromossomos. 3. Anura. 4. Região organizadora do nucléolo. 5. <i>Physalaemus</i>. I. Lourenço, Luciana Bolsoni. II. Recco-Pimentel, Shirlei Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
	(rcdt/ib)

Título em inglês: Cytogenetics of populations and species of *Physalaemus cuvieri* group (Anura, Leiuperidae).

Palavras-chave em inglês: Cytogenetics; Chromosomes; Anura; Nucleolus organizer region; *Physalaemus*.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Luciana Bolsoni Lourenço, Ana Paula Zampieri Silva de Pietri, Cynthia Eralta de Almeida Prado.

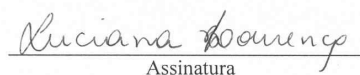
Data da defesa: 30/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

✓ Campinas, 30 de março de 2007.

BANCA EXAMINADORA

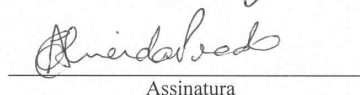
Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri


Assinatura

Profa. Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado


Assinatura

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Assinatura

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior

Assinatura

Quem me dera que eu fosse o pó da estrada
E que os pés dos pobres me estivessem pisando...

Quem me dera que eu fosse os rios que correm
E que as lavadeiras estivessem à minha beira...

Quem me dera que eu fosse os choupos à margem do rio
E tivesse só o céu por cima e a água por baixo...

Quem me dera que eu fosse o burro do moleiro
E que ele me batesse e me estimasse...

Antes isso que ser o que atravessa a vida
Olhando para trás de si e tendo pena...

Fernando Pessoa

**Dedico o meu trabalho à Profa.
Luciana B. Lourenço, à Profa.
Shirlei M. Recco-Pimentel, aos
meus pais, irmão, avós, ao meu
namorado Bread e sua família.**

Agradecimentos

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel por ter me dado a primeira oportunidade como aluna de iniciação científica, por ter acreditado em mim e no meu trabalho, e pela minha formação e meu conhecimento. Sou muito grata à Professora por ser uma pessoa maravilhosa, sempre atenciosa e dedicada aos seus alunos. Agradeço também pelos conselhos muito valiosos que sempre me fizeram olhar a vida de uma maneira diferente.

À minha atual orientadora Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, agradeço muitíssimo pela grande oportunidade profissional, por acreditar na minha capacidade e por ter me aceitado como sua aluna. Agradeço por todo aprendizado e pela atenção sempre que possível. Agradeço a Deus por você existir, você é o espelho que quero sempre me refletir como pessoa e profissional. Aprendi que respeito e reconhecimento devem ser conquistados e não exigidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pelo apoio financeiro.

Agradeço às pessoas que participaram das coletas dos exemplares para que o trabalho fosse realizado.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Paula Zampieri de Pietri e Silva, à Profa. Dra. Ana Cristina Veiga-Menoncello e à Profa. Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado, pela análise prévia da minha tese de mestrado.

A todos os autores que participaram dos artigos resultantes dessa tese, Profa Dra. Gilda V. de Andrade, Prof. Diego Baldo, Cristian Tomatis, Janaína Ferreira Lima e Stenio Vittorazzi.

Agradeço aos professores do Depto. Biologia Celular pela minha formação, e pela paciência durante as disciplinas.

Agradeço a todos os funcionários do Depto. Biologia Celular e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, em especial à secretária Lílíam Panagio pela incrível paciência e compreensão, e pela sua imensa eficiência.

Gostaria de agradecer à técnica do laboratório da Profa. Shirlei, Ms. Klélia A. Carvalho, por ter me ensinado desde o início a parte do desenvolvimento prático do trabalho. Com certeza é uma pessoa muito importante na minha vida tanto pessoal quanto profissional. Obrigada pela amizade, dedicação e conselhos em todos os momentos.

À ótima convivência com as pessoas que trabalham no laboratório, Thiago, Mônica, Fernanda e Cintia. Agradeço em especial a outras pessoas do laboratório, Gisele Introíni (Gi), Ana Cristina P. Veiga-Menoncello (Aninha), Eduardo Rondelli (Du), Gabriel Egito e Paula Rodrigues (Paulinha), pela amizade e cumplicidade dentro e fora do ambiente de trabalho. Agradeço ainda as pessoas que já passaram pelo laboratório da Profa. Shirlei, Lílían Ricco Medeiros e Odair Aguiar Junior. Muito obrigada a todos pela ajuda e conselhos principalmente nas horas mais difíceis da minha vida. Obrigada por me ensinar que muitas vezes um simples sorriso pode tornar o dia melhor.

Agradeço ao Ms. Sérgio Siqueira Junior pela coleta dos exemplares, pela grande ajuda durante a utilização dos programas de análise de imagens e por ter se prontificado a ajudar sempre que possível.

À minha amiga que se tornou irmã, Samantha C. Vieira. Foi muito importante poder contar com uma amiga tão especial. Agradeço a Deus por ter participado da minha vida.

Aos meus amigos da faculdade, Ana Cândida Piza, Leda Maria T. Alferes e César Terrasan, pela fidelidade e por ter me mostrado o valor da amizade. Muito obrigada por ter podido contar com vocês sempre.

À minha querida amiga Claudia Yano (Claudinha) pela sua amizade e força nas horas mais difíceis.

Às minhas amigas de infância, Ana Cristina N. Rocha, Regina Amarante, Silvia Parise e Taíse Lopes, que sempre estiveram ao meu lado mesmo estando distantes. Agradeço por todos os momentos que passamos juntas de muita diversão e atrapalhadas.

Aos meus eternos amigos do coração, Diler, Juli (P), Santoro, Cacá, pelos momentos de descontração, pelas risadas e gargalhadas das nossas “jantinhas”. Pela amizade valiosa e fiel, por ter aprendido que a verdadeira felicidade está nas atitudes mais simples.

À minha família, Tarcísio (pai), Lidya (mãe), Diogo (irmão) e meus avós Hiroko, Eidi (avós maternos) e Margarida (vó paterno), pelo amor imensurável e compreensão em todos os momentos. Minhas conquistas são graças a esse amor e apoio em todas as horas. Sou muito agradecida por tudo que me proporcionaram. Foram os maiores professores da minha vida.

Ao grande amor da minha vida, Bread L. G. Cruz, por tudo. Agradeço todos os dias a Deus por você e sua família terem aparecido na minha vida. É muito bom saber que vão estar sempre do meu lado. Obrigada por fazer enxergar que o amor está mais nas atitudes mais simples do que nas palavras.

SUMÁRIO

Abstract	x
Resumo	xii
I. INTRODUÇÃO	1
Análises citogenéticas em anuros	1
O grupo de <i>Physalaemus cuvieri</i>	1
Importância da análise cromossômica de espécies do grupo de <i>Physalaemus cuvieri</i>	3
II. OBJETIVOS	5
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
IV - Artigo 1: Additional cytogenetic analyses of the widespread anuran <i>Physalaemus cuvieri</i> (Anura, Leiuperidae) with emphasis on NOR variability.....	10
V - Artigo 2: Cytogenetic of species of <i>Physalaemus cuvieri</i> group (Anura, Leiuperidae), with the description of an intriguing heteromorphism in <i>P. ephippifer</i>	39
VI - Artigo 3: Caracterização cromossômica de <i>P. albifrons</i> e <i>P. santafecinus</i> (Anura, Leiuperidae).....	58
VII. CONCLUSÕES.....	69

Abstract

The genus *Physalaemus* is composed by 41 species distributed in seven groups: “albifrons”, “cuvieri”, “deimaticus”, “gracilis”, “henselii”, “olfersii” and “signifer”. Nine species compose the group “cuvieri” but just *P. cuvieri* had already been karyotyped in details. Expressive intra and interpopulational variation related to the localization of the nucleolus organizer regions (NOR) was described for this species. *Physalaemus cuvieri* is widely geographically distributed and NOR variation was described based on populations from Southern and Southeastern Brazil. In the present work we analyzed the cytogenetic of four populations from Northeastern, one from Northern and one from Southeastern Brazil. Additionally, three Argentinian populations were also included. To cytogenetically compare *P. cuvieri* with other species of *Physalaemus*, species belonging to *P. cuvieri* group (i.e. *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cuqui* and *P. ephippifer*), *P. albifrons*, recently removed from this group, and *P. santafecinus*, currently allocated in *P. albifrons* group, were also analyzed.

All populations of *P. cuvieri* studied here showed diploid number of 22 chromosomes and high intraspecific variation was observed related to the NORs. Two populations of *P. cuvieri* (Urbano Santos, state of Maranhão (MA) and Crateús, state of Ceará (CE)) had pairs 8 and 9 as NOR-bearing chromosomes. In pair 8 the interstitial NOR was adjacent to C-bands whereas the NOR at the ninth pair was coincident with a heterochromatic block. In the population from São Pedro da Água Branca, state of Maranhão (MA), besides pairs 8 and 9, the seventh pair was also a NOR-bearing one. The specimens from Palmeiras, state of Bahia (BA) and Uberlândia, state of Minas Gerais (MG) showed only one NOR, which was located at pair 8. In the population from Uberlândia (MG) intraindividual differences was found related to the NOR size. In the populations from Argentina, the interstitial NOR in chromosome pair 8 was not found. In all the specimens of these Argentinean populations, pair 11 was the NOR-bearing chromosome pair and additional NORs were also found in chromosomes 1, 7 or 8 (in a pericentromeric position) in some of the individuals. The morph 11 of specimens from Argentina was very similar to the NOR-bearing eleventh pair described for specimens from Santa Maria (RS) previously analyzed.

In contrast, in the population from Porto Nacional, state of Tocantins (TO), multiple NORs were visualized at least at five chromosomes (belonging to pair 1, 3, 4 and 10), a pattern that greatly differed from those found in the others populations of *P. cuvieri*. Also concerning the C-band distribution, the karyotype found in the population of Tocantins differed from the others. These findings are very interesting and can be useful for future taxonomic studies of this taxon.

Regarding to chromosome morphology, *P. albifrons*, *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cuqui*, *P. ephippifer* and *P. santafecinus* were very similar, specially for the seven first chromosome pairs, although in *P. albonotatus* and *P. cuqui* the position of some chromosome pairs was different. All the species could be differentiated by NOR localization and in *P. ephippifer* an interesting heteromorphism was detected in NOR-bearing pair 8 of all the females. We do not discard the hypothesis that such heteromorphism could be related to sex determination in this species, but future studies are necessary to test it.

Except for the karyotype of *P. cuvieri* from Tocantins, the karyotypes described here the principal (or only) NOR was found among the last chromosome pairs, resulting in different chromosome morphologies, what impaired interspecific inferences of homeologies and the recognition of possible rearrangements involving the NOR during the differentiation of the species analyzed. On the other hand, C-banding technique permitted to notice some interspecific homeologies. A band at an interstitial region in the short arm of pair 5, and pericentromeric C-bands in the short arm of pairs 3 and 7 were detected in *P. cuvieri*, *P. centralis* and *P. ephippifer* which seemed to be homeologous to C-bands found in pair 3, 5 and 7 of *P. albonotatus*.

Resumo

O gênero *Physalaemus* é composto por 40 espécies divididas em sete grupos: “albifrons”, “cuvieri”, “deimaticus”, “gracilis”, “henselii”, “olfersii” e “signifer”. Nove espécies compõem o grupo “cuvieri” e dessas apenas *P. cuvieri* já teve seu cariótipo descrito com detalhes, tendo apresentado expressiva variação intra e interpopulacional em relação à localização de regiões organizadoras de nucléolo (NOR). Dado que *P. cuvieri* apresenta ampla distribuição geográfica e que a variação mencionada foi encontrada em populações do sul e do sudeste do Brasil, no presente trabalho ampliamos seu estudo, com a análise cromossômica de quatro populações da região nordeste, uma da região norte e uma da região sudeste do Brasil. Adicionalmente uma população da Argentina também foi estudada. Com o intuito de comparar cariotipicamente *P. cuvieri* com outras espécies de *Physalaemus*, também foram estudados os cariótipos de *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cuqui* e *P. ephippifer*, pertencentes ao grupo “cuvieri”, *P. albifrons*, espécie recentemente removida desse grupo, e *P. santafecinus* atualmente do grupo de *P. albifrons*.

Todas as populações de *P. cuvieri* aqui estudadas apresentaram cariótipo com $2n=22$ cromossomos e grande variação em relação às NORs pôde ser observada. Duas populações de *P. cuvieri* (Urbano Santos-MA e Crateús-CE) apresentaram as NORs nos pares 8 e 9. No par 8, a NOR, de localização intersticial, mostrou-se adjacente a uma região de heterocromatina, enquanto a NOR presente no par 9 foi coincidente com um bloco heterocromático. Na população de São Pedro da Água Branca (MA), além dos pares 8 e 9, o par 7 foi também portador de NOR. Na população de Palmeiras (BA) e Uberlândia (MG), apenas um par cromossômico (8) foi portador de NOR. Na população mineira, diferenças intra-individuais foram encontradas principalmente em relação ao tamanho da NOR. Já nas populações da Argentina, a NOR intersticialmente localizada no o par cromossômico 8 não foi encontrada. Em todos os exemplares dessas populações argentinas, o par 11 foi portador de NOR e NORs adicionais foram encontradas nos cromossomos 1, 7 ou 8 (em posição pericentromérica) em alguns indivíduos. É interessante notar que o morfo 11 dessa população argentina é muito semelhante ao cromossomo 11 encontrado na população de Santa Maria (RS) analisada anteriormente.

Já na população do estado de Tocantins, NORs múltiplas foram visualizadas em pelo menos cinco cromossomos (pertencentes aos pares 1, 3, 4 e 10), padrão que difere bastante daqueles encontrados nas outras populações de *P. cuvieri*. Também em relação ao padrão de distribuição de bandas heterocromáticas no cariótipo, a população de Tocantins analisada difere das demais, fato que intriga e corrobora a necessidade de uma revisão taxonômica da espécie em questão.

A morfologia cariotípica de *P. albifrons*, *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cuqui*, *P. ephippifer* e *P. santafecinus* foi muito semelhante, principalmente em relação aos primeiros pares cromossômicos, embora em *P. albonotatus* e *P. cuqui* a ordenação de alguns pares tenha sido diferente. Todas essas espécies puderam ser diferenciadas pela localização da NOR e em *P. ephippifer* um interessante heteromorfismo foi observado no par 8 portador de NOR em todas as fêmeas analisadas. Não foi descartada a hipótese de tal heteromorfismo estar relacionado à determinação sexual nessa espécie, no entanto, futuros estudos são necessários para sua comprovação.

Exceto no cariótipo dos indivíduos de *P. cuvieri* de Tocantins, nos cariótipos aqui descritos a principal (ou única) NOR foi encontrada nos últimos pares cromossômicos, alterando a morfologia desses, o que dificultou a inferência de homeologias interespecíficas e dos possíveis rearranjos que envolveram a NOR durante a diferenciação das espécies em análise. Já com o bandamento C, algumas homeologias interespecíficas foram claramente notadas. Uma banda intersticial no braço curto do par 5, outras na região pericentromérica do braço curto dos pares 3 e 7, por exemplo, foram encontradas em *P. cuvieri*, *P. centralis* e *P. ephippifer*, e parecem homeólogas às encontradas nos pares classificados como 3, 5 e 7 no cariótipo de *P. albonotatus*.

INTRODUÇÃO

Análises citogenéticas em anuros

Até a década de 1980, os estudos citogenéticos em Anura eram desenvolvidos com técnicas simples e a maior preocupação dessas investigações era a caracterização do número e da morfologia dos cromossomos por colorações convencionais, especialmente Giemsa. Tais técnicas permitiram detectar a ocorrência de certa variabilidade entre os anuros, que se mostrou grande em determinados gêneros como *Eleutherodactylus* (Bogart, 1970, 1973, 1981, 1991). Até hoje o número diplóide e a morfologia cromossômica constituem importantes características para análises citogenéticas comparativas. Espécies muito semelhantes morfologicamente e que poderiam ser consideradas, à primeira vista, como uma única espécie, puderam ser diferenciadas cariotipicamente com base nessas características. Isso foi verificado, por exemplo, em *Osteopilus brunneus* ($2n=34$) e *Osteopilus septentrionalis* ($2n=24$) (Cole, 1974), em *Megaelosia massarti* ($2n=28$) e *M. boticariana* ($2n=32$) (Mello et al., 1995; Giaretta et al., 1998), diferenciadas pelo número e morfologia dos cromossomos. Outras espécies como *Dendropsophus nanus* e *D. sanborni* ($2n=30$) (Medeiros et al., 2003), *Paratelmatobius cardosoi* e *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) ($2n=24$) (Lourenço et al., 2000, 2003), e espécies de *Epipedobates* (Aguiar-Jr et al., 2002) têm o mesmo número cromossômico, e puderam ser diferenciadas pela morfologia de alguns cromossomos.

Embora alguns mecanismos de evolução cariotípica em Anura tenham sido propostos com base apenas em estudos de morfologia cromossômica (veja Morescalchi, 1967; Bogart, 1973), uma melhor compreensão das relações cariotípicas passou a ocorrer após o uso de técnicas citogenéticas mais avançadas. Dentre essas, encontram-se as de bandamento C, bandamento de replicação, o método de impregnação pela prata, a coloração com fluorocromos e a hibridação *in situ*, que possibilitam a melhor caracterização dos cromossomos, facilitando o reconhecimento de homeologias e a inferência de rearranjos envolvidos na evolução cariotípica dos anuros.

Com o uso de tais técnicas, espécies muito semelhantes morfologicamente e que apresentaram cariótipos com mesmo número e mesma morfologia cromossômica quando analisados com colorações convencionais, puderam ser diferenciadas citogeneticamente. Variações interespecíficas de localização e número de regiões organizadoras nucleolares (NORs), por exemplo, já foram relatadas em espécies de *Hyla* holoárticas (Anderson, 1991), em espécies do grupo de *Hypsiboas pullchellus* (Ananias et al., 2004), em espécies de *Chaunus* (Baldiessa et al., 1999) e em *Dendropsophus nanus* e *D. sanborni* (Medeiros et al., 2003), dentre outras. Com o método de bandamento C, que evidencia regiões de heterocromatina, também foram detectadas variações que distinguem espécies, como notado por Anderson (1991) em espécies de *Hyla*, em espécies de *Telmatobufo* (Formas et al., 2000) e em *Colostethus* (Veiga-Menoncello et al., 2003).

Esses métodos têm sido úteis também para mostrar variações intra-específicas de localização e número de NORs e de bandas heterocromáticas. Foram relatadas variações desse tipo, por exemplo, em *Bufo terrestris* (Foote et al., 1991), *Agalychnis callidryas* (Schmid et al., 1995), *Dendropsophus ebraccatus* (Kaiser et al., 1996), *Engystomops petersi* (Lourenço et al., 1998), *Physalaemus cuvieri* (Silva et al., 1999) e *Dendropsophus nanus* (Medeiros et al., 2003).

Outra importante aplicação dessas técnicas citogenéticas é a identificação de pares cromossômicos sexuais. Apenas poucas espécies de anuros já estudadas citogeneticamente apresentaram cromossomos sexuais heteromórficos (ver revisão de Schmid et al., 1991) e em muitas delas o reconhecimento dos cromossomos sexuais só foi possível depois da aplicação de algum tipo de bandamento (exemplo em Schempp et al., 1981). No entanto, em alguns casos os cromossomos sexuais são heteromórficos também em relação ao tamanho e/ou morfologia, como ocorre em *Eleutherodactylus shrevei* e *E. euphronides* (Schmid et al., 2002), em que uma grande diferença de tamanho pode ser notada entre os cromossomos Z e W, graças à presença de grande quantidade de heterocromatina nesse último. Tanto sistemas cromossômicos XX/XY como ZZ/ZW, OO/WO (ver referências em Schmid et al., 1991) e também sistemas múltiplos, como o de *Eleutherodactylus biporcatus* (previamente descrito como *E. maussi*; Schmid et al., 1992) já foram descritos para anuros pertencentes a diversas famílias, o que evidencia que a diferenciação de cromossomos

sexuais ocorreu diversas vezes na história evolutiva desse grupo. Por isso, a análise da diferenciação desses cromossomos pode constituir valiosa ferramenta para o estudo da evolução cariotípica nos grupos em que cromossomos sexuais heteromórficos são identificados (exemplo em Iturra & Veloso, 1989 e Cuevas & Formas, 1996).

O grupo de *Physalaemus cuvieri*

O gênero *Physalaemus* (Anura, Leiuperidae) é encontrado na América do Sul, a leste dos Andes e é composto atualmente por 41 espécies (Frost, 2007), distribuídas em sete grupos: “albifrons”, “cuvieri”, “deimaticus”, “gracilis”, “henselii”, “olfersii” e “signifer” (Nascimento et al., 2005). Esse gênero apresenta grande quantidade de polimorfismos e notória abundância de espécies crípticas (Barrio, 1965), o que dificulta a identificação satisfatória de algumas populações com base apenas em critérios morfológicos. Isso ocorre, por exemplo, com *P. biligonigerus* e *P. marmoratus* (Barrio, 1965), atualmente alocados no grupo “albifrons”, e com *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. centralis* e *P. albonotatus* (ver Frost, 2007, para referências), pertencentes ao grupo “cuvieri” (Nascimento et al., 2005).

O grupo “cuvieri” compreende nove espécies e é considerado o segundo maior do gênero, de acordo com a recente revisão taxonômica realizada por Nascimento et al. (2005). Nesse estudo, os autores reagruparam várias espécies de *Physalaemus* e o grupo “cuvieri” deixou de alocar 20 espécies antes atribuídas a ele (Lynch, 1970). Dentre elas, encontra-se *P. albifrons*, que passou a compor o grupo de “albifrons” juntamente com *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* e *P. santafecinus*.

As espécies do grupo “cuvieri” apresentam ampla distribuição geográfica, fazendo com que esse grupo esteja representado do Norte ao Sul da América do Sul a leste dos Andes, ocorrendo da Venezuela à Argentina, em formações abertas do Cerrado, Caatinga, Chacos e em regiões de domínios planos (Nascimento et al., 2005).

Importância da análise cromossômica de espécies do grupo de *Physalaemus cuvieri*

A maioria dos estudos citogenéticos existentes até o momento para o gênero *Physalaemus* foi realizada com técnicas convencionais e mostrou um número diplóide

conservado de 22 cromossomos, que diferem muito pouco em sua morfologia. No grupo de *P. cuvieri* foram assim determinados os cariótipos de *P. centralis* (Denaro, 1972), *P. aguirrei*, *P. cicada*, *P. gracilis* e *P. kroyeri* (De Lucca et al., 1974). O cariótipo de *P. cuvieri* foi inicialmente descrito com técnicas convencionais por Beçak et al. (1970) e, posteriormente, análises complementares foram apresentadas por Silva et al. (1999), que evidenciaram uma interessante variabilidade em relação ao número e à localização de NORs nessa espécie. Dentre os espécimes de *P. cuvieri* de Rio Claro (SP), diferentes padrões de distribuição de NORs foram detectados e estes não foram os mesmos observados na população de Santa Maria (RS) (Silva et al. 1999). Portanto, a análise de outras populações dessa espécie, cuja distribuição geográfica é bastante ampla, é importante para melhor compreensão dessa variação cariotípica.

Com relação às espécies anteriormente atribuídas ao grupo de *P. cuvieri*, *P. albifrons* teve seu cariótipo descrito com base em coloração convencional com Giemsa por Denaro (1972). É importante notar que a mesma metáfase usada nessa descrição foi anteriormente utilizada por Beçak et al. (1970) para ilustrar o cariótipo de *P. marmoratus* (referida pelos autores como *P. fuscomaculatus*). Amaral et al. (2000), analisando o cariótipo de *P. marmoratus*, sugeriram que a metáfase em questão fosse mesmo de *P. albifrons*. Tal equívoco provavelmente resultou de problemas relativos à identificação taxonômica dessas espécies e reforça a importância de estudos de outras naturezas para uma melhor compreensão desses anuros.

Considerando que os dados cromossômicos se mostram tão variáveis em *P. cuvieri*, é provável que a análise citogenética de diferentes populações assim como das demais espécies desse grupo possa fornecer caracteres valiosos para a distinção entre essas espécies e também para futuros estudos evolutivos.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo ampliar o número de populações de *P. cuvieri* analisadas citogeneticamente, com o intuito de melhor avaliar a variação em relação à localização de NORs nessa espécie. Pretendeu-se também descrever detalhadamente o cariótipo de outras quatro espécies do grupo de *P. cuvieri* e duas do grupo de *P. albifrons*, fornecendo comparações interespecíficas que possam auxiliar futuros estudos taxonômicos e sistemáticos.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Jr, O., Lima, A.P., Giaretta, A.A., Recco-Pimentel, S.M., 2002. Cytogenetic analysis of four poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura, Dendrobatidae). *Herpetologica* 58:293-303.
- Amaral, M.J.L.V., Cardoso, A.J., Recco-Pimentel, S.M., 2000. Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). *Caryologia* 53: 283-288.
- Ananias, F., Garcia, P.C.A., Recco-Pimentel, S.M., 2004. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 140:42-48.
- Anderson, K., 1991. Chromosome evolution in Holoartic treefrogs. In: Green, D.M. & Sessions, S.K. *Amphibians cytogenetics and evolution*. Academic Press pp. 299-331.
- Baldiessa, F.A., Batistic, R.F., Haddad, C.F.B., 1999. Cytotaxonomic considerations with description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo* (Anura, Bufonidae). *Amphibia-Reptilia* 20:420-431.
- Barrio, A., 1965. El género *Physalaemus* (ANURA, Leptodactylidae) en la Argentina. *Physis* 25:421-448.
- Beçak, M.L., Denaro, L., Beçak, W., 1970. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics* 9:225-238.
- Bogart, J.P., 1970. Los cromosomas de anfibios del genero *Eleutherodactylus*. *Jact. IV. Congr. Latin. Zool.* 1:65-78.
- Bogart, J.P., 1973. Evolution of anuran karyotypes. In *Evolutionary Biology of The Anurans: Contemporary research on Major Problems*. (Vial JL, ed). Columbia: University of Missouri Press 337-349.
- Bogart, J.P., 1981. Chromosomes studies in *Sminthillus* from Cuba and *Eleutherodactylus* from Cuba and Puerto Rico (Amphibia: Leptodactylidae). *Life Sci. Cont. R. Ont. Mus.* 129:1-22.
- Bogart, J.P., 1991. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In "Amphibian Cytogenetics and Evolution". (eds DM Green and SK Sessions) Academic Press, San Diego pp. 233-257.

- Cole, C.J., 1974. Chromosome evolution in selected treefrogs, including casque-headed species (*Pternohyla*, *Triprion*, *Hyla*, and *Smilisca*). Amer. Mus. Novitates 2541:1-10.
- Cuevas, C.C., Fromas, J.R., 1996. Heteromorphic sex chromosomes in *Eupsophus insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). Chromosome Res. 4: 467-470.
- De Lucca, E.J., 1974. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. Caryologia 27:183-191.
- Denaro, L., 1972. Karyotypes of Leptodactylidae Anurans. J. Herpetol. 6:71-74.
- Foote, D.L., Wiley, J.E., Little, M.L., Meyne, J., 1991. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. Cytogenet. Cell Genet. 57:196-199.
- Formas, J.R., Cuevas, C.C., 2000. Comparative cytogenetic analysis of the Chilean leptodactylid frog genus *Telmatobufo*, with description of *T. venustus*. P. Biol. Soc. Wash. 113:890-899.
- Frost, D.R., 2007. Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.0 (1 February, 2007). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Giaretta, A.A., Aguiar-Jr, O., 1998. A new species of *Megaelosia* from the Mantiqueira Range, Southeastern Brazil. J. Herpetol. 32:80-83.
- Iturra, P.; Veloso, A. 1989. Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. Genetica 78: 25-31.
- Kaiser, H., Mais, C., Bolaños, F., Steinlein, C., Feichtinger, W., Schmid, M., 1996. Chromosomal investigation of three Costa Rica frogs from the 30-chromosomes radiation of *Hyla* with description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. Genetica 98:95-102.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M., Cardoso, A.J., 1998. Polymorphisms of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. Chromosome Res. 6:621-628.

- Lourenço, L.B., Garcia, P.C., Recco-Pimentel, S.M., 2000. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic comments. *Hereditas* 133:201-209.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C.A., Recco-Pimentel, S.M., 2003. Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* and new insights into the relationship with *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae). *Ital. J. Zool.* 70:183-190.
- Lynch, J.D., 1970. Systematic status of the american leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix*, and *Physalaemus*. *Copeia* 1970:488-496.
- Medeiros, L.R., Rossa-Feres, D.C., Recco-Pimentel, S.M., 2003. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae), with description of NOR polymorphism in *H. nana*. *J. Hered.* 94:149-154.
- Mello, A.S., Giaretta, A.A., Recco-Pimentel, S.M., 1995. The karyotype of the stream dwelling frog *Megaelosia massarti* (Anura, Leptodactylidae, Hylodinae). *Cytologia* 60:49-52.
- Morescalchi, A., 1967. Le relazioni tra el cariotipo di Anuri Displasiocle. I. Il corredo cromossomico di alcuni Ranidae. *Caryologia* 20:65-85.
- Nascimento, L.B., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., 2005. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro* 63:297-320.
- Schempp, W., Schmid M., 1981. Chromosome banding in Amphibia. VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosome in *Rana esculenta*. *Chromosoma* 83:697-710.
- Schmid, M., Nanda, I., Steinlein, C., Kausch, K., Haaf, T., Epplen, J., 1991. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. In: *Amphibia cytogenetics and evolution*. Edited by D.M. Green and S.K. Sessions. Academic Press, San Diego 393-430.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W., 1992. Chromosome banding in Amphibia. XVII. First demonstration of multiple sex chromosomes in amphibians: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet Cell. Genet.* 62:284-292.

- Schmid, M., Feichtinger, W., Steinlein, C., Rupprecht, A., Haaf, T., Kaiser, H., 2002. Chromosome banding in Amphibia. XXIII. Giant W sex chromosomes and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Leptodactylidae). Cytogenet. Genome Res. 97:81-94.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Kasahara, S., 1999. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hereditas 131:135-141.
- Veiga-Menoncello, A.C.P., Lima .P., Recco-Pimentel, S.M., 2003. Cytogenetics analysis of four Central Amazonian species of *Colostethus* (Anura, Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. Hereditas 139:189-198.

IV-Artigo 1

Additional cytogenetic analyses of the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on NOR variability

Yeda Rumi Serra Douglas Quinderé^a, Luciana Bolsoni Lourenço^{a*}, Gilda V. de Andrade^b, Cristian Tomatis^c, Diego Baldo^c, Shirlei Maria Recco-Pimentel^a

^aDepartamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863, Campinas, São Paulo, Brazil.

^bDepartamento de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65080-040 São Luís, Maranhão, Brazil.

^cLaboratorio de Genética Evolutiva y Molecular, Universidad Nacional de Misiones, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

*Corresponding author (bolsoni@unicamp.br)

Abstract

Previous cytogenetic work based on silver staining and the C-banding technique revealed interesting NOR variability in *Physalaemus cuvieri* from southeastern and southern Brazil. In this paper, we investigated the NOR staining pattern in nine other populations of this species from northern, northeastern and southeastern Brazil and the province of Misiones in Argentina. Testicular and intestinal epithelial chromosomes were processed for staining with Giemsa, C-banding, silver impregnation and *in situ* hybridization with rDNA probes. All of the populations had $2n=22$ and $NF = 44$, and very similar karyotypes concerning the morphology of the chromosomes, but they showed a high variability in NOR pattern. NORs occurred mainly in the smaller chromosomal pairs, except for Porto Nacional population, in which chromosome pairs 1, 3 and 4 carried NORs in all the specimen analyzed, besides pair 10. Additionally to the NOR pattern, C-band distribution was also able to distinguish the specimens of Porto Nacional from all the other populations analyzed to date. Except for the specimens from Porto Nacional, the Brazilian populations analyzed here had an NOR in chromosomal pair 8, whereas the Argentinian populations showed the principal NOR terminally in pair 11. All the specimens from the three populations of the northeast region of Brazil analyzed had an NOR in chromosome 9, not found in the other populations. In specimens of São Pedro an NOR in chromosome 7 was additionally found. Interindividual variability in the number of NORs was also observed in the populations analyzed here, except for Palmeiras and Uberlândia, although in these populations variability in NOR size was observed as well as in all of the others. Additionally interesting intraindividual variations in NOR size were also detected in specimens from Uberlândia. Despite the mentioned variations, a heterochromatic C-band of variable intensity was detected in the short arm of chromosome 5 in all of the populations.

Keywords: Cytogenetics; chromosome; NOR; Anura; *Physalaemus*

1. Introduction

The South American frog genus *Physalaemus* is allocated in the family Leiuperidae, together with *Edalorhina*, *Engystomops*, *Eupemphix*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola* and *Somuncuria* (Grant et al., 2006). *Physalaemus* currently comprises 41 species distributed in South America east of the Andes (Frost, 2007) and is arranged in seven phenetic groups: “albifrons”, “cuvieri”, “deimaticus”, “gracilis”, “henselii”, “olfersii” and “signifer” (Nascimento et al., 2005), although there is no proposal of phylogenetic intrageneric relationships for *Physalaemus*.

Cytogenetic studies are useful for taxonomic analyses since they allow the characterization of the karyotype and provide data on the evolutionary chromosomal rearrangements of the species. In Anura, cytogenetic methods have been used to distinguish among species based on the patterns of heterochromatic bands (Schmid et al., 1993; Formas & Cuevas, 2000; Odierna et al., 2001; Veiga Menoncello et al., 2003) or by the localization of nucleolus organizer regions (NORs) (Veiga-Menoncello et al., 2003; Ananias et al., 2004). However, intraspecific variability in the Ag-NOR patterns has been observed in different anuran taxa (Wiley et al., 1989; Foote et al., 1991; Miura et al., 1994; Schmid et al., 1995; Kaiser et al., 1996; Silva et al., 1999; Lourenço et al., 1998).

Physalaemus cuvieri is widely distributed throughout South America, occurring in northeastern, central and southern Brazil, northeastern Argentina, eastern Paraguay, southeastern Bolivia, and possibly the lowlands of southern Venezuela (Frost, 2007). Intraspecific morphological variations have frequently been reported for this species. The reproductive biology of populations in northeastern and southeastern Brazil is similar, but their reproductive season differs because of the distinct climatic patterns of these regions (Barreto & Andrade, 1995).

Previous cytogenetic analyses of *P. cuvieri* specimens from five localities in southern and southeastern Brazil revealed marked intraspecific variation in the number and chromosomal localization of NORs (Silva et al., 1999). To investigate these interpopulational variations better, in this study we extended this cytogenetic analysis to other populations of *P. cuvieri* from states in northeastern and central Brazil (Maranhão,

Ceará, Bahia, Tocantins and Minas Gerais) and from the province of Misiones in Argentina.

2. Material and Methods

2.1. Specimens

Specimens from six Brazilian and three Argentinian populations were analyzed (Table 1 and Fig. 1). The Brazilian specimens were collected in the states of Maranhão and Ceará by Dr. Gilda V. de Andrade, in the states of Tocantins and Minas Gerais by Ms. Sergio Siqueira-Jr and in the state of Bahia by Dr. Maria Lúcia Del Grande. Voucher specimens were deposited in the Museu de História Natural, “Prof. Adão José Cardoso” (ZUEC), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil, and in Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. The Argentinian specimens were collected by Diego Baldo (under a permit issued by the Ministerio de Ecología, Recursos Naturales Renovables y Turismo de la provincial de Misiones) and deposited in the Diego Baldo (DB) collection in the Museo de La Plata in Buenos Aires, Argentina.

2.2. Chromosomal preparations and techniques

Mitotic metaphases were obtained from a suspension of intestinal and testicular cells from frogs treated with colchicine (2%) for at least 4 h (Schmid, 1978; Schmid et al., 1979). Chromosomes were stained conventionally with 10% Giemsa solution and processed by the Ag-NOR method (Howell & Black, 1980) and for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Viegas-Péquino, 1992) using the rDNA probe HM 123 (Meunier-Rotival et al., 1979). The C-banding technique (King, 1980) was done for all of the Brazilian populations.

3. Results

3.1. *Morphology of the chromosomes and NOR distribution*

All of the specimens analyzed had $2n=22$ biarmed chromosomes ($NF = 44$) and no sex chromosomes were detected. The chromosomal pairs 1, 2, 5, 6, 9, 10 and 11 were metacentric, whereas the remaining pairs (3, 4, 7 and 8) were submetacentric in most of the populations (Fig. 2). However, chromosome 9 was submetacentric in all specimens from Urbano Santos (MA), Crateús (CE) (Fig. 2A,B) and São Pedro da Água Branca (MA) (Fig. 8), pair 8 was metacentric in specimens from Palmeiras (BA) (Fig. 2D) and the eleventh pairs was submetacentric in the Argentinian population (Fig. 4).

An interesting interpopulational variation was detected in relation to the NOR occurrence and it responded to the morphological variations above-mentioned, except for Palmeiras population. In the specimens from Urbano Santos (MA) and Crateús (CE), NORs were detected interstitially in the long arm of chromosomes 8 and 9 (Fig. 5). The NOR on pair 8 varied in size among six specimens from Urbano Santos (MA) (Fig. 5 A-C, E-H) and three specimens from Crateús (CE) (Fig. 5I, J, L) while in pair 9 the NOR sites were highly polymorphic. Overall, eight patterns of NOR distribution in chromosome 9 were detected in specimens from Urbano Santos (MA) (Fig. 5A-H), and another four patterns were observed in specimens from Crateús (CE) (Fig. 5I-L). In specimens from Urbano Santos (MA), FISH with an rDNA probe was also used to confirm the existence of some of the smaller NORs visualized with the Ag-NOR method (Fig. 6).

Since the size and morphology of pairs 8 and 9 were very similar in all of the populations, the C-banding technique was essential for distinguishing between the pairs; pair 8 had heterochromatic bands adjacent to the NOR whereas the NORs in pair 9 coincided with the dark C-bands (Fig. 7).

In specimens from São Pedro da Água Branca (MA), in addition to pairs 8 and 9, pair 7 also had an NOR (Fig. 8C,D). Interestingly, the NOR in pair 8 was not constant in this population since Ag-NOR staining failed to detect this site in one of its homologues in specimen MNRJ 24255 (Fig. 8A,C). Another interesting feature of this specimen was the heteromorphic morphology of chromosome 4 (Fig. 8A) that was unrelated to variations in cytogenetic markers such as C-banding or NOR staining; the cause of this variation is

unclear. In this population, C-banding was very useful for distinguishing pair 8, which had an NOR adjacent to heterochromatic bands, from pair 9, in which the NORs coincided with the C-bands (Fig. 8B,C).

In specimens from Uberlândia (MG) and Palmeiras (BA), NORs were detected only in an interstitial region of the long arm of pair 8 (Figs. 9 and 10), adjacent to C-bands (Fig. 3C,D). As mentioned above, pair 8 of individuals from Palmeiras (BA) differed morphologically from the other chromosomes since they had a longer short arm, with an interstitial C-band near the centromere (Fig. 3D).

An intriguing intraindividual variation in NOR size was detected by Ag-NOR staining in five specimens from Uberlândia (MG) (Fig. 9A). In four of these specimens, the variation in NOR size was confirmed by FISH with an rDNA probe (Fig. 9B). Another interesting finding was the absence of the NOR in one of the homologues of pair 8 and the detection of an additional NOR site in the short arm of chromosome 3 by FISH with an rDNA probe in two of 27 metaphases for one specimen (ZUEC 13368) from this same population (Fig. 9C). This additional site was not detected by Ag-NOR staining, even though 26 silver-stained metaphases from this specimen were analyzed.

The specimens from Argentina differed from the others analyzed here since their single (Figs. 4A and 4B) or principal NOR (Figs. 4C, 4D and 4E) was detected in pair 11 in all of the specimens examined. Additional NORs were found in the long arm of one chromosome 1 (Fig. 4C), the short arm of one chromosome of pair 7 (Fig. 4E), and the long arm of one chromosome of pair 8, but, in this case, in a region near the centromere in the long arm (Fig. 4D), in contrast to the NOR site in pair 8 of specimens from Brazilian populations. One specimen from Fachinal (DB 4192) showed considerable NOR size variation between the homologous chromosomes 11 in all of the metaphases analyzed by Giemsa or Ag-NOR staining (Fig. 4B).

The NOR patterns found in metaphases of specimens from Porto Nacional (TO) greatly differed from all the others described above. In these specimens, a larger number of sites were detected by silver staining and FISH with an rDNA probe. Several non-specific markers were seen as in some metaphases after both of these techniques (Fig. 11) and we considered as real NOR sites only the sites detected in all the metaphases analyzed. When

present, the non-specific markers were frequently seen as brown sites in silver staining metaphases and as small dots in metaphases hybridized with rDNA probe, except for a non-specific marker found near the centromere in the chromosome 5 in the specimen ZUEC 13379, which was strongly detected by FISH although was seen as a brown region in the majority of the silver stained metaphases. The NOR-bearing chromosome pairs were 1, 3, 4 and 10, and in all of them the NORs were proximal to the centromere (Fig. 11).

The NORs detected in the different populations were seen as secondary constrictions in metaphases stained by Giemsa (Figs. 2, 4 and 8A).

3.2. *Heterochromatin distribution*

Heterochromatic blocks were seen in all of the centromeric regions. Non-centromeric banded regions were seen adjacent or coincident with the NOR in chromosomes 8 or 9 of specimens from the Brazilian populations, as mentioned above (Fig. 3 and 8B). Additionally all of the Brazilian populations showed constitutive heterochromatin interstitially in chromosome pair 5, in pericentromeric regions of pairs 3 and 7, and in the telomeric regions of chromosome pair 1, although in specimens from Uberlândia these terminal C-bands were not detected (Fig. 3C). The interstitial and the pericentromeric bands above-mentioned were easier to detect in metaphases from Palmeiras (BA) and Porto Nacional (TO) (Figs. 3D,E).

The interstitial regions of chromosomes 6 and 9 were also C-banded in specimens from Uberlândia (MG) (Fig. 3C), while in specimens from Palmeiras (BA) interstitial C-bands were also seen in chromosomes 2, 6, 9 and 10, in addition to a telomeric C-band in the long arm of chromosome 3 (Fig. 3D).

Individuals from Porto Nacional (TO) had pericentromeric C-bands in several chromosomes, as well as some telomeric C-bands (Fig. 3E and 11F), and some of them coincided with the non-specific markers observed after silver staining and FISH with rDNA probe (Fig 11).

4. Discussion

In general, the chromosomal morphology of the *P. cuvieri* specimens from different localities examined here were very similar to each other, with NF = 44 characteristic of the genus *Physalaemus* (Beçak et al., 1970; Denaro et al., 1972; De Lucca et al., 1974; Amaral et al., 2000; Silva et al., 2000). This similarity was seen mainly in the first seven pairs of the karyotype, which were apparently very conserved in the genus. The apparent inversion in the ordination of pairs 3 and 4 could possibly reflect inherent variations in the method used to make the measurements since these pairs were very similar in size.

All of the specimens analyzed showed small amounts of centromeric heterochromatin, in agreement with those reported by Silva et al. (1999) for the same species. A conspicuous interstitial C-band has also been found in the short arm of chromosome 5 in all of the individuals analyzed so far. Other C-bands commonly found in these specimens included small pericentromeric blocks in the short arm of chromosomes 3 and 7, particularly in populations from Palmeiras (BA) and Porto Nacional (TO).

In contrast, there was some interpopulational variation in the C-band distribution, with the main differences being related to the distribution of heterochromatin in specimens from Porto Nacional (TO). These specimens had C-banded pericentromeric regions in almost all of the chromosomes, including chromosome 9, which also had a pericentromeric band in the long arm in populations from Rio Claro (SP) and Santa Maria (RS) (Silva et al., 1999). The intensity of an interstitial C-band in the short arm of chromosome 2 also varied among the populations, being more evident in the population from Rio Claro (Silva et al., 1999) and in specimens from Palmeiras. Such variations may indeed reflect interpopulational variations in the size of heterochromatic bands, but one cannot exclude the hypothesis that they resulted from technical difficulties in detecting these small C-bands. A further difference was noted in a C-band of the short arm of pair 8, which was detected only in specimens from Palmeiras (BA); this band could be involved in the metacentric morphology of this pair since in the other populations pair 8 was submetacentric.

4.1. NOR variability

Compared to the C-banding pattern, there was considerably more variability among the NORs. The presence of more than one NOR-bearing chromosomal pair is considered a derived condition in anurans (King et al. 1990) and most of the populations of *P. cuvieri* analyzed showed this characteristic. In a previous study of *P. cuvieri*, Silva et al. (1999) found a maximum of five NOR-bearing chromosomes in four different chromosomal pairs from site B at Rio Claro in São Paulo state (SP), southeastern Brazil. Although additional NORs were commonly found in southeastern Brazilian sites studied by Silva et al. (1999), chromosome 8 was detected as the principal NOR-bearing chromosome at three of these localities whereas chromosome 11 was the NOR-bearing chromosome in karyotypes from Boracéia, SP, southeastern Brazil, and Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil.

In the populations from northeastern analyzed here, the long arm of pair 8 always bore an NOR, as did other chromosomal pairs (pair 9 and also pair 7 in specimens from São Pedro da Água Branca), whereas in specimens from Argentina the main NOR was located on pair 11. The karyotypes from Boracéia (SP) and Santa Maria (RS) (see Silva et al., 1999) and Argentina (present paper) shared the same staining pattern for the main NOR, which occupied a terminal region of chromosome 11. This terminal NOR was also found in five of six specimens from Rio Claro (SP) (Silva et al., 1999), but in this case it was not the principal NOR site and all of these specimens were heterozygous for the presence of this NOR. In contrast, there was no NOR at this location (11p ter) in any of the specimens from the northern and northeastern Brazilian populations analyzed. Hence, the occurrence of those cytogenetic markers agree with the geographical distances among the populations sampled.

All of the specimens from the states of Ceará and Maranhão had an NOR on chromosomal pair 9 that was absent in the other populations. The wide variation in the number and size of the NOR sites in these populations generated considerable morphological variation in this chromosome. In some cases, a clear distinction between pairs 8 and 9 was possible only by analyzing C-banded metaphases after silver impregnation since the NORs in pair 9 were also showed C-banding. A possible explanation for the detection of NORs by C-

banding was suggested by King et al. (1990) based on studies with hylids and involved the presence of repetitive sequences in the intergenic spacers of ribosomal DNA.

As with the population from Rio Claro (SP) analyzed by Silva et al. (1999), several NOR-bearing chromosomes were detected in the population from Porto Nacional (TO). However in this latter the NOR-bearing chromosomes 8 and 11 commonly found in the others populations of this species were not seen and the NORs occurred in pairs 1, 3, 4 and 10, greatly differing from the other populations analyzed to date. Besides the NORs, several non-specific sites were also detected in many metaphases after silver staining or FISH with rDNA probe. Silver non-specific marks were already described in many other cytogenetic studies and this detection was attributed to their heterochromatic nature (examples in Sumner, 1990; Sánchez et al., 1995; Dobigny et al., 2002). In Anura, the case of *Leptodactylus mystacinus* (Silva et al., 2006) is particularly interesting, since several non-specific sites were present in silver stained metaphases but were not detected by FISH with rDNA probe. The detection of heterochromatic regions by FISH with rDNA probe was already reported in a recent study by Martins et al. (2006). In this study a 5S ribosomal gene probe was able to detect several centromeric regions in the fish *Hoplias malabaricus* and we believe that the same phenomena occurred in our FISH experiments with HM 123 probe concerning Porto Nacional population.

The variations in NOR number and location in *P. cuvieri* probably resulted from rearrangement events, such as translocations, inversions, transpositions, amplification of single "orphan-like" rDNA genes, and reinsertional errors during the extra-chromosomal amplification of ribosomal genes in oogenesis, that are frequently considered to be responsible for such divergences in other anuran species (Wiley et al., 1989; King et al., 1990; Foote et al., 1991; Schmid et al., 1995; Kaiser et al., 1996). This intra- and interpopulational variation in NOR occurrence means that although NORs are useful cytogenetic markers for *P. cuvieri*, it is impossible to draw definite conclusions regarding the taxonomic status of the populations studied here.

4.2. Intraindividual variation in NOR occurrence

Inter- and intrapopulation variations in NOR size are common in anurans (*e.g.*, Lourenço et al., 1998; 2003; Silva et al., 1999; Wiley, 2003; Siqueira-Jr et al., 2004). However, intraindividual variations in NOR detection are very rare in these amphibians, but have been observed in *P. cuvieri*. Silva et al. (1999) reported intraindividual variation in the Ag-NOR pattern in two individuals from Rio Claro (SP) and attributed this to differential regulation in the expression of ribosomal genes. As shown here, specimens from Uberlândia (MG) showed variations in the size of the NOR on pair 8 as detected by Ag-NOR staining and FISH with an rDNA probe. Since FISH was able to detect these size variations, we suggest that they reflect structural differences in this NOR instead of differential regulation of its expression. Unequal sister chromatid exchanges are commonly suggested as mechanisms responsible for such amplifications/deletions in NORs (*e.g.* Motovali-Bashi et al., 2004) and can account for the variation seen here.

FISH also revealed additional intraindividual variation at a site in chromosome 3 in some metaphases of one individual. Although this site was never detected by Ag-NOR staining, we cannot exclude the possibility that it could be an active NOR, even though it was only detected sporadically by FISH.

4.3. Concluding remarks

The findings regarding the NOR pattern allowed the identification of some groups among the populations of *P. cuvieri* studied to date. One of them includes the populations from Urbano Santos (MA), São Pedro da Água Branca (MA) e Crateús (CE), in the northeast region of Brazil. On the other hand, the comparative analysis of the NOR and C-band patterns showed that the karyotype of specimens from Porto Nacional (TO) greatly differed from those found in all of the other populations already analyzed. All of these findings showed that important interpopulation variation occurs in *P. cuvieri* and suggest that a taxonomic revision of this species is necessary.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello, Dr. Ana Paula Z. Silva de Pietri and Dr. Cynthia P. A. Prado for critically reviewing the manuscript, Klélia A. Carvalho for technical assistance and Sérgio Siqueira Júnior for help with the field work at Porto Nacional (TO) and Uberlândia (MG). This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). All the Brazilian specimens were collected under a permit issued by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Proc. No. 02010.002895/03-84).

References

- Ananias, F., Garcia, P.C.A., Recco-Pimentel, S.M., 2004. Conserved karyotypes in *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 140:42-48.
- Amaral, M.J.L.V., Cardoso, A.J., Recco-Pimentel, S.M., 2000. Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). *Caryologia* 53:283-288.
- Barreto, L.N., Andrade, G.V., 1995. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*. 16:67-76.
- Beçak, M.L., Denaro, L., Beçak, W., 1970. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics* 9:225-238.
- Denaro, L., 1972. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. *J. Herpetol.* 6: 71-74.
- De Lucca, E.J., 1974. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia* 27:183-191.
- Dobigny, G., Ozouf-Costaz, C., Bonillo C., Volobouev V., 2002. “Ag-NORs” are not always trues NORs: new evidence in mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 98:75-77.
- Formas, J.R., Cuevas, C.C., 2000. Comparative cytogenetic analysis of the Chilean leptodactylid frog genus *Telmatobufo*, with description of *T. venustus*. *P. Biol. Soc. Wash.* 113:890-899.
- Foote, D.L., Wiley, J.E., Little, M.L., Meyne, J., 1991. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. *Cytogenet. Cell Genet.* 57:196-199.

- Frost, D.R., 2007. Amphibians species of the world: an online reference. V5.0 (February 1, 2007) Electronic database available at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- 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). *Bulletin AMNH* 299:1-262.
- 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.
- Kaiser, H., Mais, C., Bolaños, F., Steinlein, C., Feichtinger, W., Schmid, M., 1996. Chromosomal investigation of three Costa Rica frogs from the 30-chromosomes radiation of *Hyla* with description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. *Genetica* 98:95-102.
- King, M., 1980. C-banding studies on Australian hyliid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80:191-217.
- King, M., Contreras, N., Honeycutt, R.L., 1990. Variation within and between nucleolar regions in Australian hyliid frogs (Anura) shown by 18S and 28S in situ hybridization. *Genetics* 80:17-29.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M., Cardoso, A.J., 1998. Polymorphisms of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res.* 6:621-628.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C.A., Recco-Pimentel S.M., 2003. Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* and new insights into the relationship with *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae). *Ital. J. Zool.* 70:183-190.
- Martins, C., Ferreira, I.A., Oliveira, C., Foresti, F., Galetti Jr., P.M., 2006. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erithrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127:133-141.
- Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Macaya, G., Bernardi, G., 1979. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 6:2109-2123.

- Miura, I., 1994. Sex-chromosome differentiation in the Japanese brown frog, *Rana japonica*. 2. Sex-linkage analyses of the nucleolar organizer regions in chromosomes No.4 of the Hiroshima and Saeki populations. *Zool. Sci.* 11:807-815.
- Motovali-Bashi, M., Hojatia, Z., Walmsleyb, R.M., 2004. Unequal sister chromatid exchange in the rDNA array of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 564:129-137.
- Nascimento, L.B., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., 2005. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro* 63:297-320.
- Odierna, G., Vences, M., Aprea, G., Lötters, S., Andreone, F. 2001. Chromosome data for Malagasy poison frogs (Amphibia, Ranidae: Mantella) and their bearing on taxonomy and phylogeny. *Zool. Sci.* 18:505-514.
- Sánchez, A., Jiménez, R., Burgos, M., Sittou, S., Zurita, F., De La Guardia, R.D., 1995. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. *Heredity* 75:10-16.
- Schmid, M., 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361-388.
- Schimid, M., Olert, J., Klett, C., 1979. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71:29-55.
- Schmid, M., Ohta, S., Steinlein, C., Guttenbach, M., 1993. Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). *Cytogenet. Cell Genet.* 62:238-246.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F., León, P., 1995. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 69:18-26.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Kasahara, S., 1999. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas* 131:135-141.

- Silva, A.P.Z., Baldissera-Jr, F.A., Haddad, C.F.B., Kasahara, S., 2000. Karyotypes and nucleolus organizer regions of the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia, Sér. Zool.* 88:159-164.
- 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.
- Sumner, A.T., 1990. Chromosome Banding. Unwin Human Ltd, London.
- Siqueira-Jr., S., Ananias, F., Recco-Pimentel, S.M., 2004. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocation in *E. binotatus*. *Genet. Mol. Biol.* 27:363-372.
- Veiga-Menoncello, A.C.P., Lima, A.P., Recco-Pimentel, S.M., 2003. Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura- Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas* 139:189-198.
- Viegas-Pequignot, 1992. E. In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. (Ed.) *In Situ Hybridization: A Practical Approach*. Oxford University Press IRL Press, Oxford, pp.137-158.
- 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 DNAr genes on chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. *Chromosoma* 97:481-487.
- Wiley, J.E., 2003. Replication banding and FISH analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 101:80-83.

Legends

Figure 1. Map of South America showing the study sites identified by dots and numbers. The bold letters show the Brazilian states in which the samples were collected. **BA** = Bahia; **CE** = Ceará; **MA** = Maranhão; **MG** = Minas Gerais; **TO** = Tocantins. **1** = Urbano Santos (43.3° W, 43.3° S); **2** = Crateús (40.7° W, 5.3° S); **3** = São Pedro da Água Branca (48.25° W, 5.16° S); **4** = Palmeiras (41.5° W, 12.7° S); **5** = Uberlândia (48.3° W, 19.1° S); **6** = Porto Nacional (48.6° W, 10.4° S); **7** = Fachinal, Misiones (55° W, 27° S); Iguazú, Misiones (55° W, 25° S) Andresito, Misiones (54° W, 25° S).

Figure 2. Metaphases of *P. cuvieri* from Urbano Santos (**A**), Crateús (CE) (**B**), Uberlândia (MG) (**C**), Palmeiras (BA) (**D**) and Porto Nacional (TO) (**E**) stained by Giemsa. Bar=5 µm.

Figure 3. Metaphases of *P. cuvieri* from Urbano Santos (MA) (**A**), Crateús (CE) (**B**), Uberlândia (MG) (**C**), Palmeiras (BA) (**D**) and Porto Nacional (TO) (**E**) after C-banding. The arrow in **A** indicates the interstitial band adjacent to the secondary constriction of the NOR (arrowhead) in pair 8. Bar=5 µm.

Figure 4. Metaphases of the five specimens of *P. cuvieri* (**A-E**) from Argentina stained by Giemsa. The insets show the NOR-bearing chromosomes after silver impregnation. Bar=5 µm.

Figure 5. NOR-bearing chromosomes from specimens of *P. cuvieri* from Urbano Santos-MA (**A-H**) and Crateús-CE (**I-L**) after Ag-NOR staining. Bar=5 µm.

Figure 6. Karyotype of *P. cuvieri* from Urbano Santos (MA) after FISH with an rDNA probe. The arrow indicates a small NOR near the centromere of one homologue of pair 9 and the arrowhead indicates an interstitial small NOR in the other homologue of the same chromosomal pair. Note the similarity to the NOR pattern shown in Figure 5G after silver impregnation. Bar=5 µm.

Figure 7. NOR-bearing pair 9 of *P. cuvieri* from Urbano Santos (MA) submitted sequentially to C-banding and to the Ag-NOR method. Note that the same regions were detected by both methods. Bar=5 μ m.

Figure 8. **A.** Metaphase of specimen BC 92.14 of *P. cuvieri* from São Pedro da Água Branca (MA) after conventional Giemsa staining. The arrowheads indicate secondary constrictions and the inset shows heteromorphic pairs 4 and 8 of specimen MNRJ 24255. **B-C.** Metaphase of specimen MNRJ 24255 submitted sequentially to C-banding (**B**) and Ag-NOR staining (**C**). In **B**, the arrows indicate the C-bands adjacent (pair 8) or coincident (pair 9) with the NORs. **D.** NOR-bearing chromosomes of specimen MNRJ 24261. Bar=5 μ m.

Figure 9. NOR-bearing chromosomes in different cells of the same specimen of *P. cuvieri* from Uberlândia (MG) subjected to Ag-NOR staining (**A**) and FISH with an rDNA probe (**B**, **C**). Variations in NOR size were detected by both techniques. **C.** The karyotype of ZUEC 13368 after FISH with an rDNA probe. Note the interesting mark in the short arm of one chromosome of pair 3 and in only one of the homologues of pair 8. Bar=5 μ m.

Figure 10. Metaphases of *P. cuvieri* from Palmeiras (BA) after Ag-NOR staining (**A**) and FISH with an rDNA probe (**B**). Bar=5 μ m.

Figure 11. Metaphases of specimens from Porto Nacional (TO) after Ag-NOR staining (**A**, **C**, **E**), FISH with an rDNA probe (**B**, **D**) and C-banding (**F**). The NORs were indicated by arrows in A-E. The arrowheads point non-specific sites detected by Ag-NOR staining (A, C, E) and FISH (B, C), found only in some metaphases. The metaphases in D, E and F were of the same specimen. Note that the non-specific regions detected in A-E were also C-banded (arrowheads in F). Bar=5 μ m.

Table 1. Localities of the collections, total number of specimens analyzed and the NOR pattern in each *P. cuvieri* population. **DB** - Diego Baldo collection, **MNRJ** - National Museum of Rio de Janeiro and **ZUEC** - Zoology Museum of the State University of Campinas. int = interstitial; p = short arm; per = pericentromeric; q = long arm; ter = terminal.

Localities	Total number of specimens	NOR locations	Biome
Urbano Santos (MA)	7 ♂ and 1 ♀ (ZUEC 13092-13095, 13098, 13103, 13106, 11939)	8q int 8q int / 9q int 9q int	Cerrado
São Pedro (MA)	7 ♂ (MNRJ 24255*, 24256, 24259, 24261, 24266, BC 92.13, BC 92.14)	7q int 7q int / 8q int 8q int / 9q int 9q int *	Amazonia
Crateús (CE)	4 ♂ and 1 ♀ (ZUEC 13079, 13081, 13085, 13088, 13089)	8q int 8q int / 9q int 9q int	Caatinga
Uberlândia (MG)	5 ♂ (ZUEC 13366-13370)	8q int 8q int **	Cerrado
Palmeiras (BA)	4 ♂ and 1 ♀ (ZUEC 13670-13674)	8 q int 8q int	Caatinga
Porto Nacional (TO)	8 ♂ (ZUEC 13374, 13376, 13378, 13379, 13355-13357, 13359)	See on the text	Cerrado
Fachinal, Misiones	5 ♂ (DB 3049, 5200, 3705, 4192, 5199)	11p ter 11 p ter ***	Atlantic Rain Forest
Iguazú, Misiones	2 ♂ and 1 ♀ (DB 4014, 4153, 5183)	11p ter 11 ter ***	Atlantic Rain Forest
Andresito, Misiones	1 ♂ (DB 3247)	11p ter 11p ter	Atlantic Rain Forest

* Except for **MNRJ** 24255 that did not have an NOR on chromosome 8.

** Except for some metaphases of **ZUEC** 13368 (see text).

*** Some specimens had additional NORs



Figure 1

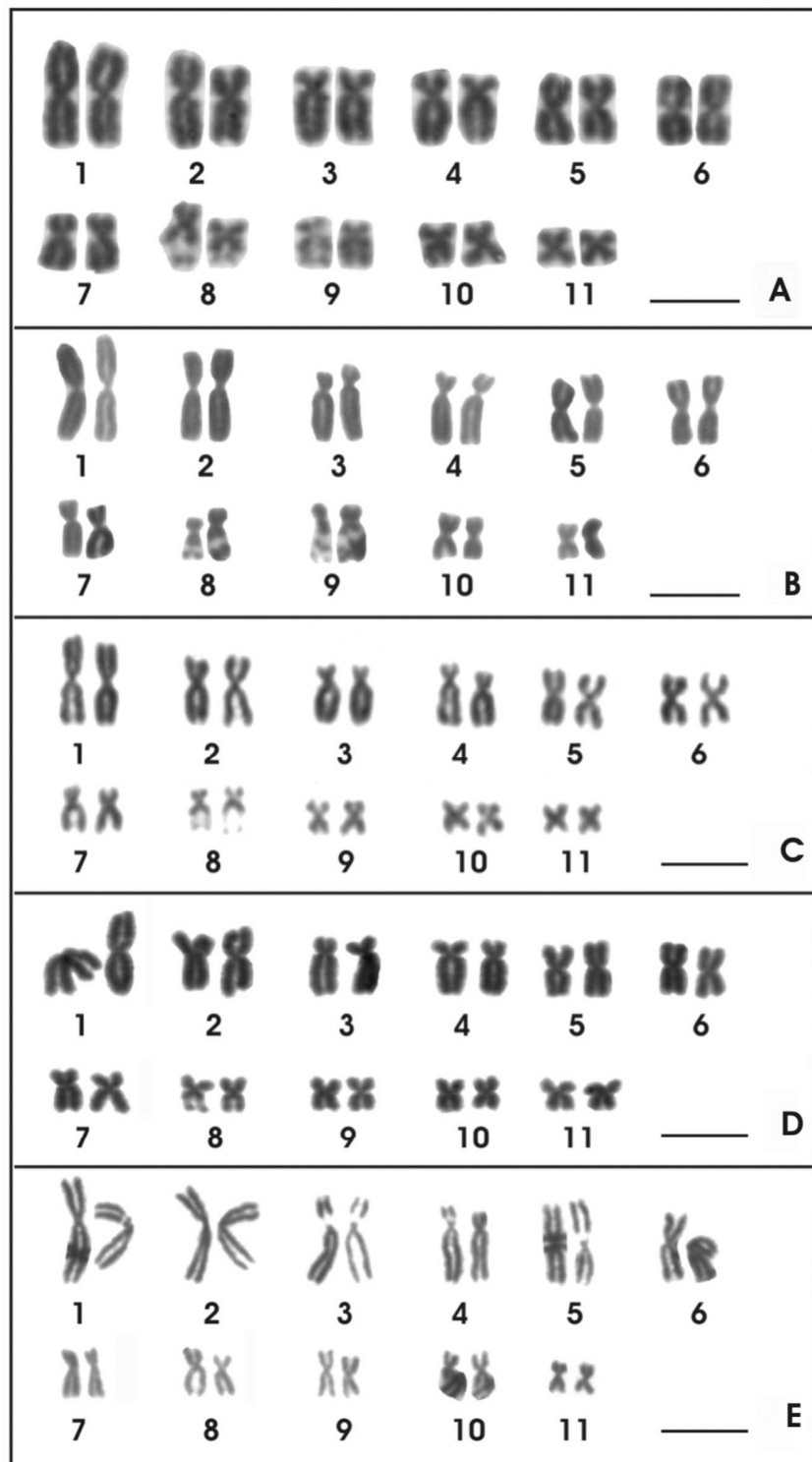


Figure 2

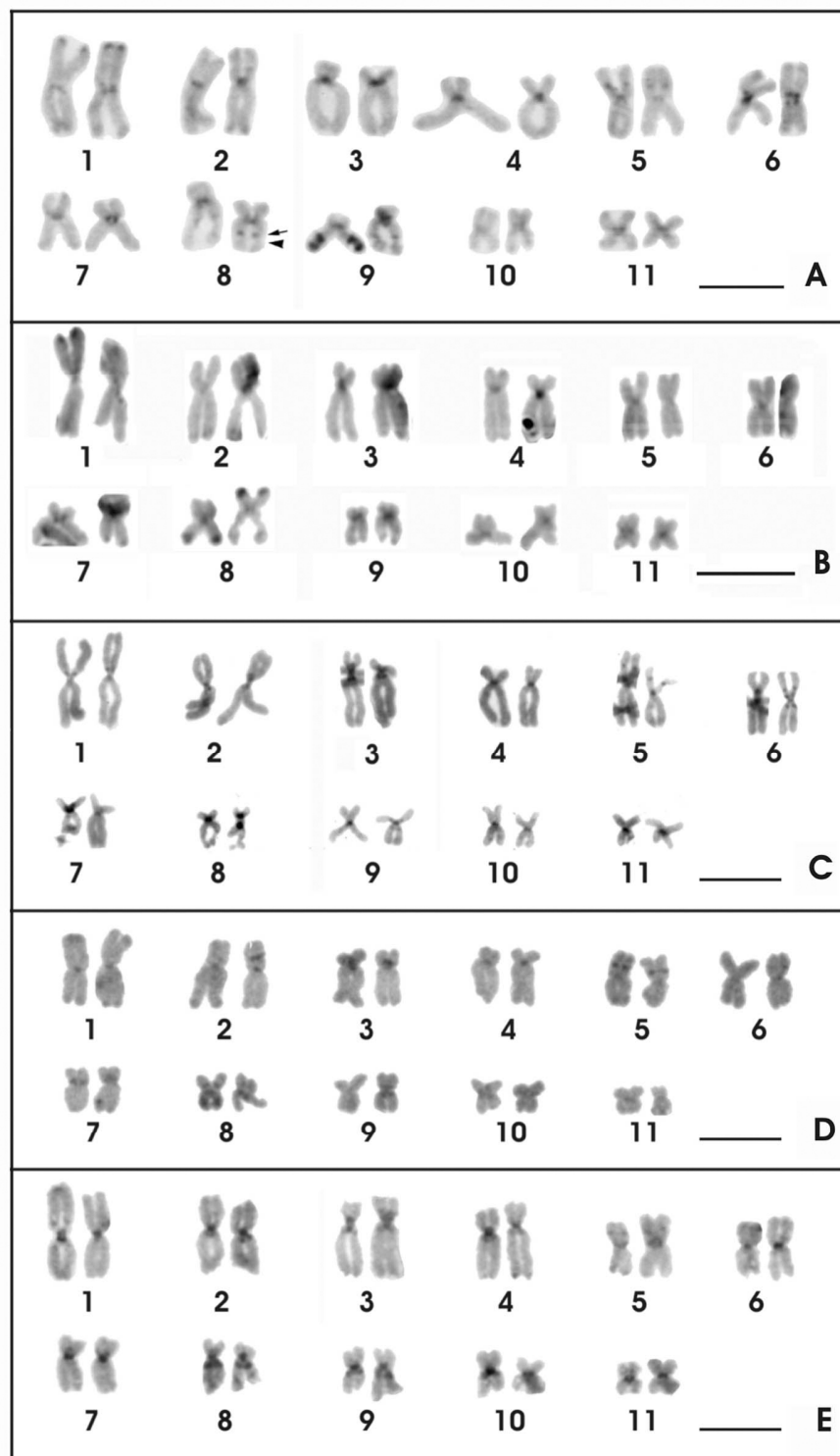


Figure 3

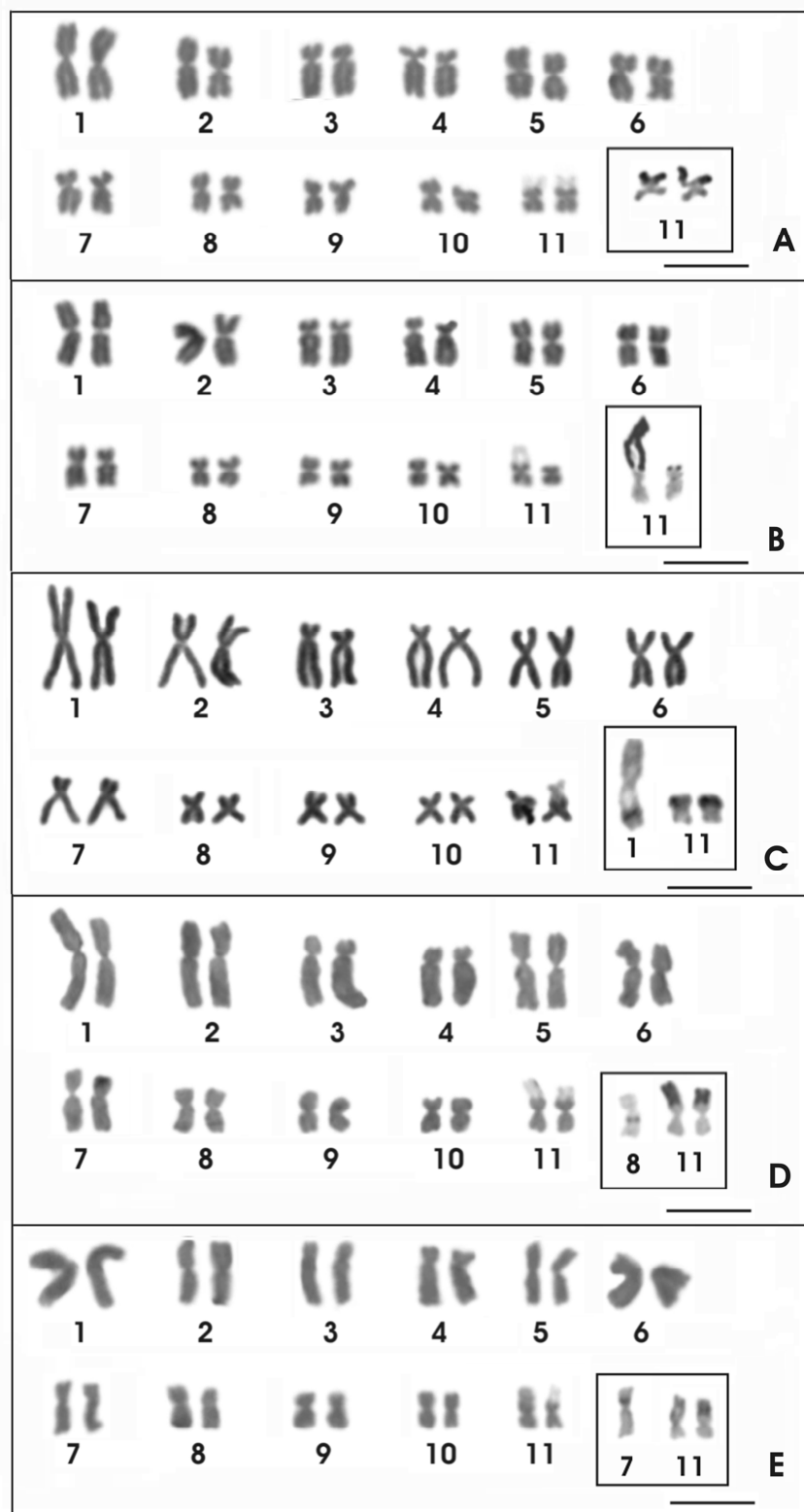


Figure 4

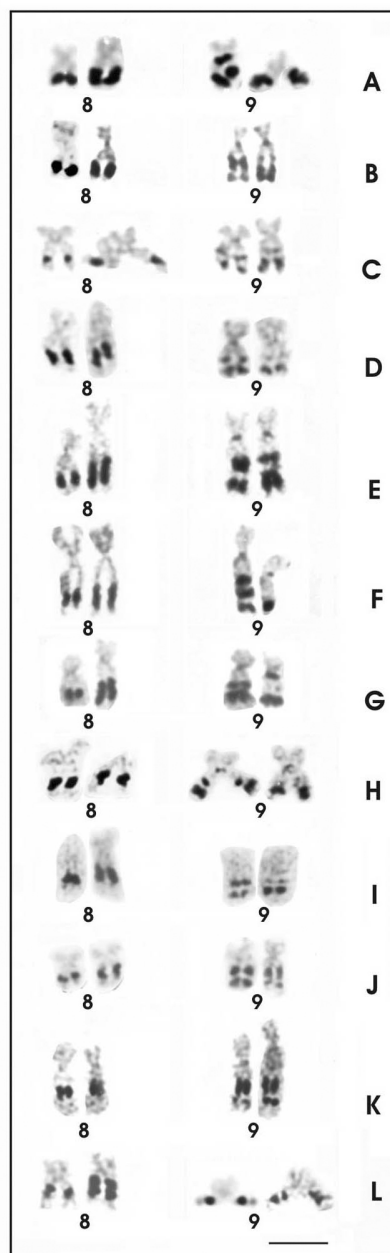
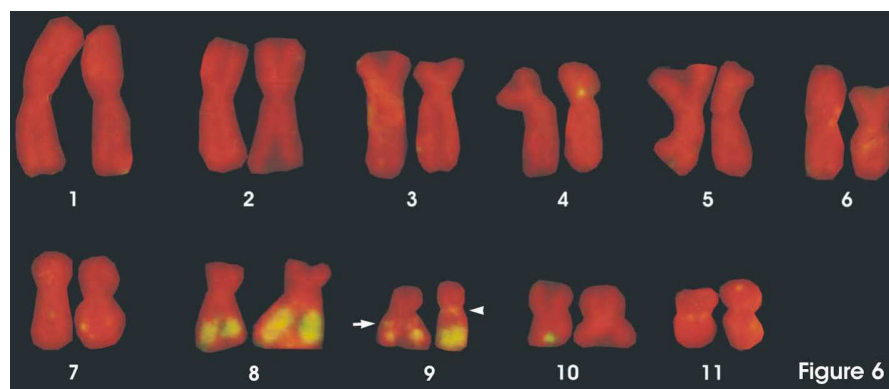


Figure 5



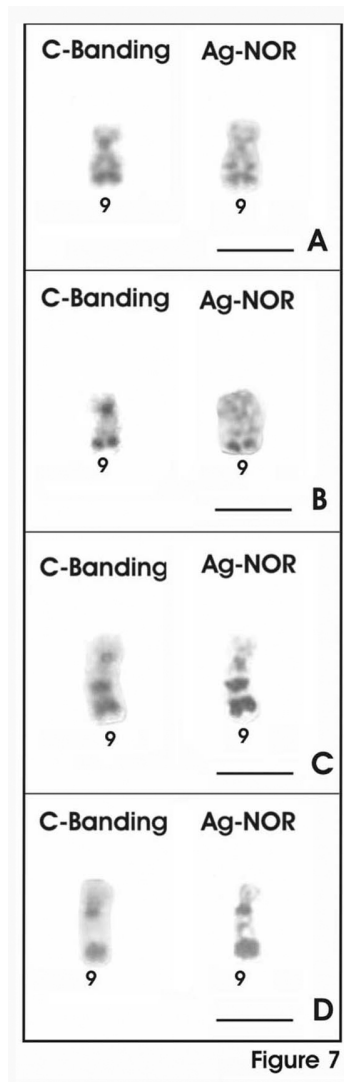


Figure 7



Figure 8

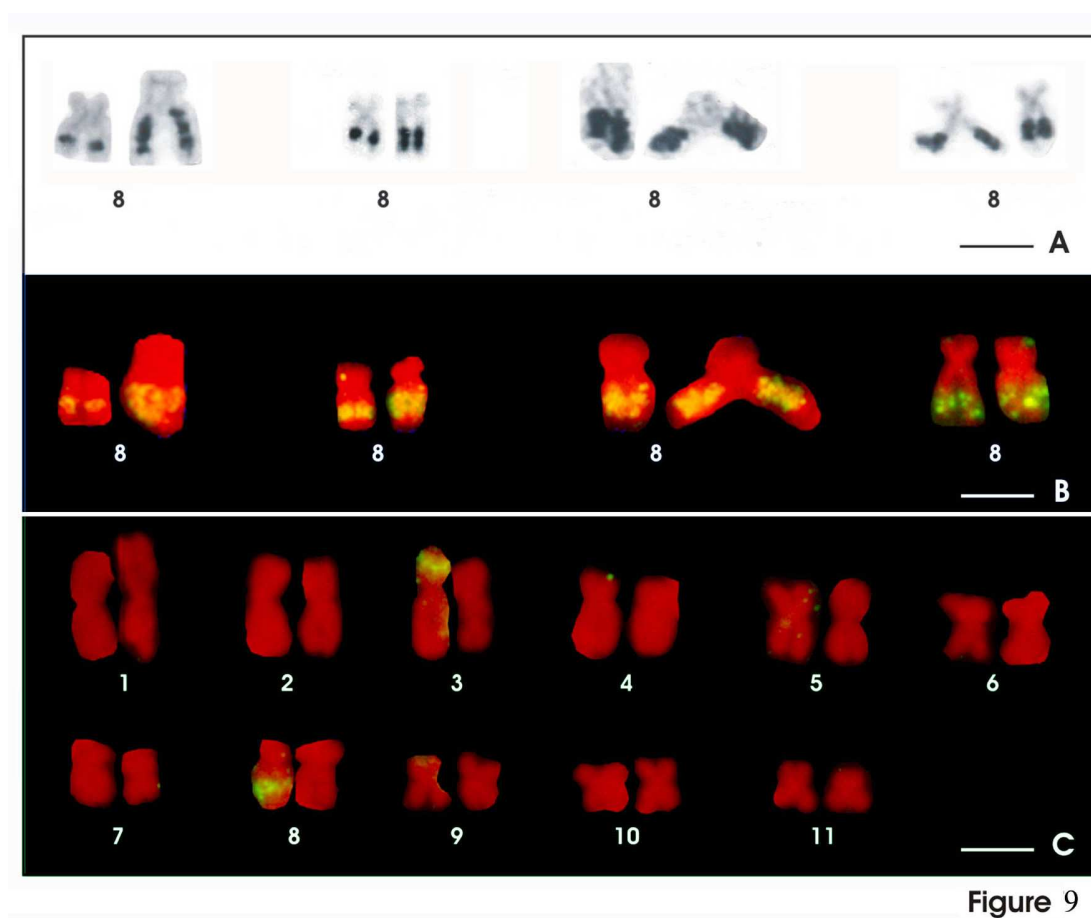


Figure 9

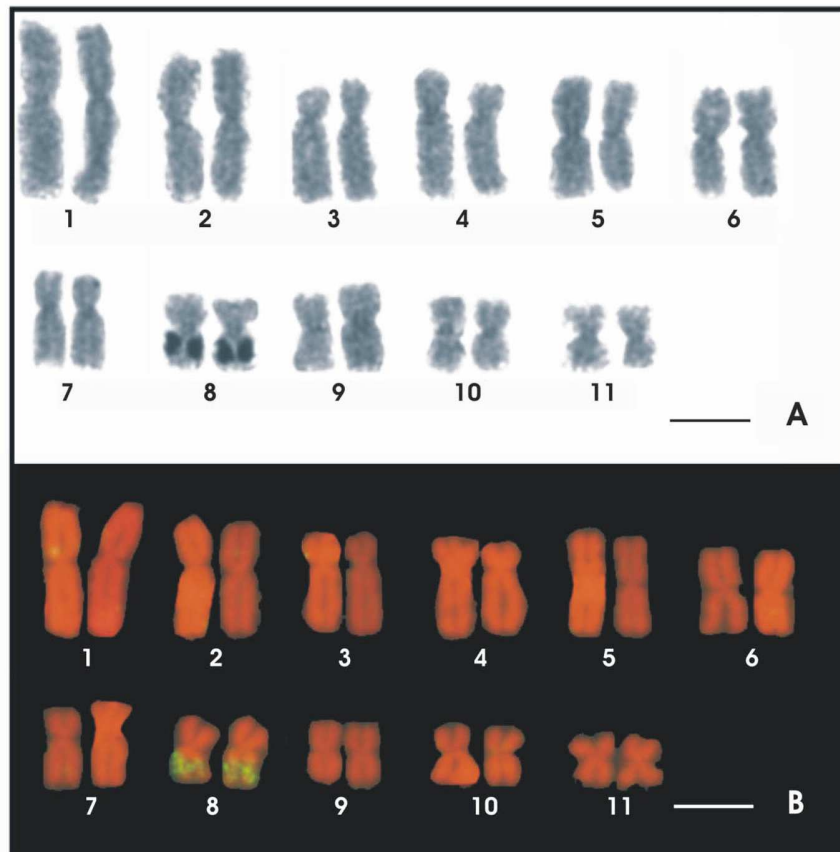


Figure 10

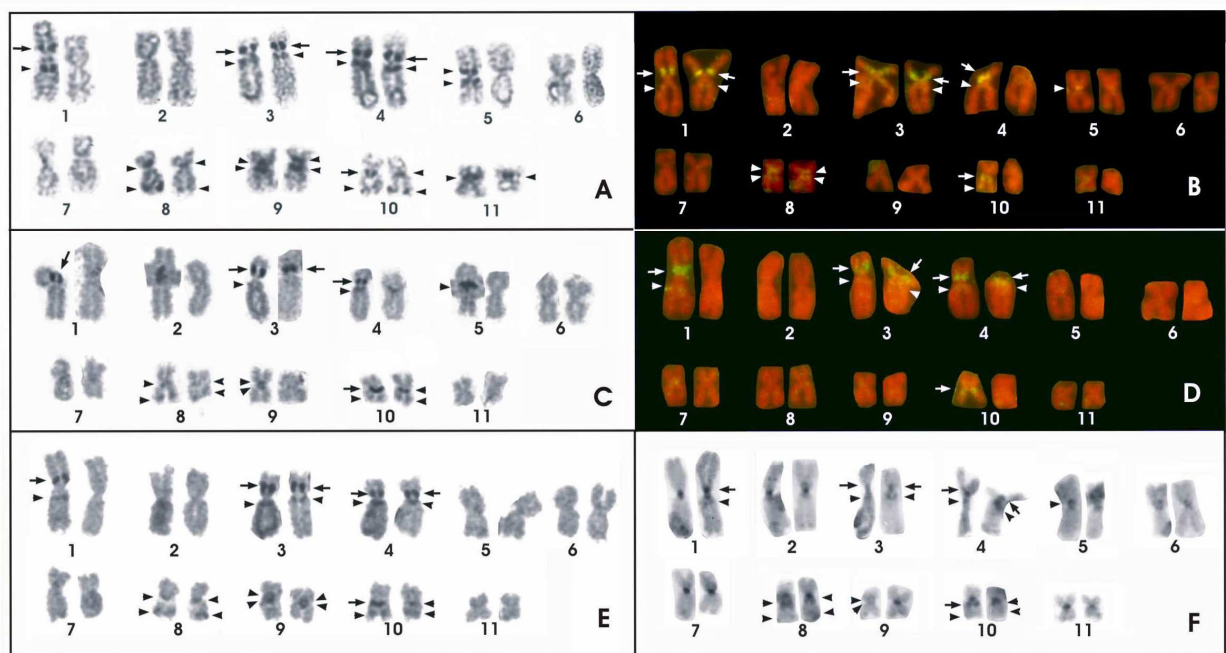


Figura 11

V-Artigo 2

Cytogenetics of species of *Physalaemus cuvieri* group (Anura, Leiuperidae), with the description of an intriguing heteromorphism in *P. ephippifer*

Yeda Rumi Serra Douglas Quinderé¹, Luciana Bolsoni Lourenço^{1*}, Cristian Tomatis², Diego Baldo², Stenio Eder Vittorazzi¹, Janaína Ferreria Lima³, Shirlei Maria Recco-Pimentel¹

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 13083-863, Campinas, São Paulo, Brazil.

²Laboratorio de Genética Evolutiva y Molecular, Universidad Nacional de Misiones, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

³ Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65080-040 São Luís, Maranhão, Brazil.

*Corresponding author (bolsoni@unicamp.br)

Abstract

The *Physalaemus cuvieri* group is widely geographically distributed and is currently the second greatest group in the genus, with nine species included. Some of these species are highly polymorphic and concomitantly several morphological characteristics are very similar among them. Therefore it is very difficult to distinguish some species based exclusively on morphologic data. Since the only karyotype analyzed in detail in this group was that of *P. cuvieri*, in this paper we provide a cytogenetic analysis of *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cuqui*, and *P. ephippifer* by Giemsa staining, Ag-NOR impregnation, C-banding and *in situ* hybridization with rDNA probe. Except for *P. cuqui*, all species analysis included C-banded karyotype description. The interstitial C-band visualized in the short arm of chromosome 5 in *P. cuvieri* was also detected in all the C-banded karyotypes described here, although in *P. albonotatus* this chromosome were classified as chromosome 3. The localization of the NOR varied among the species and was very important to differ them from each other and from *P. cuvieri*. In *Physalaemus ephippifer* an interesting heteromorphism in NOR and heterochromatin occurrence between the homologues of pair 8 was exclusively found in females. This finding suggests that pair 8 could be sex chromosomes, then characterizing the presence of the chromosomal system of sexual determination ZZ ♂/ ZW ♀ in this species. However future studies must be conducted in order to confirm this hypothesis.

Introduction

Currently the genus *Physalaemus* (Anura, Leiuperidae) is composed by 41 species (Frost, 2007) distributed in seven groups: “albifrons”, “cuvieri”, “deimaticus”, “gracilis”, “henselii”, “olfersii” and “signifer” (Nascimento et al., 2005). According to the recent taxonomic revision of Nascimento et al. (2005), nine species are allocated in *P. cuvieri* group and now it is the second greatest group of the genus. It comprises *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cicada*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. erikae*, *P. fischeri* and *P. kroyeri*, and is widely distributed in southern to northern South America, at the east of the Andes from Argentina to Venezuela, in the open formations of Cerrado, Caatinga, Chaco and Llanos Domains (Nascimento et al., 2005).

Some of the species in *P. cuvieri* group are sibling species and intraspecific morphologic variations have been found in this group. Therefore it is very difficult to recognize some of the species based exclusively on morphology. Misunderstandings sometimes occur, for example, with regards to *P. cuvieri*, *P. albonotatus* and *P. centralis* (Barrio et al., 1965).

Cytogenetic analyses have provided important data for taxonomic studies and phylogenetic inferences (e.g. Vences et al., 2000, 2002; Beçak and Kobashi, 2004). Some *Physalaemus* species were already studied cytogenetically and showed similar karyotypes with regards to chromosomal morphologies, but several interspecific and also intraspecific variability were detected by silver staining and C-banding (Amaral et al., 2000; Silva et al., 1999, 2000; Quinderé et al., manuscript in preparation). Among the nine species of *P. cuvieri* group, three had their karyotypes described by conventional staining with Giemsa, *P. centralis* (Denaro, 1972), *P. cicada* and *P. kroyeri* (De Lucca et al., 1974). *Physalaemus cuvieri* is the only species that had a detailed cytogenetic characterization (Silva et al., 1999, Quinderé et al., manuscript in preparation). Therefore in the present study we provide additional information regarding *P. centralis* karyotype and also a detailed cytogenetic characterization of *P. albonotatus*, *P. cuqui* and *P. ephippifer*, in order to help in the characterization of these species, frequently involved in taxonomic misunderstandings.

Materials and Methods

Animals

Specimens of *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cuqui* and *P. ephippifer* from different localities of Brazil and Argentina were used (Table I). The specimens of *P. centralis* and *P. ephippifer* were deposited in the Museu de História Natural, “Adão José Cardoso” (ZUEC) Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil, *P. albonotatus* specimens from Brazil were deposited in the Museu da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brazil and *P. cuqui* and *P. albonotatus* specimens from Argentina were deposited in the Diego Baldo (DB) collection in Museo de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Chromosomal preparations

Metaphases were obtained from suspension of intestinal and testis cells from animals treated with colchicine (2%) for at least 4 hours (Schmid, 1978; Schmid et al., 1979). Chromosomes were stained conventionally with 10% Giemsa solution and submitted to C-banding technique (King, 1980), Ag-NOR method (Howell & Black, 1980) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Viegas-Péquinot, 1992) using the rDNA probes HM 123 (Meunier-Rotival et al., 1979).

Results

All species had 22 chromosomes in the diploid complement and their karyotypes are described below.

Physalaemus albonotatus

The chromosomes were classified as metacentric (1, 2, 3, 6, 9, 10 and 11) or submetacentric (4, 5, 7 and 8) (Fig. 1A). Silver staining detected the NOR in the long arm

of pair 8, adjacent to a C-band, and in both arms of pair 9, coincidently with C-banded regions in the Brazilian population (Fig.3A). Heterochromatin was also interstitially detected in pairs 2 and 3, in the telomeric regions of pairs 1 and 9, and in the centromeres of all chromosomes (Fig. 2A).

In the Argentinian specimens one of the homologues of pair 9 did not show the NOR in the short arm after silver staining (Fig.3B).

Physalaemus centralis

The chromosomes were classified as metacentric (1, 2, 5, 6, 9, 10 and 11) and submetacentric (3, 4, 7 and 8) (Fig. 1B). A secondary constriction was detected at the pericentromeric region of pair 9 and coincided with the NOR detected by silver impregnation (Fig. 3C). Blocks of C-banded heterochromatin were detected interstitially in pair 9, adjacent of the NOR region (Fig. 3C) and in pairs 2, 5, 8 and 9, in pericentromeric region of pairs 3 and 10, and in all the centromeres. A size heteromorphism was detected with regards to the interstitial band in pair 8 in three individuals (Fig. 2B), what responded to the different morphology of the homologues of this pair (Figs 1B and 2B). In the specimen ZUEC 13696, a heteromorphic pair 2 was observed, in which one of the homologues showed a dark terminal and a faint interstitial C-band in the long arm (Fig.2B).

Physalaemus cuqui

The chromosomes were classified as metacentric (1, 2, 3, 6, 8, 9, 10 and 11) and submetacentric (4, 5 and 7) (Fig. 1C). The NORs were located at the telomeric regions of both arms of pair 8 and in the short arm of pair 9 (Fig. 3D).

Physalaemus ephippifer

The chromosome pairs 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10 and 11 were metacentric and pairs 3, 4 and 7 were submetacentric (Fig.1D). In seven of the eight males analyzed the NOR was terminally located in 8q (Fig. 4B), while in the male ZUEC 13710 the long arm of pair 8 chromosomes showed a smaller NOR, apparently in a more interstitial region. Also in this male, an additional NOR was found terminally in the long arm of one homologue 9 (Fig.

5). Meiotic chromosomes of this male after *in situ* hybridization with rDNA probe showed a bivalent with two NOR sites and another with just one large NOR (Fig. 5B).

The 14 females analyzed showed the NOR at the eighth pair but always in a heteromorphic condition. One homologue 8 (morph 8a) had the NOR terminally located in the long arm, as the chromosome 8 of males, whereas the other homologue 8 (morph 8b) had NOR sites in both chromosome arms, coincidentally with faint C-bands (Figs. 4A and 4B). FISH technique with rDNA probe marked the same regions detected by silver staining (Fig. 4C). The morph 8 exclusively found in females had also pericentromeric C-bands not detectable in its homologue, that in its turn showed an interstitial C-band in its short arm (Fig. 2C).

Besides the C-bands mentioned above, centromeric heterochromatin was detected in all of the chromosomes and non-centromeric heterochromatic blocks were found interstitially regions in 5p and near the centromere in the short arm of chromosomes 3, 6, 7 and 10, and in the long arm of chromosome pair 9 (Fig. 2C).

Discussion

Interspecific relationships

In general, the species of the genus *Physalaemus* exhibit very similar chromosome morphologies (see Beçak et al., 1970; Denaro et al., 1972; De Lucca et al., 1974; Amaral et al., 2000; Silva et al., 1999, 2000). However, the karyotypes of *P. albonotatus* and *P. cuqui* showed the most different arrangement of pairs 3-5 when compared with the other species. Considering the species analyzed here, chromosome pairs 3-5 of *P. albonotatus* and *P. cuqui* can be considered homeologous respectively to pairs 5, 3 and 4 of the remaining karyotypes.

An interesting feature shared by all the C-banded karyotypes analyzed here and also by *P. cuvieri* karyotype (Silva et al., 1999; Quinderé et al., manuscript in preparation) was one interstitial heterochromatic block of the short arm of a medium sized metacentric chromosome identified as 3 in *P. albonotatus* and 5 in the remaining C-banded species.

This band was not detected in other species groups of *Physalaemus* (Amaral et al., 2000; Silva et al., 2000), therefore it could be a cytogenetic marker for *P. cuvieri* group.

A small pericentromeric C-band of the short arm of pair 3 found in *P. cuvieri* (Quinderé *et al*, manuscript in preparation) was also detectable in *P. centralis*, *P. ephippifer*, and in the homeologous pair 5 of *P. albonotatus*. Although in *P. ephippifer* it was easily seen, this band was not as bigger as that found in *P. biligonigerus* and *P. marmoratus* (Amaral et al., 2000), currently allocated in *P. albifrons* group. In addition it is interesting to note that a large C-band was also present in chromosome 3 of *Eupemphix nattereri* (Lourenço et al., 2006), previously included in *Physalaemus biligonigerus* group by Lynch (1970) together with *P. biligonigerus* and *P. marmoratus*. Since a phylogenetic study of the genera *Physalaemus* and *Eupemphix* is not yet available, it is difficult to access the evolutionary origin and divergence of this heterochromatic block.

C-banding technique was also able to detect an interstitial C-band near the centromere in the long arm of chromosome 2 in *P. centralis* and *P. albonotatus*, not found in the other C-banded karyotypes of *P. cuvieri* group, i. e. *P. cuvieri* (Quinderé et al., manuscript in preparation) and *P. ephippifer*.

Although there are similarities in chromosome morphologies among the species of *P. cuvieri* group, what allow interspecific comparisons, pairs 8 and 9 greatly differ. It probably arose from the distinct locations of the NOR in these karyotypes, since these rDNA genes occupy different sites in pairs 8 and/or 9 in these species. Such a variation prevents a proper recognition of interspecific chromosome homeologies and consequently the rearrangements that involved the NOR during the differentiation of the species. Even though, the pattern of NOR occurrence can help in distinguishing the species in *P. cuvieri* group cytogenetically analyzed to date (present data; Silva et al., 1999, Quinderé et al., manuscript in preparation). However it is interesting to note that NOR-bearing pair 8 of *P. albonotatus* and of *P. cuvieri* (Silva et al., 1999, Quinderé et al., manuscript in preparation) are very similar and probably homeologous.

Heteromorphism in Physalaemus ephippifer

All the fourteen females of *P. ephippifer* analyzed showed a heteromorphic pair 8 regarding the NOR occurrence and also C-band distribution. Such characteristic was not found in the eight males analyzed, in which NOR-bearing pair 8 was homomorphic. These findings suggest that this chromosome pair can be related to sex determination, then characterizing the presence of the chromosomal system of sexual determination ZZ♂/ZW♀ in *P. ephippifer*.

Several of the heteromorphic sex chromosomes described in Anura show heteromorphism in size and morphology of the homologues and/or differential presence of heterochromatin (see Schmid et al., 1991, for references; Cuevas and Formas, 1996; Schmid et al., 2002, Green, 2002). However, in some cases the NOR was the only distinctive marker between sex chromosomes (Schmid et al., 1993; Schmid and Steinlein, 2001) and in other the sex chromosomes can only be distinguished by differential replication patterns (Schempp and Schmid, 1981). Anyway, heteromorphic sex chromosomes are rarely found in Anura and different chromosomal systems of sex determination are present in this group (see review by Schmid et al., 1991 and Schmid and Steinlein, 2001).

If pair 8 of *P. ephippifer* really constitutes another example of heteromorphic sex chromosomes, its differentiation can be deduced as a recent evolutive event, since sex chromosomes could not be recognized in other species of *Physalaemus* (Silva et al., 1999, 2000; Amaral et al., 2000). However, we do not get rid of the possibility that such heteromorphism constitutes an intraspecific variation exclusively found in females, but not related to sex determination. Future analyses with a larger sample are necessary to a proper interpretation of these data.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Denise de Cerqueira Rossa Feres for the help with the fieldwork. This work was supported by the Brazilian agencies The Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). All the specimens from Brazil were collected under a permit issued by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Proc. No. 02010.002895/03-84).

References

- Amaral, M.J.L.V., Cardoso, A.J., Recco-Pimentel, S.M., 2000. Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). *Caryologia* 53:283-288.
- Barrio, A., 1965. El género *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. *Physis* 25:421-448.
- Beçak, M.L., Denaro, L., Beçak, W., 1970. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics* 9:225-238.
- Beçak, M.L., Kobashi, L.S., 2004. Evolution by polyploidy and gene regulation in Anura. *Genet. Mol. Res.* 3:195-212.
- Cuevas, C.C., Formas, J.R., 1996. Heteromorphic sex chromosomes in *Eupsophus insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Chromosome Res.* 4:467-470.
- De Lucca, E.J., 1974. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia*, 27:183-191.
- Denaro, L., 1972. Karyotypes of Leptodactylidae Anurans. *J. Herpetol.* 6:71-74.
- Frost, D.R., 2007. Amphibians species of the world: an online reference. V5.0 (February 1, 2007) Electronic database available at: <http://research.amhn.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Green, D.M., 2002. Chromosome Polymorphism in Archey's frog (*Leiopelma archeyi*) from New Zealand. *Copeia* 1:204-207.
- 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.
- King, M., 1980. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80:191-217.
- Lourenço, L.B., Nascimento, J.A.A., Andrade, G.V., 2006. Chromosomal analyses of the leptodactylids *Pleurodema diplolistris* and *Physalaemus nattereri* (Amphibia, Anura). *Amphibia-Reptilia* 27:481-489.
- Lynch, J.D., 1970. Systematic status of the american leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix*, and *Physalaemus*. *Copeia* 1970:488-496.
- Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Macaya, G., Bernardi, G., 1979. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 6:2109-2123.

- Nascimento, L.B., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., 2005. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro 63:297-320.
- Schempp, W., Schmid, M., 1981. Chromosome banding in Amphibia. Chromosoma 83:697-710.
- Schmid, M., 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66:361-388.
- Schimid, M., Olert J., Klett C., 1979. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. Chromosoma 71:29-55.
- Schmid, M., Nanda, I., Steinlein, C., Kausch, K., Haaf, T., Epplen, J., 1991. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. In Amphibian Cytogenetics and Evolution (D.M. Green and S.K. Sessions, eds.). Academic Press, San Diego pp. 393-430.
- Schmid, M., Ohta S., Steinlein, C., Guttenbach, M., 1993. Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). Cytogenet. Cell Genet. 62:238-246.
- Schmid, M., Steinlein C., 2001. Sex chromosomes, sex-linked genes, and sex determination in the vertebrate class Amphibia, in Scherer G., Schmid M. (eds): Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination. 143-176.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Steinlein, C., Nanda, I., Mais, C., Haaf T., Garcia, R.V., Badillo, A.F., 2002. Chromosome banding in Amphibia XXII. Atypical Y chromosomes in *Gastrotheca walkeri* and *Gastrotheca ovifera* (Anura, Hylidae). Cytogenet. Genome Res. 96:228-238.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Kasahara, S., 1999. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hereditas 131:135-141.
- Silva, A.P.Z., Baldissera-Jr, F.A., Haddad, C.F.B., Kasahara, S., 2000. Karyotypes and nucleolus organizer regions of the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). Iheringia, Sér. Zool. 88:159-164.

- Vences, M., Wanke, S., Odierna, G., Kosuch, J., Veith, M., 2000. Molecular and karyological data on the South Asian ranid genera *Indirina*, *Nyctibatrachus* and *Nanophrys* (Anura, Ranidae). *Hamadryad* 25:75-82.
- Vences, M., Aprea, G., Capriglione, T., Andreone, F., Odierna, G., 2002. Ancient tetraploidy and slow molecular evolution in Scaphiophryne: ecological correlates of speciation mode in Malagasy relict amphibians. *Chromosome Res.* 10:127-136.
- Viegas-Pequignot, E., 1992. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. (ed) *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford University Press-IRL Press, Oxford, pp.137-158.

Legends

Figure 1. Giemsa-stained karyotypes of *P. albonotatus* from Argentina (**A**), *P. centralis* (**B**), *P. cuqui* (**C**) and a female of *P. ephippifer* (**D**). Arrows point the NOR secondary constrictions. Bar=5µm.

Figure 2. C-banded karyotypes of *P. albonotatus* from Brazil (**A**), *P. centralis* (**B**) and a female of *P. ephippifer*. The insets in B show a heteromorphic pair 2 and a homomorphic pair 8. Bar=5µm.

Figure 3. NOR-bearing chromosome of *P. albonotatus* from Brazil (**A**), *P. albonotatus* from Argentina (**B**), *P. centralis* (**C**) and *P. cuqui* (**D**) submitted sequentially to C-banding and to silver staining (**A** and **C**) or after silver staining (**B** and **D**). Note the C-band adjacent to the NOR in pair 8 and that coincident with the NOR in pair 9 in *P. albonotatus* (**A**), and the C-bands adjacent to the NOR in pair 9 of *P. centralis* (**C**). Bar=5µm.

Figure 4. Pair 8 of one female (**A**) and one male (**B**) of *P. ephippifer* after Giemsa staining, C-banding and silver staining. In **C**, a metaphase from a female of *P. ephippifer* after *in situ* hybridization with rDNA probe. Bar=5µm.

Figure 5. Mitotic metaphase after silver staining (**A**) and meiotic bivalents hybridized with rDNA probe (**B**) of one male (ZUEC 13710) of *P. ephippifer*. Note the additional NOR in one homologue of pair 9 besides the NOR-bearing pair 8. Bar=5µm.

Table I. Locality and number of specimens analyzed and NOR pattern in each population. Collection number of the voucher specimens are shown. Abbreviations: BC: Departamento de Biologia Celular da Unicamp, Campinas, SP, Brazil; DB: Diego Baldo collection, deposited in Museo De La Plata in Buenos Aires, Argentina; MNRJ: Museu Nacional do Rio de Janeiro, RJ, Brazil; UFMT: Universidade Federal do Mato Grosso, MT, Brazil; ZUEC: Museu de História Natural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Species	Locality	Specimens	NOR locations
<i>P. centralis</i>	Palestina (SP)	5 ♂ (ZUEC 13689, 13690, 13692, 13694, 13696)	9q int 9q int
	Porto Nacional (TO)	3 ♂ (ZUEC 13373, 13375, 13380)	9q int 9q int
<i>P. ephippifer</i>	Belém (PA)	8 ♂ (ZUEC 13703, 13708-13710, 13733, 13738-13740)	♂ 8q ter 8q ter *
		14 ♀ (ZUEC 13704-13707, 13711, 13728-13732, 13735-13737, 13741)	♀ 8pq ter 8pq ter
<i>P. albonotatus</i>	Cárceres (MT)	7 ♂ (UFMT 4462, 4466, 4467, 4469-4472) and 1 ♀ (UFMT 4465)	8q int 8q int 9pq int 9pq int
	Misiones (Argentina)	2 ♂ (DB 3466, 3472) and 1 ♀ (DB 3072)	8q int 8q int 9pq int 9q int
	Corrientes (Argentina)	1 ♂ (DB 4236) and 2 ♀ (DB 4223, 4224)	8q int 8q int 9pq int 9q int
<i>P. cuqui</i>	Salta (Argentina)	1 juvenile (DB 4973) and 1 ♂ (DB 4803)	8pq ter 8pq int 9p ter 9p ter

* One male of *P. ephippifer* (ZUEC 13710) showed additional NOR in 9q int.

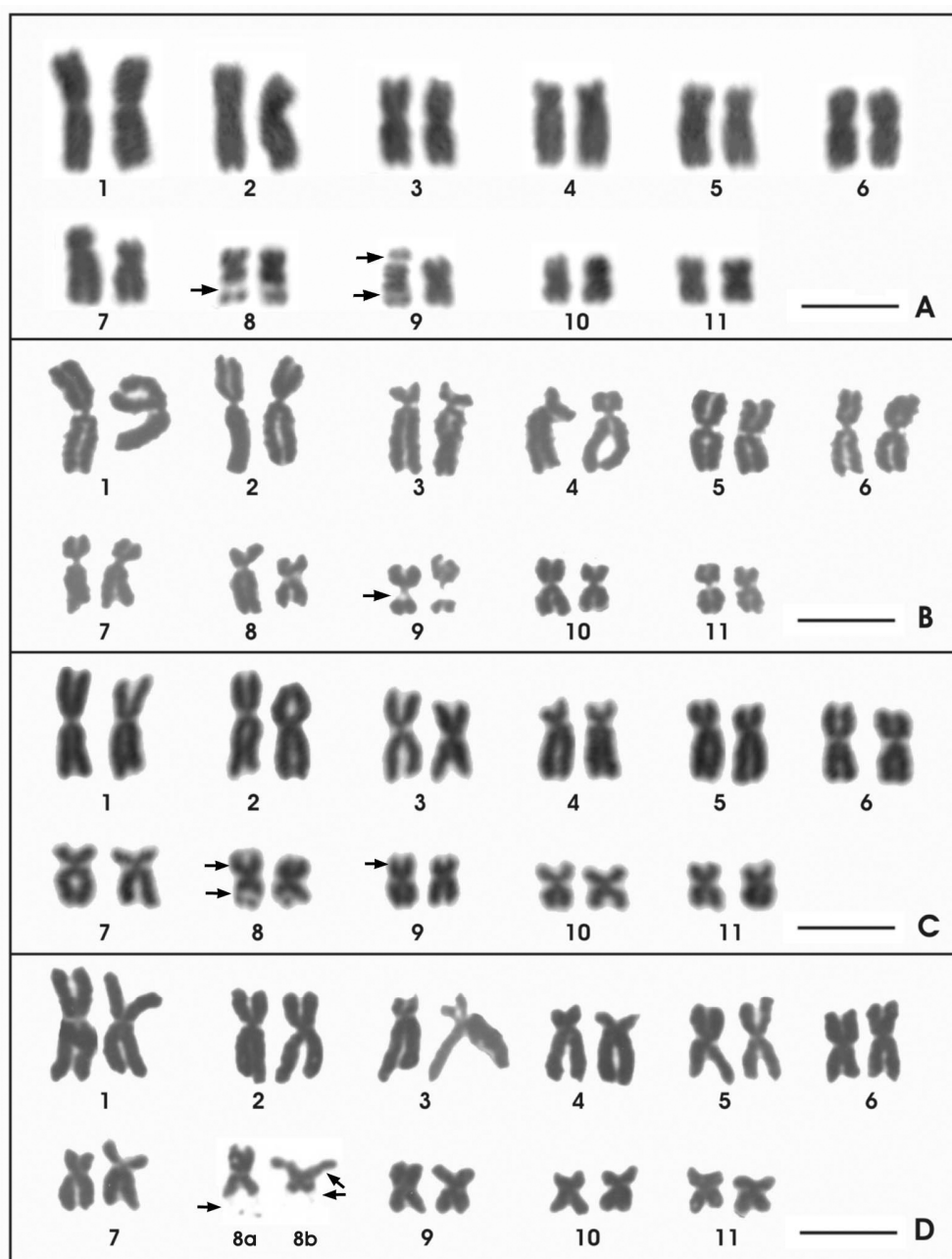


Figure 1

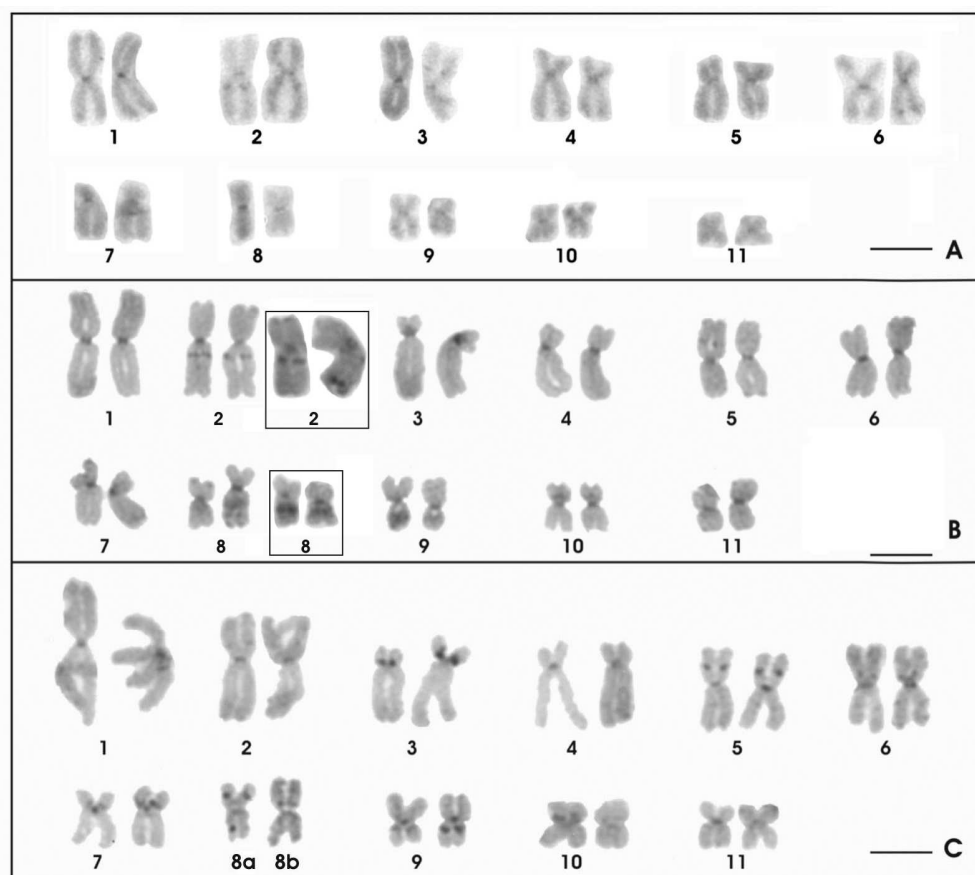
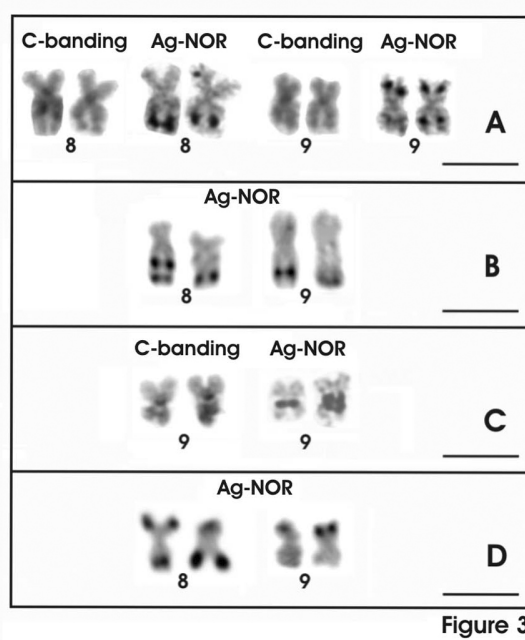


Figure 2



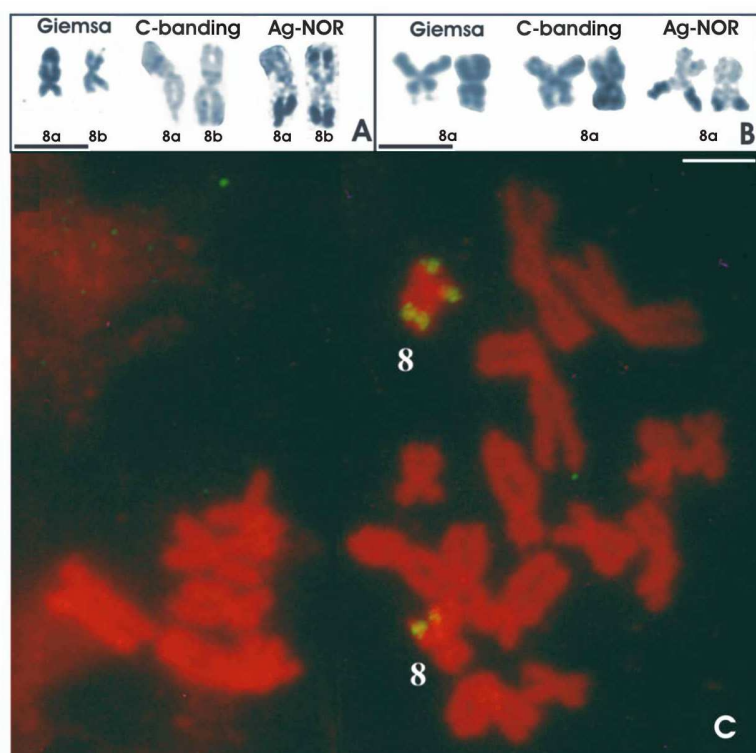


Figure 4

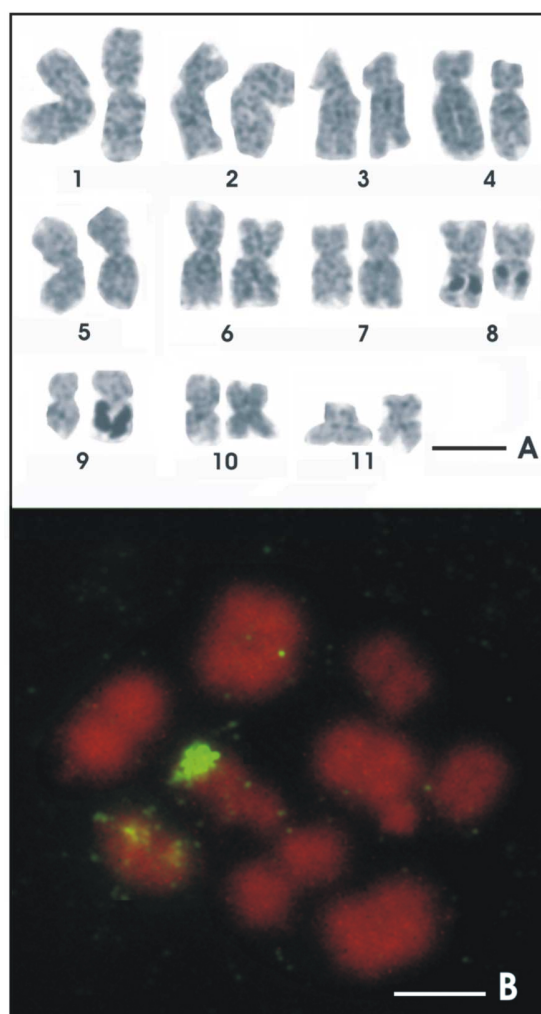


Figure 5

VI- Artigo 3 (Short Communication)

Caracterização cromossômica de *Physalaemus albifrons* e *P. santafecinus* (Anura, Leiuperidae)

Tomatis, C.¹; Quinderé, Y.R.S.D.²; Baldo, D.^{1*}; Lourenço L.B.²; Andrade G.V.³; Recco-Pimentel, S.M.²

¹Laboratorio de Genética Evolutiva y Molecular, Universidad Nacional de Misiones, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

²Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 13083-863, Campinas, São Paulo, Brazil.

³Departamento de Biologia, Centro de Ciências e Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65080-040 São Luis, Maranhão, Brazil.

*Corresponding author: diegobaldo@fceqyn.unam.edu.ar

Resumo

Dentro do gênero *Physalaemus* muitas espécies são consideradas morfologicamente polimórficas e muitas são confundidas taxonomicamente, como ocorre com as espécies do grupo de *Physalaemus albifrons*. Até recentemente a espécie *P. albifrons* era considerada pertencente ao grupo "cuvieri", no entanto atualmente está alocada no grupo "albifrons" juntamente com *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* e *P. santafecinus*. Na literatura, uma detalhada descrição cariotípica está disponível apenas para *P. biligonigerus* e *P. marmoratus*, enquanto o cariótipo de *P. albifrons* está descrito apenas com base em metáfases coradas com Giemsa e o cariótipo de *P. santafecinus* permanece desconhecido. No presente trabalho complementamos a descrição do cariótipo de *P. albifrons* com dados relativos à localização da NOR e descrevemos pela primeira vez o cariótipo de *P. santafecinus*. Morfologicamente o cariótipo de *P. santafecinus* é muito semelhante ao de *P. marmoratus* e, em especial, ao de *P. biligonigerus*. No entanto *P. santafecinus* aparentemente diferiu dessas espécies em relação à localização da NOR, que ocupa o par 9 em *P. biligonigerus* e *P. marmoratus* e o par 11 em *P. santafecinus*. Porém, como esses pares são morfologicamente muito semelhantes, não se descarta a possibilidade de serem homeólogos. O cariótipo de *Physalaemus albifrons* se assemelhou morfologicamente mais aos de espécies do grupo "cuvieri" do que aos cariótipos de *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* e *P. santafecinus*, já que o braço curto do par 3 de *P. albifrons* é relativamente menor do que o do cromossomo 3 dessas três espécies. Quanto à localização da NOR, o cariótipo de *P. albifrons* se assemelha ao encontrado em algumas populações de *P. cuvieri*, já que o par cromossômico 8 portador de NOR em *P. albifrons* é muito semelhante ao par 8 portador de NOR nessas populações de *P. cuvieri*.

Introdução

A família Leiuperidae comporta atualmente sete gêneros, *Edalorhina*, *Engystomops*, *Eupemphix*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola*, *Sumuncuria* e *Physalaemus*. Este último é o maior da família, com 41 espécies descritas (Frost, 2007) distribuídas em sete grupos (Nascimento et al., 2005). Segundo a recente revisão taxonômica realizada por Nascimento et al. (2005), o grupo de *Physalaemus cuvieri* deixa de alocar 20 espécies antes atribuídas a ele (Lynch, 1970). Dentre elas, encontra-se *P. albifrons*, que passa a compor o grupo “albifrons” juntamente com *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* (referido em alguns trabalhos como *P. fuscomaculatus* – ver Nascimento et al., 2006) e *P. santafecinus*, espécies antes alocadas no grupo “biligonigerus” junto com *Eupemphix nattereri*.

Uma característica bastante importante das espécies do grupo de *P. albifrons* é que todas são morfologicamente muito semelhantes a *P. biligonigerus* e, por isso, freqüentemente confundidas (Ceï, 1990; para outras referências ver Frost, 2007). Portanto, análises de dados de outras naturezas são essenciais para um melhor entendimento desse grupo.

Os cariótipos de *P. marmoratus* [espécie referida por Amaral et al. (2000) como *P. fuscomaculatus*] e de *P. biligonigerus* (Amaral et al., 2000, Silva et al., 2000) já foram detalhadamente caracterizados, enquanto para *P. albifrons* apenas o número e a morfologia dos cromossomos já foram descritos (Denaro et al., 1972). Provavelmente devido a dificuldades na identificação taxonômica dessas espécies, uma discordância pôde ser notada em relação à descrição cariotípica de *P. albifrons*. A mesma metáfase mitótica utilizada por Denaro et al. (1972) nessa descrição havia sido anteriormente apresentada por Beçak et al. (1970) como pertencente a *P. fuscomaculatus*, espécie hoje conhecida por *P. marmoratus*. Com base na posterior análise de *P. marmoratus*, Amaral et al. (2000) sugeriram que a metáfase em questão fosse de *P. albifrons*, já que diferenças quanto à morfologia cromossômica puderam ser notadas entre esse cariótipo e o de *P. marmoratus*. Ainda nesse trabalho, Amaral et al. (2000) descreveram diferenças citogenéticas em relação a uma banda heterocromática no braço curto do par cromossômico 3 entre *P. marmoratus* e *P. biligonigerus*, embora seus cariótipos sejam muito semelhantes.

Com o intuito de ampliar a análise citogenética das espécies do grupo “albifrons”, no presente trabalho complementamos a descrição cariótica de *P. albifrons*, fornecendo dados sobre a localização da NOR (região organizadora nucleolar) e descrevemos pela primeira vez o cariótipo de *P. santafecinus*.

Material e métodos

Animais

Oito espécimes de *Physalaemus albifrons* foram coletados em Barreirinhas (MA), com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Proc. No. 02010.002895/03-84). Depois de fixados, os exemplares foram depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil, sob os números **MNRJ** 24224, 24227 (única fêmea), 24228, 24230, 24232, e no Museu de História Natural “Adão José Cardoso” (ZUEC) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brasil, sob os números **ZUEC** 12361-12363.

Seis espécimes *Physalaemus santafecinus* foram coletados em Corrientes na Argentina e depositados na coleção “Diego Baldo” (**DB**) no Museu De La Plata em Buenos Aires na Argentina. Os números de registro desses indivíduos são **DB** 2776, 4309, 4331 (única fêmea), 5317-5319.

Preparações cromossômicas

As metáfases foram obtidas a partir de suspensão de células do epitélio intestinal e de testículos após tratamento dos espécimes com colchicina (2%) por pelo menos 4 horas (Schmid, 1978; Schmid et al., 1979). As preparações cromossômicas foram coradas com solução de Giemsa 10%, submetidas ao método Ag-NOR (Howell & Black, 1980) e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Viegas-Péquiot, 1992), utilizando como sonda o

plasmídeo recombinante HM 123, portador de uma fração do gene ribossomal 45S de *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival et al., 1979).

Resultados

O cariótipo de *Physalaemus albifrons* e o de *P. santafecinus* apresentam 22 cromossomos classificados em metacêntricos (1, 2, 5, 6, 9, 10, 11) e submetacêntricos (3, 4, 7, 8) (Fig 1). As NORs foram detectadas pelo método de impregnação por prata (Ag-NOR) no braço longo do par 8 em *P. albifrons*, e no braço longo do par 11 em *P. santafecinus*. Em ambos os casos essas regiões foram visualizadas como constrições secundárias em metáfases coradas com Giemsa (Fig. 1). No caso de *P. albifrons*, as NORs foram também evidenciadas pela técnica de hibridação *in situ* com sonda de rDNA (Fig 2). Em três espécimes de *P. albifrons*, a NOR mostrou-se heteromórfica em relação ao tamanho (Fig. 1-em destaque e Fig. 2).

Discussão

O cariótipo de *P. santafecinus*, é muito semelhante ao de duas outras espécies do grupo “albifrons”, *P. biligonigerus* e *P. marmoratus*. Devido à presença de um par cromossômico 3 metacêntrico, os cariótipos de *P. santafecinus* e *P. biligonigerus* são mais semelhantes entre si do que com o de *P. marmoratus* [referida por Amaral et al. (2000) e Silva et al. (2000) como *P. fuscomaculatus*], em que os cromossomos do par 3 são submetacêntricos. Embora em *P. santafecinus* o par 11 seja o portador da NOR, este é muito semelhante ao par 9 portador da NOR em *P. biligonigerus* e *P. marmoratus* (Amaral et al., 2000), tanto em relação à morfologia cromossômica quanto à localização da NOR. Porém, para uma melhor análise da possível homeologia desses cromossomos será necessária uma caracterização mais minuciosa utilizando outras técnicas citogenéticas, como, por exemplo, bandamento C.

O cariótipo de *P. albifrons* aqui descrito é muito semelhante ao apresentado por Denaro (1972) para essa espécie e difere do cariótipo de *P. marmoratus*, que apresentou o braço curto do par 3 relativamente maior do que o apresentado por *P. albifrons*. No entanto, o cariótipo aqui apresentado para *P. albifrons* difere do descrito por Denaro (1972) quanto

à localização da constrição secundária. Enquanto Denaro (1972) aponta constrições secundárias nos pares 2 e 11, nos espécimes de *P. albifrons* aqui analisados a constrição secundária correspondente à NOR ocorreu no par 8. Porém, não se descarta a hipótese de que esses pares 11 e 8 sejam na realidade homeólogos e que estejam ordenados de maneira diferente nos dois trabalhos, uma vez que esses cromossomos têm a mesma morfologia e são portadores da constrição secundária na mesma região do braço longo.

Com exceção do par 3, o cariótipo de *P. albifrons* é muito semelhante morfologicamente aos cariótipos das demais espécies de seu grupo, isto é, *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* e *P. santafecinus*, embora haja uma discordância na ordenação dos pares 4 e 5 dentre essas espécies. O cariótipo de *P. albifrons* também se assemelhou muito morfologicamente aos cariótipos descritos para espécies do grupo de *P. cuvieri* (Silva et al., 1999; Quinderé et al., manuscrito em preparação), que antes alocava *P. albifrons* (ver Nascimento et al., 2005), inclusive em relação ao par 3 (nos cariótipos de *P. albonotatus* e *P. cuqui* o par cromossômico homeólogo a este é classificado como 5 – Quinderé et al., manuscrito em preparação). É também interessante notar que o par cromossômico 8 portador de NOR em *P. albifrons* é muito semelhante ao par 8 portador de NOR em algumas populações de *P. cuvieri* (Silva et al., 1999; Quinderé et al., manuscrito em preparação), o que reforça a semelhança entre esses cariótipos. Portanto, os dados cariotípicos disponíveis até o momento não permitem a detecção de marcadores exclusivos do grupo de *P. albifrons*. Embora uma melhor caracterização dos cromossomos dessa espécie seja necessária para uma comparação interespecífica mais aprofundada, é possível que esses dados sejam indícios de uma maior proximidade filogenética de *P. albifrons* com o grupo de *P. cuvieri* do que com as demais espécies atualmente alocadas no grupo “albifrons”.

Agradecimentos

Esse trabalho teve apoio financeiro da FAPESP e do CNPq.

Referências

- Amaral, M.J.L.V., Cardoso, A.J., Recco-Pimentel, S.M., 2000. Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). *Caryologia* 53:283-288.
- Beçak, M.L., Denaro, L., Beçak, W., 1970. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics* 9:225-238.
- Cei, J.M., 1990. On a Paraguayan sample of a long time confused species: *Physalaemus fuscomaculatus* (Steindachner, 1864) (Anura, Leptodactylidae). *Boll Mus. Rej. Sci. nat. Torino* 8:215-231.
- Denaro, L., 1972. Karyotypes of Leptodactylidae Anurans. *J. Herpetol.* 6:71-74.
- Frost, D.R., 2007. Amphibians species of the world: an online reference. V5.0 (February 1, 2007) Electronic database available at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- 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.
- Lynch, J.D., 1970. Systematic status of the american leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix*, and *Physalaemus*. *Copeia* 1970:488-496.
- Nascimento, L.B., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., 2005. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro* 63:297-320.
- Nascimento, L.B., Pimenta, B.V.S., Cruz, C.A.G., Caramaschi, U., 2006. Taxonomic status of *Gomphobates marmoratus* Reinhardt and Lutken, 1862 “1861” and *Eupemphix fuscomaculatus* Steindachner, 1864 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *South American Journal of Herpetology* 1: 166-174.
- Schmid, M., 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361-388.
- Schimid, M., Olert J., Klett C., 1979. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71: 29-55.

- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Kasahara, S., 1999. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas* 131:135-141.
- Silva, A.P.Z., Baldissera-Jr, F.A., Haddad, C.F.B., Kasahara, S., 2000. Karyotypes and nucleolus organizer regions of the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia, Sér. Zool.* 88:159-164.
- Viegas-Pequignot, E., 1992. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. (ed) *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford University Press-IRL Press, Oxford, pp.137-158.
- Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Macaya, G., Bernardi, G., 1979. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 6:2109-2123.

Legendas

Figura 1. A. Cariótipo de *Physalaemus albifrons* corado com Giemsa. Em destaque, o par 8 portador da NOR submetido à impregnação por prata. **B.** Cromossomos de *P. santafecinus* corados com Giemsa. Em destaque, o par de cromossomos 11 submetido à impregnação por prata. Bar = 5µm

Figura 2. Metáfase mitótica de *P. albifrons* submetida à técnica de hibridação *in situ* com sonda de rDNA. Note o heteromorfismo de tamanho da NOR no par 8. Bar = 5µm

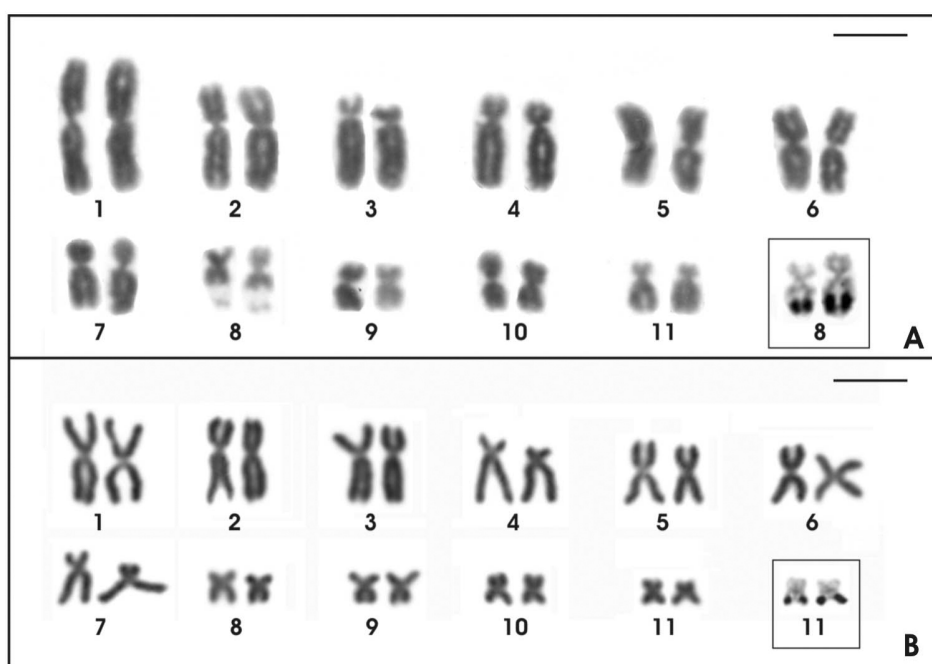


Figure 1

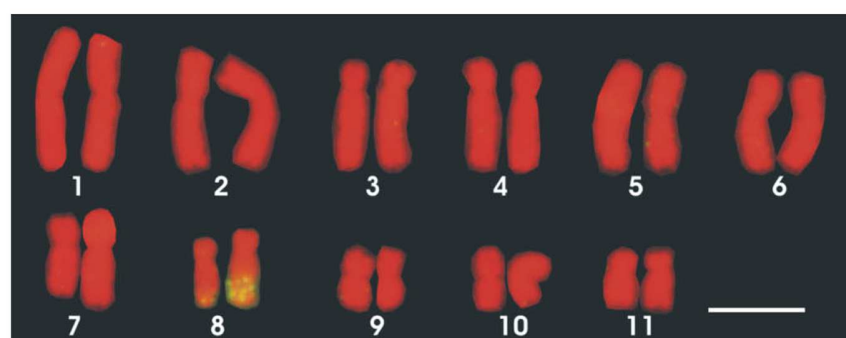


Figure 2

VII. CONCLUSÕES

1. Não houve variações no número cromossômico diplóide encontrado nas populações de *Physalaemus cuvieri* estudadas. No entanto, essa espécie mostrou-se altamente polimórfica em relação à ocorrência de regiões organizadoras nucleolares (NORs), exibindo variações inter e intrapopulacionais que dificultaram, inclusive, a análise de homeologias cromossômicas entre as populações.

2 - A ocorrência de NOR no par cromossômico 9 permitiu agrupar as populações de *P. cuvieri* do nordeste do Brasil, Crateús-CE, Urbano Santos-MA e São Pedro da Água Branca-MA, já que essa característica foi exclusivamente encontrada em todos os espécimes dessas populações. No entanto, os espécimes de São Pedro da Água Branca-MA diferem daqueles das demais populações nordestinas por apresentarem NOR também no par cromossômico 7.

3 - A NOR localizada na região terminal do braço do cromossomo 11 foi exclusivamente encontrada em populações do sul e do sudeste do Brasil, analisadas anteriormente, e nas populações provenientes da Argentina analisadas no presente trabalho. Tal observação pode refletir a proximidade geográfica dessas populações, já que tal NOR (11p ter) não foi encontrada em nenhuma outra população brasileira aqui analisada.

4 - Variação intraindividual em relação a NOR foi observada apenas na população de Uberlândia (MG) e interpretada como alterações estruturais envolvendo as NORs e não atribuída à expressão diferencial de NORs, já que essa variação foi também observada na análise de metáfases submetidas à técnica de FISH com sonda de DNAr.

5 - Todas as populações de *P. cuvieri* são bastante semelhantes em relação à morfologia dos cariótipos. No entanto, tanto em relação ao padrão da NOR quanto à distribuição da heterocromatina evidenciada pelo bandamento C, a população de Porto Nacional (TO) é a

que mais difere das outras estudadas. Nessa população, os pares cromossômicos 1, 3, 4 e 10 são portadores de NORs em regiões proximais ao centrômero.

6 - A banda encontrada na região intersticial no braço curto do par 5 (homeólogo ao par 3 do cariótipo das espécies de *P. albonotatus* e *P. cuqui*) pode indicar uma banda marcadora para o grupo “cuvieri”, portanto muito conservada nessas espécies.

7 - As NORs consistiram importantes marcadores para a análise das espécies do grupo “cuvieri” visto que variações interespecíficas foram notadas em relação à localização das NOR, permitindo diferenciá-las.

8 - No cariótipo de *P. ephippifer* foi possível notar a presença de um par cromossômico heteromórfico em relação à presença de NORs e de bandas heterocromáticas em todas as fêmeas analisadas. Tal observação sugere a presença de cromossomos sexuais, hipótese que deve ser investigada futuramente.

9 – O cariótipo de *P. albifrons* apresentou mais semelhanças com o de algumas espécies do grupo “cuvieri” do que com os cariótipos de *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* e *P. santafecinus*, hoje alocadas no mesmo grupo de *P. albifrons*. Tais semelhanças referem-se à morfologia do par cromossômico 3 e à presença de um par cromossômico 8 portador de NOR. Tendo em vista que *P. albifrons* era antes alocado no grupo “cuvieri” e que não há nenhuma proposta de relacionamento filogenético para as espécies desse gênero, tais semelhanças podem indicar uma maior proximidade de *P. albifrons* com as espécies *P. biligonigerus*, *P. marmoratus* e *P. santafecinus*, antes alocadas no mesmo grupo de *P. albifrons* (grupo “biligonigerus”) e essa hipótese deve ser melhor investigada.

DECLARAÇÃO

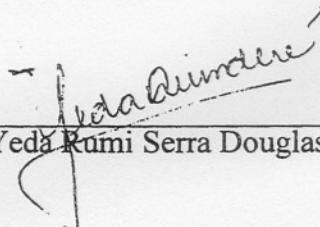
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de mestrado intitulada "Citogenética de populações e espécies de *Physalaemus* do grupo "cuvieri" (Anura, Leiuperidae)"

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

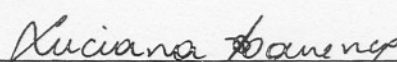
(X) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº2005/03), intitulado "Citogenética e biologia molecular de anfíbios"

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



 Aluna Yeda Rumi Serra Douglas Quinderé



 Orientadora Luciana Bolsom Lourenço

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido



 Nome:

