

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

KLÉLIA APARECIDA DE CARVALHO

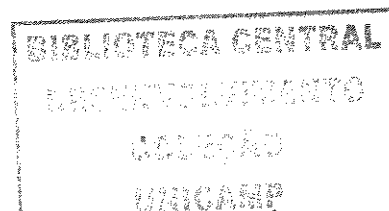
**CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE ESPÉCIES DE *Aplastodiscus* E
DO GRUPO DE *Hyla albomarginata* (HYLIDAE, ANURA)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Klélia Aparecida de Carvalho
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

SM Recco Pimentel

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel



UNIDADE	BC
Vº CHAMADA	T/ UNICAMP
	C253c
EX	
OMBO BC/	65667
ROC.	6-86-05
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	14-9-05
CPD	

Bib Id 364241

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C253c

Carvalho, Klélia Aparecida

Citogenética comparativa de espécies de *Aplastodiscus* e do grupo de *Hyla albomarginata* (Hylidae, Anura) / Klélia Aparecida Carvalho. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Shirlei Maria Recco Pimentel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. Cromossomos. 3. Região Organizadora do Nucléolo. I. Shirlei Maria Recco Pimentel. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Comparative cytogenetics of *Aplastodiscus* species and *Hyla albomarginata* group (Hylidae, Anura).

Palavras-chave em inglês: Cytogenetics, Chromosomes, Nucleolar Organizing Region.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Shirlei Maria Recco Pimentel, José Perez Pombal Junior, Eliana Morielle Versute.

Data da defesa: 20/06/2005.

Campinas, 20 de junho de 2005

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Shirlei Maria Recco Pimentel

smreccopimentel

Prof. Dr. José Perez Pombal Junior

Jose P. Pombal Jr.

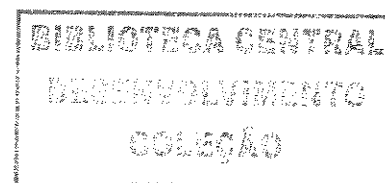
Profª. Drª. Eliana Morielle Versute

eliana.m.versute

Profª. Drª. Luciana Lourenço Bolsoni

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior

2005.06.20 712



Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.

(Clarice Lispector)

Dedicatória

**Dedico este trabalho aos meus
Pais e Irmãos; Ao meu marido
Silvio; A existência dos meus
filhos e a Profa. Shirlei.**

Agradecimentos

À Profa. Dra Shirlei Maria Recco Pimentel, pela orientação na realização desse trabalho, pela oportunidade, confiança dispensada, pela minha formação acadêmica e todo o conhecimento adquirido.

Ao Prof. Dr. Paulo C. A. Garcia, pela sugestão deste trabalho e apoio nas coletas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Às Profas. Dras. Eliana Morielle Versute, Luciana Bolsoni Lourenço e ao Prof. Dr. José Perez Pombal Junior, pela análise prévia da tese.

Às Dra. Denise P. Ceale, Dra. Marília T. Hartmann, M.Sc. Samantha Celi Vieira e Ao Prof. Dr. Fernando Ananias, M.Sc. Sérgio Siqueira Junior, e Marcos Yamamoto pelas valiosas coletas dos exemplares utilizados neste trabalho.

Aos Profs. do Departamento de Biologia Celular, pela importante contribuição à minha formação profissional e pela oportunidade única que me foi dada.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular que de alguma forma contribuíram na confecção deste trabalho. Em especial, a secretária e companheira de trabalho, Lílíam, pela sua eficiência e cumplicidade.

Aos meus colegas de hoje e aos que passaram pelo laboratório, pelas valiosas discussões, importantes na confecção deste trabalho, pela convivência, apoio e colaboração durante todos esses anos.

Ao meu querido e eterno amigo Fernando Ananias pela amizade e pelo agradável primeiro contato com a Biologia.

À Luciana Bolsoni Lourenço, pelo exemplo de vida, de profissionalismo e principalmente pela convivência durante anos.

Ao José Lino Neto, pelo incentivo durante toda a minha vida acadêmica e pela sua inestimável amizade.

Aos meus amigos especiais, Odair, Ana Cristina, Carmen e Karina, pela amizade, pela cumplicidade em todos os momentos durante a realização deste trabalho e pelo apoio nos melhores e também nos momentos mais difíceis durante estes anos.

À minha amiga Daniela B. Sudatti, pela amizade, apoio e incentivo durante a Graduação e Pós-graduação.

À minha família, Juarez, Terezinha, Klésio e Klecione, pelo amor, apoio, incentivo durante todas as minhas conquistas.

Aos meus amores, Silvio, João Pedro e Vitor, por fazerem parte da minha vida, pelo amor, carinho e incentivo que me deram força e mais vontade na realização desta conquista.

À vida, por me mostrar que por mais que o caminho seja difícil não é impossível traçá-lo, basta amor, amigos e meta.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMO	3
I. INTRODUÇÃO	6
1. Aspectos gerais da família Hylidae e do grupo em estudo	6
2. Problemática de interesse	8
3. Citogenética	10
3.1 A região organizadora do nucléolo (NOR).....	10
3.2 Heterocromatina.....	11
3.3 A região telomérica	12
4. Objetivos	14
5. Referências Bibliográficas	15
II. ARTIGO 1.....	28
Resumo.....	30
Introdução.....	31
Materiais e Métodos.....	33
Resultados	35
Discussão.....	37
Referências Bibliográficas	40
Legenda das Figuras	46
III. ARTIGO 2	51
Resumo.....	53
Introdução.....	54
Materiais e Métodos.....	56
Resultados	58
Discussão.....	60
Referências Bibliográficas	65

Legenda das Figuras	72
IV. CONCLUSÕES	78

The Hylidae family includes four subfamilies, with Hyalinae comprising 27 genera. The *Hyla* genus has many species divided into related groups. The *Hyla albomarginata* group, as known as "green *Hylas*" is subdivided into 3 complexes: "albomarginata", "albosignata" and "albofrenata". The *Aplastodiscus* genus has been the object of taxonomic discussion since its description, having been synonymized to and removed from *Hyla* more than once. Since there are great morphological and behavioral similarities between the species of the *H. albomarginata* group and the species of *Aplastodiscus*, the phylogenetic and taxonomic relationships of these genera are still under discussion. In the present research, a cytogenetic study was carried out evaluating two species of *Aplastodiscus* (*A. perviridis* and *A. cochranæ*), three populations of *H. albomarginata* ("albomarginata" complex), *H. albosignata* and *H. leucopygia* ("albosignata" complex) and *H. albofrenata*, *H. arildae*, *H. ehrhardti* and *Hyla eugenioi* ("albofrenata" complex), as well as *H. faber*, a very closely related species not pertaining to the group. The aim of this research was to contribute to the systematics of this group and to the understanding of the intra- and intergeneric relationships of *Aplastodiscus*.

Mitotic and meiotic metaphases were obtained from suspension of intestinal epithelial cells, stained with Giemsa and submitted to the techniques of C-banding, silver impregnation and *in situ* hybridization with probes of ribosomal DNA and telomeric sequence. The diploid number of $2n=24$ was found in the two species of *Aplastodiscus*, *Hyla albomarginata* and *Hyla faber*, while *Hyla albosignata* had $2n=20$ and *Hyla leucopygia* had $2n=18$. The four species of the complex "albofrenata" had $2n=22$ chromosomes. The two species of *Aplastodiscus* had the same heterochromatin pattern, but they differ from the *Hyla* species. The nucleolus organizing region (NOR) was located on the telomeric regions of pair 12 in both species of *Aplastodiscus*, in pair 09 of *H. albosignata* and *H. leucopygia*, in pair 11 in *H. faber*, and interstitially on the short arms of pair 02, with size heteromorphism in *H. albomarginata*. In two of the eight individuals of *Hyla albofrenata*, the NOR was present in the telomeric region on the long arm in pair 07

and, in six of these individuals, a interesting pattern for Anura was found. The NOR was found in the pairs 01 and 07, but in only one of the homologues of each pair. In *H. ehrhardti*, the Ag-NOR technique marked the pairs 06 and 10, but only that on pair 06 was confirmed by *in situ* hybridization. In *H. arildae*, the NOR was located in the 10 pair and in *Hyla eugenioi* in the pair 07, also in the telomeric regions.

In *H. albofrenata* and *H. arildae* multivalent rings were observed in the prophase I of meiosis, constituted of 4 to 6 bivalents, being one of them the NOR-bearing chromosomes. Translocation events during the evolution of *H. albofrenata* and *H. arildae* could be responsible for the ring formation in meiosis. The participation of the NOR bearing chromosomes in the multivalente rings could have facilitated the occurrence of polymorphism of NOR, as observed in *H. albofrenata*. The telomeric sequence probe marked the telomeric region in all species studied as well as the centromeric regions of the chromosomes of *H. albofrenata* and *H. arildae*, at the centromeric heterochromatin. In amphibians, telomeric sequences located outside the telomeric regions had only been detected in interstitial regions. The presence of these sequences in centromeric regions may have been originated by the amplification of the (TTAGGG)_n sequences related to heterochromatic amplification.

The data of the present work allow the conclusion that *A. perviridis* and *A. cochranae* could not be differentiated. The NOR bearing chromosomes 9 of *H. leucopygia* and *H. albosignata* are very similar in size, morphology (metacentric) and NOR localization (telomeric region) to the pair 12 of the species *Aplastodiscus* and also to the pair 11 of *H. faber*, suggesting that these are homologous chromosomes. Although *Hyla albomarginata* differs from all species analyzed for NOR localization on pair 2, it presented the same diploid number and chromosome morphology of *Aplastodiscus*. The conserved chromosomal morphology, mainly in the first seven pairs, between the species of "albofrenata" (present work), "albosignata" and "albomarginata" complexes and *Aplastodiscus*, suggests that one ancestral karyotype in common must have originated all these current species. The chromosomal rearrangements could lead to the differentiation of these karyotypes, with changes in diploid number, involving mainly the short chromosome group and the dispersion of heterochromatin and NOR.

A família Hylidae possui quatro subfamílias, sendo Hyalinae constituída por 27 gêneros, dentre eles o gênero *Hyla* que possui muitas espécies alocadas em grupos relacionados entre si. O grupo de *Hyla albomarginata*, também conhecido por “hylas verdes” é subdividido em três complexos: “albomarginata”, “albosignata” e “albofrenata”. O gênero *Aplastodiscus* está envolvido em discussão taxonômica desde sua descrição, tendo sido sinonimizado e retirado de *Hyla* mais de uma vez. Como há grande semelhança morfológica e comportamental entre as espécies do grupo de *H. albomarginata* e as espécies de *Aplastodiscus* (A. Lutz in B. Lutz, 1950), o relacionamento filogenético e taxonômico entre esses gêneros ainda é bastante discutido. No presente trabalho foi realizado um estudo citogenético das duas espécies de *Aplastodiscus* (*A. perviridis* e *A. cochranæ*), de três populações de *H. albomarginata* (complexo “albomarginata”), *H. albosignata* e *H. leucopygia* (complexo “albosignata”) e *H. albofrenata*, *H. arildæ*, *H. ehrhardti* e *Hyla eugenioi* (complexo “albofrenata”), além de *H. faber*, uma espécie proximamente relacionada não pertencente ao grupo, com o objetivo de contribuir para a sistemática desse grupo e para o entendimento da problemática em questão envolvendo os relacionamentos intra- e intergenérico de *Aplastodiscus*.

As metáfases mitóticas e meióticas foram obtidas por suspensão de células de epitélio intestinal e testículos e submetidas aos métodos de coloração com Giemsa, bandamento C, impregnação pela prata e hibridação *in situ* com sondas de DNA ribossomal e de sequência telomérica. O número diplóide de $2n=24$ foi encontrado nas duas espécies de *Aplastodiscus*, *Hyla albomarginata* e *Hyla faber*, enquanto *Hyla albosignata* apresentou $2n=20$ e *Hyla leucopygia* $2n=18$. As quatro espécies do complexo “albofrenata” apresentaram $2n=22$ cromossomos. As duas espécies de *Aplastodiscus* apresentaram o mesmo padrão de heterocromatina entre si, mas diferiram das espécies de *Hyla*. A região organizadora do nucléolo (NOR) foi localizada no telômero do par 12 em ambas as espécies de *Aplastodiscus*, do par 09 em *H. albosignata* e *H. leucopygia* e do par 11 em *H. faber*, e intersticialmente no braço curto do par 02, com heteromorfismo de tamanho, em *H.*

albomarginata. Em dois dos oito indivíduos de *Hyla albofrenata*, a NOR está presente na região telomérica do braço longo no par 07 e em seis desses indivíduos foi encontrado uma interessante variante em que a NOR está presente nos pares 01 e 07, mas em apenas um dos homólogos de cada par. Em *H. ehrhardti*, a técnica de Ag-NOR marcou os pares 06 e 10, mas apenas a do par 06 foi confirmada por hibridação *in situ*. Em *H. arildae*, a NOR foi localizada no par 10 e em *Hyla eugenioi* no par 07, também nos telômeros. Em *H. albofrenata* e *H. arildae* foram observados anéis multivalentes na prófase I da meiose, constituídos de quatro a seis bivalentes, com a participação dos cromossomos portadores da NOR. Eventos de translocação durante a evolução das espécies *H. albofrenata* e *H. arildae* podem ser responsáveis pela formação desses anéis na meiose. O envolvimento dos cromossomos portadores da NOR pode ter facilitado a ocorrência do polimorfismo observado em *H. albofrenata*. A sonda de seqüências teloméricas marcou os telômeros em todas as espécies e também as regiões centroméricas dos cromossomos de *H. albofrenata* e *H. arildae*, coincidente com a heterocromatina centromérica. Em anfíbios, seqüências localizadas fora dos telômeros tinham sido detectadas apenas em regiões intersticiais. A presença dessas seqüências no centrômero pode ter origem em amplificação de seqüências (TTAGGG)_n relacionada com a amplificação de regiões de heterocromatina.

Os dados do presente trabalho permitiram concluir que *A. perviridis* e *A. cochranæ* não podem ser diferenciadas citogeneticamente. O par 09, portador da NOR, de *H. albosignata* e *H. leucopygia* é muito semelhante na morfologia (metacêntricos) e na localização (região telomérica) da NOR, ao par 12 das espécies de *Aplastodiscus* e ao par 11 de *H. faber*, sugerindo serem esses cromossomos homeólogos. Embora *Hyla albomarginata* diferencie-se das demais espécies analisadas pela localização da NOR no par 2, apresentou o mesmo número diplóide e a morfologia dos cromossomos semelhante a *Aplastodiscus*. A morfologia cromossômica conservada, principalmente dos sete primeiros pares, entre as espécies dos complexos “albofrenata” (presente trabalho) “albosignata” e “albomarginata” e de *Aplastodiscus*, sugere que um cariótipo ancestral comum deve ter originado todas essas espécies atuais e que rearranjos cromossômicos levaram à diferenciação desses cariótipos, com mudança de número diplóide, envolvendo

principalmente o grupo de cromossomos menores, e dispersão de NOR e de heterocromatina.

1. Aspectos gerais da família Hylidae e do grupo em estudo

A ordem Anura apresenta atualmente 33 famílias e cerca de 4.700 espécies descritas (Frost, 2004). Os anuros estão distribuídos pelo mundo todo exceto na Antártida (Almeida, 1984; Pough *et al.*, 1993), ocupando uma grande diversidade de ambientes, sendo que pelo menos 1.600 espécies vivem na América do Sul (Zug, 1993; Duellman & Trueb, 1994). A família Hylidae é representada por anuros que possuem cabeça e olhos grandes, cintura delgada e pernas longas, e o seu tamanho varia entre 17 a 140 milímetros. No Brasil são popularmente conhecidas por pererecas. Muitas espécies apresentam discos digitais aumentados que estão relacionados ao fato de serem arborícolas (Duellman & Trueb, 1994; Pough *et al.*, 1999; Cogger & Zweifel, 1998).

Essa família possui atualmente quatro subfamílias: Hemiphractinae, Hyalinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae (Frost, 2004). A subfamília Hyalinae é constituída de 27 gêneros, todos possuindo uma distribuição geográfica bastante variável, habitando a América do Norte e do Sul, oeste da Índia, região Australo-Papuan, Eurásia incluindo o extremo norte da África e o arquipélago japonês (Frost, 1985).

Anderson (1991) propôs que o gênero *Hyla* tenha surgido na América do Sul e se expandido rapidamente por todo o continente. Porém, com o aumento do nível do mar, o grupo do norte foi separado do grupo do sul por aproximadamente 65 milhões de anos, sendo em seguida restabelecida a ligação. O gênero *Hyla* possui ampla distribuição geográfica, não sendo encontrado apenas nas regiões da Indonésia, Malásia, Polinésia, Etiópia e Madagascar. O número de espécies de *Hyla* nas regiões neotropicais é muito grande, especialmente no Brasil (Frost, 2004) e encontra-se subdividido em muitos grupos fenéticos de espécies. O grupo de *Hyla albomarginata*, constituído pelas formas verdes, é ainda subdividido em três complexos: “albomarginata”, “albofrenata” e “albosignata” (Cruz & Peixoto, 1984, 1985). O complexo de *Hyla albomarginata* compreende *H.*

albomarginata e *H. rufitela*; o complexo de *Hyla albofrenata* inclui as espécies *H. albofrenata*, *H. musica*, *H. arildae*, *H. ehrhardti*, *Hyla eugenioi* e *H. weygoldti* e o complexo de *Hyla albosignata* é constituído pelas espécies *H. albosignata*, *H. callipygia*, *H. fluminea*, *H. leucopygia* e *H. caviticola* (Cruz & Peixoto, 1984, 1985; Faivovich *et al.*, 2002; Carvalho-e-Silva & Carvalho-e-Silva, 2005).

O género *Aplastodiscus* atualmente alocado na subfamília Hylinae, é constituído por duas espécies, *A. perviridis* A. Lutz in B. Lutz, 1950 e *A. cochranæ* (Mertens, 1952) (Garcia *et al.*, 2001). A localidade tipo de *Aplastodiscus perviridis* é a Serra da Bocaina, São José do Barreiro, Estado de São Paulo (Lutz, 1950), com distribuição geográfica conhecida abrangendo áreas serranas e o planalto de Brasília, do Estado São Paulo de até o Estado Rio Grande do Sul e em Misiones, na Argentina (Frost, 2004). A localidade tipo de *Aplastodiscus cochranæ* é Queçaba, Distrito de Água Mornas, Município de Palhoça, Estado de Santa Catarina, sendo também encontrada em duas outras localidades do mesmo estado, Rancho Queimado e Angelina (Garcia *et al.*, 2001). Morfologicamente *A. cochranæ* é distinguida de *A. perviridis* pelo maior tamanho corporal médio, tímpanos proporcionalmente menores, presença de uma linha negra sobre o canto rostral, presença de uma linha branca marginada inferiormente por uma fina linha negra sobre a região cloacal e presença de uma faixa negra nas margens externas das tíbias e antebraços (Garcia *et al.*, 2001).

2. Problemática de interesse

O gênero *Aplastodiscus* (A. Lutz in B. Lutz, 1950) está envolvido em discussão taxonômica desde sua descrição. *Aplastodiscus perviridis* A. Lutz foi separada do gênero *Hyla* Laurenti, 1768 (A. Lutz in B. Lutz, 1950) devido a diferenças na estrutura dos dedos e artelhos (discos digitais estreitos e finos). Devido à semelhança entre os dois gêneros, alguns autores colocaram em dúvida a validade do gênero *Aplastodiscus* e vários trabalhos posteriores foram publicados usando a combinação *Hyla perviridis* (Bokermann, 1967; Bokermann & Sazima, 1973; Cardoso *et al.*, 1989; Cardoso & Haddad, 1992). Porém, até o momento, o gênero *Aplastodiscus* continua válido.

Hyla cochranæ foi descrita por Mertens (1952), mas Bokermann (1966) a considerou como sinônimo de *Aplastodiscus perviridis*, o que foi aceito posteriormente por vários autores (Lutz, 1973; Duellman, 1977; Cei, 1980; Frost, 1985; Lavilla, 1992). Recentemente, Garcia *et al.* (2001) revalidaram *A. cochranæ* com base em características morfológicas externas.

Segundo A. Lutz in B. Lutz (1950), dentro do gênero *Hyla*, a espécie *H. albosignata* é a que mais se aproxima de *Aplastodiscus perviridis* devido ao seu porte, cor e canto. Bokermann (1967) detectou padrões de semelhanças na vocalização entre *A. perviridis*, *H. albofrenata* e *H. albosignata*. Outra característica que aproxima *Aplastodiscus* das espécies de “hylas verdes” desses complexos é o desenvolvimento dos calos metacarpais e metatarsais, que poderiam estar relacionados ao hábito de cavar tocas na lama (Garcia *et al.*, 2001). Apesar da grande semelhança morfológica e comportamental entre as espécies do grupo de *H. albomarginata* e *Aplastodiscus* (Lutz, 1950), o relacionamento filogenético entre esses gêneros ainda é bastante discutido. Estudo recente de Haddad *et al.* (2005) mostrou que *A. perviridis* apresenta o mesmo modo reprodutivo raro e específico das espécies dos complexos de *H. albofrenata* e de *H. albosignata*. Com base nessa semelhança e nos dados de morfologia de Da Silva (1998), esses autores sugeriram uma origem monofilética para *Aplastodiscus* e esses complexos de *Hyla*. Recentemente, baseados em dados moleculares, Faivovich *et al.* (2005) propuseram a transferência das Hylas dos complexos “*albosignata*” e “*albofrenata*” para o gênero *Aplastodiscus* e revalidaram o

gênero *Hypsiboas* incluindo nele as duas espécies do complexo “albomarginata”, sendo que a espécie *H. albomarginata* ficou alocada no grupo de *Hypsiboas* (= *Hyla*) *faber*.

Há poucos estudos citogenéticos para *Aplastodiscus* e para as espécies do grupo de *H. albomarginata*, sendo que a grande maioria apenas descreve o cariótipo por métodos convencionais. Feitosa *et al.* (1995) analisou três populações (Serra da Boicana e Botucatu - SP e Morro do Ferro - MG) de *A. perviridis* ($2n=24$), porém não observou diferenças entre seus cariótipos. Beçak (1968) estudou a espécie *H. albomarginata* ($2n=24$), posteriormente re-analisada por Gruber (2002) que estudou populações de Picinguaba (SP) e de São Sebastião (SP) acrescentando dados de Ag-NOR e bandamento C. Bogart (1973) encontrou números cromossômicos distintos para *H. albofrenata* (Tijuca, RJ; $2n=24$ e Boracéia, SP; $2n=22$) e para *H. albosignata* (Boracéia, SP; $2n=20$ e Teresópolis, RJ; $2n=18$). Há possibilidade de confusão na identificação dos espécimes dessas populações, já que há espécies dentro dos complexos que são morfologicamente semelhantes e algumas que foram descritas posteriormente à realização do trabalho de Bogart (1973).

Dados citogenéticos mais detalhados da morfologia dos cromossomos das duas espécies do gênero *Aplastodiscus* e de espécies representantes dos três complexos de *H. albomarginata*, podem contribuir para a sistemática e para o entendimento da problemática em questão envolvendo os relacionamentos intra- e intergenérico de *Aplastodiscus*.

3. Citogenética

Além do estudo de características básicas do cariótipo, como o número e a morfologia cromossômica, outros marcadores citogenéticos importantes têm sido usados para caracterizar as espécies.

3.1 A região organizadora do nucléolo (NOR)

As NORs são os sítios cromossômicos dos genes que codificam RNAs ribossomais (Sumner, 1990). Essas moléculas são sintetizadas e processadas no nucléolo formando as subunidades ribossomais que migram para o citoplasma onde fazem parte do ribossomo maduro funcional. Em células em intérfase, os nucléolos visualizados representam a intensa transcrição dessa região e o processamento do RNAr precursor, e contêm proteínas relacionadas a esses processos. Há proteínas nucleolares relacionadas também a outras funções como no controle do ciclo celular (Schwarzaker & Mosgoeller, 2000; Visintin & Amon, 2000).

As regiões organizadoras do nucléolo podem se localizar em regiões de constrição secundária (Henderson *et al.*, 1972; Hsu *et al.*, 1975), conter heterocromatina (Goessens, 1984; King, 1980; Schmid, 1982) ou apresentar heterocromatina adjacente (Schmid 1978a, 1982; King, 1980).

Muitas técnicas podem ser utilizadas para localização dos genes ribossomais sendo a hibridação *in situ* o método mais específico, que independe da atividade dessa região, ou seja, detecta tanto NORs ativas quanto inativas. Outro método também muito utilizado, apesar de somente detectar os sítios ativos na última intérfase, é a impregnação pela prata. Esse método baseia-se na afinidade desse íon por algumas proteínas, conhecidas como proteínas argirófilas. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de identificar essas proteínas. Algumas delas já são conhecidas, como a RNA polimerase I (Scheer & Rose, 1984), nucleolina (Ochs *et al.* 1983), DNA topoisomerase I (Guldner *et al.*, 1986), p135 (Pfeifle *et al.*, 1986) e UBF (Chan *et al.*, 1991). A técnica de impregnação por prata mais utilizada é de Howell & Black (1980).

Nos estudos de cariótipos de anfíbios, as regiões organizadoras de nucléolos têm se mostrado uma ferramenta muito importante na comparação entre populações ou até mesmo entre espécies. O número e a localização da NOR são, em geral, característicos de cada população ou espécie (Schmid, 1978a, b), podendo, no entanto, apresentar tamanho diferente entre os homólogos caracterizando heteromorfismo, que pode ser devido à amplificação, deleção parcial, duplicação ou triplicação de um dos cístrons (Schmid, 1982).

Variação intra e inter- populacional no número, tamanho e localização da NOR já foi observada em várias espécies, como *Odontophrynus americanus* e *O. occidentalis* (Ruiz *et al.*, 1981), e em populações de *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991) e *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995). Muitos eventos como inversão, translocação, transposição da NOR por elementos genéticos móveis, amplificação de cístrons ribossômicos, translocação e inversão, envolvendo segmentos cromossômicos contendo a NOR podem estar envolvidos na ocorrência dessa variação (Wiley *et al.*, 1989; King *et al.*, 1990; Foote *et al.*, 1991; Schmid. *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1996; Lourenço *et al.*, 1998).

3.2 Heterocromatina

A cromatina apresenta-se como eucromatina e heterocromatina. Os segmentos cromossômicos que permanecem em estado condensado durante a intérfase (Heitz, 1928) e que são transcricionalmente inativos (Ris & Korenberg, 1979) são denominados heterocromatina. A composição de heterocromatina em diversos organismos é predominantemente de seqüências curtas e altamente repetitivas de DNA (Jonh, 1988; Sumner, 1994).

Em anfíbios, a heterocromatina apresenta-se associada com o centrômero, o telômero, a região organizadora do nucléolo, e/ou com algumas regiões intersticiais do cromossomo (Schmid, 1978a, b; King, 1980; Miura, 1995; Busin *et al.*, 2001; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003).

A variação da heterocromatina na localização e quantidade em diversas espécies animais tem se mostrado importante na especiação. Segundo King *et al.* (1991), a variação da heterocromatina pode se dar por três processos evolutivos: a adição de heterocromatina

em sítios específicos do cromossomo, a transformação de eucromatina em heterocromatina e a evolução combinada com múltiplos sítios de heterocromatina.

A detecção da heterocromatina pode ser feita por vários métodos, como reações de Feulgen, bandamento N e impregnação por prata. Porém, a heterocromatina é mais comumente detectada por bandamento C (Sumner, 1972; Schmid, 1978a, 1982; King, 1980; Schmid *et al.*, 1983, 1986, 1990; Baldissera Jr. *et al.*, 1993; Schmid *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1996; Lourenço *et al.*, 1999). A técnica de bandamento C é desenvolvida em três etapas: um tratamento ácido, que promove a remoção de purinas das moléculas de DNA; um tratamento alcalino, que provoca a β -eliminação envolvendo a desoxirribose do nucleotídeo que sofreu a depuração e desnatura irreversivelmente o DNA; e um tratamento salino, que remove segmentos de DNA quebrados. Admite-se que nas regiões de heterocromatina a extração de DNA através desse método ocorra mais lentamente (Holmquist, 1979), razão pela qual essas regiões coram-se mais intensamente.

3.3 As regiões teloméricas

As regiões teloméricas são constituídas por seqüências de cinco a oito pares de bases, repetidas *in tandem* e ricas em guanina. Em vertebrados, uma seqüência muito comum é (TTAGGG)*n* (Moyzis *et al.*, 1988; Beissman & Masson, 1994). Essas seqüências teloméricas são detectadas principalmente nas extremidades dos cromossomos através da técnica de hibridação *in situ*.

Em alguns vertebrados, seqüências de DNA telomérico já foram detectadas também em regiões pericentroméricas, centroméricas e intersticiais, geralmente associadas à heterocromatina (Arnason *et al.* 1988; Meyne *et al.*, 1990; Luke & Verma, 1993; Beissmam & Masson, 1994; Garagna *et al.*, 1997; Pagnozzi *et al.*, 2000; Faria, 2003).

O significado da existência de seqüências de DNA idênticas as teloméricas em regiões não teloméricas ainda é pouco entendido. Várias hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a sua origem e função, como a ocorrência de fusão de cromossomos telocêntricos na formação de cromossomos metacêntricos ou rearranjos de segmentos envolvendo os telômeros dos cromossomos durante a especiação (Meyne *et al.*, 1989, 1990;

Lee *et al.*, 1993; Nanda *et al.*, 1995; Vermeesch *et al.*, 1996; Fagundes & Yonenaga-Yassuda, 1998; Carvalho & Mattevi, 2000; Rogatcheva *et al.*, 2000; Garagna *et al.*, 1995,2001; Andrades-Miranda *et al.*, 2002). Segundo Meyne *et al.* (1990), que estudou essas seqüências em cromossomos de alguns vertebrados, espécies mais primitivas apresentam apenas sítios terminais enquanto que espécies mais derivadas e que sofreram diferenciação teriam também sítios não teloméricos. Assim sendo, essas seqüências teloméricas poderiam ser utilizadas como marcadores úteis para estudos citogenéticos.

No entanto, um estudo recente realizado com espécies de *Solanum* (batata) mostrou que as seqüências teloméricas detectadas por FISH na região centromérica se encontram interespaçadas em grandes seqüências repetidas de DNA heterocromático (Tek & Jiang, 2004). Os autores não relacionam a ocorrência dessas seqüências teloméricas no centrômero a eventos antigos de fusão cromossômica e sugerem uma possível contribuição dessas seqüências a outras funções centroméricas, incluindo a coesão de cromátides irmãs e a condensação e segregação cromossômicas. Resultado semelhante foi obtido em um estudo com marsupiais (grupo) em que foram utilizadas espécies com evidências de rearranjos em seus cariótipos. Porém, não se confirmou a presença de seqüências teloméricas em todas as regiões em que ocorreram fusões cêntricas (Metcalf *et al.*, 2004).

Portanto, a origem das seqüências teloméricas presentes nas regiões centroméricas e mesmo as intersticiais precisam ser interpretadas com cuidado. A associação dessa marcação com evento de fusão cromossômica precisa estar apoiada por outras evidências cromossômicas.

4. Objetivos

- Comparar citogeneticamente *Aplastodiscus perviridis* e *A. cochranæ*, a fim de contribuir para a problemática taxonômica envolvendo esses táxons.

- Caracterizar citogeneticamente espécies dos três complexos (“albomarginata”, “albosignata” e “albofrenata”) do grupo de *Hyla albomarginata* e do gênero *Aplastodiscus*, buscando características que possam contribuir para o entendimento dos relacionamentos entre esses complexos de espécies verdes de *Hyla* com *Aplastodiscus*.

- Contribuir para o esclarecimento da variação cromossômica encontrada por Bogart (1973) em populações atribuídas a *Hyla albofrenata* e *Hyla albosignata* de regiões do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro.

5. Referências Bibliográficas

- Almeida, C. G. Aspectos biológicos e citogenéticos de *Hyla fuscovaria* (Amphibia, Anura). **Tese de mestrado**, Instituto de Biologia, Unicamp, 121 p. Campinas, 1984.
- Ananias, F.; Garcia, P. C. A. & Recco-Pimentel, S. M. Conserved karyotypes in *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, **140**: 42-48, 2004.
- Anderson, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. In: Green, D. M. & Sessions, S.K. (eds). **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press Inc. San Diego, California, pp. 299-331, 1991.
- Andrades-Miranda, J.; Zanchin, N. I. T.; Oliveira, L. F. B.; Langguth, A R. & Mattevi, M.S. (T₂AG₃) telomeric sequence hybridization indicating centric fusion rearrangements in the rodent *Oryzomys subflavus*. **Genetica** **114**: 11-16, 2002.
- Arnason, U.; Allderdice, P.W.; Lien, J. & Wildegren, B. Highly repetitive DNA in the baleen whale genera *Balaenoptera* and *Megaptera*. **J. Mol. Evol.** **27**: 217-221, 1988.
- Baldiçserra Jr., F. A.; Oliveira, P. S. L. & Kasahara, S. Cytogenetics of four brazilian *Hyla* species (Amphibia, Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Bras. Genet.** **16**: 335-345, 1993.
- Beçak, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia** **21**: 191-208, 1968.
- Beçak, M. L.; Beçak, W. Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae-Amphibia). **Experientia** **30**: 624-625 (1974).

- Beissman, H. & Masson, J. M. Telomeric repeat sequences. **Chromosoma** 103: 154-161, 1994.
- Bogart, J. P. Evolution of anuran karyotypes. In: Vial J. L. (ed) **Evolutionary biology of anurans**. University Missouri Press, Missouri, pp. 337-349, 1973.
- Bogart, J. P. Chromosome studies in *Sminthillus* from Cuba and *Eleutherodactylus* from Cuba and Puerto Rico (Anura: Leptodactylidae). **Ont. Mus. Life. Sci. Contrib.** n. 129, 1981.
- Bokermann, W. C. A. **Lista anotada das localidades tipo de anfíbios brasileiros**. Serviço de documentação - USP, São Paulo, pp 138, 1966.
- Bokermann, W. C. A. Notas sobre cantos nupciais de anfíbios brasileiros. I (Anura). **An. Acad. Bras. Ci.** 39: 441-443, 1967.
- Bokermann, W. C. A. & Sazima, I. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 1: Duas espécies novas de *Hyla* (Anura, Hylidae). **Rev. Brás. Biol.** 33: 457-472, 1973.
- Busin, C. S.; Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S. M. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica** 110: 131-141, 2001.
- Cardoso, A. J.; Andrade, G. V. & Haddad, C. F. B. Distribuição espacial em comunidades de anfíbios (Anura) no sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Biol.** 49: 241-249, 1989.
- Cardoso, A. J. & Haddad, C. F. B. Diversidade e turno de vocalização de anuros em comunidade neotropical. **Acta Zool. Lilloana** 41: 93-105, 1992.
- Carvalho, B. A & Mattevi, M. S. (T₂AG₃) telomeric sequence hybridization suggestive of centric fusion in karyotype marsupials evolution. **Genetica** 108: 205-210, 2000.

- Carvalho-e-Silva, A. M. P. T. & Carvalho-e-Silva, S. P. New species of the *Hyla albofrenata* group, from the states of Rio de Janeiro e São Paulo, Brazil (Anura, Hylidae). **J. Herpetol.** **39**: 71-81, 2005.
- Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM. Citogenética comparativa de espécies de *Aplastodiscus* e dos complexos “albosignata” e “albomarginata” do grupo de *Hyla albomarginata* (Anura, Hylidae). (em preparação)
- Cei, J. M. & Roig, V. G. Batracios recolectados por la Expedición Biológica “Erspamer” a la mesopotamia Argentina y selva oriental de Misiones. **Notas Biol. Facult. Ciên. Ex. Fís. y Nat., Zoologia** **1**: 5-40, 1961.
- Cei, J. M. Amphibians of Argentina. **Monitore Zool. Ital., n. S., Monog.** **2**: XII+609p., 1980.
- Chan, E. K. L.; Imai, H.; Hamel, J. C.& Tan, E. M. Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. **J. Exp. Med.** **174**: 1239-1244, 1991.
- Cogger, H. G. & Zweifel, R. G. Encyclopedia of Reptiles & Amphibians, **Acad Press, San Diego, CA, II**, 240pp., 1998.
- Cruz, C. A. G. & Peixoto, A. L. Espécies verdes de *Hyla*: o complexo “albosignata” (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arq. Univ. Fed. Rio de Janeiro** **7**: 31-47, 1984.
- Cruz, C. A. G. & Peixoto, A. L. Espécies verdes de *Hyla*: o complexo “albofrenata” (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arq. Univ. Fed. Rio de Janeiro** **8**: 59-70, 1985.
- Da Silva, H. R. Phylogenetic relationships of the family Hylidae with emphasis on the relationships within the subfamily Hyalinae (Amphibia:Anura). **Tese de Doutorado**,

- Museu Nacional do Rio de Janeiro, Universidade do Rio de Janeiro, 175p. Rio de Janeiro, 1998.
- Duellman, W. Liste der rezenten Amphibien und Reptilien – Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae. **Das Tierreich** **95**, XIX+225p., 1977.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. **Biology of Amphibians**, The John Hopkins University Press. Baltimore. 670 pp, 1994.
- Fagundes, V. & Yonenaga-Yassuda, Y. Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. **Chrom. Res.** **6**: 643-648, 1998.
- Faria, K. C. Análise citogenética comparativa em espécies de morcegos dos gêneros *Molossus* (MOLOSSIDAE), *Artibeus*, *Platyrrhinus*, *Sturnira*, *Glossophaga*, *Phyllostomus* e *Carollia* (PHYLLOSTOMIDAE)- CHIROPTERA (MAMMALIA). **Tese de mestrado**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 113 p., 2003.
- Faivovich J, Cruz CAG, Peixoto, AL: The identity of *Hyla ehrhardti* Müller, 1924 (Anura, Hylidae). **J. Herpetol.** **36**: 325-327, 2002.
- Faivovich, J.; Haddad, C. F. B. H.; Garcia, P. C. A.; Frost, D. R.; Campbell, J. A. & Wheeler, W.C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** **294**: 1-240, 2005.
- Feitosa, V. L. C.; Recco-Pimentel, S. M. & Cardoso, A. J. Structural chromosomal alterations in *Hyla albopunctata* and *Aplastodiscus perviridis* (Anura, Hylidae) from the Morro do Ferro region of Minas Gerais. **Rev. Bras. Genet.** **18**: 191-197, 1995.

- Foot, D.L.; Willey, J.E.; Little, M.L. & Meyne, J. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytog. Cell Genet.** **57**: 196-199, 1991.
- Frost, D. R. **Amphibian species of the world**. Association of Systematics Collections and Allen Press, Lawrence, Kansas, pp. 110-203, 1985.
- Frost, D. R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 3.0 (22 August, 2004). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garagna, S.; Broccoli, D.; Redi, C. A.; Searle, J.B.; Cooke, H. J. & Capanna, E. Robertsonian metacentrics of the mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. **Chromosoma** **103**: 688-692, 1995.
- Garagna, S.; Ronchetti, E.; Marcheretti, S.; Crovella, S.; Formenti, D.; Rumpler, Y. & Manfredi-Romanini, M. G. Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. **Chrom Res.** **5**: 487-491, 1997.
- Garagna, S.; Marziliano, N.; Zuccotti, M.; Searle, J. B.; Capanna, E. & Redi, C. A. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **98**: 171-175, 2001.
- Garcia, P. C. A.; Caramaschi, U. & Kwet, A. O status taxonômico de *Hyla cochranae* Mertens e recharacterização de *Aplastodiscus* A. Lutz (Anura, Hylidae). **Rev. Bras. Zool.** **18**: 1197-1218, 2001.
- Goessens, G. Nucleolar structure. **Int. Rev. Cytol.** **87**: 107-158, 1984.

- Green, M. G. & Sessions, S. K. Nomenclature for chromosomes. In: Green M. G. And Sessions S. K. (Eds.), "Amphibian cytogenetics and evolution". Academic Press, San Diego, pp. 431-432, 1991.
- Gruber, S. L. Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (Anura, Hylidae) dos grupos com $2n=24$ e $2n=30$, com técnicas de coloração diferencial. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, 132p. Rio Claro, 2002.
- Guldner, H. H.; Szostecki, C.; Vosberg, H. P.; Lakomerk, H. J.; Penner, E. & Bautz, F. A. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 KDa protein identified as DNA topoisomerase I. **Chromosoma** **94**: 132-138, 1986.
- Haddad, C. F. B.; Faivovich, J. & Garcia, P. C. A. The specialized reproductive mode of the tree frog *Aplastodiscus perviridis* (Anura, Hylidae). **Amphibia-Reptilia**, **26**: 87-92, 2005.
- Hartmann, M. T.; Hartmann, P & Haddad, C. F. B. Visual signaling and reproductive biology in the nocturnal treefrog, *Hyla* sp. (aff. *ehrharti*) (Anura:Hylidae). **Amphibia-Reptilia** **25**: 395-406, 2004.
- Henderson, A. S.; Warburton, D. & Atwood, K. C. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **69**: 3394-3398, 1972.
- Heyer, R. W.; Rand, S. A.; Cruz, C. A. G.; Peixoto, O. L. & Nelson C. E. Frogs of Boracéia. **Arq. Zool.** **31**, 1990.
- Heitz, E. Das heterochromatin der moose. I. **Jabet. Wiss. Bot.** **69**: 762-818, 1928.
- Holmquist, G. The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination. **Chromosoma** **72**: 203-224, 1979.

- Howell, W. M. & Black, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** **36**: 1014-1015, 1980.
- Hsu, T. C.; Spirito, S. E. & Pardue, M. L. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma** **53**: 25-36, 1975.
- John, B. The biology of heterochromatin. In: **Heterochromatin: molecular and structural aspects** (R. S. Verma, ed.). Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 1-128, 1988.
- Kaiser, H.; Mais, C.; Bolaños, F.; Steinlein, C.; Feichtinger, W. & Schmid, M. Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with a description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica** **98**: 95-102, 1996.
- King, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** **80**: 191-217, 1980.
- King, M. The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In: **Amphibian Cytogenetics and Evolution** (D. M. Green and S. K. Sessions eds.), pp. 359-391. **Academic Press., San Diego**, 1991.
- King, M.; Contreras, N & Honeycutt, R. L. Variation within and between nucleolar regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S and 28S *in situ* hybridization. **Genetics** **80**: 17-29, 1990.
- Lavilla, E. O. Tipos portadores de nombre y localidades tipos de anfibios de Argentina. **Acta Zool. Lilloana** **42**: 1-7, 1992.
- Lee, C.; Sasi, R. & Lin, C. C. Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: Further evidence for tandem chromosome fusions

- in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. **Cytogenet. Cell Genet.** **63**: 156-159, 1993.
- Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M. & Cardoso, A. J. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. **Chrom. Res.** **6**: 621-628, 1998.
- Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M. & Cardoso, A. J. Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Can. J. Zool.** **77**: 624-631, 1999.
- Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M.; Cardoso, A. J. A second case of multivalent meiotic configurations in diploid species of Anura. **Genet. Mol. Biol.** **23**: 131-133, 2000.
- Luke, S. & Verma, R. S. Telomeric repeat (TTAGGG)_n sequences of human chromosomes are conserved in chimpanzee (*Pan troglodytes*). **Mol. Gen. Genet.** **237**: 460-462, 1993.
- Lutz, A. & Lutz, B. Anfíbios anuros da coleção Adolpho Lutz do Instituto Oswaldo Cruz. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **48**: 612-630, 1950.
- Lutz, B. Anfíbios anuros da coleção Adolpho Lutz do Instituto Oswaldo Cruz. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **48**: 600-637, 1950.
- Lutz, B. Brazilian species of *Hyla*. **Univ. Texas Press, Austin**, 265p, 1973.
- Mertens, R. Eine neue *Hyla* aus Santa Catarina, Brasilien. **Senckenbergiana** **33**: 165-167, 1952.
- Metcalfe, C. J.; Eldridge, M. D. B. & Johnston, P. G. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T₂AG₃)_n in the 2n = 14 ancestral marsupial complement and in

- the macropodines (Marsupialia: Macropodidae) by fluorescence *in situ* hybridization. **Chrom. Res.** **12**: 405-414, 2004.
- Meunier-Rotival, M.; Cortadas, J.; Macaya, G. & Bernardi, G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucleic Acids Res.** **6**: 2109-2123, 1979.
- Meyne, J.; Baker, R. J.; Hobart, H. H.; Hsu, T. C.; Ryder, O. A.; Ward, O. G.; Willey, J. E.; Wurster-Hill, D. H.; Yates, T. L. & Moyzis, R. K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma** **99**: 3-10, 1990.
- Meyne, J.; Ratliff, R. L. & Moyzis, R. K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 7049-7053, 1989.
- Miura, I. Two differentiated groups of the Japanese toad, *Bufo japonicus japonicus*, demonstrated by C-banding analysis of chromosomes. **Caryologia** **48**: 123-136, 1995.
- Moyzis, R. K.; Buckingham, J. M.; Cram, L. S.; Dani, M.; Deaven, L. L.; Jones, M. D.; Meyne J.; Ratliff, R. L. & Wu, J. R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n present at the telomeres of human chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**: 6622-6626, 1988.
- Nanda, I.; Schneider-Rasp, S.; Winking, H. & Schmid, M. Loss of telomeric sites in the chromosome of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. **Chrom. Res.** **3**: 399-409, 1995.
- Ochs, R.; Lischwe, M.; O'Lery, P. & Busch, H. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. **Exp. Cell Res.** **146**: 139-149, 1983.
- Pagnozzi, J. M.; Silva, M. J. J. & Yonenaga-Yassuda, Y. Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). **Chrom. Res.** **8**: 585-591, 2000.

- Pfeifle, J.; Boller, K. & Anderer, F. A. Phosphoprotein pp135 is an essential component of the nucleolus organizer region (NOR). **Exp. Cell Res.** **162**: 11-22, 1986.
- Pough, F.V.; Andrews, R.W.; Cadle, J.E.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H. & Wells, K.D. **Herpetology. Upper Saddle River. Prattice-Hall, Inc. XI+ 577p.** 1198,1999.
- Pough, F. H.; Heiser, J. B. & Mcfarland, W. N. Salamandras, Anuros e Cecílias. In: **A vida dos vertebrados.** Atheneu Editora, São Paulo, 1993.
- Raber, S. C.; Carvalho, K. A.; Garcia, P. C. A.; Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S. M. Chromosomal characterization of *H. bischoffi bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). **Phyllomedusa**, **3**: 51-59, 2004.
- Ris, H. & Korenberg, J. Chromosome structure and levels of chromosome organization. In: **Cell Biology: a comprehensive treatise** (D. M. Prescott & L. Goldstein, eds.), New York, 1979.
- Rogatcheva, M. B.; Ono, T.; Sonta, S.; Oda, S.& Borodin, P. M. Robertsonian metacentrics of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insetívora, Soricidae) lose the telomeric sequences in the centromeric area. **Genes Genet. Syst.** **75**: 155-158, 2000.
- Ruiz, I. R. G.; Soma M. & Beçak, W. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploidy species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). **Cytogen. Cell Genet.**, **29**: 84-98, 1981.
- Scheer, U. & Rose, K. M. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. **Proc. Nat. Acad. Sci., USA** **81**: 1431-1435, 1984.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** **66**: 361-388, 1978a.

- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma** 68: 131-148, 1978b.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87: 327-344, 1982.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. IV Differentiation of CG- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** 77: 83-103, 1980.
- Schmid, M.; Vitelli, L. & Batistoni, R. Chromosome banding in Amphibian. .III.. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma** 71: 29-55, 1979.
- Schmid, M.; Haaf, T.; Geile, B. & Sims, S. Chromosome banding in Amphibia. .VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobombae* (Anura, Hylidae). **Chromosoma** 88: 69-82, 1983.
- Schmid, M.; Haaf, T.; & Schempp, W. Chromosome banding in Amphibia. IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma** 91: 172-182, 1985.
- Schmid, M.; Sims, S. H.; Haaf, T. & Mc Gregor, H. C. Chromosome banding in Amphibia. X. 18S and 28S ribosomal RNA genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrotheca riobombae* (Anura, Hylidae). **Chromosoma** 94: 139-45, 1986.
- Schmid, M.; Steinlein, C.; Nanda, I. & Epplen, J. T. Chromosome banding in Amphibia, in Olmo E (ed). **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**: 21-45, 1990.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Weimer, R.; Mais, C.; Bolaños, F. & León, P. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and multiple

- nucleolus organizers and nucleoli in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytog. Cell Genet.** **69**: 18-26, 1995.
- Schwarzaker, H. G. & Mosgoeller, W. Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structures and function. **Cytog. Cell Genet.** **91**: 243-252, 2000.
- Siqueira-Jr , S; Ananais, F; Recco-Pimentel, S. M. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. **Genet. Mol. Biol.** **27**: 363-372 (2004).
- Sumner, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** **75**: 304-306, 1972.
- Sumner, A. T. C-banding and related methods. In: **Chromosome banding**. Unwin Hyman Ed., pp. 39-69, 1990.
- Sumner, A. T. Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem.** **38**: 91-109, 1994.
- Tek, A. L. & Jiang, J. The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. **Chromosoma** **113**: 77-83, 2004.
- Veiga-Menoncello, A. C. P.; Lima, A. P. & Recco-Pimentel, S. M. Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura- Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. **Hereditas** **139**: 189-198, 2003.
- Vermeesch, J. R.; De Meurichy, W.; Van Den Berghe, H.; Mary Nen, P. & Petit, P. Differences in the chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob (4:26) fusion site. **Cytog. Cell Genet.** **72**: 310-315, 1996.

- Viegas-Pequignot, 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, 1992.
- Vieira, S. C. Caracterização cromossômica de espécies do grupo de *Hyla polytaenia* (Anura, Hylidae). **Tese de Mestrado**, Instituto de Biologia, Unicamp, 66 p. Campinas, 2004.
- Visintin, R. & Amon, A. The nucleolus: the magician's hat cell cycle tricks. **Curr. Opin. Cell Biol.** 12: 372-377, 2000.
- Wiley, J. E.; Little, M. L.; Romano, M. A.; Blount, D. A. & Cline, G. R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid tree frogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. **Chromosoma** 97: 481-487, 1989.
- Zug, G. R. Amphibians. In: **Herpetology - An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, Inc. Washington, DC, pp. 357-385, 1993.

II. ARTIGO 1

**Citogenética comparativa de *Aplastodiscus* e de três espécies do grupo de
Hyla albomarginata (Anura, Hylidae)**

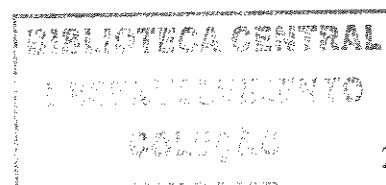
¹Carvalho, K. A., ²Garcia, P. C. A & ¹Recco-Pimentel, S.M.

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, SP

²Área de Ciências da Saúde, Curso de Ciências Biológicas, Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) 08780-911 Mogi das Cruzes, SP

Running title: Citogenética de espécies de *Aplastodiscus* e *Hyla*

Palavras-chave: *Hyla*, *Aplastodiscus*, citogenética



Resumo

No presente trabalho foram estudadas citogeneticamente as duas espécies de *Aplastodiscus* e três espécies dos complexos “albosignata” e “albomarginata” do grupo de *Hyla albomarginata*, considerados próximos por características morfológicas e comportamentais. Adicionalmente, *Hyla faber*, que é uma espécie congênica, porém não pertencente ao grupo também foi estudada a fim de contribuir com a sistemática do grupo. *Aplastodiscus perviridis*, *A. cochranæ*, *Hyla albomarginata* e *Hyla faber* apresentaram $2n=24$, enquanto *Hyla albosignata* e *Hyla leucopygia* apresentaram $2n=20$ e $2n=18$ cromossomos, respectivamente. As duas espécies de *Aplastodiscus* apresentaram cariótipos idênticos, em relação à morfologia dos cromossomos, à localização de NOR no par 12 e ao padrão de localização de heterocromatina. Os dados obtidos para *A. perviridis* e *A. cochranæ* não permitiram a sua diferenciação citogenética. No grupo de *H. albomarginata*, a NOR foi localizada no par 09 em *Hyla albosignata* e *H. leucopygia* e no par 02 em *H. albomarginata*. Em *H. faber* foi localizada no par 11. O par 09 de *H. albosignata* e *H. leucopygia* é muito semelhante, no tamanho e morfologia (metacêntricos), ao par 12 das espécies de *Aplastodiscus* e ao par 11 de *H. faber* e também na localização (região telomérica) da NOR, sugerindo serem esses cromossomos homeólogos. Embora *Hyla albomarginata* diferencie-se das demais espécies analisadas pela localização da NOR no par 02, apresenta o mesmo número diplóide e a morfologia dos cromossomos semelhante a *Aplastodiscus*. A diferenciação cromossômica das espécies analisadas no presente trabalho parece ter ocorrido por redução no número cromossômico e rearranjos envolvendo principalmente o grupo de cromossomos menores, já que os sete primeiros cromossomos apresentam morfologia e tamanhos bastante conservados nas espécies dos dois gêneros.

Introdução

O gênero *Aplastodiscus* A. Lutz in B. Lutz ,1950 é composto por apenas duas espécies, *A. perviridis* A. Lutz in B. Lutz , 1950 e *A. cochranae* (Mertens, 1952). *Aplastodiscus perviridis* ocorre do Brasil central até o nordeste da Argentina (Cei & Roig, 1961; Frost, 2004) ao passo que *A. cochranae* é conhecida em apenas três localidades do Estado de Santa Catarina, Brasil (Garcia *et al.*, 2001).

O gênero *Aplastodiscus* foi separado do gênero *Hyla* Laurenti, 1768 devido a diferenças na estrutura dos dedos e artelhos (A. Lutz in B. Lutz , 1950). No entanto, como há grande semelhança morfológica entre os dois gêneros, alguns autores colocaram em dúvida sua validade e vários trabalhos posteriores foram publicados usando a combinação *Hyla perviridis* (Bokermann, 1967; Bokermann & Sazima, 1973; Cardoso *et al.*, 1989; Cardoso & Haddad, 1992). Porém, até o momento, o gênero *Aplastodiscus* continua válido já que essa sinonimização não foi efetivada. *Aplastodiscus cochranae* foi descrita como *Hyla cochranae* Mertens, 1952, mas Bokermann (1966) a considerou sinônimo de *Aplastodiscus perviridis*, o que foi aceito posteriormente por vários autores (Lutz, 1973; Duellman, 1977; Cei, 1980; Frost, 1985; Lavilla, 1992). Recentemente, Garcia *et al.* (2001) revalidaram *A. cochranae* com base em caracteres de morfologia externa.

O grupo de *Hyla albomarginata*, constituído pelas formas verdes, é subdividido em três complexos: “albomarginata”, “albofrenata” e “albosignata” (B. Lutz, 1973). O primeiro é constituído pelas espécies *H. albomarginata* e *H. rufitela*; o segundo por *H. albofrenata*, *H. musica*, *H. arildae*, *H. ehrhardti*, *H. eugenioi* e *H. weygoldti* e o terceiro complexo inclui as espécies *H. albosignata*, *H. callipygia*, *H. fluminea*, *H. leucopygia* e *H. cavicola* (B. Lutz, 1973; Cruz & Peixoto, 1984, 1985; Faivovich *et al.*, 2002).

Segundo Lutz (1950), dentro do gênero *Hyla*, a espécie *H. albosignata* é a que mais se aproxima de *Aplastodiscus perviridis* devido ao seu porte, cor e canto. Bokermann (1967) indicou padrões semelhantes de canto entre *A. perviridis*, *H. albofrenata* e *H. albosignata*. Outra característica que aproxima *Aplastodiscus* das espécies das “hylas verdes” desses complexos é o desenvolvimento dos calos metacarpais e metatarsais, que poderiam estar relacionados ao hábito de escavar tocas na lama (Garcia *et al.*, 2001).

Apesar da grande semelhança morfológica e comportamental entre as espécies do grupo de *H. albomarginata* e *Aplastodiscus*, o relacionamento filogenético e taxonômico entre esses gêneros ainda não está claro. Estudo recente de Haddad *et al.* (2005) mostrou que *A. perviridis* apresenta o mesmo modo reprodutivo raro e específico das espécies dos complexos de *H. albofrenata* e de *H. albosignata*. Com base nessa semelhança, esses autores sugeriram uma origem monofilética para *Aplastodiscus* e esses complexos de *Hyla*. Uma análise filogenética do gênero *Hyla*, que incluiu *Aplastodiscus*, utilizando dados morfológicos também corrobora essa hipótese (Da Silva, 1998).

Recentemente, baseados em dados moleculares, Faivovich *et al.* (2005) propuseram a transferência das *Hylas* dos complexos “*albosignata*” e “*albofrenata*” para o gênero *Aplastodiscus* e revalidaram o gênero *Hypsiboas* incluindo nele as duas espécies do complexo “*albomarginata*”, sendo que a espécie *H. albomarginata* ficou alocada no grupo de *Hypsiboas* (= *Hyla*) *faber*.

Há poucos estudos citogenéticos para *Aplastodiscus* e para as espécies de *Hyla* do grupo de *H. albomarginata*, sendo que a grande maioria apenas descreve o cariótipo por métodos convencionais. Foram descritos os cariótipos de *A. perviridis* ($2n=24$) (Feitosa *et al.*, 1995) e de *H. albomarginata* ($2n=24$) (Beçak, 1968; Gruber, 2002). Bogart (1973) encontrou números cromossômicos distintos para *H. albofrenata* (Tijuca, RJ; $2n=24$ e Boracéia, SP; $2n=22$) e para *H. albosignata* (Boracéia, SP; $2n=20$ e Teresópolis, RJ; $2n=18$).

No presente trabalho, as duas espécies do gênero *Aplastodiscus*, espécies representantes de dois dos complexos do grupo de *Hyla albomarginata* (“*albomarginata*” e “*albosignata*”: senso Cruz & Peixoto, 1984, 1985) e *H. faber* foram analisados citogeneticamente, com o intuito de contribuir para o entendimento futuro da problemática envolvendo *A. perviridis* e *A. cochranae*, e o relacionamento de *Aplastodiscus* com as espécies do grupo de *H. albomarginata*.

Materiais e Métodos

Espécies analisadas

Os animais utilizados no presente estudo estão indicados na tabela 1 e foram coletados com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Proc. n° 02001.008867/01-92). Todos os espécimes foram depositados na Coleção de Anfíbios “Célio Fernando Baptista Hadadd” (CFBH), no Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Rio Claro.

Tabela 1. Dados das espécies utilizadas. f= fêmea; m= macho.

Espécies	Locais de Coleta (Município/Estado)	Número de espécimes analisados	Número de Registro na Coleção CFBH
<i>Aplastodiscus perviridis</i> A. Lutz in B. Lutz, 1950	Poços de Caldas (MG)	07 (06m; 01f)	5840; 6987-6989; 7010-7012
	São Bento do Sul (SC)	05 (m)	7406-7407; 5547-5549
<i>Aplastodiscus cochranæ</i> (Mertens, 1952)	Rancho Queimado (SC)	05 (m)	6991; 7001; 7003-7005
<i>Hyla albosignata</i> Lutz and B. Lutz, 1938	Piraquara (PR)	01 (m)	5546
	São Bento do Sul (SC)	05 (m)	5543-5545; 6992-6993
<i>Hyla leucopygia</i> Cruz and Peixoto, 1985	Mogi das Cruzes (SP)	07 (m)	4012-4013; 6646-6647; 7391-7393
	Maricá (RJ)	02 (m)	7395-7396
<i>Hyla albomarginata</i> Spix, 1824	Bertioga (SP)	05 (m)	6406-6410
	Picinguaba (SP)	04 (m)	7408-7410; 4011
	Mogi das Cruzes (SP)	02 (m)	6403-6404
<i>Hyla faber</i> Wied-Neuwied, 1821	Mogi das Cruzes (SP)	02 (m)	4014; 6650
	Biritiba Mirim (SP)	01 (m)	6982

Preparação cromossômica e técnicas

As metáfases mitóticas foram obtidas de suspensão celular de testículo e de epitélio intestinal, de acordo com Schmid (1978a) e Schmid *et al* (1979). Os cromossomos foram

submetidos à coloração convencional com Giemsa 10% para a montagem dos cariótipos, morfometria cromossômica e construção dos ideogramas. A técnica de bandamento C (Sumner, 1972) foi utilizada para evidenciar heterocromatina e a de impregnação pelo íon prata para a detecção das regiões organizadoras do nucléolo (NOR) (Howell & Black, 1980).

A localização das NORs foi confirmada por hibridação *in situ* (Viegas-Péquignot, 1992), utilizando como sonda o plasmídeo recombinante HM123, que contém um fragmento de rDNA de *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival *et al.*, 1979).

Todas as análises foram feitas com microscópio Olympus BX60. Os cromossomos foram classificados de acordo com Green & Sessions (1991).

Resultados

Todos os espécimes de *A. cochranæ*, *A. perviridis*, *H. albomarginata* e *H. faber* apresentaram número diplóide de $2n=24$ cromossomos, enquanto *H. albosignata* apresentou $2n=20$ e *H. leucopygia* $2n=18$. A morfologia dos cromossomos das espécies estudadas é bastante semelhante sendo que, em todas elas, os pares 01, 02, 09, 10, 11 e 12 são metacêntricos e os pares 04, 05, 06 e 07 são submetacêntricos. Verificou-se variação no par 03 que é metacêntrico em *Hyla albomarginata* e submetacêntrico nas demais e no par 08 que é submetacêntrico em *H. albosignata* e *H. leucopygia* e metacêntrico nas demais espécies (Figs. 1A-F; 4A-F; Tabela 2).

Heterocromatina foi detectada para as espécies *A. cochranæ*, *A. perviridis* e *H. albomarginata* (Figs. 2A-C; 4A, B e E). Para as demais espécies não foram obtidos resultados satisfatórios. Blocos de heterocromatina foram observados nas regiões centroméricas de todos os cromossomos das três espécies, diferindo apenas na quantidade. Em *Aplastodiscus* foram detectados blocos de heterocromatina na região telomérica dos braços curtos dos pares 01, 02 e nos braços longos dos pares 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07 e 08 e intersticiais nos braços longos dos pares 06, 10, 11 e 12 e nos braços curtos do par 11 nas duas espécies. No par 12 foi ainda detectada heterocromatina adjacente a NOR. Em *Hyla albomarginata*, bandas C positivas foram observadas nas regiões teloméricas dos braços curtos dos pares 01, 02 e 03 e braços longos dos pares 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e 09. Heterocromatina intersticial foi visualizada nos braços curtos dos pares 02, 03 e 04 e nos braços longos dos pares 05 e 06. No cromossomo 02, portador da NOR, a heterocromatina é coincidente com a NOR, e se estende desta região até o centrômero (Figs. 2 A-C; 4 A, B e E).

A NOR foi detectada na região telomérica do braço longo do par 12 em *A. cochranæ* e *A. perviridis* e do par 09 em *H. albosignata* e *H. leucopygia*. Em *H. albomarginata*, a NOR está localizada intersticialmente no braço curto do par 02, apresentando-se heteromórfica entre os homólogos. *Hyla faber* apresentou a NOR na região telomérica do braço longo do par 11 (Figs. 3A-F; 4A-F). Constrições secundárias foram

freqüentemente observadas nos cromossomos de todas as espécies, estando sempre associadas com a NOR. Em todas as espécies, a localização da região organizadora do nucléolo detectada por Ag-NOR foi confirmada por hibridação *in situ* com sondas de DNAr (Fig. 3A-F).

Discussão

A análise de número e morfologia cromossômica tem sido, algumas vezes, útil para diferenciar espécies com morfologia externa muito semelhante, como ocorreu com as espécies de *Megaelosia* (Giaretta & Aguiar-Jr, 1998), *Hyla nana* e *H. sanborni* (Medeiros *et al.*, 2003) e *Colostethus* (Veiga- Menoncello *et al.*, 2003). As duas espécies de *Aplastodiscus*, no entanto, apresentaram o mesmo número diplóide de 24 cromossomos, e com morfologia cromossômica bastante conservada, o que é bastante comum entre as espécies da família Hylidae, como já relatado para espécies proximalmente relacionadas como *H. marginata*, *H. semiguttata* e *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) (Ananias *et al.*, 2004), *H. bischoffi* e *H. guentheri* (Raber *et al.*, 2004), *H. polytenia* e *H. leptolineata* (Vieira, 2004), entre outras. No entanto, nos exemplos citados, os cariótipos puderam ser diferenciados pela localização de NOR e/ou pelo padrão de distribuição de heterocromatina, o que não ocorreu com *Aplastodiscus*. No presente trabalho, não só os dados de número e morfologia cromossômica foram idênticos, mas também localização da NOR e padrão de heterocromatina, não permitindo a distinção entre *A. perviridis* e *A. cochranæ*.

As duas espécies do complexo “albosignata”, *Hyla albosignata* e *H. leucopygia*, apesar de mostrarem diferenças no número ($2n=20$ e 18 , respectivamente) apresentaram grande semelhança na morfologia cromossômica. Aparentemente, a redução do número cromossômico ocorreu pela perda de um metacêntrico pequeno, provavelmente o par 10, já que o par 09 nas duas espécies tem aproximadamente o mesmo tamanho e carregam a NOR na mesma posição e, além disso, os demais cromossomos são bastante assemelhados morfológicamente. Os resultados aqui obtidos para *H. albosignata* diferem daqueles mostrados por Bogart (1973) que estudou duas outras populações atribuídas a essa espécie, tendo encontrado $2n=20$ (Boracéia - SP) e $2n=18$ (Teresópolis - RJ) cromossomos. O cariótipo com $2n=18$ cromossomos encontrado por Bogart é idêntico ao da espécie *Hyla leucopygia* do presente trabalho, coletada em uma região (Maricá) muito próxima a Teresópolis (~50 Km). Como *H. leucopygia* da mesma localidade (Teresópolis - RJ) foi descrita por Cruz & Peixoto (1984), os dados citogenéticos sugerem que a espécie estudada por Bogart (1973) é *Hyla leucopygia*.

Os cariótipos das espécies *H. albosignata* ($2n=20$) e *H. leucopygia* ($2n=18$) mostraram semelhanças também com as duas espécies de *Aplastodiscus* ($2n=24$). A diferenciação cromossômica dessas espécies parece ter ocorrido por redução no número cromossômico, já que cariótipos semelhantes com $2n=24$ são observados em outras espécies de *Hyla*. Tal redução envolve principalmente o grupo de cromossomos menores, já que os sete primeiros cromossomos apresentam morfologia e tamanhos bastante conservados. Além disso, o par 09, portador da NOR em *H. albosignata* e *H. leucopygia*, é muito semelhante no tamanho, na morfologia (metacêntrico) e na localização (região do telômero) dos cístrons ribossomais quando comparado ao par 12 das espécies de *Aplastodiscus*. Hipóteses de redução de número de cromossomos para explicar cariótipos semelhantes com número cromossômico diferente já foram levantadas para outras espécies de anuros (Beçak, 1968; Bogart, 1970; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003; Siqueira-Jr. *et al.*, 2004). Apesar de *Hyla albomarginata* também apresentar a maioria dos cromossomos com morfologia muito semelhante a dos cromossomos das outras espécies discutidas acima, difere na localização da NOR, que se encontra no grupo de cromossomos grandes, no par 2, diferenciando essa espécie das demais.

O heteromorfismo de NOR observado entre os homólogos do par 2 de *H. albomarginata* é um evento bastante comum em anuros e se deve provavelmente à amplificação das sequências de rDNA, o que provavelmente justifica o pequeno aumento no tamanho total do cromossomo maior portador da NOR.

Os dados moleculares obtidos por Faivovich *et al.* (2005) mostraram que *H. albomarginata* (*Hypsiboas albomarginatus*) é mais aparentada com outras espécies de “*Hyla*”, ficando no grupo de *Hypsiboas faber*, enquanto *A. perviridis*, *A. cochranæ*, *H. albosignata* e *H. leucopygia* ficaram no gênero *Aplastodiscus*, sendo grupos irmãos. O cariótipo e o par 11 portador da NOR de *Hyla faber*, são também bastante semelhantes aos das espécies de *Aplastodiscus*, *H. albosignata* e *H. leucopygia*, confirmando o relacionamento próximo, principalmente com *Aplastodiscus*.

Os estudos comportamentais, morfológicos, moleculares e os dados citogenéticos obtidos até o momento mostraram que as espécies dos gêneros *Aplastodiscus*, dos complexos “*albomarginata*” e “*albosignata*” (grupo de *Hyla albomarginata*) e o grupo de

Hysiboas faber são filogeneticamente muito próximas, provavelmente originadas de um ancestral comum.

Ainda, em relação a *Aplastodiscus*, as duas espécies não apresentaram nenhuma diferença em relação às características citogenéticas analisadas e por esses parâmetros não foi possível distingui-las.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Denise P. Ceale, Dra. Marília T. Hartmann, Dr. Fernando Ananias, M.Sc. Sérgio Siqueira Junior, M.Sc. Samantha Celi Vieira e Marcos Yamamoto, pela coleta de alguns dos exemplares e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. nº. 04/10901-6) pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- Ananias, F.; Garcia, P. C. A. & Recco-Pimentel, S. M. Conserved karyotypes in *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, **140**: 42-48, 2004.
- Beçak, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**. **21**: 191-208, 1968.
- Bogart, J. P. Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. **Cytogenetics** **9**: 369-383, 1970.
- Bogart, J. P. Evolution of anuran karyotypes. In: Vial J. L. (ed) **Evolutionary biology of anurans**. University Missouri Press, Missouri, pp. 337-349, 1973.
- Bokermann, W. C. A. **Lista anotada das localidades tipo de anfíbios brasileiros**. 138p. Serviço de documentação - USP, São Paulo, 1966.
- Bokermann, W. C. A. Notas sobre cantos nupciais de anfíbios brasileiros. I (Anura). **An. Acad. Bras. Ci.** **39**: 441-443, 1967.
- Bokermann, W. C. A. & Sazima, I. Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. 1: Duas espécies novas de *Hyla* (Anura, Hylidae). **Rev. Bras. Biol.** **33**: 457-472, 1973.
- Cardoso, A. J.; Andrade, G. V. & Haddad, C. F. B. Distribuição espacial em comunidades de anfíbios (Anura) no sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Biol.** **49**: 241-249, 1989.
- Cardoso, A. J. & Haddad, C. F. B. Diversidade e turno de vocalização de anuros em comunidade neotropical. **Acta Zool. Lilloana** **41**: 93-105, 1992.

- Cei, J. M. & Roig, V. G. Batracios recolectados por la Expedición Biológica “Erspamer” a la mesopotamia argentina y selva oriental de Misiones. **Notas Biol. Facult. Ciên. Ex. Fís. y Nat., Zoologia** 1: 5-40, 1961.
- Cei, J. M. Amphibians of Argentina. **Monitore Zool. Ital.**, n. S., Monog. 2: XII+609p., 1980.
- Cruz, C. A. G. & Peixoto, A. L. Espécies verdes de *Hyla*: o complexo “albosignata” (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arq. Univ. Fed. Rio de Janeiro** 7: 31-47, 1984.
- Cruz, C. A. G. & Peixoto, A. L. Espécies verdes de *Hyla*: o complexo “albofrenata” (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arq. Univ. Fed. Rio de Janeiro** 8: 59-70, 1985.
- Da Silva, H. R. Phylogenetic relationships of the family Hylidae with emphasis on the relationships within the subfamily Hyalinae (Amphibia:Anura). **Tese de Doutorado**, Museu Nacional do Rio de Janeiro, Universidade do Rio de Janeiro, 175p. Rio de Janeiro, 1998.
- Duellman, W. Liste der rezenten Amphibien und Reptilien – Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae. **Das Tierreich** 95, XIX+225p., 1977.
- Faivovich, J. The identity of *Hyla ehrhardti* Müller, 1924 (Anura, Hylidae). **J. Herpetol.** 36: 325-327, 2002.
- Faivovich, J.; Haddad, C. F. B. H.; Garcia, P. C. A.; Frost, D. R.; Campbell, J. A. & Wheeler, W.C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hyalinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 294: 1-240, 2005.

- Feitosa, V. L. C.; Recco-Pimentel, S. M. & Cardoso, A. J. Structural chromosomal alterations in *Hyla albopunctata* and *Aplastodiscus perviridis* (Anura, Hylidae) from the Morro do Ferro region of Minas Gerais. **Rev. Bras. Genet.** **18**: 191-197, 1995.
- Frost, D. R. **Amphibian species of the world**. Association of Systematics Collections and Allen Press, Lawrence, Kansas, pp. 110-203, 1985.
- Frost, D. R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 3.0 (22 August, 2004). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garcia, P. C. A; Caramaschi, U. & Kwet, A. O status taxonômico de *Hyla cochranae* Mertens e recaracterização de *Aplastodiscus* A. Lutz (Anura, Hylidae). **Rev. Bras. Zool.** **18**: 1197-1218, 2001.
- Giaretta, A. A. & Aguiar-Jr, O. A new species of Megaelosia (Anura, Leptodactylidae-Hylodinae) from the Mantiqueira range, southeastern Brazil. **J. Herpetol.** **32**: 80-83, 1998
- Green, M. G. & Sessions, S. K. Nomenclature for chromosomes. In: **Green M. G. And Sessions S. K. (Eds.), "Amphibian cytogenetics and evolution"**. Academic Press, San Diego, pp. 431-432, 1991.
- Gruber, S. L. Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (Anura, Hylidae) dos grupos com $2n=24$ e $2n=30$, com técnicas de coloração diferencial. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, Rio Claro, 132p., 2002.

- Haddad, C. F. B.; Faivovich, J. & Garcia, P. C. A. The specialized reproductive mode of the tree frog *Aplastodiscus perviridis* (anura, Hylidae). **Amphibia-Reptilia**, **26**: 87-92, 2005.
- Howell, W. M. & Black, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, **36**: 1014-1015, 1980.
- Lavilla, E. O. Tipos portadores de nombre y localidades tipos de anfibios de Argentina. **Acta Zool. Lilloana** **42**: 1-7, 1992.
- Lutz, A. & Lutz, B. Anfíbios anuros da coleção Adolpho Lutz do Instituto Oswaldo Cruz. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **48**: 612-637, 1950.
- Lutz, B. Anfíbios anuros da coleção Adolpho Lutz do Instituto Oswaldo Cruz. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **48**: 600-637, 1950.
- Lutz, B. Brazilian species of *Hyla*. **Univ. Texas Press, Austin**, 265p., 1973.
- Medeiros, L. R.; Rossa-Feres, D. C. & Recco-Pimentel, S. M. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae), with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. **J. Hered.**, **94**: 149-154, 2003.
- Mertens, R. Eine neue *Hyla* aus Santa Catarina, Brasilien. **Senckenbergiana** **33**: 165-167, 1950.
- Meunier-Rotival M.; Cortadas, J.; Macaya, G. & Bernardi, G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucleic Acids Res.** **6**: 2109-2123, 1979.

- Raber, S. C.; Carvalho, K. A.; Garcia, P. C. A.; Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S. M. Chromosomal characterization of *H. bischoffi bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). **Phyllomedusa**, **3**: 51-59, 2004.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** **66**: 361-388, 1978a.
- Schmid, M.; Vitelli, L. & Batistoni, R. Chromosome banding in Amphibian. III. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma** **71**: 29-55, 1979.
- Siqueira-Jr, S; Ananais, F; Recco-Pimentel, S. M. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. **Genet. Mol. Biol.** **27**: 363-372 (2004).
- Sumner, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** **75**: 304-306, 1972.
- Veiga-Menoncello, A. C. P.; Lima, A. P. & Recco-Pimentel, S. M. Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura- Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. **Hereditas** **139**: 189-198, 2003.
- Vieira, S. C. Caracterização cromossômica de espécies do grupo de *Hyla polytaenia* (Anura, Hylidae). **Tese de Mestrado**, Instituto de Biologia, Unicamp, 66 p. Campinas, 2004.
- Viegas-Pequignot, 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, 1992.

Tabela 2. Dados morfométricos e classificação dos cromossomos, segundo Green & Sessions (1991). TR% = Tamanho relativo, IC = Índice centromérico, CC = Classificação centromérica. (*Valores obtidos para os morfos do par cromossômico 02 de *H. albomarginata*).

		Cromossomos											
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
<i>A. perviridis</i>													
	TR%	15,0	13,1	11,3	10,6	9,7	7,6	6,7	6,1	5,8	5,4	4,8	3,9
	IC	0,45	0,41	0,31	0,31	0,35	0,27	0,33	0,41	0,43	0,44	0,40	0,42
	CC	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M
<i>A. cochranæ</i>													
	TR%	14,7	12,6	10,7	10,4	9,7	7,9	6,7	6,1	5,8	5,4	5,1	4,9
	IC	0,46	0,44	0,27	0,35	0,34	0,30	0,37	0,45	0,45	0,46	0,45	0,48
	CC	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M
<i>H. albosignata</i>													
	TR%	15,9	13,0	11,8	11,1	10,5	10,2	9,9	7,6	5,7	4,3		
	IC	0,46	0,41	0,33	0,31	0,29	0,29	0,29	0,27	0,40	0,45		
	CC	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	M		
<i>H. leucopygia</i>													
	TR%	17,9	13,9	11,7	11,3	11,1	10,5	9,8	8,7	5,3			
	IC	0,48	0,39	0,31	0,31	0,32	0,30	0,30	0,29	0,43			
	CC	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M			
<i>H. albomarginata</i>													
	TR%	15,3	15,0 13,2*	11,3	10,5	9,2	8,3	6,6	5,6	5,5	5,0	4,1	3,6
	IC	0,48	0,41 0,40*	0,41	0,33	0,30	0,28	0,40	0,41	0,44	0,47	0,44	0,46
	CC	M	M	M	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	M
<i>H. faber</i>													
	TR%	15,0	12,6	11,2	10,5	10,1	7,8	6,7	6,0	5,7	5,4	4,8	4,2
	IC	0,45	0,41	0,30	0,34	0,35	0,28	0,32	0,46	0,42	0,44	0,40	0,44
	CC	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M

Legenda das Figuras

Figura 1. Cariótipos de *A. perviridis* (A), *A. cochranæ* (B), *H. albosignata* (C), *H. leucopygia* (D), *H. albomarginata* (E) e *H. faber* (F). Setas indicam constrições secundárias. Barra = 10µm.

Figura 2. Cariótipos de *A. perviridis* (A), *A. cochranæ* (B), *H. albomarginata* (C) submetidos ao bandamento C. Setas indicam bandas intersticiais e teloméricas. Barra = 10µm.

Figura 3. Par cromossômico portador da NOR submetido à coloração com Giemsa, Impregnação pela Prata e Hibridação *in situ*, de *A. perviridis* (A), *A. cochranæ* (B), *H. albosignata* (C), *H. leucopygia* (D), *H. albomarginata* (E) e *H. faber* (F). Barra = 10µm.

Figura 4. Ideogramas dos cariótipos de *A. perviridis* (A), *A. cochranæ* (B), *H. albosignata* (C), *H. leucopygia* (D), *H. albomarginata* (E) e *H. faber* (F). Os blocos negros indicam bandas C e os cinzas regiões de NOR. As áreas hachuradas representam as constrições secundárias. Em (E), as letras a e b indicam os morfos do cromossomo 02.

Figura 1

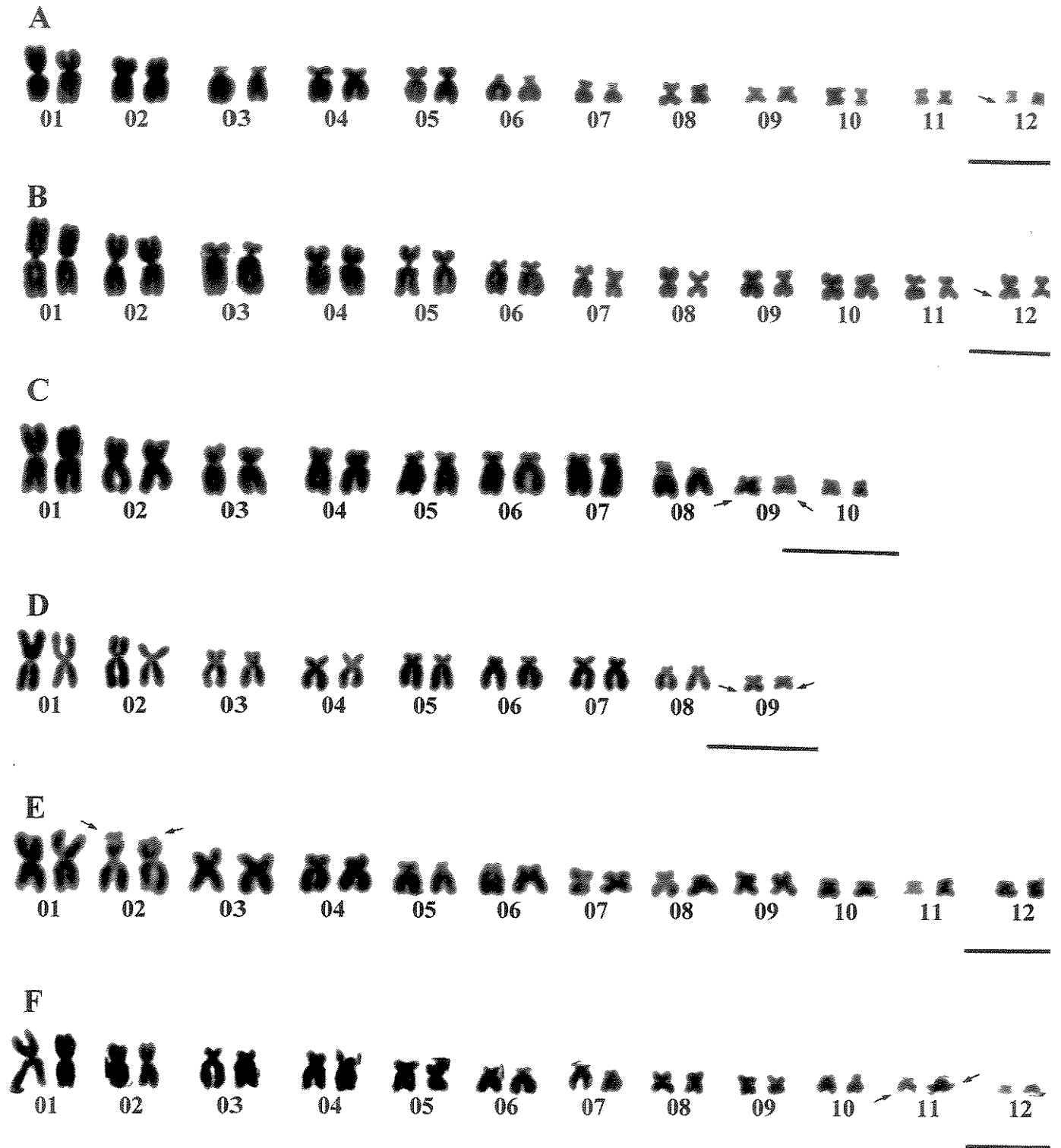


Figura 2

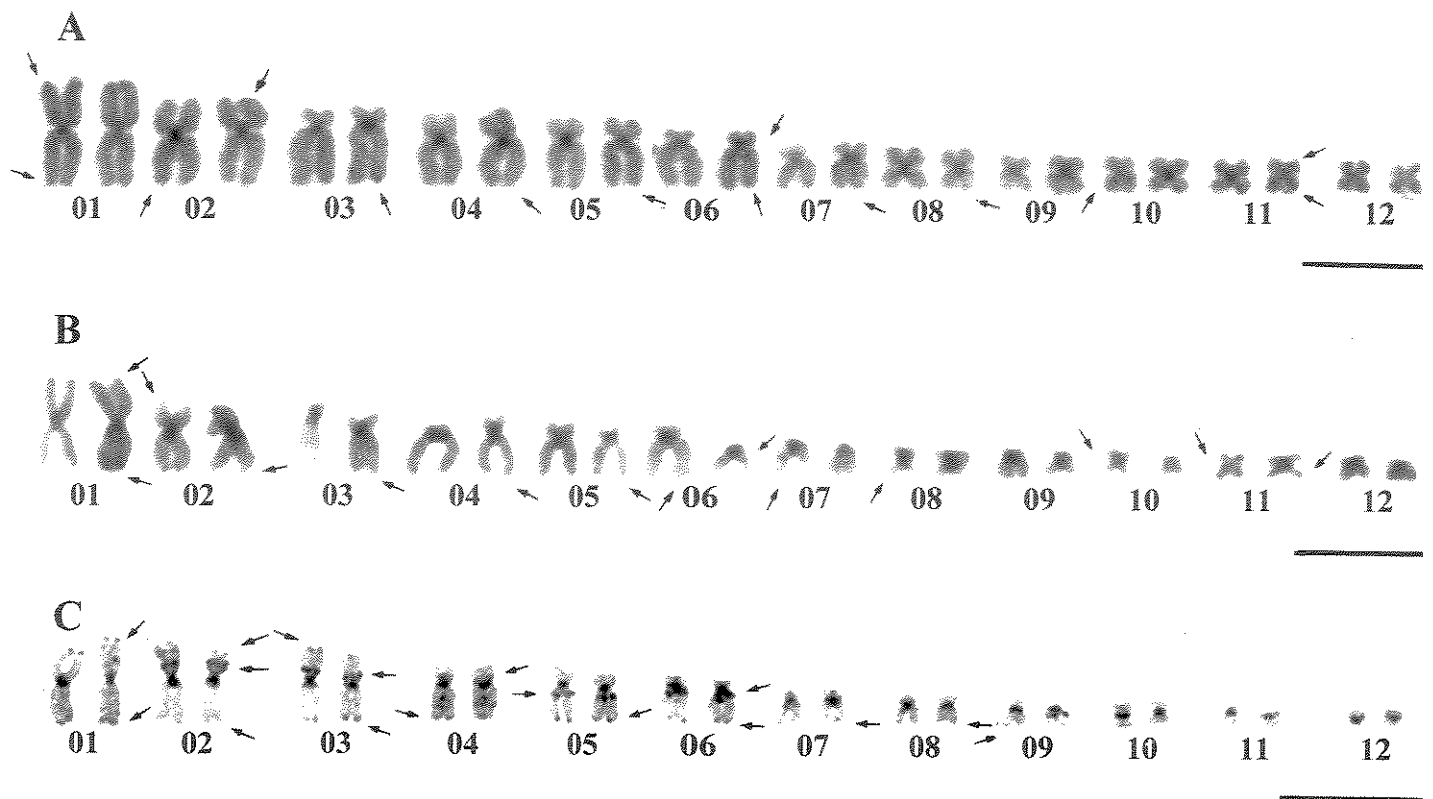


Figura 3

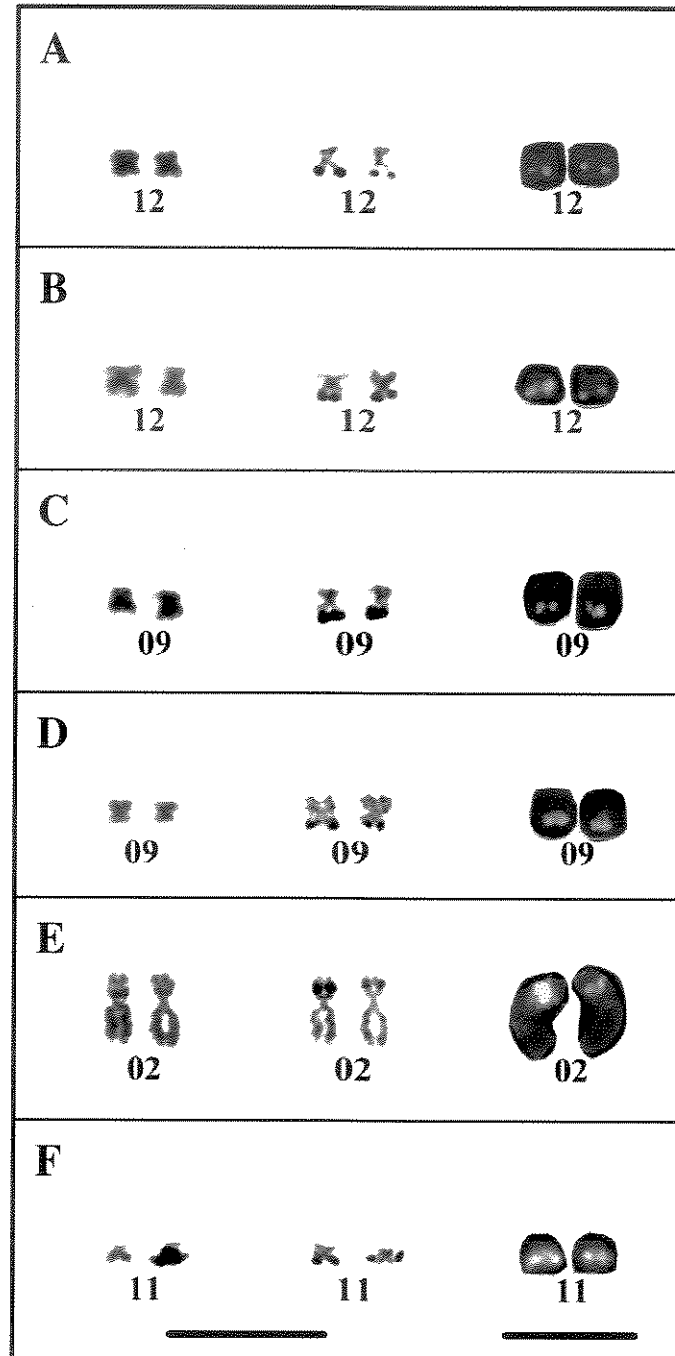
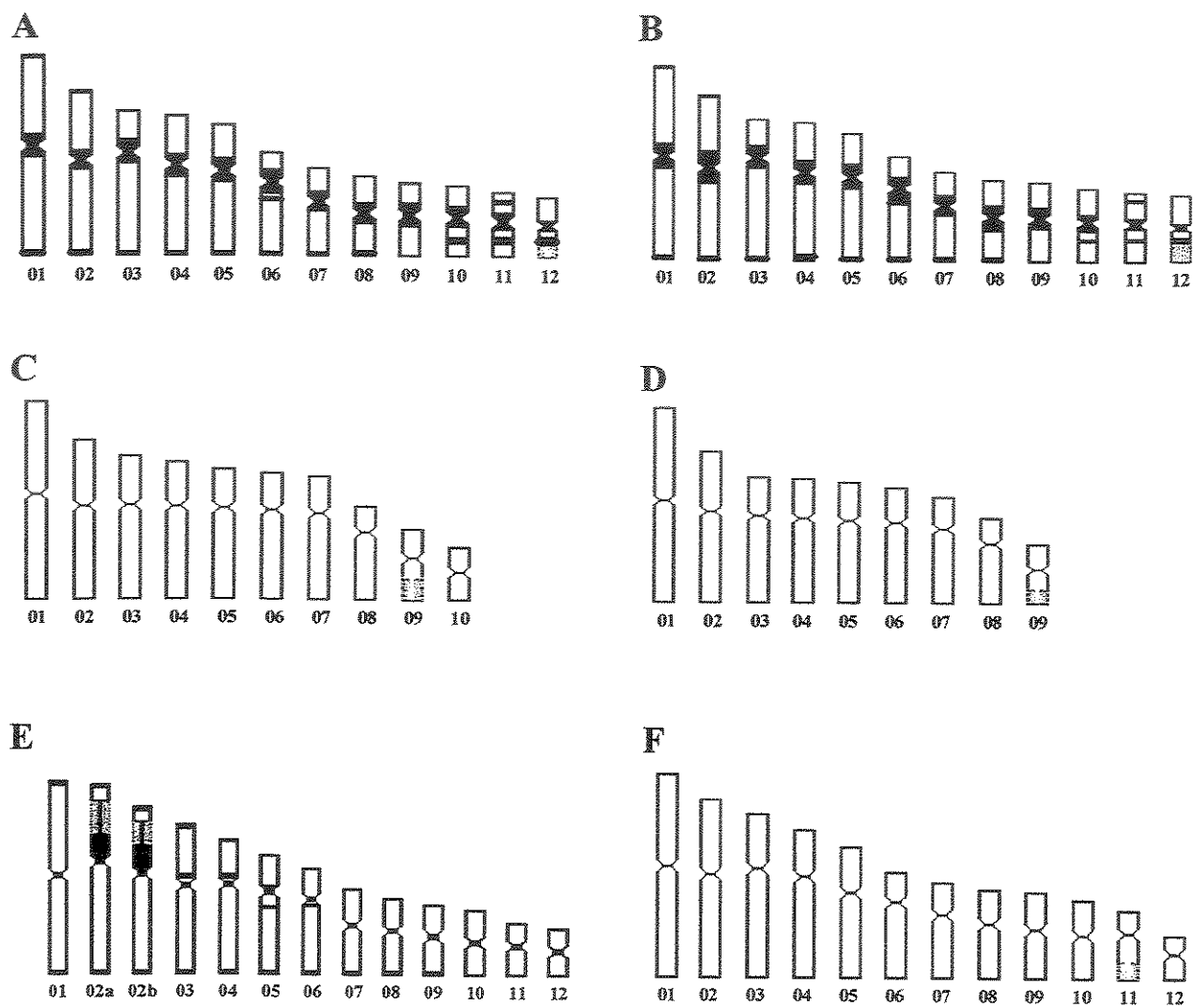


Figura 4



III. ARTIGO 2

Dispersão de NOR, detecção de seqüências teloméricas na heterocromatina centromérica e multivalentes na meiose de espécies do complexo de *Hyla albofrenata* (Anura, Hylidae).

¹Carvalho, K. A., ²Garcia, P. C. A & ¹Recco-Pimentel, S.M.

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, SP

²Área de Ciências da Saúde, Curso de Ciências Biológicas, Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) 08780-911 Mogi das Cruzes, SP

Running title: Citogenética de espécies do complexo “albofrenata”

Palavras-chave: *Hyla*, cariótipo, multivalentes, seqüência telomérica, NOR

Resumo

As quatro espécies analisadas no presente trabalho pertencem ao complexo “albofrenata” do grupo de *Hyla albomarginata* e se encontram distribuídas pelas regiões sudeste e sul do Brasil. *Hyla albofrenata*, *H. arildae*, *H. ehrhardti* e *Hyla eugenioi* apresentaram o número diplóide de $2n=22$ e morfologia cromossômica muito semelhante. Essas espécies puderam ser diferenciadas pela distribuição e quantidade de heterocromatina e pela localização da NOR, que se mostraram espécie-específicos. Seis dos oito indivíduos de *H. albofrenata* apresentaram um polimorfismo inédito de NOR em anuros, pois apenas um dos homólogos dos pares 01 e 07 foi marcado. Em *H. ehrhardti*, a técnica de Ag-NOR marcou os pares 06 e 10, mas apenas a do par 06 foi confirmada por hibridação *in situ*. Em *H. arildae*, a NOR foi localizada no par 10 e em *Hyla eugenioi* no par 07. Em *H. albofrenata* e *H. arildae* observou-se anéis multivalentes na prófase I da meiose, com a participação dos cromossomos portadores da NOR. A sonda de seqüências teloméricas marcou os telômeros em todas as espécies e também as regiões centroméricas dos cromossomos de *H. albofrenata* e *H. arildae*, coincidente com a heterocromatina centromérica. A morfologia cromossômica conservada, principalmente dos sete primeiros pares, entre as espécies dos complexos “albofrenata” (presente trabalho) “albosignata” e “albomarginata” e de *Aplastodiscus*, sugere que um cariótipo ancestral comum deve ter originado todas essas espécies atuais e que rearranjos cromossômicos levaram à diferenciação desses cariótipos, com mudança de número diplóide e dispersão de NOR e de heterocromatina.

Introdução

O grupo de *Hyla albomarginata* (Hylidae), conhecido pelas formas verdes de *Hyla*, compreende três complexos: “albomarginata”, “albosignata” e “albofrenata”. O complexo “albofrenata”, enfocado no presente estudo, é constituído pelas espécies *Hyla albofrenata*, *Hyla arildae*, *Hyla ehrhardti*, *Hyla musica*, *Hyla weygoldti* e *Hyla eugenioi* (Cruz & Peixoto, 1985; Faivovich *et al.*, 2002; Carvalho-e-Silva & Carvalho-e-Silva, 2005).

Hyla albofrenata distribui-se apenas na Floresta da Tijuca, cidade do Rio de Janeiro, enquanto *Hyla arildae* está distribuída pela Serra do Mar e Serra da Mantiqueira no sudeste do Brasil. *Hyla ehrhardti* é encontrada somente em Santa Catarina, Brasil (Frost, 2004) e *Hyla eugenioi* localiza-se na região da Serra do Mar entre o litoral Norte do Estado de São Paulo e do Estado do Rio de Janeiro (Carvalho-e-Silva & Carvalho-e-Silva, 2005).

Esse grupo das *Hylas* verdes está envolvido em uma discussão taxonômica juntamente com o gênero *Aplastodiscus*, uma vez que Bokermann (1967) apontou semelhanças no padrão de canto com as espécies *Hyla albofrenata* e *Hyla albosignata* e Haddad *et al.* (2005) verificaram que essas espécies têm o mesmo modo reprodutivo de cavar tocas na lama, corroborando Da Silva (1998) que sugeriu uma origem monofilética para essas espécies. Dados moleculares, Faivovich *et al.* (2005) propuseram a transferência das *Hylas* dos complexos “albosignata” e “albofrenata” para o gênero *Aplastodiscus* e revalidaram o gênero *Hypsiboas* incluindo nele as duas espécies do complexo “albomarginata”, sendo que a espécie *H. albomarginata* ficou alocada no grupo de *Hypsiboas* (= *Hyla*) *faber*.

Estudos cariotípicos realizados por Bogart (1973) mostraram números cromossômicos distintos para duas populações atribuídas a *Hyla albofrenata*, sendo uma da Floresta da Tijuca (RJ); com $2n=24$, e a outra da Boracéia (SP); com $2n=22$. Mais tarde, no entanto, Heyer *et al.* (1990) identificaram a população de Boracéia como sendo *Hyla arildae*.

Neste trabalho, as espécies *Hyla albofrenata*, *Hyla arildae*, *Hyla ehrhardti* e *Hyla eugenioi* foram analisadas citogeneticamente quanto ao número e morfologia dos cromossomos, padrão de heterocromatina, localização da NOR e de seqüências teloméricas,

visando à caracterização do complexo de *Hyla albofrenata* do grupo de *Hyla albomarginata* e contribuir com a sistemática do grupo e o entendimento do relacionamento dentro do grupo e com *Aplastodiscus*.

Materiais e Métodos

Espécimes

Foram analisados oito espécimes de *Hyla albofrenata* (sete machos e uma fêmea) provenientes da Floresta da Tijuca do Rio de Janeiro - RJ, quatro machos de *Hyla arildae* do Parque Natural Municipal da Serra do Itapety, Mogi das Cruzes - SP, quatro machos de *Hyla ehrhardti* de São Bento do Sul - RS, e três machos de *Hyla eugenioi* de Picinguaba - SP.

Os animais foram coletados com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Proc. nº.02001.008867/01-92).

O material testemunho de *Hyla albofrenata* foi depositado no Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), com os registros: MNRJ 36923 - 36928. As demais espécies foram depositadas na coleção de anfíbios "Célio F. B. Hadadd" (CFBH) do Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, SP, Brasil, com os registros: CFBH 6648-6649 e 6999-7000 (*Hyla arildae*), CFBH 5550 e CFBH 6643-6645 (*Hyla ehrhardti*) e CFBH 6996-6998 (*Hyla eugenioi*).

Preparações cromossômicas e técnicas

As metáfases meióticas e mitóticas foram obtidas a partir de suspensão celular de testículo e de epitélio intestinal, de acordo com Schmid (1978a) e Schmid *et al.* (1979). Os cromossomos foram submetidos à coloração com Giemsa 10%, bandamento C (Sumner, 1972) e impregnação pela prata (AgNOR) (Howell & Black, 1980).

Para hibridação *in situ* (Viegas-Péquignot, 1992) foi utilizado como sonda o plasmídeo recombinante (HM123) contendo fragmentos de rDNA de *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival *et al.*, 1979) marcado com biotina por “nick translation” e um oligonucleotídeo (TTAGGG)₇ repetido *in tandem*.

Todas as análises foram feitas em microscópio Olympus BX60. Os cromossomos foram medidos e classificados de acordo com Green & Sessions (1991).

Resultados

As espécies *Hyla albofrenata*, *H. arildae*, *H. ehrhardti* e *Hyla eugenioi* apresentaram o número diplóide de $2n=22$ cromossomos. A morfologia dos cromossomos corados com Giemsa é muito semelhante entre as espécies estudadas. As quatro espécies apresentaram os pares 01, 02, 09, 10 e 11 metacêntricos e os pares 04 e 05 submetacêntricos. Os pares 03 e 07 de *Hyla arildae* e o par 06 de *Hyla ehrhardti* são metacêntricos, mas submetacêntricos nas demais. O par 08 é submetacêntrico em *Hyla albofrenata* e metacêntrico nas outras espécies (Figs. 1 e 5; Tabela 1).

As quatro espécies estudadas apresentaram blocos de heterocromatina na região centromérica, diferindo apenas na quantidade, maior em *H. arildae* e *Hyla eugenioi*. Um dos homólogos dos pares 01 e 07 de *H. albofrenata* apresentou heterocromatina telomérica coincidente com a região organizadora do nucléolo. Em *H. ehrhardti*, heterocromatina telomérica foi detectada nos pares 01, 02, 05, 06, 07, 08 e 10, sendo também coincidente com a região organizadora do nucléolo no par 06, enquanto que em *Hyla eugenioi* foi observada nos pares 01, 02, 04 e 05. Heterocromatina intersticial foi detectada apenas nos braços longos pares 04 e 05 de *H. albofrenata* e no par 07 de *H. ehrhardti* (Figs. 2 e 5).

A localização da NOR por impregnação pela prata variou entre as espécies analisadas. Em seis indivíduos de *H. albofrenata* a técnica de Ag-NOR marcou a região telomérica do braço curto de um dos homólogos do par 01 e na região telomérica do braço longo de um dos homólogos do par 07. Em dois indivíduos dessa espécie a prata marcou apenas o par 07 (Figs. 3A e 5A). Em *H. arildae*, marcou a região telomérica do braço longo do par 10 (Figs. 3 B e 5B). Em *H. ehrhardti*, a marcação ocorreu em dois pares, na região telomérica do braço longo dos pares 06 e 10, apresentando heteromorfismo no par 06 (Figs. 3C e 5C). Em *Hyla eugenioi*, a NOR localiza-se apenas no telômero do braço longo do par 07 (Figs. 3D e 5D). Em todos os indivíduos das quatro espécies, a marcação de prata é coincidente com heterocromatina. A associação da constrição secundária com a região organizadora do nucléolo nem sempre foi visualizada nestas espécies, possivelmente pela sua localização telomérica ou grau de condensação. A localização da NOR foi confirmada

por hibridação *in situ* (Figs. 3A-D) em todas as espécies, porém, em *Hyla ehrhardti* nenhum sinal foi detectado no par 10.

Todos os indivíduos analisados das espécies *Hyla albofrenata* e *Hyla arildae* apresentaram anéis multivalentes na meiose, constituídos de quatro a seis bivalentes, sendo que os cromossomos portadores da NOR também estão envolvidos na formação desses anéis conforme verificado por hibridação *in situ* (Fig. 3E-H).

A sonda telomérica marcou todos os telômeros nas quatro espécies. Em *Hyla albofrenata* e *Hyla arildae* a sonda apresentou homologia também com todas as regiões centroméricas, sendo o sinal mais intenso em *H. arildae* do que em *H. albofrenata* (Fig. 4A-D).

A tabela 2 apresenta um resumo de dados citogenéticos das espécies de *Aplastodiscus* e do grupo de *Hyla albomarginata* para efeito comparativo.

Discussão

As quatro espécies aqui estudadas do complexo de *Hyla albofrenata* apresentaram o cariótipo com $2n=22$ e a morfologia dos cromossomos bastante semelhante. O cariótipo de *Hyla albofrenata* difere quanto ao número de cromossomos do que foi descrito por Bogart (1973) para espécimes do mesmo local, a Floresta da Tijuca no Estado do Rio de Janeiro, que apresentou o número cromossômico $2n=24$ sendo que o número e a morfologia se assemelham ao de *H. albomarginata* (Carvalho *et al.*, em preparação).

No mesmo trabalho, Bogart (1973) descreve o cariótipo de *Hyla albofrenata* de outra localidade, Boracéia (SP), com $2n=22$ cromossomos. No entanto, não há informações sobre a existência dessa espécie nesse local. Em 1990, Heyer *et al.* redescreveu a espécie de Boracéia como sendo *Hyla arildae*. Os dados obtidos neste trabalho quanto ao número e a morfologia da espécie *Hyla arildae* corrobora o trabalho de Heyer *et al.* (1990).

O padrão de heterocromatina diferiu entre as espécies na quantidade de heterocromatina centromérica, maior em *Hyla arildae*, e na localização e quantidade das bandas intersticiais e teloméricas, permitindo diferenciar essas espécies dentro do complexo e das outras espécies do grupo de *Hyla albomarginata* (Carvalho *et al.*, em preparação). Essa variabilidade interespecífica da heterocromatina permite distinguir essas espécies próximas, o que já foi verificado também para outros grupos de anuros com cariótipos muito semelhantes, como em Bufonidae (Schmid, 1978a; 1980), Leptodactylidae (Schmid, 1985; Bogart, 1981; Ruiz *et al.*, 1981) e Hylidae (Ananias *et al.*, 2004; Raber *et al.*, 2004).

A localização da região organizadora do nucléolo também diferiu entre as espécies do complexo “albofrenata”, sugerindo que possíveis rearranjos cromossômicos nos segmentos portadores da NOR tenham ocorrido durante a evolução dessas espécies proximamente relacionadas. Outras espécies do grupo de *H. albomarginata* (Carvalho *et al.*, em preparação) também mostraram variação nessa característica, sendo a NOR localizada nos telômeros do par 09 em *H. albosignata* e *H. leucopygia* e intersticial no par 02 em *H. albomarginata*. *Hyla crepitans* e *Hyla pardalis*, alocadas no grupo de *Hyla faber* por Faivovich *et al.* (2005), apresentam $2n=24$ e NOR localizada no par 11 (Gruber, 2002).

Um polimorfismo raro de NOR, em anuros, foi observado nos espécimes analisados de *Hyla albofrenata*. Seis desses indivíduos que apresentaram duas marcações Ag-NOR, confirmadas por FISH, em heterozigose nos pares 01 e 07, ou seja, uma em um dos homólogos do par 01 e a outra em um dos homólogos do par 07, o que sugere que essa condição deve ser derivada em relação a NOR em homozigose no par 07 observada em dois espécimes de *Hyla albofrenata*. Além disso, não há nenhuma espécie do grupo de *Hyla albomarginata* até agora estudada com NOR no par 01 (Carvalho *et al.*, em preparação).

Uma explicação possível para essa variação interindividual é que tenha ocorrido translocação do segmento portador da NOR do par 07 para o par 01. Uma forte evidência que respalda essa hipótese é a presença dos cromossomos portadores da NOR no anel multivalente observado na meiose, confirmado por hibridação *in situ*, que pode ter facilitado o rearranjo da NOR. Não foi encontrado nenhum indivíduo com a NOR em homozigose no par 01, embora não se possa descartar que a causa seja o reduzido tamanho da amostra. Pode se aventar à possibilidade de que a NOR em homozigose no par 01 seja uma condição deletéria (Schmid, 1982).

A presença de NOR em um dos homólogos de dois ou mais pares de cromossomos já foi observado em *Hyla versicolor*, *Hyla chrysoscelis* (Wiley *et al.*, 1989) e *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998) apresentando diversos padrões, com a NOR dispersa no cariótipo. No entanto, diferentemente dessas espécies, em *H. albofrenata* foi encontrado apenas dois padrões, sendo o mais comum nessa amostra, o padrão em heterozigose.

A ocorrência de heteromorfismo de tamanho de NORs homólogas, semelhante ao observado no par 06 de *Hyla ehrhardti* já foi amplamente descrito em anuros (Lourenço *et al.*, 1998; Busin *et al.*, 2001; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003; Siqueira-Jr *et al.*, 2004). Os mecanismos citados na literatura para explicar esse fenômeno são amplificação de algumas seqüências dos genes ribossomais em um dos homólogos do par, crossing-over desigual, troca entre cromátides irmãs e duplicações acidentais na quantidade de rDNA (Schmid, 1982; King, 1990). Embora não se saiba a origem do heteromorfismo observado em *H. ehrhardti*, não se verificou nas metáfases analisadas dois blocos distintos que pudesse sugerir a ocorrência de duplicação ou de translocação da NOR.

Em *H. ehrhardti*, a impregnação pela prata marcou dois pares de cromossomos, porém a hibridação *in situ* não confirmou a presença de rDNA no par 10. Como foi detectada heterocromatina na mesma posição por bandamento C, deve ter ocorrido impregnação inespecífica pela prata nessa região. Marcação inespecífica de heterocromatina pelo método de Ag-NOR já foi observada em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998) e em *Pseudis* sp. (aff. *minuta*) (= *P. cardosoi*) (Busin *et al.*, 2001).

A formação de anéis multivalentes na meiose envolvendo cromossomos não homólogos, como observado nas espécies *H. albofrenata* e *H. arildae* (com a participação dos cromossomos portadores da NOR), pode ser explicada por eventos de translocação ocorridos durante a evolução cariotípica destas espécies. Em anuros, esse evento é raro e foi descrito apenas em *Eleutherodactylus binotatus* (Beçak *et al.*, 1974; Siqueira-Jr *et al.*, 2004) e em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 2000). Em ambos os casos, a presença desses anéis parece estar relacionada com a ocorrência de rearranjos de translocações múltiplas em heterozigose que levaram à alteração da morfologia de cromossomos envolvidos no anel. Porém, o presente trabalho apresenta o primeiro caso em que o cromossomo portador da NOR está comprovadamente envolvido nesse processo. Interessante que em *H. arildae* a NOR foi detectada apenas no par 10, e, embora a amostra analisada seja pequena, não foi também observada nenhuma variação nesse cariótipo que pudesse ser relacionada à presença dos anéis multivalentes, como ocorreu em *H. albofrenata* (presente trabalho), *Eleutherodactylus* (Beçak *et al.*, 1974; Siqueira-Jr *et al.*, 2004) e *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 2000).

Todas as espécies quando submetidas à técnica de hibridação *in situ* utilizando sonda telomérica apresentaram marcações nos telômeros. *Hyla albofrenata* e *H. arildae* apresentaram, além dos telômeros, também as regiões centroméricas marcadas, demonstrando a presença de seqüências homólogas à sonda telomérica. Até o momento, não há na literatura a descrição desse tipo de marcação centromérica em anuros, porém, seqüências de DNA telomérico (TTAGGG)_n já foram detectadas em regiões intersticiais de alguns cromossomos de *H. versicolor*, *H. squirella* e *H. chrysoscelis* (Meyne *et al.*, 1990). No entanto, seqüências semelhantes a telomérica em regiões intersticiais já foram detectadas em cromossomos de outros vertebrados, como em lebre, baleias, coelhos,

gambás, cavalo, serpentes, aves (Meyne *et al.*, 1990), girafas (Vermeesch *et al.*, 1996), marsupiais (Pagnozzi *et al.*, 2000), e em plantas (Teck & Jiang, 2004).

A origem e o significado da ocorrência dessas seqüências em regiões não teloméricas ainda são pouco entendidos, porém, foram levantadas algumas hipóteses, como a de que a amplificação das seqüências (TTAGGG)_n estaria relacionada com a amplificação de regiões de heterocromatina (Fagundes & Yonenaga-Yassuda, 1998), de que seriam sítios de telômeros verdadeiros, resultantes de rearranjos cromossômicos como inversões e fusões cêtricas ou em *tandem* (Lee *et al.*, 1993; Vermeesch *et al.*, 1996), de que poderiam se originar por mecanismos como mutações, crossing-over desigual, transposição ou amplificação de seqüências de DNA (TTAGGG)_n endógenas, ou ainda que surgiram por mecanismos de reparo em quebras ocorridas na linhagem germinativa durante a evolução (Vermeesch *et al.*, 1996; Garagna *et al.*, 1997).

Em espécies de *Solanum* (batata), seqüências teloméricas foram detectadas por FISH em regiões centroméricas dos cromossomos. A análise molecular mostrou que essas seqüências semelhantes a telômeros sofreram extensiva amplificação, associada à heterocromatina centromérica altamente condensada (Tek & Jiang, 2004). Segundo esses autores, os resultados sugerem que em *Solanum*, a presença dessas seqüências não pode ser explicada como remanescentes dos telômeros devido a eventos antigos na evolução do cariótipo, como as fusões cromossômicas. Essas seqüências podem estar relacionadas a outras funções. No presente trabalho, a associação dessas seqüências com heterocromatina centromérica parece evidente, já que em *H. arildae* o sinal de hibridação foi mais intenso do que em *H. albofrenata*, o que coincide também com a presença de maior quantidade de heterocromatina detectada por bandamento C. Essas seqüências teloméricas podem estar dispersas pela heterocromatina centromérica de todos os cromossomos, à semelhança do que foi descrito para espécies de *Solanum*, e sua presença nos centrômeros também não poderia ser explicada por eventos de fusão de cromossomos durante a evolução dessas espécies. Segundo Meyne *et al.* (1990), espécies mais derivadas e altamente diferenciadas teriam a presença de sítios teloméricos e não teloméricos, enquanto que espécies primitivas apresentariam somente sítios teloméricos (Meyne *et al.*, 1990). Isso, no entanto, não

encontra respaldo no conjunto de dados citogenéticos do presente trabalho para o grupo de anuros em estudo.

A localização da NOR e o padrão de heterocromatina mostraram-se espécie-específico e permitiram diferenciar cromossomicamente as espécies do complexo *Hyla albofrenata*. Mas, essas características de NOR e heterocromatina não contribuíram com homeologias para demonstrar citogeneticamente maior proximidade das espécies dos três complexos do grupo de *Hyla albomarginata* com o gênero *Aplastodiscus* (Carvalho *et al.*, em preparação). Por outro lado, a morfologia cromossômica conservada, principalmente dos sete primeiros pares, entre as espécies do complexo *Hyla albofrenata* (presente trabalho) e dessas com os dos outros dois complexos (“albosignata” e “albomarginata”) do grupo de *H. albomarginata* e com *Aplastodiscus* (Carvalho *et al.*, em preparação), sugere que um cariótipo ancestral comum deve ter originado todas essas espécies atuais e que rearranjos cromossômicos levaram à diferenciação desses cariótipos, com mudança de número diplóide que envolveu principalmente os cromossomos menores e outras alterações que levaram dispersão de NOR e de heterocromatina.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Marília Teresinha Hartmann e ao MSc. Sérgio Siqueira Júnior pelas coletas de alguns dos exemplares e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. nº.04/10901-6) pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Ananias, F., Garcia, P. C. A., Recco-Pimentel, S. M: Conserved karyotypes in *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 140: 42-48 (2004).
- Beçak, ML., Beçak, W: Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae- Amphibia). *Experientia* 30: 624-625 (1974).
- Bogart JP: Evolution of anuran karyotypes, in Vial JL (ed): *Evolutionary biology of anurans*, pp 337-349 (University Missouri Press, Missouri (1973).
- Bogart JP: Chromosome studies in *Sminthillus* from Cuba and *Eleutherodactylus* from Cuba and Puerto Rico (Anura: Leptodactylidae). *Ont Mus Life Sci Contrib* n. 129 (1981).
- Bokermann WC: A. Notas sobre cantos nupciais de anfíbios brasileiros: I (Anura), pp 441-443 (*An. Acad. Brasil. Ci.* 39: 441-443 (1967)).
- Busin CS, Vinciprova G, Recco-Pimentel SM: Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica* 110: 131-141 (2001).
- Carvalho-e-Silva AMPT. Carvalho-e-Silva S P: New species of the *Hyla albofrenata* group, from the states of Rio de Janeiro e São Paulo, Brazil (Anura, Hylidae). *J. Herpetol.*, 39: 71-81 (2005).
- Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM: Citogenética comparativa de espécies de *Aplastodiscus* e dos complexos “albosignata” e “albomarginata” do grupo de *Hyla albomarginata* (Anura, Hylidae). (em preparação)

- Cruz CAG, Peixoto, AL: Espécies verdes de *Hyla*: o complexo “Albofrenata”. (Amphibia, Anura, Hylidae). Arq. Univ. Fed. Rio de Janeiro 8: 59-70 (1985).
- Da Silva HR: Phylogenetic relationships of the family Hylidae with emphasis on the relationships within the subfamily Hylineae (Amphibia:Anura). Tese de Doutorado, Museu Nacional do Rio de Janeiro, Universidade do Rio de Janeiro, pp 175, Rio de Janeiro (1998).
- Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y: Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. Chrom. Res. 6: 643-648 (1998).
- Faivovich J, Cruz CAG, Peixoto, AL: The identity of *Hyla ehrhardti* Müller, 1924 (Anura, Hylidae). J. Herpetol. 36: 325-327 (2002).
- Faivovich, J, Haddad, CFBH, Garcia, PCA, Frost, DR,; Campbell, JA, Wheeler, WC: Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 294: 1-240 (2005).
- Frost DR: Amphibian species of the world: an online reference. Version 3.0 (22 August, 2004) <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garagna S, Ronchetti E, Marcheretti S, Crovella S, Formenti D, Rumpler Y, Manfredi-Romanini MG: Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. Chrom. Res. 5: 487-491 (1997).

- Green MG, Sessions SK: Nomenclature for chromosomes, in Green DM, Sessions SK (eds): In: Amphibian cytogenetics and evolution, pp 431-432 Academic Press, San Diego (1991).
- Gruber, SL: Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (Anura, Hylidae) dos grupos com $2n=24$ e $2n=30$, com técnicas de coloração diferencial. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, 132p. Rio Claro (2002).
- Haddad CFB, Faivovich J, Garcia PCA: The specialized reproductive mode of the tree frog *Aplastodiscus perviridis* (Anura, Hylidae). *Amphibia-Reptilia*, 26: 87-92 (2005).
- Heyer RW, Rand SA, Cruz CAG, Peixoto OL, Nelson C: E. Frogs of Boracéia. *Arq. Zool.*: 31 (1990).
- Howell WM, Black DA: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015 (1980).
- King M, Contreras N, Honeycutt RL: Variation within and between nucleolar regions in Australian hylid frog (Anura) shown by 18S and 28S *in situ* hybridization. *Genetics* 80: 17-29 (1990).
- Lee C, Sasi R, Lin CC: Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for *tandem* chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 156-159 (1993).
- Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ: Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromos. Res.* 6: 621-628 (1998).

- Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ: A second case of multivalent meiotic configurations in diploid species of Anura. *Genet. Mol. Biol.* 23: 131-133 (2000).
- Meunier-Rotiyal M, Cortadas J, Macaya G, Bernardi G: Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucl. Acids Res.* 6: 2109-2123 (1979).
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK: Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3-10 (1990).
- Pagnozzi JM, Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y: Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chrom. Res.* 8: 585-591 (2000).
- Raber SC, Carvalho KA, Garcia PCA, Vinciprova G, Recco-Pimentel SM: Chromosomal characterization of *H. bischoffi bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). *Phyllomedusa* 3: 51-59 (2004).
- Ruiz IRG, Soma M, Beçak W: Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploidy species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogen. Cell Genet.* 29: 84-98 (1981).
- Schmid M: Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-388 (1978a).
- Schmid M: Chromosome banding in Amphibia. IV Differentiation of CG- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103 (1980).
- Schmid M, Vitelli L, Batistoni R: Chromosome banding in Amphibian. III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71: 29-55 (1979).
- Schmid M: Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-344 (1982).

- Schmid M, Haaf T, Schempp W: Chromosome banding in Amphibia. IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma* 91: 172-182 (1985).
- Siqueira-Jr S, Ananais F, Recco-Pimentel SM: Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. *Genet. Mol. Biol.* 27: 363-372 (2004).
- Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306 (1972).
- Tek AL, Jiang J: The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. *Chromosoma* 113: 77-83 (2004).
- Veiga-Menoncello ACP, Lima AP, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura- Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. *Hereditas* 139: 189-198 (2003).
- Vermeesch JR, De Meurichy W, Van Den Berghe H, Mary Nen P, Petit P: Differences in the chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob (4:26) fusion site. *Cytogenet. Cell Genet.* 72: 310-315 (1996).
- Viegas-Pequignot E: *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes, in: Willernson D (ed): *In situ* hybridization: a practical approach, pp.137-158 (Oxford University Press-IRL Press, Oxford (1992).
- Wiley, JE, Little, ML, Romano, MA, Blount, DA, Cline, GR: Polymorphism in the location of the 18S and 28S rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid tree frogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. *Chromosoma* 97: 481-487 (1989).

Tabela 1. Dados morfométricos das espécies do complexo “albofrenata”.

	Cromossomos										
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11
<i>Hyla albofrenata</i>											
TR%	14,4	12,5	11,4	11,0	10,0	9,0	7,7	8,0	4,0	5,7	5,1
IC	0,44	0,40	0,35	0,35	0,33	0,31	0,33	0,37	0,43	0,42	0,39
CC	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M
<i>Hyla arildae</i>											
TR%	15,3	13,9	12,3	10,8	10,1	8,0	6,9	6,4	6,0	5,6	4,7
IC	0,47	0,46	0,41	0,31	0,34	0,31	0,42	0,44	0,43	0,41	0,44
CC	M	M	M	SM	SM	SM	M	M	M	M	M
<i>Hyla ehrhardti</i>											
TR%	14,9	12,7	11,0	10,7	10,3	8,7	7,7	7,0	6,5	5,4	5,1
IC	0,46	0,42	0,35	0,29	0,35	0,36	0,29	0,43	0,41	0,43	0,43
CC	M	M	SM	SM	SM	M	SM	M	M	M	M
<i>Hyla eugenioi</i>											
TR%	15,3	12,8	11,7	11,0	10,4	8,8	7,8	6,5	6,1	5,5	4,1
IC	0,44	0,40	0,37	0,32	0,35	0,31	0,30	0,38	0,41	0,41	0,45
CC	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M

TR= tamanho relativo (%), IC= índice centromérico, CC= classificação cromossômica, M= metacêntrico, SM= submetacêntrico. Os dados morfométricos foram baseados em dez.metáfases das espécies estudadas.

Tabela 2. Dados citogenéticos para as espécies de *Aplastodiscus* e do grupo de *Hyla albomarginata*.

Nomenclatura atual (Frost, 2004)	Nomeclatura proposta por Faivovich et al. (2005)	2n	Morfologia cromossômica	Cromossomo portador da NOR (AgNOR e FISH)	Sequências telomérica (FISH)	Anéis multivalentes na meiose	Heterocromatina (Bandamento C)
<i>Aplastodiscus perviridis</i> (1)	<i>Aplastodiscus perviridis</i>	24	M; M; SM; SM; SM; SM; M; M; M; M; M; M	Par 12	-	-	Todos os centrômeros Teloméricas: Pares 01 e 02, no braço curto e nos pares 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e 12 no braço longo Interstitial: Par 11 no braço curto e nos pares 06, 10 e 11 no braço longo
<i>Aplastodiscus cochranæ</i> (1)	<i>Aplastodiscus cochranæ</i>	24	M; M; SM; SM; SM; SM; M; M; M; M; M; M	Par 12	-	-	Todos os centrômeros Teloméricas: Pares 01 e 02, no braço curto e nos pares 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e 12 no braço longo Interstitial: Par 11 no braço curto e nos pares 06, 10 e 11 no braço longo
<i>Hyla albomarginata</i> (1)	<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	24	M; M; M; SM; SM; SM; M; M; M; M; M; M; M	Par 02	-	-	Todos os centrômeros Telomérica: Pares 01, 02 e 03 no braço curto e nos Pares 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08 e 09 no braço longo Interstitial: Pares 02, 03, 04 no braço curto e nos pares 05 e 06 no braço longo.
<i>Hyla albosignata</i> (1)	<i>Aplastodiscus albosignatus</i>	20	M; M; SM; SM; SM; SM; SM; SM; M; M	Par 09	-	-	-
<i>Hyla leucopygia</i> (1)	<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	18	M; M; SM; SM; SM; SM; SM; SM; M;	Par 09	-	-	-
<i>Hyla faber</i> (1)	<i>Hypsiboas faber</i>	24	M; M; SM; SM; SM; SM; SM; M; M; M; M; M	Par 11	-	-	Todos os centrômeros
<i>Hyla albofenata</i> (2)	<i>Aplastodiscus albofenatus</i>	22	M; M; SM; SM; SM; SM; SM; SM; M; M; M	Par 07 ou 01/07	Telômeros e centrômeros	Presença	Todos os centrômeros Telomérica: Par 01 no braço curto e Par 07 no braço longo Interstitial: Pares 04 e 05 no braço longo Todos os centrômeros
<i>Hyla arildæ</i> (2)	<i>Aplastodiscus arildæ</i>	22	M; M; M; SM; SM; SM; M; M; M; M; M;	Par 10	Telômeros e centrômeros	Presença	Todos os centrômeros Telomérica: Par 01e 02 no braço curto; Pares 02, 05, 06, 08 e 10 no braço longo Interstitial: Par 07 no braço longo Todos os centrômeros
<i>Hyla ehrhardti</i> (2)	* <i>Aplastodiscus ehrhardti</i>	22	M; M; SM; SM; SM; M; SM; M; M; M; M	Par 06	Telômeros	Ausência	Todos os centrômeros Telomérica: Par 01, no braço curto; Pares 02, 04 e 05 no braço longo
<i>Hyla eugenioi</i> (2)	<i>Aplastodiscus aff. ehrhardti</i>	22	M; M; SM; SM; SM; SM; SM; M; M; M	Par 07	Telômeros	Ausência	Todos os centrômeros Telomérica: Par 01, no braço curto; Pares 02, 04 e 05 no braço longo

(1) Carvalho et al. (em preparação); (2) Presente trabalho. * Essa espécie não foi incluída na análise, provavelmente Gênero *Aplastodiscus*.

Legenda das Figuras

Figura 1. Cariótipo de *Hyla albofrenata* (A), *H. arildae* (B), *H. ehrhardti* (C) e *Hyla eugenioi* (D). Setas indicam constrições secundárias. Barra = 10µm.

Figura 2. Cariótipos de *Hyla albofrenata* (A), *H. arildae* (B), *H. ehrhardti* (C) e *Hyla eugenioi* (D) submetidos ao bandamento C. Setas indicam bandas intersticiais e teloméricas. Barra = 10µm.

Figura 3. Cromossomos mitóticos (A-D) marcados pela técnica de Ag-NOR e FISH com sonda de rDNA e cromossomos meióticos (E-H) corados com Giemsa e marcados por FISH, de *Hyla albofrenata* (A e E), *H. arildae* (B e F), *H. ehrhardti* (C e G) e *Hyla eugenioi* (D e H). Barra = 10µm.

Figura 4. Metáfases mitóticas submetidas a FISH com sonda telomérica. *Hyla albofrenata* (A), *H. arildae* (B), *H. ehrhardti* (C), *Hyla eugenioi* (D). Barra = 10µm.

Figura 5. Ideograma dos cariótipos de *Hyla albofrenata* (A), *H. arildae* (B), *H. ehrhardti* (C) e *Hyla eugenioi* (D). Blocos negros indicam bandamento C positivo; blocos cinza regiões de NOR. As áreas hachuradas representam as constrições secundárias. Em A, as letras a e b indicam os morfos dos cromossomos 01 e 07 em *H. albofrenata*. Em C, note o heteromorfismo de NOR em *H. ehrhardti*. Barra = 10µm.

Figura 1

A



B



C

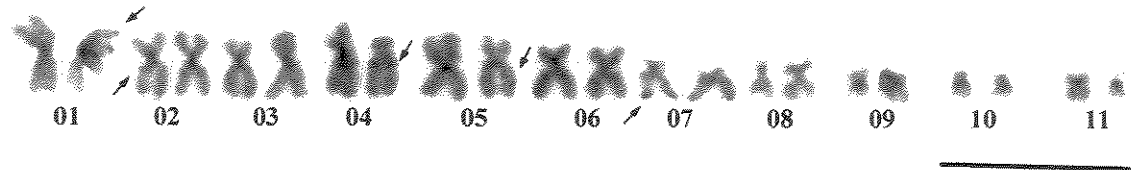


D



Figura 2

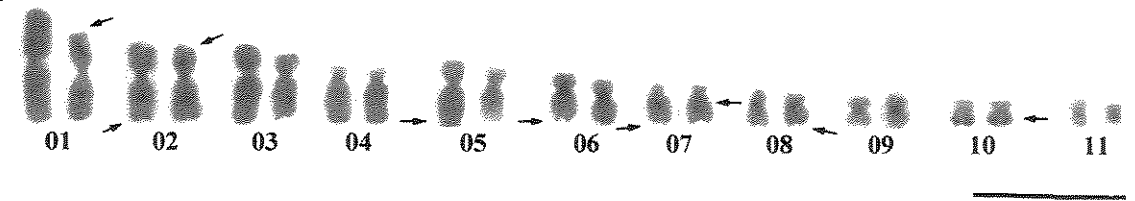
A



B



C



D

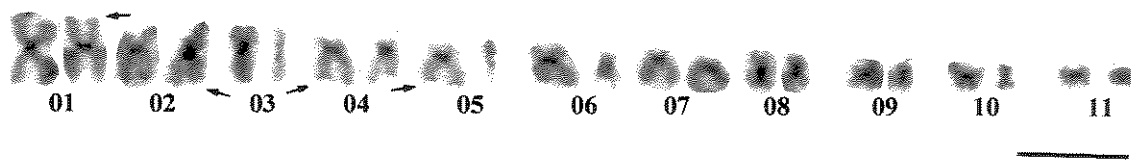


Figura 3

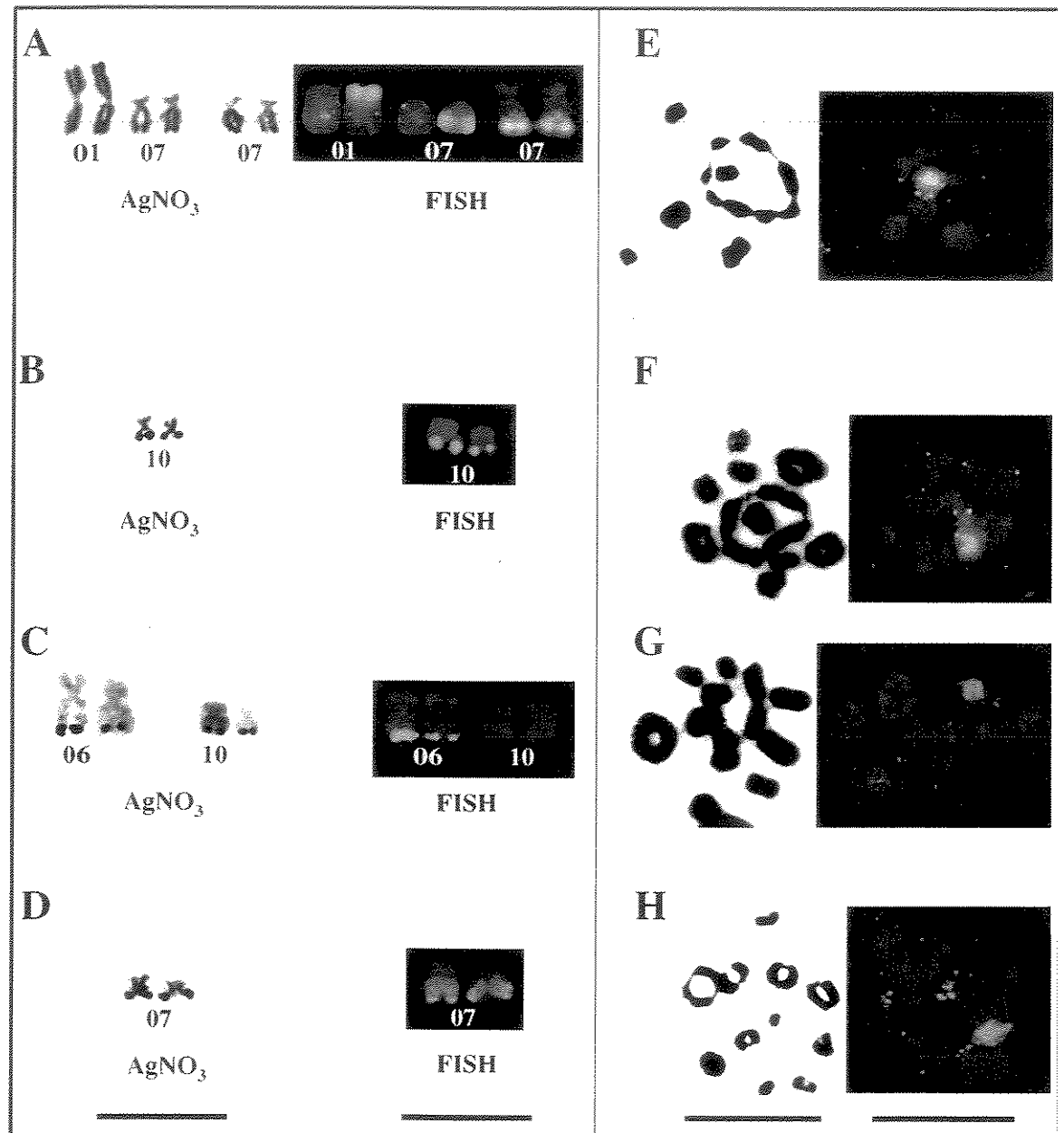


Figura 4

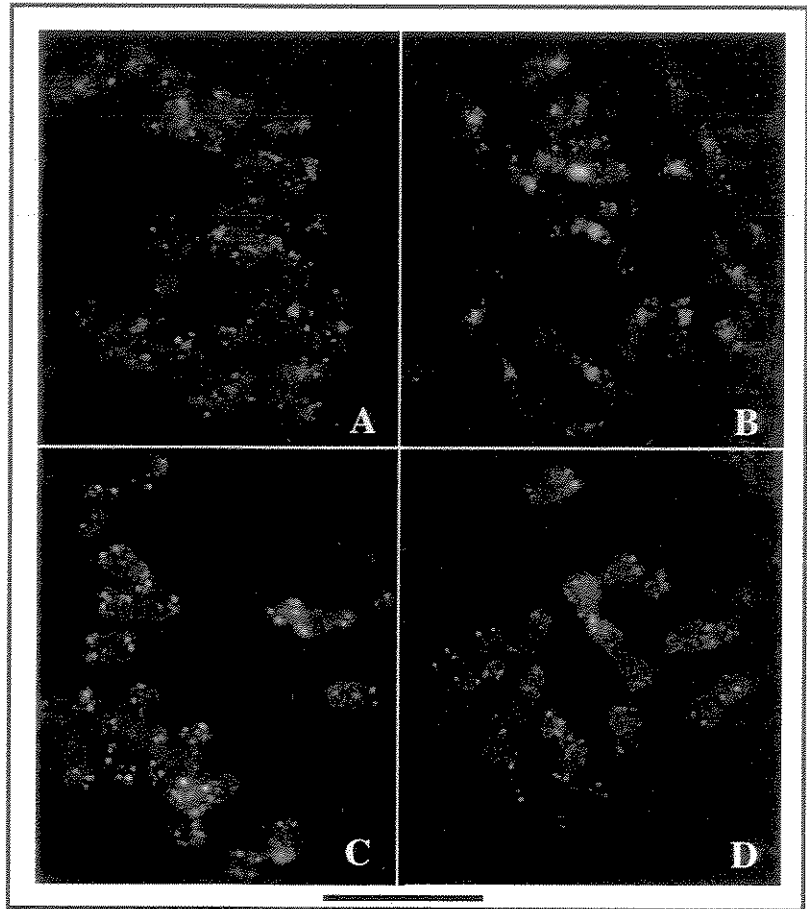
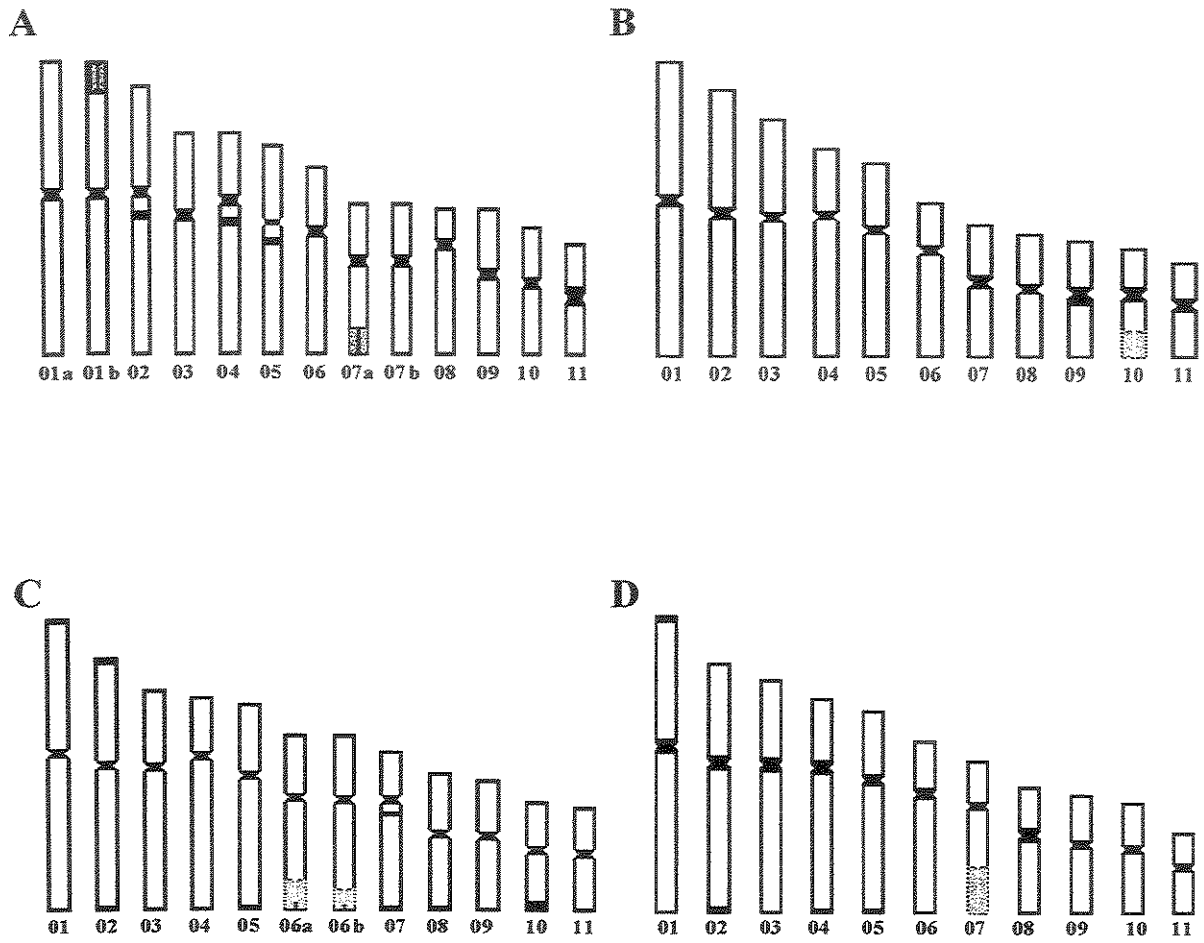


Figura 5



IV. CONCLUSÕES

1- Os cariótipos, o padrão de heterocromatina e a localização e número de NORs foram idênticos entre as espécies *Aplastodiscus perviridis* e *A. cochranæ*, não sendo possível por esses parâmetros distinguir essas espécies.

2- *Hyla albosignata* e *Hyla leucopygia*, pertencentes ao complexo “*albosignata*”, divergiram no número cromossômico, $2n=20$ e $2n=18$ respectivamente, porém a semelhança morfológica entre os seus cromossomos e os pares portadores da NOR sugere um relacionamento muito próximo entre elas.

3- O cariótipo com $2n=18$ cromossomos da espécie *Hyla leucopygia* do presente trabalho, coletada em Maricá (RJ) é idêntico ao cariótipo $2n=18$ descrito por Bogart para *H. albosignata* de Teresópolis (distante ~50 Km de Maricá). Sugere-se que a espécie de Teresópolis seja *Hyla leucopygia* e não *H. albosignata*.

4- Dados como morfologia, número cromossômico e localização da NOR sugerem um relacionamento filogenético muito próximo das espécies *H. albosignata*, *H. leucopygia* e *Hyla faber* com as espécies do gênero *Aplastodiscus*.

5- *Hyla albomarginata* diferencia-se das demais espécies de *Hyla* analisadas pela localização da NOR no par 2 e por apresentar o mesmo número diplóide e a morfologia dos cromossomos semelhante a *Aplastodiscus*, o que sugere grande proximidade entre elas.

6- A diferenciação cromossômica entre as espécies *Aplastodiscus perviridis*, *A. cochranæ*, *Hyla albomarginata* e *Hyla faber* ($2n=24$), *Hyla albosignata* ($2n=20$) e *Hyla leucopygia* ($2n=18$) pode ter ocorrido por redução no número cromossômico e rearranjos envolvendo principalmente o grupo de cromossomos menores, já que os sete primeiros cromossomos apresentam morfologia e tamanhos bastante conservados nas espécies dos dois gêneros.

7- O par 09 de *H. albosignata* e *H. leucopygia* é muito semelhante na morfologia (metacêntricos), ao par 12 das espécies de *Aplastodiscus* e ao par 11 de *H. faber*, e também na localização (região telomérica) da NOR, sugerindo serem esses cromossomos homeólogos.

8- As espécies pertencentes ao complexo “albofrenata” podem ser distinguidas entre si através da localização da NOR, localização e quantidade de heterocromatina e quantidade e localização de seqüências teloméricas.

9- O cariótipo de *Hyla albofrenata* difere quanto ao número de cromossomos do que foi descrito por Bogart (1973) para espécimes do mesmo local, a Floresta da Tijuca no Rio de Janeiro. Provavelmente, os espécimes analisados por Bogart (1973) com $2n=24$ cromossomos são da espécie *H. albomarginata* que ocorre naquela localidade, e não de *H. albofrenata*. O cariótipo descrito por Bogart (1973) se assemelha ao de *H. albomarginata* (Carvalho *et al.*, em preparação).

10- *Hyla albofrenata* de outra localidade, Boracéia (SP), descrito por Bogart (1973) com $2n=22$ cromossomos, foi redescrito por Heyer (1990) como *Hyla arildae*. Os dados obtidos neste trabalho quanto ao número e a morfologia dos cromossomos são semelhantes ao descrito para a população de Boracéia, corroborando Heyer (1990).

11- Seis dos oito indivíduos de *H. albofrenata* apresentaram um polimorfismo inédito de NOR em anuros, detectado em apenas um dos homólogos dos pares 01 e 07. Sugere-se que essa condição em heterozigose deva ser derivada em relação a NOR em homozigose no par 07 observada em dois espécimes e que essa variação interindividual pode ter ocorrido por translocação do segmento portador da NOR do par 07 para o par 01. Respalda essa hipótese, a presença dos cromossomos portadores da NOR no anel multivalente observado na meiose, que pode ter facilitado esse rearranjo.

12- Em *H. ehrhardti*, a técnica de Ag-NOR marcou os pares 06 e 10, mas apenas a marcação do par 06 foi confirmada por hibridação *in situ*. A inespecificidade de marcação por prata pode ser atribuída à presença de heterocromatina nessa região cromossômica.

13- A presença de anéis multivalentes na prófase I da meiose de *H. albofrenata* e *H. arildae*, com a participação dos cromossomos portadores da NOR, sugere a ocorrência de translocação recíproca e que rearranjos desse tipo contribuíram para a evolução dos cariótipos dessas espécies.

14- A detecção de seqüências teloméricas nas regiões centroméricas dos cromossomos de *H. albofrenata* e *H. arildae*, coincidente com a heterocromatina banda C positiva, sugere que essas seqüências estejam dispersas pela heterocromatina centromérica de todos os cromossomos e não há evidências de que sua presença nos centrômeros seja devida a eventos de fusão de cromossomos durante a evolução dessas espécies.

15- A morfologia cromossômica conservada, principalmente dos sete primeiros pares, entre as espécies dos complexos “albofrenata” (presente trabalho), “albosignata” e “albomarginata” e de *Aplastodiscus*, sugere que um cariótipo ancestral comum deve ter originado todas essas espécies atuais e que rearranjos cromossômicos levaram à diferenciação desses cariótipos, com mudança de número diplóide e dispersão de NOR e de heterocromatina. Com base em citogenética, as espécies de *Aplastodiscus* e de *Hyla* analisadas no presente trabalho poderiam compor um único gênero.