	 Bernink and Anne Martin and Anne and Anne Martin Anne and Anne 	LANDALW M S.M.A.D.A.
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPIN	JAS	
CANIFIC LINITIDE LOTADUAL DE CANIFIC		
	****	0-10 mm

LILIAN RICCO MEDEIROS

CITOGENÉTICA DE DENDROPSOPHUS (ANURA, HYLIDAE): CARACTERIZAÇÕES E COMPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS ENTRE

ESPÉCIES RELACIONADAS

E	ste exemplar corresponde à redação final
d	a têse defendida pelo(a) candidato (a)
e	aprovada pela Comissão Julgadora.
	marcolimenter

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

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

Campinas, 2005

81	BLIOTECA CENTRAL
Fart P	ESENVOLVIMENTO
	COLEÇÃO
	UNICAMP

i



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M467c	Medeiros, Lilian Ricco Citogenética de Dendropsophus (Anura, Hylidae): caracterizações e comparações cromossômicas entre espécies relacionadas / Lilian Ricco Medeiros Campinas, SP: [s.n.], 2005.
	Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Citogenética. 2. Cromossomos. 3. Anura. 4. Hylidae. I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Cytogenetic of Dendropsophus (Anura, Hylidae): chromosomal caracterization and comparison of closely related species.

Palavras-chave em inglês: Cytogenetic, Chromosomes, Anura, Hylidae.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel, Itamar Alves Martins, Luciana Bolsoni Lourenço, Ana Paula Zampieri Silva de Pietri, Cynthia Peralta de Almeida Prado. Data da defesa: 26/08/2005.

Campinas, 26 de agosto de 2005

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)

Prof.Dr. Itamar Alves Martins

Assinatura

ssinatura

Assinatura

Assinatur

Assinatura

de

iciana

Profa.Dra. Luciana Bolsoni Lourenço

Profa.Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri

Profa.Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado

Profa.Dra. Eliana Morielle Versute

Assinatura

na

Prof.Dr. Odair Aguiar Junior

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial:

À Profa. Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel pela oportunidade, por ter dado todo o suporte necessário para o desenvolvimento desta tese, pelo exemplo de competência, também pela amizade, apoio e paciência nas horas de dificuldade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro indispensável na realização deste trabalho

Aos docentes do Departamento de Biologia Celular pela valiosa contribuição a minha formação. Em especial a Profa. Laurecir pela oportunidade de participar do programa de estágio docente (PED).

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular pelo auxílio, em especial a Líliam pela eficiência.

Aos coletores do presente trabalho, Dr. Reginaldo Machado, Dr. Silvio C. Almeida, Dr. Giovani Vinciprova, sem os quais o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

A Profa. Denise pelas coletas, auxilio e principalmente pelo incentivo e amizade.

Aos Professores Dr. Odair Aguiar Júnior, Dr. Itamar Alves Martins, Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri, Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, Dra. Cynthia Peralta de Almeida Prado, Dra. Eliana Morielle Versute por terem aceitado participar da pré banca e /banca e pelas valiosas correções da presente tese.

Aos amigos de laboratório, Ana, Odair, Gabriel, Eduardo, Gisele, Paula, Carmem e Luciana pelo apoio e agradável convivência. Em especial a Samantha, Aline e Yeda pela amizade e apoio nas horas de dificuldade, ao Sérgio pela amizade e auxílio com computador. À Klélia pelo apoio técnico e amizade.

Aos meus amigos Felipe, Juliana e Larinha que mesmo à distância sempre deram apoio e incentivo e pelas horas de agradáveis que passamos quando estamos juntos. Ao meu marido Gustavo pela paciência, apoio nas horas difíceis, motivação da minha vida e no meu trabalho e pela leitura da tese e principalmente por seu amor e sua dedicação.

Á minha filha Carolina que me faz cada dia mais feliz enriquecendo minha vida com muito amor.

A minha querida mãe pelo incentivo, apoio, dedicação, por estar sempre ao meu lado quando mais precisei de um colo e principalmente pelo exemplo de força e coragem.

Ao meu pai pelo apoio e incentivo.

Aos meus irmãos Renato e Leonardo pela grande amizade, incentivo, e carinho que sempre me deram.

As minhas cunhadas Soraya e Adriana pelo carinho, respeito e amizade.

As minhas queridas sobrinhas Júlia e Mariana pelas poucas, mas valiosas horas de alegria.

Aos meus sogros Sra. Neusa e Sr. Antônio e cunhados, Fernando e Francisco pelo auxílio nas horas de dificuldade e principalmente pela amizade, carinho e incentivo.

A Selma, pelo incentivo, amizade, paciência e por estar sempre disposta a me ouvir e dar conselhos.

Aos amigos, Thiago, Viviani e Rubão que mesmo longe sempre estiveram dando apoio. Em especial ao Marcelo Menin pelas coletas e auxílio no desenvolvimento deste trabalho além da amizade.

Dedico esta tese ao meu marido, a minha filha e a minha Mãe.

SUMÁRIO

ABSTRACT	1		
RESUMO	3		
1. INTRODUÇÃO	5		
1.1. Ordem Anura: aspectos gerais	6		
1.2. Citogenética de Anura	7		
1.3. Cromossomos B	9		
1.4. Região Organizadora Nucleolar (NOR)	13		
1.5. Heterocromatina	16		
1.6. A Família Hylidae e o Gênero Dendropsophus: aspectos gerais	18		
1.7. Problemática e Justificativa	19		
1.8. Objetivos	22		
1.9. Referências Bibliográficas	23		
2. ARTIGO I: Análise citogenética em espécies de Dendropsophus			
(Anura: Hylidae)	35		
Resumo	37		
Introdução	38		
Material e Métodos	39		
Resultados	40		
Discussão	42		
Referências Bibliográficas	46		
3. ARTIGO II: Diferenciação cariotípica de duas espécies de			
Dendropsophus elianeae e D. rubicundula, e análise de duas populações de			

D. minutus (Amphibia, Anura)	
Resumo	59
Introdução	59
Material e Métodos	61

Resultados	62
Discussão	63
Referências Bibliográficas	68
4. ARTIGO III: B-chromosomes in two Brazilian populations of	
Dendropsophus nanus (Anura, Hylidae)	78
Abstract	80
Introduction	80
Material and Methods	82
Results	83
Discussion	84
References	87
5. CONCLUSÕES GERAIS	99
5.1. Referências Bibliográficas	102

In the present study we characterized and compared cytogenetically populations of seven closely related *Dendropsophus* (Hylinae), a group of 30 chromosomes species, that show similar external morphology: D. nanus (Botucatu, SP; Bodoquena, MS; Telêmaco Borba, PR; Bacabal, MA), D. walfordi (between Rio Madeira and Pacaás, RO), D. sanborni (Torres, RS), D. jimi (Uberlândia, MG), D. rubicundulus (Uberlândia, MG), D. elianeae (Botucatu, SP; Nova Itapirema, SP; Bodoquena, MS) e D. minutus (Vitória Brasil, SP; Bodoquena, MG). The metaphases were obtained from intestinal epithelium and testis cell suspensions. The slides were stained with 10% Giemsa solution or submitted to the C-band (King, 1980), silver staining (Ag-NOR) and *in situ* fluorescence hybridization techniques. All species had 2n=30 chromosomes, except some individuals of D. nanus, which showed up to three little Bchromosomes, all telocentrics. These chromosomes were univalent in meiosis. All the species presented a little amount of heterochromatin, located only in the centromeric region. However, some individuals of D. nanus from Telêmaco Borba (PR) and of D. rubicundulus from Uberlândia (MG) had a little block of interstitial heterochromatin in the pair 3 (D. nanus) and in the pair 12 (D. rubicundulus), characterizing an intra-populational variation. The nucleolar organizing region (NOR) was detected in only one chromosomal pair in all species. An individual of *D. sanborni* had one heteromorphism due to a duplication of the NOR in one of the homologues of the pair 12. Dendropsophus nanus from Telêmaco Borba (PR), Bacabal (MA) and Serra da Bodoquena (MS) and of D. walfordi collected between the Madeira and Pacaás rivers (RO) showed identical karyotypes, with 2n=30 and NF=52. A specimen of D. nanus from Serra da Bodoquena presented NF=51 due to an heteromorphism in the pair 6, in which one of the homologues is metacentric and the other is telocentric, probably because of a pericentric inversion. In all the specimens, the NOR was located in the metacentric pair 13. Dendropsophus sanborni from Botucatu (SP) and Torres (RS), and D. jimi from Uberlândia (MG) also had identical karyotypes, with 2n=30 e NF=50, differing from the other two species by the presence of five telocentrics instead of four, with the NOR located in the telocentric pair

12. We did not observe citogenetic differences between the populations of *D. nanus* and of *D.* sanborni, neither differences among these populations and others already described in the literature. The B-chromosomes found in two populations of D. nanus did not showed heterochromatin neither ribosomal genes. Dendropsophus elianeae had three pairs of telocentric and the NOR in the pair 11. In contrast, D. rubicundulus presented only two telocentrics and the NOR in the pair 5. The two populations of D. minutus had the same karyotype already described for other populations, with absence of telocentric chromosome. The NOR was detected in the pair 9. The cytogenetic data presented here did not permit to distinguish D. nanus from D. walfordi, neither D. sanborni from D. jimi, suggesting that these species are very closely related. Dendropsophus elianeae and D. rubicundulus were until recently considered as a unique species, and for a long time D. rubicundulus was erroneously denominated as D. elongata. These species were easily distinguished from each other by the number of telocentrics and location of the NOR. They also differ from the D. elongata, described in the literature, which has only one pair of telocentric. No significant difference was detected among the karyotypes of the three populations of D. elianeae. Hence, the cytogenetic data confirm the current taxonomic status of D. elianeae and of D. rubicundulus. Rearrangements, such as inversion and translocation, should have occurred during the differentiation of these species, driving the changes in the chromosome morphology and the migration of the NOR in the genome, without modifying the chromosomal number.

Obs.: This work was developed under permission of the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) for the animal capture (Proc. 02001.008876/01-83) and for access to the genetic patrimony (CGEN/MMA, no. 023/2005).

No presente estudo caracterizamos e comparamos citogeneticamente populações de sete espécies de Dendropsophus (Hylinae) proximamente relacionadas e que apresentam morfologia externa semelhante: D. nanus (Botucatu, SP; Bodoquena, MS; Telêmaco Borba, PR; Bacabal, MA), D. walfordi (entre Rio Madeira e Pacaás, RO), D. sanborni (Torres, RS), D. jimi (Uberlândia, MG), D. rubicundulus (Uberlândia, MG), D. elianeae (Botucatu, SP; Nova Itapirema, SP; Bodoquena, MS) e D. minutus (Vitória Brasil, SP; Bodoquena, MG). As metáfases foram obtidas a partir de suspensões de células do epitélio intestinal e de testículo. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 10% ou submetidas às técnicas de banda C e de impregnação por prata (Ag-NOR) e hibridação in situ fluorescente. Os dados citogenéticos revelaram a presença de 2n=30 cromossomos em todas espécies, exceto em alguns indivíduos de D. nanus, que apresentaram até três cromossomos B pequenos, todos telocêntricos e univalentes na meiose. Todas as espécies apresentaram pequena quantidade de heterocromatina, localizada somente na região centromérica. No entanto, alguns indivíduos de D. nanus de Telêmaco Borba (PR) e de D. rubicundulus de Uberlândia (MG) apresentaram um pequeno bloco de heterocromatina intersticial no par 3 e no par 12, respectivamente, caracterizando uma variação intrapopulacional. A região organizadora do nucléolo (NOR) foi detectada em um único par cromossômico nas diferentes espécies. Um indivíduo de D. sanborni apresentou um heteromorfismo no par 12 devido a uma duplicação da NOR em um dos homólogos. As populações de D. nanus provenientes de Telêmaco Borba (PR), Bacabal (MA) e Serra da Bodoquena (MS) e a de D. walfordi coletada entre os rios Madeira e Pacaás (RO) apresentaram cariótipos idênticos, com 2n=30 e NF=52. Um espécime de D. nanus da Serra da Bodoquena, apresentou NF=51 devido a um heteromorfismo no par 6, em que um dos homólogos é metacêntrico e o outro telocêntrico, provavelmente devido a uma inversão do tipo pericêntrica. Em todos os espécimes, a NOR foi localizada no par metacêntrico 13. Dendropsophus sanborni proveniente de Botucatu (SP) e Torres (RS) e D. jimi de Uberlândia (MG) também apresentaram cariótipos idênticos, com 2n=30 e NF=50, diferindo das outras

duas espécies pela presença de cinco telocêntricos em vez de quatro, com a NOR localizada no par telocêntrico 12. Não foram observadas diferenças citogenéticas entre as populações de D. nanus e entre as de D. sanborni, e nem destas com as outras populações já descritas na literatura. Os cromossomos B presentes em duas populações de D. nanus não apresentaram heterocromatina e nem genes ribossomais. Dendropsophus elianeae apresentou três pares de telocêntricos e a NOR no par 11, enquanto D. rubicundulus apresentou apenas dois telocêntricos e a NOR no par 5. As duas populações de D. minutus apresentaram o mesmo cariótipo já descrito para outras populações, com ausência de cromossomo do tipo telocêntrico. A NOR nessa espécie foi detectada no par 9. Os dados citogenéticos do presente trabalho não permitiram distinguir D. nanus de D. walfordi, nem D. sanborni de D. jimi, sugerindo que são espécies muito intimamente relacionadas. Dendropsophus elianeae e D. rubicundulus foram até pouco tempo consideradas como uma única espécie e D. rubicundulus foi por muito tempo erroneamente denominada de D. elongata. Essas espécies foram facilmente diferenciadas pelo número de telocêntricos e pela localização da NOR. Diferem também de D. elongata, descrita na literatura, que possui apenas um par de telocêntricos. Nenhuma diferença siginificativa foi detectada entre os cariótipos das três populações de D. elianeae. Portanto, os dados citogenéticos corroboraram o status taxonômico atual de D. elianeae e D. rubicundulus. Rearranjos do tipo inversão e translocação devem ter ocorrido durante a diferenciação das espécies de Dendropsophus, levando a modificação na morfologia dos cromossomos e à migração da NOR no genoma, sem alterar o número de cromossomos.

Obs.: Este trabalho foi desenvolvido com permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) para coleta dos animais (Proc. 02001.008876/01-83) e para acesso ao patrimônio genético (CGEN/MMA, no. 023/2005).

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. A ordem Anura: aspectos gerais

A ordem Anura possui 33 famílias e aproximadamente 5000 espécies descritas (Frost, 2004, AmphibiaWeb, 2005). Os anuros são representados pelos sapos, rãs e pererecas, e são cosmopolitas. Estão ausentes somente na maioria das ilhas oceânicas e nas regiões onde o clima é extremamente adverso às suas adaptações morfofisiológicas, como desertos e regiões polares (Duellman & Trueb, 1986; Frost, 2004).

Uma vez que os anuros são bastante conservados do ponto de vista morfológico, investigações das relações filogenéticas baseadas somente nestes caracteres muitas vezes são pouco informativas (Hillis, 1991). Recentemente, novas abordagens aos estudos filogenéticos de anuros foram possibilitadas pelo uso de outras ferramentas como análises citogenéticas, ultra-estrutura de espermatozóides, estudos moleculares, comportamentais, bioquímicos e biogeográficos (Maxson & Heyer, 1982; Miura *et al.*, 1995; Hass *et al.*,1995; Hay *et al.*, 1995; Caldwell,1996; Cannatella *et at.*, 1998; Clough & Summers, 2000; Chek *et al.*, 2001; Busin *et al.* 2001; Garda *et al.*, 2002). Além disso, para esclarecer alguns problemas filogenéticos e taxonômicos, muitas vezes há a necessidade de uso de mais de uma destas ferramentas. Algumas técnicas são utilizadas para solucionar problemas entre espécies supostamente aparentadas, outras para elucidar relações entre táxons mais elevados (Hillis, 1987).

1.2. Citogenética de Anura

Estudos baseados somente em caracteres morfológicos podem gerar muitas dúvidas por falta de mais dados que possam caracterizar de forma precisa as entidades sistemáticas. O estudo citogenético tem contribuído para as investigações em sistemática e taxonomia de vários grupos de anuros. O uso de caracteres morfológicos juntamente com os de outras áreas, como da citogenética, vem ajudando a esclarecer os problemas filogenéticos e taxonômicos neste grupo.

As investigações filogenéticas em Anura com base apenas em dados morfológicos são de difícil interpretação, uma vez que, apesar do grande número de espécies e da diversidade de habitats, os Anura são pouco variados morfologicamente. Exceto pelas relações entre as famílias basais (Canatella, 1985; Hillis, 1991), pouco é conhecido sobre a filogenia dessa ordem. A pequena divergência morfológica entre os Neobatrachia pode ser explicada pelo fato de a maioria das famílias desse grupo ter derivado do ancestral comum há pouco tempo na escala evolutiva (Hillis, 1991). No entanto, isso não impede que os caracteres citogenéticos e moleculares tenham sofrido maior divergência do que os morfológicos, o que justifica uma maior investigação dos Neobatrachia nesses níveis.

Em citogenética, espécies que são morfologicamente muito parecidas, como *Hyla brunnea* e *H. septentrionalis*, consideradas inicialmente como uma única espécie, foram submetidas à análise cromossômica oque neste caso foi muito elucidativo. Demonstrou-se que a primeira apresentava 2n=34 e a segunda 2n=24 cromossomos, além de diferenças na morfologia destes (Cole, 1974). No caso de *H. nana* e *H. sanborni*, espécies morfologicamente muito semelhantes, apesar de apresentarem o mesmo número

cromossômico, foram diferenciadas pela presença da NOR em diferentes pares cromossômicos e pelo número de telocêntricos (Medeiros *et al.*, 2003).

Existem ainda estudos em que espécimes morfologicamente idênticos de uma mesma população exibiram dois cariótipos distintos, como em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1999). Outro caso ocorreu com o gênero *Pseudis*, no qual foi encontrada uma população morfologicamente muito parecida com *P. minutus*, 2n=24, no entanto apresentava 2n=28 cromossomos (Busin *et al.*, 2001). Posteriormente os espécimes com 2n=28 foram confirmados tratar-se de outra espécie, descrita previamente por Kwet (2000) como *P. cardosoi*.

Analisando as primeiras descrições cariotípicas de anuros, que consistiam na determinação do número cromossômico, identificação de constrições secundárias, posições centroméricas e comprimento relativo dos cromossomos, Morescalchi (1968, 1973) e Lynch (1971), sugeriram que anuros com caracteres morfológicos primitivos tinham cariótipos com alto número cromossômico e apresentavam cromossomos telocêntricos.

Fusão cêntrica e fusão "in tandem" foram os mecanismos responsáveis pelas reduções cromossômicas durante o processo evolutivo em Anura (Bogart, 1973, 1991; Beçak *et al.*, 1970 e Morescalchi, 1973, Miura *et al.*, 1995). Porém não existem dados suficientes para apontar a polaridade da transformação cariotípica, sendo impossível à eleição da redução ou do aumento do número cromossômico (Bogart, 1991). Em alguns casos, como em *Pseudis cardosoi* (Busin *et al.*, 2001), há evidências de que fissão cêntrica tenha sido o mecanismo principal.

A ocorrência de poliploidia natural nos anuros também tem sido descrita em pelo menos 38 espécies distribuídas em diferentes famílias, e pode ser originada por autopoliploidia ou alopoliploidia, sendo a primeira a mais comum (Tymowska, 1991).

Cromossomos sexuais heteromórficos são raros nos anuros, ocorrendo em aproximadamente 20 espécies e em muitos casos sua identificação é feita após a utilização de algum tipo de bandamento cromossômico (Schmid, 1980; Nishioka *et al.*, 1993; Lourenço *et al.*, 1999; Schmid, *et al.*, 2002a,b; Schmid, *et al.*, 2003; Schmid & Steinlein, 2003).

1.3. Cromossomos B

Em algumas espécies, além dos cromossomos que compõem o cariótipo normal, ditos cromossomos A, aparecem cromossomos extras, geralmente pequenos e heterocromáticos, chamados cromossomos B, cromossomos acessórios ou cromossomos supernumerários. Nas espécies que possuem esses cromossomos, o número deles por indivíduo pode ser muito variável. Podem tanto se assemelhar aos cromossomos do complemento normal como serem claramente distintos (revisão em Guerra, 1988).

A variação numérica se deve, em parte, ao comportamento meiótico irregular, freqüentemente com formação de univalentes, migração preferencial para um dos pólos, retardo anafásico ou, mais raramente, pareamento com um cromossomo A. Em algumas espécies, o número de cromossomos B varia entre diferentes células de um mesmo indivíduo. Neste caso, isso se deve a um retardo anafásico, com eliminação do cromossomo B de algumas células ou tecidos, ou à não disjunção mitótica, quando ambas as cromátides migram para um mesmo pólo. Em plantas, existem vários casos em que os supernumerários

são completamente eliminados das raízes e são mantidos em níveis variáveis em outros órgãos (revisão em Guerra, 1988).

A julgar por esta alta instabilidade, dever-se-ia esperar que os cromossomos B fossem rapidamente eliminados das espécies onde surgem. Entretanto, isso não ocorre e vários dados sugerem que em algumas espécies, o número de cromossomos B é controlado geneticamente. Em milho e centeio, por exemplo, observa-se que quando existe um B no grão de pólen ele migra preferencialmente para o pólo que irá originar o núcleo reprodutivo ou o gameta que fecundará a oosfera, garantindo assim sua transmissão (revisão em Guerra, 1988).

A existência de mecanismos capazes de controlar o número de cromossomos B em determinados órgãos ou de favorecer a sua transmissão gamética sugere que esses cromossomos tenham alguma importância para as espécies. Embora nesses cromossomos não tenham sido localizados genes que causem alteração fenotípica importante, sabe-se que em alguns casos os cromossomos B interferem em características críticas para a espécie, como o emparelhamento de homólogos A e freqüência de quiasmas (revisão em Guerra, 1988).

Em alguns espécimes de *Akodon* sp (2n=25) foi encontrada atividade gênica em cromossomos B (Kasahara & Yonenaga-Yassuda, 1982). Nesses roedores foram observadas regiões organizadoras de nucléolos em ambos os telômeros de um cromossomo B submetacêntrico. Isto mostra que cromossomos B podem conter informações genéticas. Entretanto, os genes da região organizadora do nucléolo (NOR) constituem um tipo especial de informação genética, devido a sua repetitividade. Em vários organismos tem sido demostrado que quando há variação intraespecifica no número de genes para RNAr, essa variação geralmente é compensada pela taxa de transcrição desses genes. Com relação aos genes das NOR de *Akodon* sp, observou-se que os presentes no cromossomo B não têm

conseqüências importantes para seu portador (Kasahara & Yonenaga-Yassuda, 1982). Por outro lado, em determinado momento da história evolutiva de uma espécie pode haver necessidade de alterar a freqüência de quiasmas ou aumentar o limite de transcrição de genes de RNAr, e os cromossomos B poderão conferir uma vantagem adaptativa para a espécie (revisão em Guerra, 1988)

Em Anura, apenas em dez espécies, distribuídas em seis famílias, foi detectada a presença de cromossomos B (Morescalchi, 1968; Nur & Nevo, 1969; Schmid, 1978b; Wu & Zhao, 1985; Schmid *et al.*, 1987; Kuramoto, 1989; Belcheva & Sophianidou, 1990; Green, 1991; Baldissera *et al*, 1993; Schmid *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2003). Morescalchi (1968) descreveu cromossomos B em *Leiopelma hochstetteri*. Até 1988, 20 populações desta espécie haviam sido estudadas e verificou-se a existência de muitas variações interpopulacionais em relação ao número de cromossomos B. Os cromossomos B de *L. hochstetteri* parecem não ter efeito algum. Essa falta de influência pode ocasionar um aumento no número destes cromossomos (Green *et al.*, 1987; Green, 2004).

Nur & Nevo (1969) encontraram em uma população do hilídeo *Acris crepitans* de zero a cinco pequenos supernumerários metacêntricos por indivíduo. Dessauer & Nevo (1969) encontraram uma variação no loci de transferina e esterase desta população que não ocorria nas outras populações. Esses autores concluíram que nesta população os cromossomos B podem provocar efeitos detrimentais.

Wu & Zhao (1985) descreveram um cromossomo B metacêntrico pequeno em uma espécie de ranídeo chinês *Amolops liagshanensis* que foi observado somente em fêmeas. Os autores argumentaram que esse cromossomo B talvez fosse um indicativo de um sistema sexual 0W/00. Contudo foram analisados somente três fêmeas e um macho e mais estudos

precisariam ter sido feitos para confirmar esta hipótese. Schmid *et al.* (1987) encontraram um cromossomo B telocêntrico pequeno em uma fêmea de *Discoglossus pictus*, que segundo estes autores era muito semelhante ao pequeno cromossomo que aparecia no cariótipo de *Ascaphus truei*. Um único e grande cromossomo B tem sido encontrado entre populações do sapo *Scaphiopus hammondii*, sendo esse telocêntrico e heterocromático, exceto em uma pequena região onde se encontra a NOR (Green, 1991; Green, 2004). Kuramoto (1989) descreveu um cromossomo B telocêntrico em um macho de *Rana everetti* das Filipinas.

Cromossomos B também foram descritos em espécimes de *Rana temporaria* de quatro populações da Bulgária (Belcheva & Sophianidou, 1990). Estes cromossomos eram metacêntricos e a heterocromatina ocupava a região distal de um dos braços. Segundo Schmid (1978b) a preservação dos cromossomos B em espécimes das populações até então analisadas indicava que eles garantiriam alguma vantagem podendo estar relacionada com atividade transcricional ou com um aumento de recombinação, assim aumentando a variabilidade genética da espécie. Belcheva & Sophianidou (1990) ao estudar a espécie *Rana temporaria*, também concordaram que cromossomos B conferem alguma vantagem seletiva através do aumento da variabilidade genética.

Baldissera *et al.* (1993) também descreveram em *Hyla* sp. (aff. *circundata*) um cromossomo B. Dois espécimes (um macho e uma fêmea) apresentaram um cariótipo com 2n=25, que era similar ao de 2n=24 exceto pela presença de um pequeno metacêntrico. Recentemente, Rosa *et al.* (2003) descreveram o primeiro caso de cromossomo B na família Leptodactylidae, em dois espécimes de *Megaelosia massarti*, sendo que um deles apresentou um pequeno metacêntrico inteiramente heterocromático, e o outro um metacêntrico grande

contendo heterocromatina apenas na região telomérica de ambos os braços. Nesses cromossomos também não foram detectados genes para RNAr.

No anuro equatoriano, *Gastroteca espeletia*, foi encontrado uma evidência substancial na variação e ocorrência de cromossomos B Todos os 47 individuos (machos e fêmeas) tem de 1 a 9 cromossomos B mitoticamente estáveis com morfologia diferente, em adição aos cromossomos do complemento normal (2n=26 cromossomos) (Schmid *et al.*, 2002b). Os cromossomos B destes animais são inteiramente heterocromáticos. Ele também carregam genes de RNA 18S + 28S em seqüências teloméricas (Schmid *et al.*, 2002b).

1.4. A Região Organizadora Nucleolar (NOR)

A transcrição contínua de múltiplas cópias dos genes dos RNAr garante um suprimento adequado destas moléculas, que são imediatamente associadas a proteínas ribossomais para formar as subunidades ribossomais. Essa associação ocorre no núcleo, em uma estrutura grande e distinta, chamada nucléolo. O nucléolo contém grandes alças de DNA que emanam de um ou mais pares de cromossomos, cada uma das quais contém um agrupamento de genes de RNAr. Cada um desses agrupamentos é conhecido como uma região organizadora nucleolar (Alberts *et al.*, 2002).

As regiões organizadoras de nucléolos são sítios cromossômicos formados por numerosas cópias de genes que, na maioria dos animais, codificam os RNAr 18S, 5,8S e 28S, arranjados "in tandem" e separadas por seqüências espaçadoras (Long & David, 1980). Esses espaçadores podem transcrever, embora o transcrito formado seja rapidamente desorganizado (Miller, 1981).

Células eucarióticas sintetizam grande quantidade de RNAr, que corresponde à cerca de 80% do total de RNA celular. Acima de 100 cópias de genes RNAr são necessárias para sintetizar milhares de novos ribossomos por ciclo celular, utilizados para manter a capacidade sintética das células filhas (Webb & Mougey, 1991).

O tamanho das NORs (mesmo que sejam homólogas) pode variar bastante entre diferentes indivíduos da mesma espécie, devido ao diferente número de cópias dos genes ribossomais apresentado por cada NOR (Schmid, 1982). King et al. (1990) relataram variação desse tipo entre diferentes células de um mesmo indivíduo em espécies de Litoria e em Cyclorana novaehollandiae (Hylidae, Anura). No entanto, o número e a localização das NORs tendem a ser característicos de cada população ou espécie (Schmid, 1978a, b) embora variação dessa natureza já tenha sido relatada para algumas espécies, como, por exemplo, em Agalychnis callidryas (Schmid et al. 1995), Bufo terrestris (Foote et al., 1991), Hyla nana (Medeiros et al., 2003), H. chrysocelis e H. versicolor (Willey et al., 1989), Physalaemus petersi (Lourenço et al., 1998) e Paratelmatobius poecilogaster (Lourenço et al., 2000). Amplificação de cístrons ribossômicos, ativação de NORs latentes, rearranjos cromossômicos, como inversões e translocações, e elementos genéticos móveis são alguns dos mecanismos utilizados para explicar o surgimento de NORs adicionais. A maioria das NORs aparece como constrições secundárias e em alguns casos essas regiões contêm heterocromatina (King, 1980; Schmid, 1982).

Em muitas espécies de anuros foram detectadas NORs adicionais e algumas delas se destacavam pelo tamanho maior do que aquelas encontradas em pares onde a NOR era fixa. NORs adicionais são comuns entre espécies de anuros e naquelas em que não se observa

14

outras NORs no genoma, a hibridação *in situ* com sonda de DNAr mostra os mesmos sítios detectados pela prata e muito raramente tem se detectado sítios adicionais por FISH.

NORs podem ser detectadas pelos métodos de hibridação *in situ* (método mais especifico) coloração com mitramicina ou cromomicina, bandamento N e impregnação pelo íon prata

O método de impregnação por prata é o mais utilizado, embora a impregnação pela prata não é específica para NORs, pois outras estruturas como heterocromatina e cinetocoro também podem ser evidenciadas, porém, quando marcadas são facilmente distinguíveis das NORs pelas suas formas e colorações, pois geralmente as NORs aparecem mais escuras e são puntiformes (Sumner, 1990).

A análise cuidadosa do número, da localização cromossômica e das características moleculares das NORs em diferentes indivíduos pode permitir a identificação de homeologias entre diferentes populações e espécies. A identificação de homeologias possibilita, em alguns casos, o reconhecimento de alguns rearranjos cromossômicos que possivelmente diferenciaram cariotipicamente espécies ou grupos.

Portanto, a análise da NOR e suas características, como número, tamanho e posição no genoma, é de fundamental importância para o entendimento da evolução cromossômica de grupos em estudo e constituem um caráter informativo para a distinção de diferentes espécies e populações.

1.5. Heterocromatina

O termo heterocromatina é usado genericamente para descrever a região do cromossomo que permanece condensada durante todo o ciclo celular e que é transcricionalmente inativa durante a intérfase (Alberts *et al.*, 2002). Outra característica muito marcante é a chamada replicação tardia do DNA, isto é, a heterocromatina inicia sua replicação depois da eucromatina, característicamente no final da fase S.

O termo heterocromatina era dividido em constitutiva e facultativa. Atualmente isto não é mais necessário, pois a organização de ambos os tipos de cromatina é baseada no mesmo modelo de interação da cromatina nucleossomal com complexos de proteínas (Henning, 1999).

A heterocromatina de diversos organismos já estudados é composta predominantemente por seqüências curtas de DNA, altamente repetitivas e não codificadoras, como confirma a revisão de John (1988). A inexistência de genes na heterocromatina e a observação de que essa cromatina pode ser eliminada ou não amplificada enquanto o restante do DNA sofre politenização em células somáticas levou alguns pesquisadores a considerar a heterocromatina como um "lixo" do núcleo. Sumner (1994) lembra que a ausência de genes não exclui a possibilidade dessa cromatina exercer outras funções. Pardue & Henning (1990) discutem que a heterocromatina não deve ser um "lixo" e sim exercer funções ainda não definidas, fazendo uma analogia de heterocromatina com "artigo de colecionadores" (collector's item), cuja importância é reconhecida apenas por quem entende. Esses autores mencionam ainda alguns fenômenos relacionados à heterocromatina, como variegação, associação desse tipo de cromatina com cromossomos Y de insetos, e outros. O método mais utilizado para se evidenciar a heterocromatina é a banda C, embora existam outros métodos como por exemplo os bandamento N, Q, H e mitramicina. A reação de Feulgen (Sumner, 1990).

Diferenças nos padrões heterocromáticos entre espécies são encontradas tanto nos anuros primitivos quanto nos mais derivados (King, 1991). Porém, nos anuros primitivos de sete famílias pertencentes aos Archaeobatrachia foram detectadas pequenas quantidades de heterocromatina através das técnicas de bandamento. Já os Neobatrachia, anuros considerados derivados, apresentam uma grande diversidade na distribuição e quantidade de heterocromatina (King, 1991).

Schmid (1978a) detectou três classes de heterocromatina em bufonídeos e em hilídeos, diferenciadas pela resposta aos métodos de bandamento: banda C positiva fortemente fluorescente a quinacrina mostarda; banda C positiva fracamente fluorescente e heterocromatina telomérica com uma fraca banda C. Tais diferenças na coloração da heterocromatina, principalmente com relação à banda C, foram encontradas em alguns hilídeos dos gêneros *Litoria* (King, 1980) e *Hyla* (Anderson, 1991), nos leiopelmatídeos do gênero *Leiopelma* (Green, 1988), e nos ranídeos do gênero *Rana* (Schmid, 1978a).

Além destas diferenças, as bandas de heterocromatina podem se apresentar em estado heteromórfico. Schmid (1978a), por exemplo, encontrou diferenças no tamanho dos blocos heterocromáticos entre cromossomos homólogos em 7 espécies de bufonídeos e hilídeos. King (1980) detectou heteromorfismo em uma banda telomérica de *Litoria meireiana*.

Características da heterocromatina banda C positiva evidenciam que seu estudo pode fornecer importantes informações evolutivas, sendo, portanto um caráter citogenético a ser analisado. Como poe exemplo, a presença de um bloco de banda C associada a uma constrição secundária, permitiu que Lourenço *et al.* (2003) demonstrassem a presença de uma inversão paracêntrica em um indivíduo de *Scythrophrys sawayae*.

1.6. A Família Hylidae e o Gênero Dendropsophus: aspectos gerais

A família Hylidae possui três subfamílias, 43 gêneros e aproximadamente 731 espécies (Frost, 2004, AmphibiaWeb, 2005, Faivovich *et al.*, 2005). Esta família compreende anuros arborícolas que usualmente possuem cabeça e olhos grandes e, freqüentemente, cintura delgada, patas longas e de tamanho extremamente variável (Duellman & Trueb, 1986). Muitas espécies da família Hylidae possuem discos digitais aumentados e são denominadas pererecas (Pough *et al.*, 1993).

A subfamília Hylinae atualmente é constituída por 36 gêneros e aproximadamente 570 espécies, todos possuindo uma distribuição geográfica bastante variável, habitando a América do Norte e do Sul, oeste da Índia, Região Australo-Papua, Eurásia, incluindo o extremo norte da África e o Arquipélago japonês (Frost, 2004, Faivovich *et al.*, 2005). Algumas espécies que pertenciam ao gênero *Hyla* foram recentemente realocadas em novos gêneros por Faivovich *et al.* (2005), como é o caso do gênero *Dendropsophus*, que recebeu as espécies anteriormente denominadas de "*Hyla* de 30-cromossomos". Este gênero é atualmente contituido por 87 espécies.

O gênero *Dendropsophus*, é caracterizado até o momento, pelo número conservado de 2n=30 cromossomos (Bogart, 1973, Kaiser *et al.*, 1996, Medeiros *et al.*, 2003, Gruber *et al.*, 2005). Essa característica associada à análise molecular de genes mitocondriais, nucleares e caracteres morfológicos sugerem que o gênero seja monofilético (Faivovich *et al.*, 2005).

18

1.7. Problemática e Justificativa

As espécies *Dendropsophus nanus* (=*Hyla nana* Boulenger, 1889), *D. sanborni* (=*H. sanborni* Schmidt, 1944), *D. walfordi* (=*H. walfordi* Bokermann, 1962), *D. elianeae* (= *H. elianeae* Napoli & Caramaschi, 2000), *D. jimi* (=*H. jimi* Napoli & Caramaschi, 1999b) *D. rubicundulus* (=*H. rubicundula* Reinhardt & Lutken, 1862) e *D. minutus* (=*H. minuta* Peters,1872) (Faivovich *et al.*, 2005), são consideradas espécies próximas e pertencentes ao gênero *Dendropsophus* de 30 cromossomos (Del-Grande, 1995; Langone & Basso, 1987; Langone, 1994). Barrio (1967) chegou a considerar *D. sanborni* como sendo subespécie de *D. nanus*. Posteriormente, Cardoso (1981) considerou *D. sanborni* como espécie plena, sendo isso também aceito por Basso *et al.* (1985) baseado nas observações osteológicas e do canto de anúncio, além da verificação de ambas ocorrendo em simpatria em vários locais (Langone & Basso, 1987).

Segundo Langone & Basso (1987), devido às semelhanças destas duas espécies, muitos dos trabalhos feitos com *Dendropsophus nanus* são na verdade exemplares de *D. sanborni* e vice-versa.

Dendropsophus walfordi tem sido considerada como subespécie ou ainda sinônimo de *D. nanus* (Langone & Basso, 1987). Bokermann (1962) descreveu *D. walfordi* com base no material do Forte Príncipe da Beira, Estado de Rondônia. Lutz (1973) considerou *D. walfordi* como sinônimo de *D. nanus*, baseando-se em sua morfologia, mas Heyer (1976) considerou *D. walfordi* como espécie plena. Segundo Langone & Basso (1987), Cardoso (comun. pess.) também a considerava espécie plena baseando-se em seu canto nupcial, registrado em

Rondônia. Esses mesmos autores examinaram exemplares dessa espécie e observaram diferenças morfológicas que a separa de *D. nanus*.

Dendropsophus rubicundulus, cuja localidade tipo é Lagoa Santa (MG), também já foi confundida com *D. nanus* (Lutz 1973, Langone & Basso 1987). Cochran (1955) utilizou *D. rubicundulus* como se fossem espécimes de *D. nanus* (Langone & Basso 1987).

Dendropsophus jimi e D. elianeae são espécies que foram recentemente descritas por Napoli & Caramaschi (1999, 2000), como pertencentes ao grupo de espécies de D. rubicundulus. Esse grupo, definido por Napoli & Caramaschi (1998), compreende as espécies D. rubicundulus Reinhardt & Lütken, 1862, D. tritaeniata Bokermann, 1965, D. anataliasiasi Bokermann, 1972, D. araguaya Napoli & Caramaschi, 1998, D. cerradensis Napoli & Caramaschi, 1998, D. jimi Napoli & Caramaschi, 1999, D. rhea Napoli & Caramaschi, 1999, D. cachimbo e D. elianeae Napoli & Caramaschi, 2000. Porém Faivovich e colaboradores (2005) através de estudos moleculares aloca tais espécies no grupo de D. microcephalus clado D. rubicundulus. Os espécimes dos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiais atribuídos a D. rubicundulus foram considerados uma nova espécie, denominada D. elianeae, por se diferenciar morfologicamente dos espécimes que ocorrem em Minas Gerais. Os espécimes de D. elianeae dos Estados de SP, MT e MS, consideradas até então como D. rubicundulus chegaram a ser também chamados erroneamente de D. elongata (Napoli & Caramaschi, 1999).

Dendropsophus minutus foi considerada espécie próxima de *D. nanus* e de *D. sanborni* (Barrio 1967, Cei, 1987). Esses autores consideraram essas três espécies como pertencentes ao grupo de *Dendropsophus minutus*. Porém, há ainda muita controvérsia na literatura pois Jim (1980) e Frost (1985) consideram *Dendropsophus nanus*, *D. sanborni* e *D. walfordi*

como pertencentes ao grupo de *Dendropsophus nanus e* Langone (1994) considerou *Dendropsophus nanus* e *Dendropsophus sanborni* pertencentes ao grupo de *Dendropsophus microcephala*. Faivovich e colaboradores (2005) alocaram as 33 espécies ao grupo de *D. microcephala*, entre elas: *Dendropsophus nanus*, *D. sanborni*, *D. walfordi*, *D. elianeae*, *D. jimi* e *D. rubicundulus*. Já *Dendropsophus minutus* pertence agora ao grupo *D. minutus* com outras três espécies (*D. aperomeus*, *D. miyatai* e *D. riveroi*).

Uma análise cariotípica feita recentemente em espécimes de *Dendropsophus nanus* e de *D. sanborni* de uma população de Nova Aliança (SP) (Medeiros *et al.*, 2003) conflitam com os dados obtidos por Skuk & Langone (1992), para populações dessas mesmas espécies provenientes da Província do Chaco na Argentina e do Paraná, Brasil.

O cariótipo de *Dendropsophus nanus* mostrado por esses autores é mais parecido ao de *D. sanborni* estudado por Medeiros *et. al.* (2003). A população de *D. sanborni* de Nova Aliança (SP), por outro lado, difere daquela do Paraná analisada por Skuk & Langone (1992) por apresentar cinco telocêntricos em vez de quatro e fíca idêntico ao de *D. nanus* de Nova Aliança (SP) se trocarmos os pares 6 e 9 de posição no cariótipo de *D. sanborni* do Paraná. Bogart (1973) também analisou o cariótipo de *D. nanus* que apresentou 5 telocêntricos. Com a troca de posição do par 13 com o 14, o cariótipo também ficaria idêntico ao de *D. sanborni* de Nova Aliança (SP) (Medeiros *et al.*, 2003). Considerando-se que Skuk & Langone (1992) mediram apenas duas metáfases de *D. sanborni*, e que esses cromossomos médios têm todos tamanhos muito próximos, a possibilidade de ter ocorrido um posicionamento invertido no cariótipo é muito grande. Comparações da morfologia cromossômica das populações de *D. nanus* e de *D. sanborni* feitas por Medeiros *et al.* (2003) com as descritas na literatura mostram que, com apenas uma inversão na posição de dois pares de cromossomos, o

cariótipo de *D. nanus* do norte da Argentina (Bogart, 1973) e o de *D. sanborni* do Paraná (Skuk & Langone, 1992) ficam idênticos, respectivamente, ao de *D. sanborni* e de *D. nanus* de Nova Aliança (Medeiros *et al.*, 2003). É possível que a semelhança morfológica entre essas duas espécies esteja dificultando sua identificação. Uma outra possibilidade é que as diferenças detectadas estejam caracterizando as diferentes populações dessas espécies, que provavelmente sofreram pequenas modificações em seus cariótipos, podendo-se especular se um processo de especiação incipiente estaria ocorrendo nessas populações.

Portanto, as dificuldades de identificação por critérios morfológicos associadas a esses dados citogenéticos conflitantes, indicam a necessidade de uma revisão dessas populações e também do relacionamento dessas com outras espécies próximas. A análise citogenética de outras populações de *D. nanus* e *D. sanborni* poderiam contribuir para esclarecer se de fato existem apenas duas espécies, *D. nanus* e *D. sanborni*, e a relação destas com outras espécies do grupo de *Dendropsophus*.

1.8. Objetivos

 Caracterizar e comparar citogeneticamente populações de *Dendropsophus nanus* e de D. sanborni, e as espécies D. minutus, D. rubicundulus, D. elianeae, D. jimi e D. walfordi.

2) Analisar diferentes populações (geograficamente distintas) de *D. elianeae* e compará-las com *D. rubicundulus*.

3) Comparar populações de *D. nanus* com *D. walfordi*, espécies cujo relacionamento ainda é confuso.

1.9. Referências Bibliográficas

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell (4th Ed.), New York, Garland Science. pp1616.
- <u>AmphibiaWeb</u>: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2005. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <u>http://amphibiaweb.org/</u>.
- Anderson, K. (1991). Chromosome evolution in holoarctic *Hyla* treefrogs. In: Green,
 M.G. e Sessions, S.K., eds. Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic
 Press, San Diego, pp. 299-331.
- Baldissera Jr., F.A., Oliveira, P.S.L. & Kasahara, S. (1993). Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Bras. Genet.** 16 (2): 335-34.
- Barrio, A. (1967). Sobre la validez de *Hyla sanborni* y *H.uruguaya* (Anura, Hylidae).Physis, 26 (76): 521-524.
- Basso, N. J., Peri, S. I. & Di Tada, I. E. (1985). Revalidación de *Hyla sanborni* Schmidt,
 1944 (Anura: Hylidae). Cuadernos herpetológicos, Asociación Herpetológica
 Argentina, 1(3): 1-11.
- Belcheva, R.G. & Sofianidou, T.S. (1990). Karyological investigation of the brown frogs species (Anura, Ranidae) from Bulgaria and Greece. In: Cytogenetics of Amphibians and Reptiles, Birkhauser-Verlag, Basel, pp.141-146.

- Beçak, M.L., Denaro, L. & Beçak, W. (1970). Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. Cytogenetics 9 : 225-238.
- Bogart, J.P. (1973). Evolution of anuran karyotypes. In: VIAL, J.L. eds. Evolutionary biology of anurans. Univ. Missouri Press, pp. 337-49.
- Bogart, J.P. (1991). The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution**, pp.233-257, Academic Press, San Diego.
- Bokermann, W.C.A. (1962). Nova espécie de *Hyla* de Rondônia, Brasil (Amphibia, Salientia). Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro, (5): 53 55, fig.1.
- Busin, C.S., Vinciprova, G. & Recco-Pimentel, S.M. (2001). Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). Genetica 110 : 131-141.
- Caldwell, J.P. (1996). The evolution of myrmecography and its correlates in poison frogs (Family Dendrobaridae). Jour. Zool. Lond., 240: 75-1001
- Cannatella, D.C.; Hillis, D.M.; Chippindale, P.T.; Weigt, L.; Rand, A.S. & Ryan, M. (1998). Phylogeny of frogs of the *Physalaemus pustulosus* species group, with an examination of data incongruence. **Syst. Biol**., 47(2): 311-335.
- Cannatella, D.C. (1985). A phylogeny of primitive frogs (Archaeobatrachia). PhD. Dissertation. University of Kansas, Lawrence.
- Cardoso, A. J. (1981). Organização espacial e temporal na reprodução e vida larvária de uma comunidade de hilídeos no sudeste do Brasil (Amphibia, Anura). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. UNICAMP.

- Cei, J. M. (1987). Additional notes to "Amphibians of Argentina": an update, 1980-1986. Monitore Zoologico Italiano, (21): 209-272.
- Chek, A.A.; Lougheed, S.C.; Bogart, J.P. & Boag, P.T. (2001). Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). Mol. Phyl. Evol., 18 (3): 370-385.
- Clough, M. & Summers, K. (2000). Phylogenetic systematics and biogeography of the poison frogs: evidence from mitochondrial DNA sequences. Biol. Jou. Linn. Soc., 70 (3): 515-540.
- Cole, C.J. (1974). Chromosome evolution in selected treefrogs including casqueheaded species (*Pternohyla*, *Triprion*, *Hyla* and *Smilisca*). Am. Mus. Novit. 2451: 1-10.
- Del-Grande, M. L. (1995). Estudo comparado da biologia de Hyla nana e de Hyla sanborni (Amphibia, Anura, Hylidae), em Corumbataí, Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 70p.
- Dessauer, H.C. & Nevo, E. (1969). Geographic variation of blood and liver proteins in the cricket frogs. **Biochem. Genet.** 3 : 171-188.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1986). Cytogenetics, molecular and genomic evolution.In: Biology of Amphibians. McGraw Hill Book Company, New York.
- Faivovich, J, Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Museum Nat. Hist., 294: 1-240.

- Foote, D.L., Willey, J.E. & Little, M.L., Meyne, J. (1991). Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. Cytogenet. Cell Genet. 57 : 196-199.
- Frost, D. R. (1985). **Amphibian Species of the World.** Allen Press and the Association of Systematics Collections, Lawrence, Kansas.
- Frost, D. R. Amphibian species of the world: an Online Reference. Version 3.0 (22 August,
2004).EletronicDatabaseAccessibleathttp://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html.AmericanMuseumofNatural History, New York, USA.<a href="http://www.selfattion.org/logical-action-completed-logical-
- Garda, A.A.;Colli, G.R.; Aguiar-Jr. O.; Recco-Pimentel, S.M. & Báo S.N. (2002). The ultrastructure of the espermatozoa of *Epipedobates flavopictus* (Amphibia, Anura, Dendrobatidae), with comments on its evolutionary significance. Tissue & Cell, 259: 1-8.
- Green, D.M. (1988). Heteromorphic sex chromosome in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zeland. J. Heredity 79 : 165-9.
- Green D.M. (1991) Supernumerary chromosome in amphibians, in Green DM: and Sessions SK (eds): in Amphibian Cytogenetics and Evolution, Academic Press, San Diego. pp.333-358.
- Green, D.M. & Sessions, S.K. (1991). Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic Press, San Diego. 456pp.
- Green, D.M., Kezer, J. & Nussbaum, R.A. (1987). Supernumerary chromosome variation and heterochromatin distribution in the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. Chromosoma 95 : 339-344.

- Green D.M. (2004). Structure and evolution of B chromosomes in amphibians. Cytogenet. Genome Res. 106: 235-242.
- Guerra, M.S. (1988). Introdução a Citogenética Geral, ed. Guanabara, Rio de Janeiro, RJ. pp 97-98.
- Gruber, SL, Haddad, CFB & Kasahara, S (2005) Evaluating the karyotypic diversity in species of Hyla (Anura; Hylidae) with 2n=30 chromosomes based on the analysis of ten species. Folia Biologica 51: 68-75.
- Hass, C.A.; Dunski, J.F. & Maxson, L.R. (1995). Divergent lineage within the *Bufo margaritifera* complex (Amphibia: Anura; Bufonidae) revealed by albumin immunology. **Biotropica**, 27(2): 238-249.
- Hay, J.M.; Ruvinsky, I.; Hedges, B. & Maxson, L.R. (1995). Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. Mol. Biol. Evol., 12(5): 928-937.
- Heyer, W.R. (1976). Notes on the frogs fauna of the Amazon basin. Acta Amazônica, 6
 (3): 369 378, fig.1. Manaus.
- Hernandez-Verdun, D., Roussel, P. & Gautier, T. (1993). Nucleolar proteins during mitosis. Chrom. Today 11: 79-90.
- Hillis, D.M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. Ann. Rev.Ecol. Syst. 18: 23-42.
- Hillis, D.M. (1991). The phylogeny of amphibians. In Amphibian Cytogenetics and Evolution, pp. 7-31, Academic Press, San Diego.

- John, B. (1988). The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S., ed. Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects. Cambridge University Press, Cambridge. pp 1-147.
- Kaiser, H, Mais C, Bolaños & Steinlein, C (1996) Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. Genetica, 98: 95-102. 1996.
- Kasahara, S. & Yonenaga-Yassuda, Y. (1982). Chromosomal variability in Akodon sp. (Rodentia, Cricetidae). Cytologia, 47: 317-324.
- Kasahara S, Silva APZ and Haddad CFB (1996) Chromosome banding in three species of Brasilian toads (Amphibia - Bufonidae). Ver. Brasil. Genet. 19(2):237-242.
- King, M. (1980). C-banding studies in Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** 80 : 191-207.
- King, M., Contreras, S.N. & Honeycutt, R.L. (1990). Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. Genetica 80 :17-29.
- King, M. (1991). Evolution of heterochromatin in the Amphibia genome. In: Green, M.G. e Sessions, S. K., eds. Amphibian Cytogenetic and Evolution. Academic Press, San Diego, pp. 359-91.
- Kuramoto, M. (1989). Karyological studies on some Philipine frogs. In Current Herpetology in East Asia. Ed. M. Matsui, T. Hikida, R.C. Goris, Herpetological Society of Japan, Kyoto, pp. 115-121.
- Kwet, A. (2000). The genus *Pseudis* (Anura: Pseudidae) in Rio Grande do Sul, southern Brazil, with description of a new species. **Amphibia-Reptilia** 21 : 39-55.
- Langone, J. A. e Basso, N. G. (1987). Distribucion geografica y sinonima de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo, 164 (11): 1-17.
- Langone, J. A. (1994). Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biologicos). **Museo Damaso Antonio Larrañaga** (5): 9-45.
- Long, E.O. & David, I.B. (1980). Repeated genes in eukaryotes. Ann. Rev. Bioch. 49: 727-764.
- Lourenço, L.B.; Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1998). Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. Chrom. Res. 6: 621-628.
- Lourenço, L.B.; Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1999). Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae).
 Can. J. Zool. 77: 624-631.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2000) Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae) with phylogenetic comments. Hereditas 113 (3): 201-209.

- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003). Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae) and new insights on the relationship with the leptodactylid *Paratelmatobius*. **Ital. J. Zool**. 70: 183-190.
- Lutz, B. (1973). Brazilian species of *Hyla*. University of Texas Press. Austin & London. 260 pp.
 - Lynch, J. M. (1971). Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ., 53: 1-238.
 - Maxson, L.R. & Heyer, W.R. (1982). Leptodactylid frogs and the brazilian shield: an old continuing adaptative relationships. **Biotropica**, 14(1): 10-15,
 - Medeiros, L.R., Rossa-Feres D.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003). Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. Journal of Heredity 94: 149-154.
 - Miller, O.L. (1981). The nucleolus, chromosome and vizualization of genetic activity. J. Cell. Biol. 91: 15-17.
 - Miura, I., Nishioka, M., Borkin, L.J. & Wu, Z. (1995). The origin of the brown frogs with 2n=24 chromosomes. **Experientia** 51: 179-188.
 - Morescalchi, A. (1968). The karyotype of two specimes of *Leiopelma hochstetteri* Fitz. (Amphibia, Salientia). Caryologia 21:37-46.
 - Morescalchi, A. (1973). Amphibia. In: Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution Chiarelli A.B. & Capana, eds. Academic Press. New York pp.233-348.

- Napoli, M.F. & Caramaschi, U. (1998). Duas novas espécies de *Hyla* Laurenti, 1768 do Brasil central afins de *H. tritaeniata* Bokermann, 1965 (Amphibia, Anura, Hylidae).
 Bol. Mus. Nac. 391 : 1-12.
- Napoli, M.F. & Caramaschi, U. (1999). Geographic variation of *Hyla rubicundula* and *Hyla anataliasiasi* with the description of a new species (Anura, Hylidae). Alytes 16 (3-4): 165-189.
- Napoli, M.F. & Caramaschi, U. (2000). Description and variation of a new Brazilian species of *Hyla rubicundula* group (Anura, Hylidae). Alytes 17 (3-4): 165-184.
- Nishioka, M.; Miura, I. & Saitoh, K. (1993). Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sx-determining mechanism. Sci. Rep. Lab. Amphibiam Biol. Hiroshima Univ. 12: 55-81.
- Nur, U. & Nevo, E. (1969). Supernumerary chromosomes in the cricket frog, *Acris crepitans*. Caryologia 22: 97-102.
- Pardue, M.L. & Henning, W. (1990). Heterochromatin: junk or collector's item? Chromosoma 100: 3-7.
- Pough, F. H.; Heiser, J. B. & McFarland, W. N. (1993). Salamandras, Anuros e Cecílias.In: A vida dos vertebrados. Atheneu Editora, São Paulo.
- Rosa, C., Aguiar-Jr, O., Giaretta, A.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2003). Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B chromosome in a leptodactylid frog. **Copeia** 1: 166-174.
- Schmid, M. (1978a). Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66: 361-388.

- Schmid, M. (1978b). Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. Chromosoma 68: 131-48.
- Schmid, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** 77: 83-103.
- Schmid, M. (1982). Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87: 327-44.
- Schmid, M., Vitelli, L. & Batistoni, R. (1987). Chromosome banding in Amphibia XI:
 Constitutive heterochromatin, nucleolus organizer regions 18S+28S and 5S ribosomal
 RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. Chromosoma 95: 271-284.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F. & Leon, P. (1995). Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). Cytogenet. Cell. Genet. (69): 18-26.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Steinlein, C. Rupprecht, A., Haaf, T & Kaiser, H. (2002a). Chromosome banding in Amphibia. XXIII. Giant W sex chromosomes and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphonides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Leptodactilydae). Cytogenet. Genome Res. (97): 81-94.
- Schmid, M, Ziegler C.G., Steinlein, C. Nanda I. & Haaf T. (2002b). Chromosome banding in Amphibia. XXIV. The B chromosome of Gastroteca espeletia (Anura; Hylidae). Cytogenet Genome Res. (97): 205-218.

- Schmid, M & Steinlein, C. (2003). Chromosome banding in Amphibia. XXIX. The primitive XY/XX sex chromosome of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). Cytogenet Genome Res. (101): 74-79.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Steinlein, C., Garcia R.V. & Badillo A. F. (2003).
 Chromosome banding in Amphibia. XXVIII. Homomorphic XY sex chromosome in Eleutherodactylus riveroi (Anura, Leptodactilydae). Cytogenet Genome Res. (101): 62-73.
- Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma** 58: 307-324.
- Skuk, G. & Langone, J.A. (1992). Los cromosomas de cuatro especies del Género *Hyla* (Anura: Hylidae) com número diploide de 2n=30. Acta Zool. Lilloana 41: 165-171.
- Sumner, A.T. (1990). C-banding and related methods. In: Chromosome Banding. Unwin Hyman Ed., London, pp. 39-69.
- Sumner, A.T. (1994). Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem** 38: 91-109.
- Tymowska, J. (1991). Poliploiy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*.IN: Green, D.M. & Session, S.K. (eds), Amphibian Cytogenetics and Evolution.Academic Press, San Diego. pp. 259-294.
- Webb, B.S. & Mougey, E.B. (1991). News from the nucleolus: *RNAr* gene expression. **TIBS** 16: 58-62.

- Wiley, J.E., Little, M.L., Romano, M.A., Blount, D.A. & Cline, G.R. (1989). Polymorphism in the location of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. Chromosoma 97: 481-487.
- Wu, G.F. & Zhao, E. (1985). Preliminary studies on karyotypes of the genus *Amolops* of the Hengduan mountains. Acta Herpetol. Sinica 4: 276-282.

•

2. ARTIGO I

=

Análise citogenética de espécies de *Dendropsophus* (Anura: Hylidae)

Lilian R. Medeiros¹, Gilda V. Andrade², Albertina P. Lima³ e Shirlei M. Recco-Pimentel^{1*}

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13086-863 Campinas, São Paulo, Brasil; ²Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus do Bacanga, 65080-040, São Luis, Maranhão, Brasil. ³Coordenadoria de Pesquisas em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil.

Título resumido: Análise citogenética de Dendropsophus

Palavras-chave: Anura, citogenética, Dendropsophus, cromossomo.

*Autor para correspondência (telefone: +55-19-37886128; Fax: +55-19-37886111; Email: shirlei@unicamp.br)

Resumo

Foram comparadas citogeneticamente três populações de Dendropsophus nanus, uma de D. walfordi, duas de D. sanborni e uma de D. jimi, visando contribuir para o esclarecimento de problemas taxonômicos que envolvem tais espécies. Foram utilizadas técnicas de coloração com Giemsa, banda C, Ag-NOR e hibridação in situ fluorescente (FISH). As populações de D. nanus provenientes de Telêmaco Borba (PR), Bacabal (MA) e Serra da Bodoquena (MS) e D. walfordi coletados entre os rios Madeira e Pacaás (RO) apresentaram cariótipos idênticos, com 2n=30 e NF=52. Um espécime *Dendropsophus nanus* da Serra da Bodoquena, apresentou NF=51 devido a um heteromorfismo no par 6, em que um dos homólogos é metacêntrico e o outro telocêntrico, provavelmente devido a uma inversão do tipo pericêntrica. Todas as espécies apresentaram apenas heterocromatina centromérica, à exceção de alguns indivíduos de D. nanus provenientes de Telêmaco Borba (PR) que apresentaram um pequeno bloco de heterocromatina próximo ao centrômero do par 3. Em todos os espécimes, a NOR foi localizada no par metacêntrico 13. Dendropsophus sanborni proveniente de Botucatu (SP) e Torres (RS) e D. *jimi* de Uberlândia (MG) também apresentaram cariótipos idênticos entre si, com 2n=30 e NF=50, diferindo das outras duas espécies pela presença de cinco telocêntricos em vez de quatro e a NOR localizada no par telocêntrico 12. Os dados citogenéticos não permitiram distinguir D. nanus de D. walfordi, assim como D. sanborni de D. jimi, sugerindo que se tratam de espécies intimamente relacionadas. O cariótipo de D. jimi e de D. walfordi foram descritos pela primeira vez nesse trabalho.

Introdução

As espécies Dendropsophus nanus (=Hyla nana Boulenger, 1889), D. sanborni (=H. sanborni Schmidt, 1944), D. walfordi (=H. walfordi Bokermann, 1962), e D. jimi (=H. jimi Napoli & Caramaschi, 1999b) (revisão em Faivovich et al., 2005) têm sido alvo de discussão taxonômica (Langone & Basso, 1987, Medeiros et al., 2003) especialmente devido a semelhanças morfológicas. Todas estas espécies são próximas e pertencentes ao grupo de Dendropsophus com 30 cromossomos (Langone & Basso, 1987; Langone, 1994). Dendropsophus sanborni chegou a ser considerada subespécie de D. nanus (Barrio, 1967; Cei, 1980) e posteriormente Cardoso (1981) considerou D. sanborni como espécie plena, sendo também aceito por Basso et al. (1985). No entanto, estas espécies foram freqüentemente confundidas (Langone & Basso 1987, Medeiros et al., 2003). Além disso, D. walfordi foi considerada sinônimo de D. nanus baseado em sua morfologia (Lutz, 1973; Duellman 1977; Frost, 1985). Porém, Langone & Basso (1987) retiraram D. walfordi da sinonímia com D. nanus e a consideraram como uma espécie válida com base em dados de canto e morfologia do girino. A espécie D. jimi foi descrita recentemente e incluída no grupo D. rubicundulus no complexo tritaeniata (Napoli & Caramaschi 1999b). Tais espécies apresentam características distintas de morfologia externa de adulto e girino, vocalização e habitat e por estarem sempre relacionadas aos ambientes de cerrado (Napoli & Caramaschi, 1998). Enquanto as espécies aqui estudadas pertencem ao grupo de D. microcephalus. Faivovich et al. (2005), baseado em estudos moleculares, propôs a inclusão de todas essas espécies no grupo D. microcephalus.

Recentemente, análises cariotípicas feitas por Medeiros et al. (2003) para espécimes de Dendropsophus nanus e de D. sanborni provenientes de Nova Itapirema, SP, conflitaram com os dados cariotípicos obtidos por Skuk & Langone (1992) e por Bogart (1973). Medeiros *et al.* (2003) observaram que om apenas uma inversão na posição de dois pares de cromossomos, o cariótipo de *D. nanus* do norte da Argentina (Bogart, 1973) e o de *D. sanborni* do Paraná, Brasil (Skuk & Langone, 1992) tornam-se idênticos, respectivamente, aos de *D. sanborni* e de *D. nanus*, ambas procedentes de Nova Aliança, São Paulo, Brasil. Possivelmente, a semelhança morfológica entre essas duas espécies tenha causado problemas na identificação. As dificuldades de identificação por critérios morfológicos associados a esses dados citogenéticos indicam a necessidade de análises cariotípicas de outras populações de *D. nanus* e *D. sanborni* e também do relacionamento dessas com outras espécies próximas. A análise citogenética de outras populações destas espécies visa contribuir para

Neste trabalho foram analisadas três populações de *D. nanus*, uma de *D. walfordi* coletada próxima da localidade-tipo, duas de *D. sanborni* e uma de *D. jimi*. O número e a morfologia cromossômica, a distribuição e a quantidade de heterocromatina e a localização da NOR foram considerados como critério de comparação com o objetivo de caracterizar e diferenciar essas espécies.

Material e Métodos

Foram examinadas três populações de *Dendropsophus nanus* do Brasil, sendo dez espécimes (todos machos) coletados em Telêmaco Borba (24°18'S, 50°33'W), PR, em Novembro de 2002, identificados e coletados por R. Machado, 22 espécimes (15 machos e 7 fêmeas) coletados em Bacabal (4°22'S; 44°52'W), MA, em Fevereiro de 2002, identificados e coletados por G. V. Andrade e 13 espécimes (12 machos e 1 fêmea) coletados na Serra da

Bodoquena (20°41'S; 56°44'W), MS, em Novembro de 2001 identificados e coletados por M. Uetanabaro. Dezesseis espécimes (todos machos) de *D. walfordi*, coletados entre os rios Madeira e Pacaás Novos (aproximadamente 11°50'S; 64°10'W), RO, Brasil, em Janeiro de 2003, identificados e coletados por A. P. Lima. Duas populações de *D. sanborni*, 22 especimes (20 machos e duas fêmeas) foram coletadas em Botucatu (22°53'S, 48°26'W), SP, Brasil em Janeiro de 2000 coletados por S. C. Almeida, identificados por J. Jim e S. C. Almeida e oito espécimes (quatro machos e quatro fêmeas) foram coletados em Torres (29°18'S; 49°41'W), RS, Brasil identificados e coletados por G. Vinciprova. Uma população de *D. jimi*, 16 especimes (todos machos) de Uberlândia (18°56'S; 48°18'W), MG, Brasil identificados e coletados por A. A. Giaretta (Fig. 1).

Os espécimes foram depositados no Museu de História Natural "Prof. Adão José Cardoso" (ZUEC), Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil, com os números ZUEC 12382-12391 (*Dendropsophus nanus*, Telêmaco Borba), 11850-11871 (*D. nanus*, Bacabal), 13178-13190 (*D. nanus*, Serra da Bodoquena), 12190-12205 (*D. walfordi*, coletados entre os rios Madeira e Pacaás Novos), 12433-12454 (*D. sanborni*, Botucatu), 13146- 13153 (*D. sanborni*, Torres), 12401-12408, 12463-12464, 12305-12310 (*D. jimi*, Uberlândia). Os animais foram coletados com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA – Proc.02001.008876/01-83) e permissão para pesquisa com material genômico (Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético, CGEN/MMA, no.023/2005).

As preparações cromossômicas foram obtidas de suspensão de células de epitélio intestinal e testículo descritas por Schmid (1978a) e Schmid *et al* (1979). As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 10% ou submetidas às técnicas de: banda C (King, 1980), coloração Ag-NOR (Howell & Black, 1980) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com

sondas de rDNA (Viegas-Péquignot, 1992). A sonda consiste de um plasmídeo recombinante HM123 com fragmentos de rDNA de *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival *et al*, 1979), usando protocolo da GIBCO. Todas as preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio Olympus BX60. A classificação cromossômica seguiu aquela descrita por Green and Sessions (1991).

Resultados

Dendropsophus nanus, *D. walfordi*, *D. jimi* e *D. sanborni* apresentaram cariótipos com 2n=30 cromossomos (Figs. 2A, D.). *Dendropsophus nanus* e *D. walfordi* possuem um número fundamental igual a 52 (Figs. 2A, B e 5A, B), exceto um espécime de *Dendropsophus nanus* (fêmea) proveniente da Serra da Bodoquena, que mostrou um número fundamental igual a 51 devido a um heteromorfismo entre os homólogos do par 6, sendo um cromossomo telocêntrico (morfo 6a) e o outro submetacêntrico (morfo 6b) (Figs.2A, 5A e tabela 2). *Dendropsophus jimi* e *D. sanborni* apresentaram número fundamental igual a 50 (Figs. 2C, D e 5C, D).

Nos espécimes de *D. nanus* das três populações e nos indivíduos de *D. walfordi* os pares 3, 8, 9, 10, 11 e 13 são metacêntricos; os pares 1, 2, 4, 5 e 7 submetacêntricos e os pares 6, 12, 14 e 15 telocêntricos (Figs.2A, B, 5A, B e Tabela 1). Em alguns indivíduos de *D. nanus* foi possível detectar uma constrição secundária na região telomérica do braço longo do par 13 (Fig. 2A). *Dendropsophus jimi* e *D. sanborni* apresentaram o mesmo cariótipo, com os pares 2, 8, 9, 10, 11 e 14 metacêntricos; os pares 1, 3, 4 e 6 submetacêntricos e os pares 5, 7, 12, 13 e 15 telocêntricos (Figs. 2C, D 5C, D e tabela 2). O método de bandamento C marcou apenas as regiões centroméricas de todos os cromossomos das quatro espécies (Figs. 3A-D),

com exceção de alguns indivíduos de *D. nanus* provenientes de Telêmaco Borba (PR) em que foi detectado um pequeno bloco de heterocromatina no braço longo do par 3, próximo ao centrômero (Figs. 3A e 5A). O método Ag-NOR permitiu identificar marcação na região telomérica do par cromossômico 13 nos espécimes das três populações de *D. nanus* e na população de *D. walfordi* (Figs. 2A, B e 5A, B), entre o centrômero e o telômero do par telocêntrico 12 na população de *D. sanborni* de Botucatu, no telômero deste mesmo par na população de *D. sanborni* de Torres (Figs. 2C e 5C) e no telômero do par 12 em *D. jimi* (Figs. 2D e 5D).

A hibridação "*in situ*" evidenciou as mesmas regiões detectadas pelo método Ag-NOR em todas as populações de todas as espécies (Figs. 4A-G).

Discussão

Os espécimes das três populações de *D. nanus* apresentaram cariótipos idênticos ao da população de Nova Itapirema (SP) descrito por Medeiros *et al.* (2003). O heteromorfismo observado no par 6 de um espécime da população da Serra da Bodoquena (MS), em que o cromossomo 6a apresentou morfologia semelhante ao par 6 telocêntrico dos outros espécimes e o cromossomo 6b apresentou morfologia de submetacêntrico pode ser explicada por uma inversão do tipo pericêntrica. A hipótese de inversão se baseia na morfologia cromossômica e no fato de não ter sido detectado alteração de tamanho total do cromossomo submetacêntrico, o que ocorreria se o fenômeno fosse deleção ou translocação. Em Anura, a ocorrência de inversões pericêntricas já foi sugerida, por exemplo, para explicar a origem do heteromorfismo na razão de braços entre os homólogos do par 1 em um espécime de *Paratelmatobius cardosoi* (Lourenço *et al.*, 2003a). Nessa espécie, no entanto,

diferentemente de *D. nanus* do presente trabalho, o par 1 apresentou também variação de tamanho entre os homólogos e de padrão de banda C, os blocos de heterocromatina serviram também como marcadores e permitiram comprovar a ocorrência da inversão. Em *D. nanus* não foi possível encontrar um marcador com as técnicas utilizadas no presente trabalho.

O cariótipo de *Dendropsophus nanus* mostrado por Skuk & Langone (1992) é semelhante ao de *D. sanborni* estudado por Medeiros *et. al.* (2003) e ao das duas populações analisadas no presente trabalho, por apresentar cinco telocêntricos em vez de quatro e se torna idêntico ao de *D. nanus* de Nova Aliança (SP) e das demais populações estudadas aqui (Telêmaco Borba, Bacabal e Serra da Bodoquena). Bogart (1973) também analisou o cariótipo de *D. nanus* que apresentou 5 telocêntricos. Com a inversão na posição de apenas um par cromossômico o cariótipo ficaria idêntico ao de *D. sanborni* de Nova Aliança (SP) (Medeiros *et al.*, 2003) e das populações apresentadas neste trabalho (Torres e Botucatu). Portanto, podemos confirmar que provavelmente o que houve foi um erro de identificação das espécies feita por estes autores devido a grande semelhança morfológica destas espécies.

Medeiros *et al.* (2003), encontraram também NORs adicionais em vários indivíduos da população de *D. nanus* de Nova Itapirema (SP). Entretanto, no presente estudo a NOR nas diferentes populações desta espécie foi sempre observada no par 13 e nenhuma NOR adicional foi encontrada.

Dendropsophus walfordi também apresentou cariótipo idêntico ao das populações de *D. nanus* analisadas, não só no número e morfologia dos cromossomos como também na localização da NOR e na distribuição de heterocromatina. Bokermann (1962) descreveu *D. walfordi* com base no material do Forte Príncipe da Beira, (RO), Brasil. Desde então, essa espécie foi sucessivamente sinonimizada a *D. nanus* por alguns pesquisadores (Lutz, 1973;

Duellman 1977; Frost, 1985) e considerada espécie plena por outros, baseado principalmente no canto de anuncio (Heyer, 1976, 1977; Langone & Basso, 1987; De La Riva *et al.* (1997). Os dados citogenéticos obtidos no presente trabalho não permitiram diferenciar *D. nanus* de *D. walfordi*, favorecendo a proposta de sinonimização e confirmando que esses dois táxons devem ser intimamente relacionados e que provavelmente tiveram uma origem comum.

As duas populações de D. sanborni (Torres-RS e Botucatu-SP) apresentaram cariótipos idênticos aos descritos por Medeiros et al. (2003) para a população de Nova Itapirema (SP). A diferença de localização da NOR no par 12, telomérica nos espécimes de Nova Itapirema e intersticial na população de Botucatu (SP), aqui estudadas, é uma variação interpopulacional que pode ter ocorrido por inversão paracêntrica, já que aparentemente não há perda ou ganho de segmentos, uma vez que os dados morfométricos não mostraram diferença no tamanho relativo desses cromossomos e nem mudança de morfologia. O heteromorfismo de tamanho da NOR observado entre os cromossomos homólogos em um indivíduo de D. sanborni do município de Botucatu (SP), provavelmente se deve a uma duplicação dessa região, pois foram observados dois blocos distintos em um dos cromossomos homólogos, tanto pelo método de Ag-NOR como por hibridação in situ. Esse heteromorfismo interindividual tem sido freqüentemente demonstrado em Anura (Schmid, 1978a,b; Schmid et al., 1990; Vitelli et al., 1982; Aguiar-Jr. et al., 2002; Lourenço et al., 2003b; Veiga-Menoncello et al., 2003). Geralmente é assumido que variações de NORs, incluindo duplicações e deleções, são originadas por crossing-over desigual (Schmid et al. 1987) ou troca desigual entre cromátides irmãs.

O cariótipo de *D. jimi* está sendo descrito pela primeira vez neste trabalho. Comparando com os as demais espécies, pode-se observar que esta espécie possui cariótipo idêntico ao das

populações de *D. sanborni* analisadas no presente trabalho e a de Nova Aliança (Medeiros *et al.*, 2003), assim como a mesma localização de NOR no telômero do par telocêntrico 12. Considerando que essa espécie difere marcadamente de *D. sanborni* e das demais por características morfológicas e comportamentais, é possível que esse seja um caso de origem comum dessas entidades taxonômicas, cujas modificações citadas não se refletiram em mudanças cromossômicas detectáveis pelos métodos utilizados. Em anuros, exemplos de espécies com cariótipos indistinguíveis já foram relatados, por exemplo, em três espécies do gênero *Bufo* (Kasahara *et al.*, 1996) que apresentaram cariótipos idênticos e o mesmo padrão de banda C e NOR. Resultado semelhante foi obtido para outros hilideos, como *H. guentheri* e *H. bischoffi* (Raber *et al.*, 2004).

Dendropsophus jimi foi descrita recentemente por Napoli & Caramaschi (1999b) como pertencente ao grupo de espécies de *D. rubicundulus*, que inclui as espécies *D. rubicundulus*, *D. tritaeniatus*, *D. anataliasiasi*, *D. araguaya*, *D. cerradensis*, *D. cachimbo*, *D. jimi*, *D. rhea* e *D. elianeae* (Napoli & Caramaschi 1998, 1999a, 1999b, 2000). No entanto, o cariótipo de *D. jimi* é idêntico ao de *D. sanborni* (presente trabalho) alocada anteriormente no grupo de *D. microcephalus* e difere de *D. rubicundulus* e *D. elianeae* (Medeiros *et al.*, em preparação) pela morfologia dos cromossomos e localização da NOR. Portanto, considerando essas características cariotípicas, os dados de presente trabalho estão de acordo com o agrupamento proposto na filogenia de Faivovich *et al.* (2005) que inclui no grupo de *Dendropsophus microcephalus* todas essas espécies estudadas aqui.

As marcações apresentadas pelo método de banda C, para todas as espécies, foram detectadas somente em regiões centroméricas. Porém, em alguns espécimes de *D. nanus* da população de Telêmaco Borba (PR) foi detectado um bloco heterocromático no braço curto

próximo ao centrômero no par cromossômico 3. Este bloco não foi observado nas das demais populações de *D. nanus* estudadas e pode se tratar de um polimorfismo populacional. Pequenas quantidades de heterocromatina têm sido observadas em grupos de espécies com cariótipos muito conservados, como relatado por exemplo em *Bufo* (Kasahara *et al.*, 1996), espécies do grupo de *H. pulchella* (Ananias, 1996) e *Physalaemus* (Amaral *et al.*, 2000), o que não é o caso desse grupo de *Dendropsophus* que apresenta variação em morfologia cromossômica e distribuição de NOR no genoma.

Referências Bibliográficas

- Aguiar-Jr., O., Lima, A.P., Giaretta, A.A. & Recco-Pimentel, S.M. (2002). Cytogenetic analysis of four frogs of the Epipedobates genus (Anura: Dendrobatidae).
 Herpetologica, 58 (3): 293-303.
- Amaral, M.J.L.V., Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (2000). Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). Caryologia 53(2): 283-288.
- Ananias, F. (1996). Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo <u>pulchella</u> (Amphibia, Anura, Hylidae). Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP. 101p.
- Barrio, A. (1967). Sobre la validez de Hyla sanborni y D.uruguaya (Anura, Hylidae).Physis, 26 (76): 521-524.
- Basso, N.J., Peri, S.I. & Di Tada, I.E. (1985). Revalidación de *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura: Hylidae). Cuadernos herpetológicos, Asociación Herpetológica Argentina, 1(3): 1-11.
- Bokermann, W.C.A. (1962). Nova espécie de *Hyla* de Rondônia, Brasil (Amphibia, Salientia). **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, (5): 53 55, fig.1.

- Cardoso, A.J. (1981). Organização espacial e temporal na reprodução e vida larvária de uma comunidade de hilídeos no sudeste do Brasil (Amphibia, Anura). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. UNICAMP
- De La Riva, R., Márquez, R. & Bosch J. (1997). Descriptionof the advertisement calls of some South American Hylidae (Amphibia: Anura): taxonomic and methodological consequences. Bonn.Zool. Beitr. 175-185.
- Duellman, W.E. (1977): Liste der rezenten amphibien und reptilien: Hylidae, Centrolenidae, Pseudidae. **das Tierreich** 95: 1-225.
- Frost, D.R. (1985). Amphibian Species of the World. Allen Press and the Association of Systematics Collections, Lawrence, Kansas.
- Faivovich, J, Haddad, CFB, Garcia, PCA, Frost, DR, Campbell, JA & Wheeler, WC (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Museum Nat. Hist., 294: 1-240.
- Green D.M. & Sessions S.K. (1991) Supernumerary chromosomes in Amphibian, pp.333-357 in Amphibian **Cytogenetics and Evolution**, Academic Press, San Diego.
- Heyer, W.R. (1976). Notes on the frogs fauna of the Amazon basin. Acta Amazônica, 6
 (3): 369 378, fig.1. Manaus.
- Heyer, W.R. (1977). Taxonomicnotes on frogs form de Madeira and Purus rivers, Brazil.Pap. Avuls. Zool., S. Paulo 31 (8): 141-162.
- Howell W.M. & Black D.A. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015.
- Kasahara, S., Silva, A.P.Z. & Haddad, C.F.B. (1996). Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). **Bras. J. Genet.** 19 (2): 237-242.
- King M. (1980) C-banding studies in Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** 80:191-207.
- Langone J.A. & Basso N.G. (1987) Distribucion geografica y sinonima de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo, 164:1-17.

- Langone J.A. (1994) Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biologicos). Museo Damaso Antonio Larrañaga 5:9-45.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003a). Cytogenetics of a new species of *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae), with the description of an apparent case of pericentric inversion. **Amphibia-Reptilia**, 24: 47-55.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003b). Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae) and new insights on the relationship with the leptodactylid *Paratelmatobius*. **Ital. J. Zool**. 70: 183-190.
- Lutz, B. (1973). Brazilian species of *Hyla*. University of Texas Press. Austin & London. 260 pp.
- Medeiros, L.R., Rossa-Feres D.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003). Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. Journal of Heredity 94: 149-154.
- Meunier-Rotival M., Cortadas J. & Macaya G. (1979). Isolation and organization of calf ribosomal DNA. Nucleic Acids Res. 6:2109-2123.
- Napoli, M.F. & Caramaschi, U. (1998). Duas novas espécies de *Hyla* Laurenti, 1768 do Brasil central afins de *H. tritaeniata* Bokermann, 1965 (Amphibia, Anura, Hylidae).
 Bol. Mus. Nac. 391: 1-12.
- Napoli, M.F. & Caramaschi, U. (1999). Geographic variation of *Hyla rubicundula* and *Hyla anataliasiasi* with the description of a new species (Anura, Hylidae). Alytes 16 (3-4): 165-189.
 - Napoli, M.F. & Caramaschi, U. (2000). Description and variation of a new Brazilian species of *Hyla rubicundula* group (Anura, Hylidae). Alytes 17 (3-4): 165-184.
- Raber, S.C., Carvalho, K.A., Garcia, P.C.A., Vinciprova, G. and Recco-Pimentel, S.M. (2004). Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). Phyllomedusa. 3(1):43-49.
- Schmid, M. (1978a). Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66: 361-388.

- Schmid, M. (1978b). Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. Chromosoma 68: 131-48.
- Schmid M., Orlet J. & Klett C. (1979) Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. Chromosoma 71:29-55.
- Schmid, M., Vitelli, L. & Batistoni, R. (1987). Chromosome banding in Amphibia XI:
 Constitutive heterochromatin, nucleolus organizer regions 18S+28S and 5S
 ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae.
 Chromosoma 95: 271-284.
- Schmid M., Steinleins, C., Nanda, I. & Epplen, J.T. (1990) Chromosome banding in Amphibia. Pp. 21-45. In: E. Olmo (ed.), Cytogenetics of amphibians and reptiles. Birkhäuser Verlag, Berlin, Germany.
- Skuk, G. & Langone, J.A. (1992). Los cromosomas de cuatro especies del Género Hyla (Anura: Hylidae) com número diploide de 2n=30. Acta Zool. Lilloana (41): 165-171.
- Silva, A. P. Z., Haddad, C. F. B., Kasahara, S. (2000).Chromosomal studies on five species of the genus Leptodactylus FITZINGER, 1826 (Amphibia-Anura), using differential staining.. Cytobios, Inglaterra, (103): 25-38.
- Veiga-Menoncello, A.C.P., Lima, A.P. & Recco-Pimentel, S.M. (2003). Cytogenetic analysis of four central Amazonian species of *Colostethus* (Anura- Dendrobatidae) with a diploid complement of 22 chromosomes. Hereditas 139: 189-198.
- Viegas-Péquignot E. (1992) In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes, pp. 137-158 in Willernson, D. ed. In situ hybridization: a pratical approach. Oxford University Press, Oxford IRL Press.
- Vitelli, L.; Batistoni, R.; Andronico, F.; Nardi, I. & Barsacchipiloni, G. (1982).
 Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary diverse anuran amphibians. Chromosoma (84): 475-491.

Legendas

Figura 1: Mapa do Brasil representando os locais onde foram coletadas as espécies estudadas

Figura 2: Cariótipos corados com Giemsa e em destaque submetidos ao método Ag-NOR. *Dendropsophus nanus* (A) mostrando o morfo 6a e 6b, constrição secundária do par 13 e NOR no memo par; *D. walfordi* (B) mostrando NOR do par 13; *D. sanborni* (C) de Botucatu, mostrando constrição secundária do par 12 e marcação da NOR neste local duplicação da NOR no par 12' e a NOR da população de Torres 12''e *D. jimi* (D) mostrando a NOR do par 12.(Barra = 5μm).

Figura 3: Cromossomos metafásicos de células intestinais submetidos ao método de Banda C. *Dendropsophus nanus* (A); *D. walfordi* (B); *D. sanborni* (C) e *D. jimi* (D). (Barra= 5µm).

Figura 4: Cromossomos metafásicos de células intestinais submetidos ao método de hibridação "*in situ*" fluorescente (FISH). *Dendropsophus nanus* (A); *D. walfordi* (B); *D. sanborni* de Botucatu (C); *D. sanborni* de Botucatu mostrando ao duplicação da NOR
(D); *D. sanborni* da população de Torres (E) e *D. jimi* (F). (Barra= 5µm).

Figura 5: Ideogramas representativos dos cariótipos. As áreas pretas indicam regiões de heterocromatina, os círculos cinza indicam a NOR. *D. nanus* (A); *D. walfordi* (B); *D. sanborni* (C) e *D. jimi* (D).



Figura 1



Figura 2







Figura 4





C.



D.

B.



Figura 5

-	Dendropsophus	nanus(A)	(n=14)		D.	<i>walfordi</i> (B)	(n=12)	
cromossomo	T.R.(%)	R.B	I.C.	P.C.	T.R.(%)	R.B.	I.C.	P.C.
1	10,9	2,37	0,29	SM	10,78	2,5	0,28	SM
2	10,5	2,25	0,3	SM	10	2,25	0,30	SM
3	10,14	1,08	0,48	М	9,24	1	0,41	Μ
4	9,73	3,0	0,25	SM	8,85	2,28	0,3	SM
5	8,92	1,75	0,36	SM	8,47	2,66	0,27	SM
6	7,29			Т				
6'	7,07	2,6	0,31	SM	7,7			Т
7	6,88	2,4	0,29	SM	6,93	$\overline{2}$	0,33	SM
8	6,1	1,14	0,46	М	6,16	1,28	0,43	Μ
9	5,67	1,33	0,42	М	5,77	1,5	0,4	Μ
10	5,26	0,85	0,53	М	5,39	1,33	0,42	Μ
11	4,45	1,2	0,45	М	5	1,16	0,46	Μ
12	4,15			Т	4,62	_		Т
13	3,74	1,25	0,44	М	4,22	1,2	0,45	Μ
14	3,34	-	-	Т	3,82			Т
15	2,93	_	_	Т	3,05	_	_	Т

Tabela 1: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Dendropsophus nanus* de Bacabal (MA) (A) e de *D. walfordi*. Classificação segundo Green & Sessions (1991).

Tabela 2: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Dendropsophus sanborni* de Botucatu (SP) e *D. jimi* de Uberlândia (MG). Classificação segundo Green & Sessions (1991).

	Dendropsophus	s sanborni	(n=14)		D.	jimi	(n=16)	
cromossomo	T.R.(%)	R.B	I.C.	P.C.	T.R.(%)	R.B.	I.C.	P.C.
1	11,27	2,97	0,25	SM	10,84	2,98	0,27	SM
2	10,17	2,23	0,47	Μ	10,52	1,76	0,44	Μ
3	9,63	1,13	0,30	SM	9,57	1,29	0,38	SM
4	8,06	2,86	0,25	SM	7,91	2,39	0,30	SM
5	7,73			Т	7,72			Т
6	7,34	2,77	0,26	SM	6,94	2,36	0,35	SM
7	6,73			Т	6,86		_	Т
8	6,36	1,44	0,39	М	6,05	1,65	0,39	М
9	5,69	1,39	0,41	М	5,88	1,34	0,44	М
10	5,29	1,28	0,43	М	5,26	1,27	0,44	М
11	4,94	1,43	0,41	М	5,18	1,33	0,43	М
12	4,75	_		Т	4,85	_		Т
13	4,55		_	Т	4,58	_	—	Т
14	4,17	1,37	0,42	Μ	4,17	1,36	0,43	Μ
15	3,32	-	-	Т	3,67	-		Т

R.B.= Relação de braços, T.R.= Tamanho relativo, I.C.= Índice Centromérico, P.C.= Posição do centrômero; M.= Metacêntrico, S.M.= Submetacêntrico, T=Telocêntrico, n.= Número de metáfases medidas.

3. ARTIGO II

Diferenciação cariotípica de *Dendropsophus elianeae* e *D. rubicundulus*, e análise de duas populações de *D. minutus* (Amphibia, Anura)

Lilian R. Medeiros¹, Denise C. Rossa-Feres², Masao Uetanabaro³, Jorge Jim⁴, Ariovaldo A. Giaretta⁵ and Shirlei M. Recco-Pimentel^{1*}

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13086-863 Campinas, São Paulo, Brasil; ²Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil; ³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus Campo Grande, CP 549, 79070-900 Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. ⁴Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-000 Botucatu, São Paulo, Brasil. ⁵Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU) Umuarama 38400902 Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Título resumido: Citogenética de espécies de *Dendropsophus*Palavras-chave: Anura, citogenética, *Dendropsophus*, cromossomos.
*Autor para correspondência (Telefone: +55-19-37886128; Fax: +55-19-37886111; E-mail: shirlei@unicamp.br).

RESUMO

Os cariótipos de três populações de *Dendropsophus elianeae*, espécie recentemente descrita, uma de *D. rubicundulus* e de duas de *Dendropsophus minutus* foram descritos nesse trabalho utilizando técnicas de coloração convencional, banda C e Ag-NOR. *Dendropsophus elianeae* e *D. rubicundulus* foram até pouco tempo consideradas como uma única espécie e *D. rubicundulus* foi por muito tempo erroneamente denominada *D. elongata*. Os dados do presente trabalho mostraram que *D. elianeae* apresenta três pares de telocêntricos e NOR no par 11, enquanto *D. rubicundulus* apresenta apenas dois telocêntricos e NOR no par 5. Diferem também de *D. elongata*, descrita na literatura, com apenas um par de telocêntricos. Esses dados corroboram o *status* taxonômico de *D. elianeae* e *D. rubicundulus*. Nenhuma diferença siginificativa foi detectada entre os cariótipos das três populações de *D. elianeae*. As duas populações de *D. minutus* apresentaram o mesmo cariótipo já descrito anteriormente para outras populações, com ausência de cromossomo do tipo telocêntrico. A NOR foi detectada no par 9. Na diferenciação dessas espécies, pode ter ocorrido rearranjos do tipo inversão e translocação, levando a modificação na morfologia dos cromossomos.

INTRODUÇÃO

O gênero *Dendropsophus* é atualmente constituído por 87 espécies (Faivovich *et al.*, 2005) sendo que 31 delas já foram cariotipadas, possuindo 2n=30 cromossomos (King, 1990; Kuramoto, 1990; Medeiros, *et al.*, 2003, Gruber *et al.*, 2005). No entanto, poucas espécies foram estudadas utilizando técnicas de coloração diferencial dos cromossomos. Até o final da década de 70, os dados citogenéticos eram obtidos a partir de técnicas simples e a maior preocupação das investigações era a caracterização do número cromossômico de cada espécie. Algumas espécies

de *Dendropsophus* de 30 cromossomos foram estudadas dessa maneira (Rabello,1970; Bogart, 1973) tendo sido possível observar variação na morfologia dos cromossomos, sendo o número e o tamanho dos cromossomos telocêntricos a característica mais utilizada para diferenciar as espécies desse grupo.

As espécies, *D. elianeae*, recentemente descrita por Napoli & Caramaschi (2000) com base em espécimes coletados em Bela Vista (MS), Brasil e *D. rubicundulus*, Reinhardt & Lütken 1862, foram envolvidas em uma discussão taxonômica, uma vez que espécimes dos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, Brasil, atribuídos a *D. rubicundulus*, foram re-descritos como uma nova espécie denominada *D. elianeae*. Essa re-descrição se baseou em diferenciação morfológica, pelo fato desses animais serem maiores e mais robustos e apresentarem dorso imaculado, em relação a *D. rubicundulus* de Minas Gerais (Napoli & Caramaschi, 2000). Esta espécie, por sua vez, também foi erroneamente chamada de *D. elongata*, até que Cardoso & Vielliard (1985), baseados em dados de vocalização, identificaram os espécimes de Minas Gerais como *D. rubicundulus*, espécie distinta de *D. elongata*.

Dendropsophus minutus Peters, 1872 é uma espécie neotropical, uma das mais amplamente distribuídas e abundantes da América do Sul (Lutz, 1973). Cardoso e Haddad (1984) encontraram diversas formas com base no padrão de coloração, tamanho e bioacústica e sugeriram que poderiam representar estágios de especiação. Esta espécie de *Dendropsophus* não apresenta nenhum cromossomo telocêntrico (Rabello, 1970; Bogart, 1973; Gruber, 2002), característica esta pouco comum nos cariótipos das espécies desse gênero, que apresentam em geral de 1 a 5 telocêntricos.

No presente trabalho descrevemos os cariótipos de três populações de *D. elianeae*, uma de *D. rubicundulus* e duas de *D. minutus*, bem como o padrão de heterocromatina e a localização da

60

região organizadora do nucléolo (NOR), buscando contribuir com dados para a sistemática dessas espécies.

Material e Métodos

Foram analisados onze espécimes de *Dendropsophus minutus*, sendo seis espécimes (todos machos) provenientes de Vitória Brasil (SP) $(20^{\circ}11'S - 50^{\circ}26'W)$ e cinco (todos machos) da Serra da Bodoquena (MS) $(20^{\circ}41'S - 56^{\circ}44'W)$, 14 indivíduos de *Dendropsophus elianeae* de três localidades, sendo três (todos machos) de Nova Itapirema (SP) $(21^{\circ}11'S - 49^{\circ}42'W)$ cinco espécimes (todos machos) de Botucatu (SP) $(22^{\circ}56'S - 48^{\circ}26'W)$ e seis espécimes (4 $e^{\circ}2 = 10^{\circ}$), provenientes de Serra da Bodoquena (MS) $(20^{\circ}41'S - 56^{\circ}44'W)$ e onze espécimes (todos machos) de *D. rubicundulus* provenientes de Uberlândia (MG) $(18^{\circ}56'S - 48^{\circ}18'W)$.

Após a retirada do intestino e dos testículos, órgãos utilizados para a análise citogenética, os espécimes foram fixados e depositados na coleção do Museu de História Natural "Prof. Adão José Cardoso" (ZUEC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil, ou no Museu do Departamento de Zoologia (DZSJRP), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), de São José do Rio Preto, SP, Brasil, com os seguintes números de registro: DZSJRP 007970-007972 e 007974-007976 (*Dendropsophus minutus* de Vitória Brasil), ZUEC 12409-12413 (*D. minutus* da Serra da Bodoquena), DZSJRP 007964-007966 (*D. elianeae* de Nova Itapirema), ZUEC 12273-12277 (*D. elianeae* de Botucatu), ZUEC 12465-12470 (*D. elianeae* da Serra da Bodoquena), ZUEC 12455-12462 e 13130-13132 (*D. rubicundulus* de Uberlândia). Os animais foram coletados com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e recursos renováveis

(IBAMA – Proc. 02001.008876/01-83) e a pesquisa teve autorização de Acesso à amostra do patrimônio genético (CGEN/MMA, no. 023/2005).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de suspensão de células do epitélio intestinal e de testículo como descrito por Schmid (1978a) e Schmid e colaboradores (1979). As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 10% ou submetidas às técnicas de banda C (King, 1980) e impregnação por prata (Howell & Black, 1980). Para a nomenclatura cromossômica relativa à posição centromérica foi seguida a proposta de Green e Sessions (1991).

RESULTADOS

As três espécies do presente estudo *Dendropsophus elianeae*, *D. rubicundulus* e *D. minutus* apresentaram cariótipos com 2n=30 cromossomos (figs.1, 2, 3 e 4). O número fundamental (NF) variou entre as três espécies, sendo 54 nas três populações de *Dendropsophus elianeae* analisadas, 56 em *D. rubicundulus* e 60 nas duas populações de *D. minutus* (figs.1, 2, 3 e 4).

As três populações de *Dendropsophus elianeae* apresentaram os pares 3, 10, 12, 14 e 15 metacêntricos; os pares 1, 2, 4, 5, 7, 8 e 11 submetacêntricos e os pares 6, 9 e 13 telocêntricos (figs.1A, 4A e tabela 1). A NOR foi detectada no telômero do braço curto da par 11 pelo método Ag-NOR em todos os espécimes desta espécie (figs.1A e 4A). *Dendropsophus rubicundulus* apresentou os pares 3, 8, 9, 10, 11, 13, 14 e 15 metacêntricos, os pares 1, 2, 4, 5 e 7 submetacêntricos e ao pares 6 e 12 telocêntricos (figs. 2A, 4B e tabela 1). A NOR foi localizada no telômero do braço curto do par 5 (fig. 2A e 4B). Em *Dendropsophus minutus* os pares 3, 12, 13, 14 e 15 são metacêntricos e os pares 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 são submetacêntricos (figs.

3A, 4C e tabela 1). Nas duas populações, a NOR foi localizada entre o centrômero e o telômero no braço longo do par 9 (fig. 3A e 4C).

O método de bandamento C permitiu identificar uma pequena quantidade de heterocromatina somente na região centromérica de todos os cromossomos de todos os indivíduos das três espécies (figs. 1B, 2B, 3B e 4A-C). Em quatro indivíduos de *D. rubicundulus* foi observado também um bloco de heterocromatina entre o centrômero e o telômero do par 12 (fig. 2B).

DISCUSSÃO

As diferenças marcantes na morfologia cromossômica *D. elianeae* (de SP) e *D. rubicundulus* (de MG) devido principalmente a presença de três pares de cromossomos telocêntricos na primeira e apenas dois pares na segunda e a localização da NOR nos pares 11 (submetacêntrico) em *D. elianeae* e 5 (submetacêntrico) em *D. rubicundulus*, corroboram a classificação feita por Napoli & Caramaschi (1999).

A banda C intersticial encontrada no par 12 nos quatro indivíduos de *D. rubicundulus* parece ser apenas uma variação intra-especifica. O padrão de heterocromatina não foi um bom marcador para diferenciar essas espécies já que ambas apresentaram pequena quantidade, localizada somente na região centromérica. Em contraste, a NOR e o número de telocêntricos as diferenciam claramente (tabela 2). Essas características dos cariótipos têm se mostrado muito úteis para diferenciar as espécies de *Dendropsophus* de 30 cromossomos, as quais são morfologicamente muito parecidas ou crípticas, como ocorreu também com *D. nanus* e *D. sanborni* (Medeiros *et al.*, 2003).

Os cariótipos dos indivíduos de D. elianeae do presente trabalho, provenientes de duas populações do Estado de São Paulo (Nova Itapirema e Botucatu) e do Estado de Mato Grosso do Sul (Bodoquena), apresentaram cariótipo semelhante ao da população do município de Rio Claro, analisado por Gruber (2005) em relação à morfologia dos cromossomos e número de telocêntricos. Porém, além dos três telocêntricos ocuparem posições diferentes no cariograma, essa autora também descreveu a localização da NOR em um cromossomo telocêntrico enquanto nos indivíduos analisados no presente trabalho a NOR foi localizada em um par submetacêntrico. Essa variação interpopulacional de NOR em D. elianeae poderia ser explicada por translocação do segmento da NOR, que alteraria o tamanho relativo dos cromossomos envolvidos no rearranjo e conseqüentemente o posicionamento dos mesmos no cariograma. Variação desse tipo foi encontrada em D. ebraccata da Costa Rica em que a população de Quepos apresentava a NOR no braço longo do par 13 submetacêntrico, enquanto na população do Vale de Talamanco, foi localizada no cromossomo 10 telocêntrico (Kaiser et al., 1996). Pode-se especular se essa variação cromossômica, encontrada para essas populações geograficamente distintas de D. elianeae, à semelhança do que foi proposto por Kaiser et al. (1996) para D. ebraccata, seria indicativa de um processo de especiação incipiente. Uma análise morfológica, comportamental e de habitat dessas populações seria necessária para se obter informações adicionais sobre a diferenciação dessas populações citogeneticamente variáveis para confirmar essa hipótese.

O cariótipo de *D. rubicundulus* foi anteriormente descrito por Rabello (1970), porém, a procedência dos espécimes não foi indicada no trabalho. O cariótipo analisado por Rabello (1970) por coloração convencional apresentou quatro pares de cromossomos "acrocêntricos" (=telocêntricos) enquanto *D. rubicundulus* do presente estudo apresentou apenas dois pares, o que sugere um provável erro de identificação. Há outras espécies no grupo de *Dendropsophus* de
30 cromossomos já estudadas que apresentam quatro cromossomos telocêntricos em seu cariótipo, mas não foi possível associar o cariótipo obtido por Rabello com nenhum dos cariótipos já descritos. O desconhecimento do local de coleta dificulta ainda mais essa comparação.

Outra espécie estudada neste trabalho foi D. minutus, proveniente de duas localidades, Vitória Brasil (SP) e Serra da Bodoquena (MS). Os espécimes das duas populações apresentaram morfologia cromossômica semelhante ao descrito por Rabello (1970), Bogart (1973) (ambas de localidades desconhecidas) e Gruber (2002) (de Rio Claro e Ubatuba, SP). Comparando a localização da NOR nas populações do presente trabalho (intersticial no braço longo do par 9) com aquelas analisadas por Gruber (2002) (intersticial no par 12), há aparentemente uma grande semelhança; é provável que os cromossomos sejam os mesmos, porém, ordenados em posições diferentes nos cariótipos. Quanto ao bandamento C, à semelhanças das demais espécies de Dendropsophus de 30 cromossomos, D. minutus também apresentou pouca heterocromatina localizada apenas na região centromérica. Os cariótipos das Dendropsophus de 30 cromossomos variam principalmente pelo número de cromossomos telocêntricos, sendo encontrados até cinco, como em D. sanborni (Medeiros et al., 2003, Gruber, 2002), D. nahdereri (Gruber, 2002), D. labialis (Bogart, 1973) e D. jimi (Medeiros et al., em preparação) (tabela 2) ou nenhum como em D. minutus (Bogart, 1973), D. microcephalus (Anderson, 1991; Kaiser et al., 1996) e D. leali (Bogart & Bogart 1971; Bogart, 1973).

Outra característica marcante que diferencia essas espécies é a localização da NOR que pode ser detectada nos cromossomos telocêntricos ou nos meta/submetacêntricos, tanto nos maiores, como em *D. nahdereri* (Gruber, 2002) e *D. rubicundulus* (presente trabalho), quanto nos cromossomos menores, como ocorre com a maioria das espécies de *Dendropsophus* de 30

cromossomos (tabela 2) (Kaiser et al., 1996; Medeiros et al., 2003; Gruber, 2002). Dendropsophus rubicundulus, D. elianeae (presente trabalho) e D. jimi (Medeiros et al., em preparação), pertencentes ao clado de D. rubicundulus (Napoli & Caramaschi, 1999, 2000), diferem marcadamente por apresentarem, respectivamente, dois, três e cinco telocêntricos e a NOR em cromossomos distintos. No entanto, D. jimi (Medeiros et al., em preparação) apresenta cariótipo idêntico ao de D. sanborni (Medeiros et al., 2003) a qual estava incluída em outro grupo, o de D. microcephalus. O agrupamento proposto por Faivovich et al. (2005) na filogenia de Hylinae derivada de estudos de seqüências de DNA e morfologia externa, é mais condizente com os resultados obtidos pela análise citogenética, uma vez que incluiu no grupo de D. microcephalus as espécies Dendropsophus nanus, D. sanborni, D. walfordi, D. bipunctatus e D. rhodopeplus (grupo D. microcephalus), D. berthalutzae (grupo decipiens) e D. rubicundulus (clado rubicundulus). Portanto, D. jimi e D. elianeae citogeneticamente ficariam no grupo de D. microcephalus.

Essas espécies apresentam em comum o número de cromossomos e morfologia conservada dos pares maiores. A análise desses cariótipos sugere que na diversificação dessas espécies pode ter predominado rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica e translocação, que levaram a mudanças na morfologia e tamanho dos cromossomos e à dispersão da NOR dentro do genoma, sem alterar o número de cromossomos (todas 2n=30). Verifica-se também pequena quantidade de heterocromatina, em geral restrita à região centromérica. As características de aumento de conteúdo de heterocromatina e sua distribuição no genoma já foram inúmeras vezes relacionadas com eventos de evolução cromossômica de anfíbios anuros. Em especial, o aumento de heterocromatina parece caracterizar cariótipos mais derivados em anuros, conforme proposto por Schmid *et al.*(1978a).

Segundo Borgart (1973), as espécies de *Dendropsophus* de 30 cromossomos parecem formar agrupamentos conforme o número de cromossomos considerados telocêntricos. No entanto, à medida que outras espécies do grupo são analisadas citogeneticamente, essa regra parece não se confirmar. Os cariótipos das espécies deste grupo têm, no entanto, algumas características em comum. Por exemplo, os pares cromossômicos 1, 2, 3 e 4 são sempre meta ou submetacêntricos (Rabello, 1970; Bogart, 1973; Medeiros *et al.*, 2003). Com exceção de *Dendropsophus minutus*, *D. leali* e *D. microcephalus*, as espécies analisadas até o momento também apresentam um ou dois cromossomos telocêntricos grandes e a partir do sexto par sempre são encontrados os três tipos de morfologia cromossômica.

Skuk & Langone (1992) consideraram que os pares telocêntricos que aparecem nas quatro espécies por eles estudadas (*Dendropsophus nanus*, *D. sanborni*, *D. baileyi* e *D. berthalutzae*) poderiam caracterizar a condição ancestral. Assim, a ausência destes cromossomos indicaria uma condição derivada. No entanto, na filogenia de Faivovich *et al.* (2005), *D. microcephalus* (nenhum telocêntrico) está no clado das espécies com um (*D. rhodoplepus* e *D. bipunctatus*), dois (*D. rubicundulus*), quatro (*D. nanus*) e cinco (*D. sanborni*) telocêntricos, tendo ainda *D. marmorata* (com cinco) (Bogart, 1973) como a espécie mais basal e *D. minutus* (com nenhum telocêntrico) como espécie mais basal em relação a *D. microcephalus*. Por outro lado, na filogenia de Faivovich *et al.* (2005), *Dendropsophus* forma um grupo monofilético proximamente relacionado aos gêneros *Pseudis* e *Lysapsus* (Hylinae). Todas as espécies desses dois gêneros apresentaram 2n=24 (Busin *et al.*, 2001; Busin *et al.* – em preparação), com exceção de uma única espécie, *P. cardosoi*, que apresentou 2n=28 cromossomos com quatro pares de telocêntricos (Busin *et al.*, 2001). Um estudo filogenético incluindo essa espécie poderia ser bastante esclarecedor.

Verifica-se que as espécies de Hylinae com 2n=30 cromossomos são cariotipicamente mais diversificadas do que as com 2n=24, em relação à morfologia dos cromossomos, sendo que o número fundamental (NF) das espécies de *Dendropsophus* varia de 50 a 60 (ver Bogart, 1973; Anderson *et al.*, 1991; Kaiser *et al.*, 1996; Gruber *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2003). Segundo King *et al.* (1990), esta diversidade no número fundamental das espécies de 30 cromossomos é devido a uma considerável quantidade de rearranjos cromossômicos, principalmente do tipo inversão pericêntrica. Apesar dessa diferença cariotípica, as espécies de *Dendropsophus* são pequenas e de coloração muito semelhante, o que dificulta a identificação (Bogart, 1973). O estudo cromossômico, juntamente com dados morfológicos, osteológicos e moleculares confirma que o grupo com 30 cromossomos é monofilético.

Referências bibliográficas

- Anderson, K (1991). Chromosome evolution in holarctic *Hyla* treefrogs. In: Green, DM & Sessions, SK (ed). Amphibian Cytogenetics and Evolution. San Diego: Academic Press, p. 299-328.
- Bogart, JP & Bogart, E (1971). Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. **Herpetologica** 27: 229-235.
- Bogart, JP (1973). Evolution of anuran karyotypes. In: VIAL, J.L. eds. Evolutionary biology of anurans. Univ. Missouri Press, pp. 337-49.
- Busin, C, Vinciprova, G & Recco-Pimentel, SM (2001). Chromosomal rearrangements as the source of variation in the amount of chromosomes in *Pseudis* (Amphbia, Anura). Genetica 110: 131-141.
- Cardoso, AJ & Vielliard, JME (1985). Caracterização bio-acústica da população topotípica de *Hyla rubicundula* (Amphibia, Anura). **Rev. Bras. Biol.** 2 (7); 423-426.
- Faivovich, J, Haddad, CFB, Garcia, PCA, Frost, DR, Campbell, JA & Wheeler, WC (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae:

phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Museum Nat. Hist., 294: 1-240.

- Frost DR (2004) Amphibian species of the world: an online reference. Version 3.0 (22 August 2004) Eletronic Database accessible at <u>http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html</u>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Green DM & Sessions SK (1991) Supernumerary chromosomes in Amphibian, pp.333-357 in Amphibian Cytogenetics and Evolution, Academic Press, San Diego.
- Gruber, SL, Haddad, CFB & Kasahara, S (2005) Evaluating the karyotypic diversity in species of Hyla (Anura; Hylidae) with 2n=30 chromosomes based on the analysis of ten species. Folia Biologica 51: 68-75.
- Howell WM & Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015.
- Kaiser, H, Mais C, Bolaños & Steinlein, C (1996) Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. Genetica, 98: 95-102. 1996.
- King M (1980). C-banding studies in Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** 80:191-207.
- King, M, Contreras, N & Honeycutt, RL (1990). Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. Genetica (80):17-29.
- Lutz, B (1973). Brazilian species of Hyla. University of Texas Press. Austin. xviii + 26
- Medeiros, LR, Rossa-Feres DC & Recco-Pimentel, SM (2003). Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. Journal of Heredity 94: 149-154.
- Napoli, MF & Caramaschi, U (1999). Geographic variation of *Hyla rubicundula* and *Hyla anataliasiasi* with the description of a new species (Anura, Hylidae). Alytes 16 (3-4): 165-189.
- Napoli, MF & Caramaschi, U (2000). Description and variation of a new Brazilian species of *Hyla rubicundula* group (Anura, Hylidae). **Alytes** 17 (3-4): 165-184.

- Rabello, MN (1970). Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, 23 (1): 45-59.
- Schmid, M (1978). Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66: 361-388.
- Schmid M Orlet J & Klett C (1979) Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. Chromosoma 71:29-55.
- Skuk, G & Langone, JA (1992). Los cromosomas de cuatro especies del Género *Hyla* (Anura: Hylidae) com número diploide de 2n=30. Acta Zool. Lilloana (41): 165-171.

Legendas

Figura 1: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Dendropsophus elianeae* corados com Giemsa e submetidos ao método Ag-NOR (A), Cariótipo de *D. elianeae* submetido ao método de banda C (B). (Barra= 5µm).

Figura 2: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Dendropsophus rubicundulus* corados com Giemsa e submetidos ao método Ag-NOR (A), Cariótipo de *D. rubicundulus* submetido ao método de banda C (B). (Barra= 5µm).

Figura 3: Cromossomos metafásicos de células intestinais de *Dendropsophus minutus* corados com Giemsa e submetidos ao método Ag-NOR (A), Cariótipo de *D. minutus* submetido ao método de banda C (B). (Barra= 5µm).

Figura 4: Ideograma representativo dos cariótipos de *Dendropsophus elianeae* (A), *D. rubicundulus* (B) e *D. minutus* (C). As áreas pretas indicam regiões de heterocromatina, os círculos cinza indicam a NOR.



Figura 1



Figura 2



Figura 3











A.

Tabela 1: Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Dendropsophus rubicundulus* de Uberlândia (MG), *D. elianeae* de Nova Itapirema (SP) e *D. minutus* da Serra da Bodoquena (MS). Classificação segundo Green & Sessions (1991).

	Dendropsophus rubicundulus		ndulus	(n=14)	4) D. elianeae		(n=18)		D. minutus (n=16))	
CR	T.R.(%)	R.B	I.C.	P.C.	T.R.(%)	R.B.	I.C.	PC	T.R.(%)	R.B	I.C.	P.C.
1	11,97	3,26	0,25	SM	10,23	3	0,25	SM	11,85	2,75	0,26	SM
2	10,28	2,23	0,31	SM	10.58	2,8	0,26	SM	10,27	3,33	0,25	SM
3	9,35	1,09	0,5	М	9,81	1,21	0,45	Μ	9,09	1	0,47	Μ
4	8,35	1,96	0,33	SM	8,19	2,84	0,26	SM	8,30	3,2	0,25	SM
5	7,79	2,19	0,31	SM	7,84	3,11	0,25	SM	7,50	2,16	0,31	SM
6	7,04	_	_	Т	7,76	_	_	Т	7,45	2,16	0,31	SM
7	7,23	1,85	0,35	SM	7,44	2,88	0,25	SM	7,11	2,60	0,27	SM
8	6,47	1,46	0,40	М	6,58	1,81	0,35	SM	6,31	1,60	0,37	SM
9	6,10	1,40	0,41	М	6,15	_	_	Т	5,92	1,50	0,35	SM
10	5,35	1,37	0,42	М	5,97	1,33	0,42	Μ	5,53	2,50	0,28	SM
11	4,69	1,38	0,42	М	4,87	1,85	0,34	SM	4,90	1,8	0,35	SM
12	4,88	_	_	Т	4,44	1,08	0,48	Μ	4,73	1,4	0,41	Μ
13	4,13	1,09	0,47	М	4,26	_	_	Т	4,34	1,75	0,37	Μ
14	3,66	1,16	0,46	М	3,15	1,15	0,47	Μ	3,55	1,25	0,44	Μ
15	3,09	1,2	0,45	М	2,73	1,16	0,46	Μ	3,16	1	0,5	Μ

CR=cromossomo, R.B.= Razão de braços, T.R.= Tamanho relativo, I.C.= Índice Centromérico, P.C.= Posição do centrômero; M.= Metacêntrico, S.M.= Submetacêntrico, T=Telocêntrico, n.= Número de metáfases medidas.

Espécie	Local	no. indivivduos analisados	Númer o de cromos	NF	telocêntricos	metacêntricos	Submetacêntricos	Banda C	NOR	OBS.
D. nanus ¹	Botucatu (SP)	15 (1♀)	2n=30	52	6,12,14 e 15	3,8,9,10,11 e 13	1,2,4,5 e 7	centromérica	Telômero do braço longo do par 13	9 espécimes 2n=31 e um 2n=31,32 e 33
D. nanus ^{I}	Telêmaco Borba (PR)	10♂	2n=30	52	6,12,14 e 15	3,8,9,10,11 e 13	1,2,4,5 e 7	Centromérica+ um peq. bloco no par 3	Telômero do braço longo do par 13	
D. nanus ^{1}	Bacabal (MA)	22(15♂ e 7♀)	2n=30	52	6,12,14 e 15	3,8,9,10,11 e 13	1,2,4,5 e 7	Centromérica	Telômero do braço longo do par 13	
D. nanus ^{I}	Bodoquena (MS)	13(1♀)	2n=30	52 a ♀ 51	6,12,14 e 15	3,8,9,10,11 e 13	1,2,4,5 e 7	centromérica	Telômero do braço longo do par 13	Em um espécime um dos homólogos do par 6 era submetacêntrico
D. walfordi ¹	Rondônia	16♂	2n=30	52	6,12,14 e 15	3,8,9,10,11 e 13	1,2,4,5 e 7	centromérica	Telômero do braço longo do par 13	= Dendropsophus nanus
D. sanborni ¹	Botucatu (SP)	22 (20♂ e 2♀)	2n=30	50	5,7,12,13 e 15	2,8,9,10,11 e 14	1,3,4 e 6	centromérica	Entre o telômero e o centrômero do par12	Localização da NOR ≠ de ∆s de Nova Itapirema
D. sanborni ¹	Torres (RS)	8 (4♂ e 4♀)	2n=30	50	5,7,12,13 e 15	2,8,9,10,11 e 14	1,3,4 e 6	centromérica	Entre o telômero e o centrômero do par12	Localização da NOR = Botucatu e ≠ de ∆s de Nova Itapirema
D. jimi ⁷	Uberlândia (MG)	16♂	2n=30	50	5,6,11,13 e 14	3,8,9,10,12 e 15	1,2,4 e 7	centromérica	no telômero do par 13	Quase idêntico (posição crom.) a D. <i>sanborni</i> de N. Itapirema
D. elianeae ²	Bodoquena (MS)	6 (4 ♂e 2♀)	2n=30	54	6,9 e 13	3,10,12,14 e 15	1,2,4,5,7,8 e 11	centromérica	Telômero do braço curto do par 11	=
D. elianeae ²	Botucatu (SP)	5 👌	2n=30	54	6,9 e 13	3,10,12,14 e 15	1,2,4,5,7,8 e 11	centromérica	Telômero do braço curto do par 11	=
D. elianeae ²	Nova Itapirema (SP)	3 👌	2n=30	54	6,9 e 13	3,10,12,14 e 15	1,2,4,5,7,8 e 11	centromérica	Telômero do braço curto do par 11	=
D. rubicundulus ²	Uberlândia (MG)	11♂	2n=30	56	6 e 13	3,8,9,10,11,12, 14 e 15	1,2,4,5 e 7	Centromérica em 4 ∆s um peq. bloco inersticial no par12	telômero do braço curto do par 5	
D. minutus ²	Vitória Brasil (SP)	6 ී	2n=30	60	-	3,12,13,14 e 15	1,2,4,5,6,7,8,9,10 e 11	centromérica	Entre o centrômero e o telômero do braço longo do par 9	=
D. minutus ²	Bodoquena (MS)	53	2n=30	60	_	3,12,13,14 e 15	1,2,4,5,6,7,8,9,10 e 11	centromérica	Entre o centrômero e o telômero do braço longo do par 9	=

Tabela 2: Dados cromossômicos das espécies de Dendropsophus.

(1) Medeiros et al., em preparação; (2) Presente artigo

4. ARTIGO III

Obs.: Os dados citogenéticos referente à espécie *Dendropsophus nanus* da população de Nova Itapirema, SP, fizeram parte da tese de mestrado de Medeiros, 2000. A população de Botucatu, SP, foi analisada durante o doutorado.

B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae)

Lilian R. Medeiros¹, Denise C. Rossa-Feres², Jorge Jim³ and Shirlei M. Recco-Pimentel^{1*}

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13086-863 Campinas, São Paulo, Brazil; ²Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; ³Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-000 Botucatu, São Paulo, Brazil.

Running title: B-chromosomes in Dendropsophus nanus

Key words: Anura, B-chromosome, cytogenetics, *Dendropsophus*, supernumerary chromosome.

*Author for correspondence (Phone: +55-19-3788-6128; Fax: +55-19-3788-6111; Email: shirlei@unicamp.br)

Abstract

This report describes the presence of B-chromosomes in two populations of *Dendropsophus nanus* (= *Hyla nana* Boulenger, 1889) from São Paulo State, Brazil. These chromosomes were observed in 9.3% (4 out of 43 specimens) and 60% (9 out of 15 specimens) of specimens from the municipalities of Nova Aliança and Botucatu, respectively. The karyotype of 2n = 30+1B found in *D. nanus* was similar to that of other species with 2n=30 chromosomes, except for the presence of an additional small telocentric chromosome. In one specimen from Botucatu, cells with one to three extra chromosomes were observed. These B-chromosomes appear as univalent in meiosis I and did not bear a nucleolar organizer region (NOR) or exhibit constitutive heterochromatin.

Introduction

B-Chromosomes are extra genomic elements that occur in animals and plants and are generally considered dispensable for normal development since they have no apparent functions (Jones and Rees, 1982). According to Beukeboom (1994), B chromosomes occur in approximately 15% of living species. These chromosomes have been described for 26 species of salamanders and frogs (Green, 2004). Individuals with these chromosomes are usually phenotypically indistinguishable from those without them (Clark and Wall, 1996). B-chromosomes bear no similarity to the autosomes, are

inherited in a non-Mendelian pattern, and occur as univalents in meiosis (Jones and Rees, 1982; Green, 1991, 2004).

The number of B-chromosomes can vary among populations of the same species, among individuals of the same population and among cells of the same individual. In the latter case, this variation results from a delay in anaphase, with subsequent elimination of the B-chromosomes from some cells or tissues, or is caused by non-mitotic disjunction in which both sister chromatids migrate to the same pole (Guerra, 1988; Clark and Wall, 1996).

Among vertebrates, one of the largest variations in the number of B-chromosomes has been described for *Leiopelma hochstetteri*, a frog endemic to New Zealand, in which individuals with up to 16 of these chromosomes have been observed (Green, 1988). This variation has been attributed to non-meiotic disjunction resulting from instability during cell division.

In Anura, B-chromosomes have been described in only 10 species from six families: Hylidae (*Acris crepitans, Hypsiboas* sp. aff. *circundata*) (Nur and Nevo, 1969; Baldissera *et al.*, 1993), Leiopelmatidae (*Leiopelma hochstetteri*) (Green *et al.*, 1987, 1993; Green, 1988, 2004; Sharbel *et al.*, 1998), Discoglossidae (*Discoglossus pictus*) (Schmid *et al.*, 1987), Pelobatidae (*Scaphiopus hammondi*) (Green, 1991), Ranidae (*Amolops liangshanensis, Rana everetti, R. temporaria*) (Ullerich, 1967; Schmid, 1978; Wu and Zhao, 1985; Kuramoto, 1989; Belcheva and Sofianidou, 1990) and Leptodactylidae (*Megaelosia massarti, Gastrotheca espeletia*) (Rosa *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2002). Anuran B-chromosomes vary in size, in the amount of heterochromatin and repeated DNA sequences, and in number. Most B-chromosomes in anurans are derived from the A set of chromosomes in the corresponding species and have apparently undergone cumulative evolutionary changes since their formation (Green, 2004).

In this report, we describe one more case of B-chromosomes in anurans involving specimens of *Dendropsophus nanus* (= *Hyla nana* Boulenger, 1889) from two populations collected at different localities in southeastern Brazil.

Materials and methods

Forty-three specimens (40 males and 3 females) of *D. nanus* were collected at Nova Aliança (22°11'S, 49°42'W), in São Paulo State (SP), Brazil, from February to May 1998 and from October 1998 to May 1999, and 15 specimens (all males) were collected at Botucatu (22°53'S, 48°26'W), SP, Brazil, in November 2000.

The specimens were identified according to Rossa-Feres (1997) and Rossa-Feres and Jim (2001), and were deposited in the Museu de História Natural "Prof. Adão José Cardoso" (ZUEC), Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil and in the Departamento de Zoologia (DSJRP), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil, under the accession numbers ZUEC 11405 to 11412, 11416 to 11418, 11647 to 11677, 12242 to 12272 and DZSJRP 1111. The frogs were collected with a permit issued by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA – Proc. 02001.008876/01-83).

Chromosomal preparations were obtained from intestinal or testicular cell suspensions, as described by Schmid (1978) and Schmid *et al.*, (1979). The slides were stained with 10% Giemsa solution and prepared for C-banding (King, 1980), Ag-NOR

staining (Howell and Black, 1980) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rDNA probes (Viegas-Péquignot, 1992). The probe for FISH consisted of a recombinant plasmid HM123 containing a fragment of *Xenopus laevis* rDNA (Meunier-Rotival *et al.*, 1979), which was biotin-labelled by a nick translation reaction using a GIBCO protocol. The chromosomal preparations were analyzed using an Olympus BX60 photomicroscope. The chromosomal nomenclature relative to the position of the centromere followed that of Green and Sessions (1991).

Results

The karyotype of 39 specimens of *D. nanus* from Nova Aliança and five specimens from Botucatu showed 2n = 30 chromosomes (Figure 1A), as previously described for a population from Nova Aliança (Medeiros *et al.*, 2003). However, in four males from Nova Aliança (ZUEC 11673, 11651, 11652 and DZSJRP 1111) and nine males from Botucatu (ZUEC 12242, 12245, 12246, 12247, 12249, 12251, 12254, 12256 and 12261), the karyotype was 2n = 31 chromosomes (Table 1). This karyotype differed from that of 2n=30 by the presence of an extra small telocentric chromosome (Figure 1B). In one specimen from Botucatu, we observed cells with 2n = 30+1B, 30+2B or 30+3B chromosomes (Figure 1B-D, Table 1). These additional chromosomes were all of the same size and morphology.

The small extra chromosome was observed in metaphases from meiosis that had 15 bivalents and one, two or three small univalents (Figure 2A-C). Hence, the B-chromosomes were not associated with the A chromosomes. Individuals with 2n = 30 chromosomes had 15 bivalents, and no univalents in meiosis I.

The two populations of *D. nanus* shared a common C-banding pattern characterized by small amounts of heterochromatin in the pericentromeric region of all chromosomes (Figure 1E), except for the extra chromosomes (Figure 1F-H). In the metaphases of four specimens with 2n = 30+1B chromosomes from Nova Aliança, and in all specimens from Botucatu with 2n = 30+1B and in that one with 2n=30+1-3B, the small extra chromosomes showed no signs of an NOR. This region was detected on chromosome pair 13 in all specimens analyzed after Ag-NOR staining and FISH techniques (Figures 1I and 3A, B).

Discussion

The extra chromosomes found in specimens of *D. nanus* with 2n=31, and in the specimen from Botucatu that had cells with 2n=31 to 2n=33 chromosomes, can be considered as B-chromosomes since they showed some of the characteristics usually attributed to these chromosomes. Previous descriptions of the karyotype of *D. nanus* for other populations (Rabello, 1970; Bogart, 1973; Skuk and Langone, 1992) did not mention the presence of any B-chromosomes. This small extra element, which differs morphologically from autosomes, always occurs as a univalent in cells in metaphase I (reviewed in Jones and Rees, 1982).

B-Chromosomes contain few genes with important effects, although some of these chromosomes may carry functional genes (Green, 1990). The influence that these chromosomes exert is usually determined by the number of these chromosomes present in the cell, although this has not yet been documented for amphibians (Green, 1991). In some cases, the effect can be a decrease in fertility (Hewitt *et al.*, 1987) and abnormal

meiosis (Parker *et al.*, 1981). Several studies have shown that some genes on Bchromosomes are expressed (Green, 1990; Jones, 1995; Covert, 1998; Camacho, 2000; Green, 2004). An interesting case of B-chromosomes in amphibians involves *Leiopelma hochstetteri* (Anura), which may have up to 16 extra chromosomes. In this species, the B-chromosomes in the lampbrush state have small lateral loops indicating transcriptional activity, although this is lower than that of autosomes (Green *et al.*, 1987; Green, 1988). In this species, B-chromosomes are most probably derived from the sex chromosome (Green, 2004). This conclusion is supported by the homology between the DNA sequences of the B-chromosomes and the univalent W chromosome that indicates derivation from the latter (Sharbel *et al.*, 1998).

The B chromosomes of *D. nanus* contained no active NOR, as shown by silver staining and FISH. The presence of ribosomal genes in B-chromosomes is rare and has been detected in the Anura only in *Scaphiopus hammondi* (Green, 1988) and *Gastrotheca espeletia* (Schmid *et al.*, 2002). In the former species, the NOR contributes to the number of nucleoli in the cell, indicating that B-chromosomes can carry functional genes of great importance (Green, 1991). Belcheva and Sofianidou (1990) described B-chromosomes in *Rana temporaria* and argued that the maintenance of B-chromosomes in this population indicated that they conferred some advantage to transcriptional activity or to the genetic variability of the species.

Various mechanisms have been proposed to explain the origin and conservation of B-chromosomes. Traditionally, these chromosomes are believed to be derived from autosomes (Jones and Rees 1982). Since there is no pairing or quiasmata between B-chromosomes and sections of A chromosomes in meiosis, it is probable that the initial

homology among these two groups must have been quickly lost. Modifications in the structure and in the pairing behavior during meiosis thus prevent association with the ancestral A chromosomes (Camacho *et al.*, 2000).

Heterochromatization is a common process that occurs during the differentiation of these extra chromosomes since many are completely heterochromatic in numerous species (Venere *et al.*, 1999). Although the heterochromatic condition of B chromosomes is not a general pattern, these chromosomes may have originated from centromeric fragments, but this hypothesis has received little support (Green *et al.*, 1987; Camacho *et al.*, 2000). This process of B-chromosome differentiation is not applicable to *D. nanus* since these chromosomes showed no heterochromatic band. Hence, their isolation from the A chromosomes must have involved other mechanisms.

Another possibility to explain the origin of B-chromosomes is that they may be derived from the A chromosomes of other closely related species through interspecific hybridization, as suggested for hybrid species of the fish *Poecilia formosa* (Schartl *et al.*, 1995) and the wasp *Nasonia* (McAllister and Werren, 1997). *Dendropsophus sanborni* Schmidt, 1944 is morphologically (Cei, 1980; Langone, 1994) and ecologically (Cei, 1980; Rossa-Ferres, 1997) very similar to *D. nanus*, and both belong to the same intrageneric group (Frost, 2004). Considering their great similarity and syntopic occurrence at several localities (Langone and Basso, 1987), we cannot discard the hypothesis of interspecific hybridization as the origin of karyotypes with B-chromosomes in *D. nana*.

Acknowledgments

The authors thank Marcelo Menin and Silvio César de Almeida for help with the field work, Klélia A. Carvalho for technical assistance and Dr. Luciana B. Lourenço for assistance in some of the FISH experiments. This work was supported by the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc. 00/11031-4) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Baldissera Jr FA, Oliveira PSL, and Kasahara S (1993) Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. Rev. Bras. Genet. 16:335-345.
- Belcheva RG and Sofianidou TS (1990) Karyological investigation of the brown frogs species (Anura, Ranidae) from Bulgaria and Greece. In: Cytogenetics of Amphibians and Reptiles, Birkhauser-Verlag, Basel, pp.141-146
- Beukeboom LW (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B chromosome conference. Heredity 73:328-336.
- Bogart JP (1973) Evolution of anuran karyotypes, in VIAL, J.L. eds. Evolutionary biology of anurans. University of Missouri Press. pp.337-349.
- Camacho JPM, Sharbel TF and Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 335:163-178.

- Cei JM (1980) Amphibians of Argentina. Monitore Zoologico Italiano, (N.S.). Monografia 2:1-609.
- Clark MS and Wall WJ (1996). Chromosome form and function. In: Chromosomes: the complex code. Ed. Chapman and Hall, London. pp.61-65.
- Covert SF (1998) Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. Curr. Genet. 33:311-319.
- Frost DR (2004) Amphibian species of the world: an online reference. Version 3.0 (22 August 2004) Eletronic Database accessible at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Green DM (1988) Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochsteteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. Chromosoma 97:55-70.
- Green DM (1990) Miller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. Genome 33:818-824.
- Green DM (1991) Supernumerary chromosomes in amphibians, in Green DM: and Sessions SK (eds). In Amphibian Cytogenetics and Evolution, Academic Press, San Diego. pp.333-358.
- Green DM (2004) Structure and evolution of B chromosomes in amphibians. Cytogenet. Genome Res. 106:235-242.
- Green DM, Kezer J and Nussbaum RA (1987) Supernumerary chromosome variation and heterochromatin distribution in the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. Chromosoma 95:339-344.

- Green DM, Zeyl CW and Sharbel, TF (1993) The evolution of hypervariable sex and supernumerary chromosomes in the relict New Zealand frog. *Leiopelma hochstetteri*. J. Evol. Biol. 6:417-441.
- Guerra MS (1988) Variação e evolução cromossômica: variação numérica, pp. 97-100 in Introdução à Citogenética Geral, ed. Guanabara, Rio de Janeiro, RJ.
- Hewitt GM, East TM and Shaw MW (1987) Sperm dysfunction produced by Bchromosomes in the grasshopper *Myrmeleo 0tettix maculatus*. Heredity 58:59-68.
- Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36:1014-1015.
- Jones RN (1995) Tansley review no. 85. B chromosomes in plants. New Phytol. 131: 411-434.
- Jones RN and Rees H (1982) B-Chromosomes. Academic Press, London.
- King M (1980) C-banding studies in Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. Chromosoma 80:191-207.
- Kuramoto M (1989) Karyologycal studies on some Philippine frogs. in Matsui M, Kikida T, Goris RC (eds): Current herpetology in East Asia, (Herpetological Society of Japan, Kyoto) pp. 115-121
- Langone JA (1994) Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biologicos). Museo Damaso Antonio Larrañaga 5:9-45.
- Langone JA and Basso NG (1987) Distribucion geografica y sinonima de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo, 164:1-17.

- McAllister BF and Werren JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Chromosoma 106:243-253.
- Medeiros LR, Rossa-Feres DC and Recco-Pimentel SM (2003) Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. J. Heredity 94:149-154.
- Meunier-Rotival M, Cortadas J and Macaya G (1979) Isolation and organization of calf ribosomal DNA. Nucleic Acids Res. 6:2109-2123.
- Nur U and Nevo E (1969) Supernumerary chromosome in the cricket frog, *Acris crepitans*. Caryologia 22:97-102.
- Parker JS, Ainsworth CC and Taylor S (1981) The B-chromosome system of *Hypochoeris maculata* II. B-effects on meiotic A-chromosome behaviour. Chromosoma 67:123-143.

Rabello MN (1970) Chromosomal studies in Brazilian anurans. Caryologia 23:45-59.

- Rosa C, Aguiar-Jr O, Giaretta AA and Recco-Pimentel SM (2003) Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in a leptodactylid frog. Copeia 2003:166-174.
- Rossa-Feres DC (1997) Ecologia de uma comunidade de anfíbios da região noroeste do Estado de São Paulo: microhabitat, sazonalidade, dieta e nicho multidimensional. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro.
- Rossa-Feres DC and Jim J (2001) Similaridade do sítio de vocalização em uma comunidade de anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Zool. 18:439-454.

- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmidt M and Parzefall J (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. Nature 373:68-61.
- Schmid M (1978) Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66:361-388.
- Schmid M, Orlet J and Klett C (1979) Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. Chromosoma 71:29-55.
- Schmid M, Vitelli L and Batistoni R (1987) Chromosome banding in Amphibia XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizer regions 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. Chromosoma 95:271-284.
- Schmid M, Zieglr CG, Steinlein C, Nanda I and Haaf T (2002) The B chromosomes of *Gastrotheca espeletia* (Anura, Hylidae). Cytogenet. Genome Res. 97:205-218.
- Sharbel, TF, Green, DM and Houben, A (1998) B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. Genome 41:14-22.
- Skuk G and Langone JA (1992) Los cromosomas de cuatro especies del género *Hyla* (Anura: Hylidae) com número diploide de 2n=30. Acta Zool. Lilloana 41:165-171.
- Ullerich FH (1967) Weitere untersuchungen über chromosomenverhältnisse und DNSgehalt bei anuren (Amphibia). Chromosoma 21:345-368.
- Venere PC, Miyazawa CS and Galetti Jr PM (1999) New cases of supernumerary chromosome in characiform fishes. Gen. Mol. Biol. 22:345-349.

- Viegas-Péquignot E (1992) In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes, in Willernson, D. ed. In situ hybridization: a practical approach. Oxford University Press-IRL Press, Oxford. pp. 137-158.
- Wu, GF & Zhao, E (1985) Preliminary studies on karyotypes of the genus Amolops of the Hengduan mountains. Acta Herpetol. Sinica 4: 276-282.

Legends

Figure 1. Karyotypes of *D. nanus* after Giemsa staining (A) and C-banding (E). One, two and three small telocentric B-chromosomes were seen in metaphases of some specimens after Giemsa staining (B-D) and C-banding (F-H). Ag-NOR-bearing chromosomes (I). Bar = 5 μ m.

Figure 2. Metaphase I of *D. nanus* with 15 bivalents and one (A), two (B) and three (C) small univalent B-chromosomes after Giemsa staining. Bar = $5 \mu m$.

Figure 3. Mitotic metaphases of *D. nanus* with one (A) and two (B) B-chromosomes (arrows) after fluorescence *in situ* hybridization. Bar = 5 μ m.



Figure 1



Figure 2



Specimens	Sex	Collection	Number of		Number of		Number
(Museum		locality	metaph	ases	metaphases with		of B
accession			analyzed		B chromosomes		chromo-
number)			Intestine	Testis	Intestine	Testis	somes
ZUEC 11651	М	Nova Aliança (SP)	19	17	11	12	1
ZUEC 11652	М	Nova Aliança (SP)	23	11	14	7	1
ZUEC 11673	М	Nova Aliança (SP)	12	8	5	6	1
DZSJRP 1111	М	Nova Aliança (SP)	14	12	8	6	1
ZUEC 12242	М	Botucatu (SP)	28	39	9	10	1
					6	9	2
					5	12	3
ZUEC 12245	М	Botucatu (SP)	24	6	18	9	1
ZUEC 12246	М	Botucatu (SP)	14	12	12	8	1
ZUEC 12247	М	Botucatu (SP)	8	5	5	3	1
ZUEC 12249	М	Botucatu (SP)	22	7	17	5	1
ZUEC 12251	М	Botucatu (SP)	12	10	8	8	1
ZUEC 12254	М	Botucatu (SP)	18	12	13	9	1
ZUEC 12256	Μ	Botucatu (SP)	28	14	23	9	1
ZUEC 12261	М	Botucatu (SP)	13	8	7	6	1

Table 1: Museum accession number, sex, location, number of metaphases analyzed and number of B chromosomes in *Dendropsophus nanus*.

ZUEC = Museu de História Natural "Professor Adão José Cardoso", Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil.

DZSJRP = Coleção do Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

5. CONCLUSÕES GERAIS

5. Conclusões gerais

- Os dados obtidos para as sete espécies do presente estudo (*Dendropsophus nanus*, *D. sanborni*, *D. minutus*, *D. rubicundulus D. elianeae*, *D. jimi* e *D. walfordi*) revelaram a presença de 2n=30 cromossomos em todas espécies.

- Os cariótipos das quatro populações de *Dendropsophus nanus* analisadas mostraram-se semelhantes ao descrito por Medeiros *et al.* (2003) para a população de Nova Itapirema (SP). Porém, na população de Botucatu foi observada a presença de um pequeno cromossomo adicional em nove indivíduos e em um espécime foram encontrados até três destes pequenos cromossomos. Esses cromossomos foram considerados como cromossomos B por possuírem algumas das características a eles atribuídas, como comportamento de univalente na meiose I. Esses cromossomos supernumerários se caracterizaram também pela ausência de genes ribossomais e de heterocromatina.

- Nas quatro populações de *D. nanus*, a NOR foi detectada também no par 13, como descrito para a de Nova Itapirema (SP) por Medeiros *et al.* (2003) e não foram detectadas marcações adicionais.

- O heteromorfismo no par 6, com um dos homólogos telocêntrico e o outro submetacêntrico (NF=51), em um espécime de *Dendropsophus nanus* proveniente da Serra da Bodoquena (MS), provavelmente ocorreu por inversão do tipo pericêntrica uma vez que mudou a morfologia mas não foi detectada alteração de tamanho total do cromossomo submetacêntrico.

- As populações de *Dendropsophus sanborni* analisadas mostraram que, morfologicamente, os cromossomos são muito semelhantes aos da população de Nova

Itapirema (SP). Porém, houve diferença na localização da NOR no par 12, pois nas populações de Botucatu e Torres, encontra-se localizado entre o centrômero e o telômero, enquanto na população de Nova Itapirema está localizada no telômero. Isto provavelmente ocorreu por inversão paracêntrica.

- O heteromorfismo de NOR observado no par 12 em um espécime de *D. sanborni* de Botucatu (SP), trata-se de uma variação interpopulacional, devido provavelmente a uma duplicação da NOR.

- Os dados citogenéticos não permitiram distinguir *D. nanus* de *D. walfordi*, assim como *Dendropsophus sanborni* de *D. jimi*, sugerindo se tratam de espécies intimamente relacionadas.

- Os resultados do presente estudo corroboram a classificação feita por Napoli & Caramaschi (1999) com relação a *D. elianeae* (de SP) e *D. rubicundulus* (de MG) devido a diferenças marcantes na morfologia cromossômica, principalmente pela presença de três pares de cromossomos telocêntricos na primeira e apenas dois pares na segunda e pela localização da NOR nos pares 11 (submetacêntrico) em *D. elianeae* e 5 (submetacêntrico) em *D. rubicundulus*.

- *Dendropsophus jimi* apresentou um cariótipo idêntico ao de *D. sanborni* e diferem de *D. rubicundulus* e *D. elianeae* pela morfologia e localização da NOR. Considerando essas características cariotípicas, *D. jimi* poderia fazer parte do mesmo grupo das demais espécies estudadas aqui, o que está de acordo também com o agrupamento proposto na filogenia de Faivovich *et al.* (2005) que inclui essas espécies no grupo de *Dendropsophus microcephalus*. Do ponto de vista citogenético, *D. jimi* também ficaria incluída nesse grupo.

- As duas populações de *D. minutus*, de Vitória Brasil (SP) e Serra da Bodoquena (MS) apresentaram morfologia cromossômica semelhante ao descrito anteriormente por outros
autores. A semelhança morfológica entre os cromossomos portadores da NOR, par 9 nas populações estudadas no presente trabalho e 12 naquelas analisadas por Gruber (2002), e a posição coincidente da NOR nesses cromossomos, sugere que os cromossomos sejam os mesmos, porém, ordenados em posições diferentes nos cariótipos.

- O padrão de distribuição de heterocromatina, com todas as espécies apresentando pequena quantidade localizada somente na região centromérica, é semelhante ao das demais espécies de *Dendropsophus* de 30 cromossomos. Exceções ocorreram apenas na população de *D. nanus* de Telêmaco Borba (PR) e em *D. rubicundulus* de Uberlândia (MG), em que alguns espécimes apresentaram um pequeno bloco de heterocromatina intersticial em um dos pares, caracterizando uma variação intrapopulacional.

- Apesar da variação no NF, a morfologia de alguns cromossomos das espécies do presente trabalho é muito semelhante. Os pares 1, 2, 3 e 4 são sempre metacêntricos ou submetacêntricos e, com exceção de *Dendropsophus minutus*, a maioria das espécies também apresenta um ou mais cromossomos telocêntricos grandes.

- O número fundamental (NF) variou de 50 a 60 entre as espécies analisadas devido às diferenças no número de cromossomos telocêntricos, sendo encontrados desde cinco pares em *D. sanborni* até nenhum par como em *D. minutus*. Esses resultados não corroboraram a hipótese de Skuk & Langone (1992) de que a presença de pares telocêntricos poderia indicar uma condição ancestral e a ausência desse tipo de cromossomos uma condição derivada, uma vez que na filogenia de Hylidae proposta por Faivovich e colaboradores (2005) essas espécies foram incluídas no grupo de *D. microcephalus*, clado derivado dentro das *Dendropsophus* de 30 cromossomos, e que este clado é composto de espécies com nenhum (*D. microcephalus*), com um (*D. rhodoplepa* e *D. bipunctata*), dois (*D. rubicundulus*),

quatro (*D. nana*) e cinco (*D. sanborni*) telocêntricos, tendo ainda *D. microcephalus* (com nenhum) como a espécie mais basal do grupo de *Dendropsophus* de 30 cromossomos.

Referências bibliográficas

- Faivovich, J, Haddad, CFB, Garcia, PCA, Frost, DR, Campbell, JA & Wheeler, WC (2005). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull. Am. Museum Nat. Hist., 294: 1-240.
- Gruber, SL (2002). Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Dendropsophus* (Anura, Hylidae) dos grupos com 2n=24 e 2n=30, com técnicas de coloração diferencial. Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, pp. 132.
- Medeiros, LR, Rossa-Feres DC & Recco-Pimentel, SM (2003). Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. Journal of Heredity 94: 149-154.
- Napoli, MF & Caramaschi, U (1999). Geographic variation of *Hyla rubicundula* and *Hyla anataliasiasi* with the description of a new species (Anura, Hylidae). Alytes 16 (3-4): 165-189.
- Skuk, G & Langone, JA (1992). Los cromosomas de cuatro especies del Género *Hyla* (Anura: Hylidae) com número diploide de 2n=30. Acta Zool. Lilloana (41): 165-171.