

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

THIAGO CELLIN DUARTE

Estudo citogenético de *Pseudopaludicola canga*, *P. mineira* e

***P. saltica* e de cinco populações de *Pseudopaludicola* sp.**

(Anura, Leiuperidae)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
THIAGO CELLIN DUARTE
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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



Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D85e	Duarte, Thiago Cellin Estudo citogenético de <i>Pseudopaludicola canga</i>, <i>P. mineira</i> e <i>P. saltica</i> e de cinco populações de <i>Pseudopaludicola</i> sp. (Anura, Leiuperidae) / Thiago Cellin Duarte. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadores: Shirlei Maria Recco-Pimentel, Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Amphibia. 2. Citogenética. 3. Cariótipos. 4. Cromossomos sexuais. 5. <i>Pseudopaludicola</i>. I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria. II. Veiga-Menoncello, Ana Cristina Prado. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
	(scs/ib)

Título em inglês: Cytogenetic study of *Pseudopaludicola canga*, *P. mineira* and *P. saltica* and five populations of *Pseudopaludicola* sp. (Anura, Leiuperidae).

Palavras-chave em inglês: Amphibia; Cytogenetics; Karyotype; Sex chromosomes; *Pseudopaludicola*.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel, Ana Paula Zampieri Silva de Pietri, Luciana Bolsoni Lourenço.

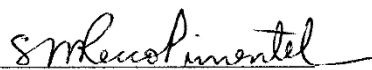
Data da defesa: 28/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

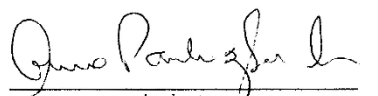
Campinas, 28 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

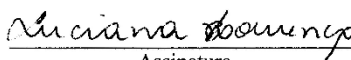
Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini


Assinatura

Profa. Dra. Carmen Sílvia Busin

Assinatura

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior

Assinatura

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

**Dedico esse trabalho a
meus queridos pais, José
Calado e Vanice.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, a quem sou infinitamente grato por tudo que me aconteceu durante esta fase tão importante da minha vida.

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel, por ter aberto as portas de seu laboratório e me aceitado no curso de mestrado mesmo sem nenhuma experiência acadêmica prévia, o que demonstrou uma grande confiança em mim, fato que me comoveu profundamente. Agradeço ainda, pela sua competente orientação e experiência de vida.

À Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello, minha co-orientadora, pela paciência, amizade e compreensão durante os momentos mais sinuosos dessa minha caminhada. Agradeço-a também pela sua competente orientação principalmente na parte experimental da minha tese.

Ao Prof. Dr. Itamar Alves Martins, da Universidade de Taubaté (UNITAU), meu mestre na graduação, pelo incentivo e exemplo profissional, que confiou em mim desde a primeira instância, e tornou meu desejo de cursar este curso de mestrado em realidade.

À Fundação de Desenvolvimento da Educação do Estado de São Paulo (FUNDESP), pelo auxílio financeiro, indispensável à realização desse trabalho.

Às Profes. Dres. Odair Aguiar Junior, Luciana Bolsoni Lourenço e Ana Paula Zampieri Silva de Pietri, pela leitura prévia desse trabalho.

Aos docentes do Departamento de Biologia Celular, pela contribuição que deram no âmbito profissional. Em especial à Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, pela sua humildade e acessibilidade a eventuais questionamentos e discussões.

À Beth, do Museu de Historia Natural “Prof. Adão José Cardoso, pela eficiência e agilidade em catalogar os espécimes envolvidos neste estudo.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, por todo o apoio e serviço prestado. Em especial, à secretaria Liliam pela sua competência e eficiência.

Aos colegas de laboratório, Cíntia, Gabriel, Gisele, Odair, Paula, Yeda e a Klélia pelo apoio técnico e agradável convívio. Em especial, à Mônica e ao Eduardo, pela amizade, companheirismo e momentos de descontração.

Ao Sérgio Siqueira Junior, o ser humano mais altruísta que conheci, por tudo, desde o apoio técnico e emocional, até as coletas de espécimes, e principalmente, pela amizade sincera e verdadeira, que juntamente com esse título são às coisas mais valiosas que conquistei durante essa empreitada.

À “galera” da república *Caverna de Adulão*: Bruno, Carlos Perinelli, Davi, Edgar, Felipe, Gabriel, Leandro, Luciano, Luiz Fernando, Mateus e Victor pela amizade, companheirismo e inúmeros momentos de descontração.

À minha amada namorada Cleonice, pela compreensão, tolerância, carinho, amor e confiança que sempre estiveram presentes, e foram indispensáveis. Agradeço também a sua família que me acolheu com todo o carinho e sempre me incentivou.

Aos meus entes queridos, meu pai José Calado e a minha irmã Camilla, pelo incentivo, sacrifício, apoio e carinho. Em especial, à minha mãe Vanice pela enorme dedicação e confiança despendida nesta importante etapa da minha vida.

Em suma, a todos aqueles que contribuíram e colaboraram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. A ordem Anura – aspectos gerais.....	5
1.2. Citogenética em anuros.....	6
1.2.1. Região Organizadora do Nucléolo (NOR).....	8
1.2.2. Heterocromatina.....	11
1.2.3. Cromossomos sexuais em anuros.....	15
1.3. A família Leiuperidae e o gênero <i>Pseudopaludicola</i>	19
1.4. Justificativa.....	23
1.5. Objetivos.....	24
1.6. Referências.....	25
2. ARTIGO.....	41
Resumo.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	45
Resultados.....	46
Discussão.....	48
Referências.....	55
Legendas.....	64
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	72

RESUMO

O gênero *Pseudopaludicola*, atualmente pertencente à família Leiuperidae, é formado por 12 espécies amplamente distribuídas pela América do Sul, com nove delas relatadas para o Brasil. Com base em dados morfológicos, as espécies do gênero foram alocadas em dois grupos: “pusilla” e “falcipes”. Mudanças taxonômicas freqüentes foram relatadas para o gênero e análises recentes com base em dados moleculares mostraram que as relações intergenéricas de *Pseudopaludicola* também permanecem pouco esclarecidas. Devido à grande semelhança morfológica dos exemplares de *Pseudopaludicola*, há suspeita de confusões na identificação das espécies para algumas localidades e da existência de espécies novas. De modo geral, existem poucas informações citogenéticas para o gênero que, em sua maioria, se restringem à determinação do número de cromossomos e análise do cariótipo por método de coloração convencional. Considerando que a análise citogenética mais detalhada constitui uma ferramenta importante que pode contribuir para a diferenciação de espécies de *Pseudopaludicola* e para o entendimento da sistemática do gênero, no presente trabalho foram estudadas as espécies *Pseudopaludicola mineira*, *P. canga* e *P. saltica*, provenientes de suas localidades-tipo (Serra do Cipó, MG; Serra dos Carajás, PA; e Chapada dos Guimarães, MT, respectivamente), *P. saltica* de Uberlândia, MG, *Pseudopaludicola* aff. *saltica* de Rio Claro (SP), *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* de Icém (SP), e outras três amostras de *Pseudopaludicola* sp. (1, 2 e 3) provenientes, respectivamente, de Andaraí (BA), Barreirinhas (MA) e Uberlândia (MG). As metáfases foram obtidas de suspensões de células de epitélio intestinal e de testículo, e coradas com Giemsa ou submetidas às técnicas impregnação por prata (Ag-NOR) para detecção de região organizadora de nucléolo (NOR) e de bandamento C, para a localização de heterocromatina. As espécies estudadas dividem-se em dois grupos quanto ao número de cromossomos, $2n=18$ e $2n=22$. As espécies *P. mineira*, *Pseudopaludicola* sp.1, *P. saltica* e *Pseudopaludicola* aff. *saltica* apresentam $2n=22$ cromossomos. *Pseudopaludicola mineira* diferiu de *Pseudopaludicola* sp.1 pela morfologia dos pares 7, 8 e 11, posição da NOR no par 8 e pela distribuição de blocos heterocromáticos. As duas populações de *P. saltica* e a população de *Pseudopaludicola* aff. *saltica* apresentaram cromossomos com a mesma morfologia, exceto o par 8 que em *P. saltica* caracteriza cromossomos sexuais do tipo XX/XY, sendo o X telocêntrico e o Y submetacêntrico, ambos portadores da NOR, enquanto

em *Pseudopaludicola* aff. *saltica* o par 8 é telocêntrico, heteromórfico em tamanho, e apresenta marcação da NOR e banda heterocromática apenas no cromossomo maior do par. Os cariótipos de *P. canga*, *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* apresentaram cariótipos idênticos com $2n=18$ cromossomos. Esses cariótipos diferem, no entanto, quanto à localização da NOR pericentromérica no braço curto do par 3 em *P. canga* e *Pseudopaludicola* sp.2 e telomérica no braço longo do par 9 em *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*. O padrão de bandamento C destas espécies mostrou-se bastante similar diferindo apenas pela presença de uma banda no braço longo do par 2 em *P. canga* e *Pseudopaludicola* sp.2 e ausente em *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*. Os dados citogenéticos permitiram diferenciar *Pseudopaludicola* sp.1 das demais espécies de 22 cromossomos já cariotipadas, sugerindo que possa se tratar de uma nova espécie. O sistema de determinação do sexo do tipo $XX♀/XY♂$ detectado em *P. saltica* não foi relatado anteriormente para o gênero *Pseudopaludicola*, sendo esse o primeiro caso. A hipótese de fissão seguida de perda do braço menor em um dos homólogos de um par de cromossomos submetacêntricos é sugerida para explicar a origem do cromossomo X. O heteromorfismo do par 8 observado em *Pseudopaludicola* aff. *saltica*, pode ter ocorrido por mecanismo de *crossing-over* desigual. As espécies *Pseudopaludicola canga* e *Pseudopaludicola* sp.2 não puderam ser citogeneticamente diferenciadas, no entanto, não descartamos a possibilidade de serem táxons distintos. A grande similaridade dos cariótipos $2n=18$ sugere que *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* possam também pertencer ao mesmo grupo em que se encontra *P. canga*, atualmente grupo “pusilla”. Os dados sugerem ainda que *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* ($2n=18$) seja proximamente relacionada à *P. canga* ($2n=18$) e não a *P. falcipes* ($2n=22$), apesar das semelhanças morfológicas entre seus exemplares. Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a necessidade de uma extensa revisão taxonômica no gênero *Pseudopaludicola*.

ABSTRACT

The genus *Pseudopaludicola*, of the family Leiuperidae, comprises 12 frog species and is widely distributed in South America. In Brazil, nine species have been described within this genus. As based on morphological data, the *Pseudopaludicola* species were classified in two groups named “pusilla” and “falcipes”. Although this genus has undergone several taxonomic changes, recent molecular analyses revealed still unclear intergeneric relationships. The high morphological similarities among diverse species of *Pseudopaludicola*, associated to their sympatry in several localities, suggest taxonomic misidentification which had been based only in morphological characteristics. Besides, recent studies seem to indicate the existence of cryptic *Pseudopaludicola* species in several Brazilian localities. Cytogenetics of *Pseudopaludicola* has been scarce and restricted to the determination of chromosome number and morphology. Further cytogenetic analysis can contribute to differentiate the *Pseudopaludicola* species and, therefore, improve the sistematics of this genus. The objective of this work was to analyze the karyotypes of several Brazilian *Pseudopaludicola* species aiming at providing their characterization and further understanding of their systematic relationships. The analyzed species were the *P. mineira*, *P. canga* and *P. saltica*, from their type-localities (Serra do Cipó, MG; Serra dos Carajás, PA, and Chapada dos Guimarães, MT, respectively), *P. saltica* from Uberlândia, MG, *Pseudopaludicola* aff. *saltica* from Rio Claro (SP), *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* from Icém (SP), and specimens of *Pseudopaludicola* sp. 1, 2 and 3, respectively from Andaraí (BA), Barreirinhas (MA) and Uberlândia (MG). Metaphases were obtained from intestinal epithelium and testicular cell suspensions, and stained with Giemsa or submitted to silver staining, in order to detect the nucleolus organizing regions (Ag-NOR), and to C-banding technique for heterochromatin localization. As based on chromosome number, there were two groups of karyotypes, with $2n=22$ and $2n=18$. The species *P. mineira*, *Pseudopaludicola* sp.1, *P. saltica* and *Pseudopaludicola* aff. *saltica* had a diploid number of $2n=22$. *Pseudopaludicola mineira* and *Pseudopaludicola* sp.1 differed in the morphology of pairs 7, 8 and 11, in the NOR location in the pair 8 and in the heterochromatin distribution. The *P. saltica* and *Pseudopaludicola* aff. *saltica* populations showed very similar chromosomal morphology and identical heterochromatin pattern, except

for the pair 8. In *P. saltica*, the pair 8 was characterized as sex chromosomes $XX^{\text{♀}}/XY^{\text{♂}}$, being the X classified as telocentric and Y submetacentric, whereas in *Pseudopaludicola* aff. *saltica*, in both male and female specimens, the homologues of pair 8 are telocentrics, heteromorphic in size with the heterochromatin block present only in the longer homologue. The pair 8 is the NOR-bearing chromosome in both *P. saltica* and *Pseudopaludicola* aff. *saltica*. High similarity was observed among the karyotypes of *P. canga*, *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 and *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*, all of them with $2n=18$ chromosomes. However, these karyotypes differed in the NOR location, which was on pair 3 in *P. canga* and *Pseudopaludicola* sp.2, and on pair 9 in *Pseudopaludicola* sp.3 and *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*. These species had similar heterochromatic blocks, except for one C-band on the long arm of pair 2 in *P. canga* and *Pseudopaludicola* sp.2, which was not observed in *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*). The cytogenetic data clearly distinguished *Pseudopaludicola* sp.1 from the other known species of this genus with 22 chromosomes, and suggested that this could be a not yet described species. The identification of sex chromosomes $XX^{\text{♀}}/XY^{\text{♂}}$ in *P. saltica*, is the first case of sex chromosomes reported in the genus *Pseudopaludicola*. A mechanism of fission followed by loss of the short arm in one of homologues of a submetacentric pair could explain the origin of the X chromosome in *P. saltica*. The size heteromorphism in the homologues of the pair 8 of *Pseudopaludicola* aff. *saltica*, with the NOR site and heterochromatin present only in one of the homologues, could be explained by unequal crossing-over. The species *Pseudopaludicola* *canga* and *Pseudopaludicola* sp.2 could not be cytogenetically distinguished, suggesting that they belong to the same taxon. Since all the analyzed karyotypes of $2n=18$ were very similar, we may suggest that *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* should be included in the same group of *P. canga*, which is currently allocated in the “pusilla” group. In addition, the results indicated that *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* ($2n=18$) is more closely related to *P. canga* ($2n=18$) than to *P. falcipes* ($2n=22$), although the specimens are morphologically very similar and their identification is not unequivocal. Ultimately, the data presented herein reinforce the necessity of a taxonomic revision of the genus *Pseudopaludicola*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Ordem Anura – aspectos gerais

Segundo Frost (2008) a ordem Anura compreende os anfíbios mais bem sucedidos e divide-se em 48 famílias com 5602 espécies descritas até o momento. São animais cosmopolitas e encontram-se amplamente distribuídos por todos os continentes, não sendo encontrados apenas em regiões desérticas, na Antártida, em altas latitudes e em algumas ilhas oceânicas. Aproximadamente 1700 espécies são encontradas na América do Sul.

Os anuros caracterizam-se por apresentar um corpo curto com ausência de cauda, quatro extremidades locomotoras, sendo os membros posteriores, em geral, sob a forma de poderosas patas saltadoras, escavadoras ou nadadoras (Duellman & Trueb, 1994). As larvas são aquáticas, inicialmente com brânquias externas e posteriormente com brânquias internas. Durante a metamorfose as patas posteriores aparecem primeiro, seguidas pelo surgimento das patas anteriores (Ziswiler, 1988 *apud* Busin, 2005). Indivíduos adultos, normalmente, têm vida terrestre e sua respiração é feita por pulmões e pela difusão dos gases através da pele, que geralmente é lisa, úmida e sem apêndices epidérmicos (Duellman & Trueb, 1994; Pough *et al.*, 2004).

Os anuros, assim como os pássaros, anunciam sua presença por meio de vocalização. Algumas espécies produzem sons variados, sendo o mais comum o canto de anúncio usado pelos machos para atrair as fêmeas. Os cantos territoriais são reconhecidos por outros machos e os cantos de combate são os produzidos durante interações entre machos (Duellman & Trueb, 1994). Embora haja bastante variação entre os cantos, este é bastante característico para as espécies de anuros, servindo para identificar a espécie e o sexo do animal, porém, frequentemente, táxons correlatos apresentam cantos bastante similares (Lutz, 1973 *apud* Busin, 2005).

Os animais da ordem Anura apresentam também uma variedade de modos reprodutivos, sendo mais freqüente a fecundação externa (Duellman & Trueb, 1994).

Apesar do alto número de representantes dessa Classe, os anuros são morfologicamente semelhantes, o que dificulta as identificações baseadas exclusivamente nestes caracteres, bem como o entendimento das relações de parentesco. Nos últimos anos, uma ferramenta muito

valiosa tem sido utilizada para o estudo dos anuros – a análise molecular. Esta técnica tem se baseado em sequenciar fragmentos ou segmentos de DNA de diversos indivíduos de diferentes famílias, gêneros e até populações da mesma espécie e posteriormente comparar os dados, inferindo hipóteses de relacionamento (Hillis, 1987; Hillis *et al.*, 1993).

Contudo, Emerson *et al.* (2000) acreditavam que análises com dados moleculares e morfológicos têm sido problemáticas, uma vez que os estudos morfológicos têm fornecido poucas informações contundentes, sendo algumas de difícil interpretação e que as análises moleculares têm abordado poucos táxons ou se baseado somente em caracteres pouco informativos. Entretanto, atualmente, segundo diversos autores (por exemplo, Faivovich *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 2006 e Grant *et al.*, 2006), a análise molecular com um maior número de táxons e um sequenciamento de uma maior quantidade de genes, tanto nucleares quanto mitocondriais, podem suportar informações contundentes na filogenia dos anuros. De acordo com Aguiar Jr. (2003), a utilização combinada dos dados moleculares, aliadas a outras fontes como dados bioquímicos, comportamentais, de ultra-estrutura de espermatozóides e citogenéticos também podem ajudar a elucidar ou suportar hipóteses de filogenia.

Recentemente, os estudos filogenéticos moleculares envolvendo os dendrobatídeos e várias espécies de diversas famílias promoveram algumas alterações na sistemática desse grupo. Nestes estudos Frost *et al.* (2006) e Grant *et al.* (2006) realocaram em diferentes gêneros e ou famílias algumas espécies tidas anteriormente como relacionadas, mas que se mostraram distintas.

Portanto, a associação de diversas fontes de informações tais como molecular, ultra-estrutura dos espermatozóides, além da citogenética, pode ser bastante elucidativa, uma vez que diferentes caracteres podem ter pressões evolutivas distintas, o que reforça a importância destas ferramentas para o entendimento da sistemática e filogenia dos anuros.

1.2. Citogenética em anuros

Até o início da década de 80, os estudos citogenéticos baseavam-se apenas na definição do número e morfologia cromossômica por análise de cariótipos submetidos à coloração por Giemsa. Apesar de simples, estes estudos pioneiros revelaram a existência de grupos que apresentavam cariótipos extremamente conservados e outros bastante diversificados (veja Beçak, 1968; Batistic, 1970; Bogart, 1973, 1981, para exemplos).

Morescalchi (1968, 1973) e Lynch (1971) sugeriram inicialmente que os grupos mais basais dos anuros possuíam freqüentemente um número alto de cromossomos além da presença de cromossomos telocêntricos e microcromossomos, enquanto as famílias mais derivadas apresentavam um número menor de cromossomos. Suas teorias foram contestadas posteriormente por Bogart (1973), em seus estudos sobre a evolução cariotípica dos anuros. Nestes estudos, Bogart (1973) verificou que famílias tidas como basais, tais como Ascaphidae, possuíam uma variação cromossômica que dificultava a comparação com outros exemplares de anuros. Além disso, o cariótipo de um representante anuro basal, *Rhinophrynus dorsalis*, apresentou um baixo número de cromossomos ($2n=22$), similar a algumas espécies de Microhylidae, também tidas como basais.

Com base nesse tipo de análise simples do cariótipo, alguns mecanismos de evolução cariotípica, como fusão cêntrica, foram sugeridos para diferentes espécies de Hylidae (Beçak, 1968) e Leptodactylidae (Beçak, 1968; Batistic, 1970). Entretanto, mecanismos de translocações também foram considerados para explicar a redução no número de cromossomos, que segundo Beçak (1968) poderiam mascarar o processo de fusão. Na contramão da hipótese de redução do número de cromossomos, o aumento de cromossomos por mecanismo de fissão também já foi relatado para alguns anuros. Kuramoto & Allison (1989) sugeriram este mecanismo para *Barigenys flavigularis*, e Busin *et al.* (2001) para *Pseudis cardosoi*. Outro evento presente na especiação dos anuros é a poliploidização. Tal ocorrência já foi descrita para diversas espécies de várias famílias, como por exemplo, *Ceratophrys dorsata* (atualmente *C. aurita*) (Beçak *et al.*, 1967), *C. ornata* (Bogart, 1967), *C. joazeirensis* (Vieira *et al.*, 2006) e *Odontophrynus americanus* (Bogart, 1967). Este aumento no lote diplóide pode ocorrer por aloploidia ou autoploidia, sendo este último mais comum em anuros (Tymowska, 1991).

Embora muitos mecanismos de evolução cariotípica em Anura tenham sido propostos, a melhor compreensão das relações cariotípicas e de evolução desses animais passou a ocorrer após o advento e a utilização de marcadores citogenéticos, como os obtidos com técnicas de bandamento cromossômico e impregnação por prata para localizar a região organizadora do nucléolo. Um exemplo bastante elucidativo da importância dessas técnicas de bandamento para o entendimento dos processos de evolução cromossômica em anuros é o estudo de Miura *et al.* (1995) com rãs-marrons em que havia um evidente caso de redução cromossômica de $2n$

= 26 para $2n = 24$. Utilizando a análise de banda C e bandas de replicação tardia, foi possível detectar um processo de fusão *in tandem* entre os cromossomos 11 e 13 de um cariótipo primitivo com $2n = 26$, dando origem ao cromossomo 6 das espécies com $2n = 24$ cromossomos.

A análise citogenética empregando técnicas de bandamento cromossômico tem permitido diferenciar espécies morfologicamente semelhantes, uma vez que apresentam cariótipos distintos como o observado em representantes dos gêneros *Megaelosia* (Giaretta & Aguiar-Jr, 1998; Rosa *et al.*, 2003); *Dendropsophus* (Medeiros *et al.*, 2003); *Paratelmatobius* (Lourenço *et al.*, 2000, 2003b); *Allobates* (Aguiar-Jr *et al.*, 2002; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003; 2006); *Pseudis* (Busin *et al.*, 2001) entre outros.

O estudo dessas variações cromossômicas contribui na formulação de hipóteses sobre a relação filogenética entre diferentes grupos taxonômicos, assim como dentro de um mesmo grupo e, ainda, permite a análise de rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução desses táxons (Busin, 2005). Portanto, a análise citogenética utilizando diferentes técnicas de bandamento cromossômico como ferramenta no estudo de questões taxonômicas podem, segundo diversos autores, contribuir de forma eficaz para solucionar problemas na sistemática e auxiliar na compreensão dos processos evolutivos que envolvem este grupo de animais (por exemplo,; Schmid, 1978a, 1978b, 1980a, 1980b, 1982; King, 1980, 1991; Lourenço *et al.*, 1999, 2000, 2003a, 2003b; Aguiar Jr. *et al.*, 2002; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003, 2006, Silva *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2006, Busin *et al.* 2008, dentre outros).

1.2.1. Região organizadora do Nucléolo (NOR)

A região organizadora do nucléolo corresponde a sítios cromossômicos formados por numerosas cópias de genes que codificam o RNAr precursor que contém os RNAr 18S, 5,8S e 28S, organizadas *in tandem* e separadas por seqüências espaçadoras externas não transcritas entre cada unidade repetida (IGS) e por espaçadores internos transcritos (ITS) (Sumner, 1990; Alberts *et al.*, 2004; Mello, 2007).

A produção de RNAr ocorre no nucléolo onde formam-se os pré-ribossomos que posteriormente tornam-se ribossomos funcionais no citoplasma no momento da tradução. Os espaçadores internos são removidos do transcrito primário de RNAr, que no caso de anfíbios é

40S, durante o processo de maturação desse tipo de RNA que ocorre efetivamente no nucléolo (Long & David, 1980). A associação dos RNAr 18S, 5,8S e 28S com proteínas ribossomais e com os RNAr 5S, sintetizados fora do nucléolo e posteriormente transportados até ele, culminam na formação das subunidades ribossomais 40S e 60S. Diferentes tipos, tamanhos e números de nucléolos ocorrem de acordo com o tipo e estado fisiológico da célula em questão, bem como a quantidade de NORs presentes (Alberts *et al.*, 2004; Mello, 2007).

Schwarzcher & Wachtler (1993) afirmam que nem todas as NORs de uma célula são ativas durante intérfase, mas as que transcrevem originam os nucléolos. Essas estruturas contêm proteínas relacionadas ao processo de transcrição e proteínas ribossomais, que constituem até 85% de seu volume, além de DNA e RNA ribossomais que podem chegar, respectivamente, até 17% e 10% do volume do nucléolo.

Entre os indivíduos da mesma espécie, o tamanho das diferentes NORs pode variar consideravelmente devido ao número variável de cópias do gene ribossomal apresentado por cada uma delas (Schmid, 1982).

As NORs são ricas em pares de base GC, principalmente nas regiões que codificam os RNAs 18S, 5,8S e 28S (Sumner, 1990), geralmente aparecem como constrições secundárias e, em alguns casos, podem conter heterocromatina (Henderson *et al.*, 1972). Goessens (1984) mostra ainda a localização adjacente de determinado tipo de heterocromatina com regiões organizadoras do nucléolo. Em anfíbios, especialmente em anuros, as NORs podem coincidir com bandas heterocromáticas e facultativamente apresentar grandes blocos de banda C associados a elas (King, 1980, 1988; King *et al.*, 1990; Lourenço *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999). Essas regiões são compostas parcialmente ou totalmente por seqüências de DNA repetitivo, o que explica a evidenciação dessa região pela técnica de banda C (Li & Graur, 1991).

As NORs podem ser evidenciadas para a análise do seu número e de sua localização cromossômica, por meio de hibridação *in situ*, técnicas citoquímicas como a coloração com mitramicina ou cromomicina A₃, bandamento N e impregnação pelo íon prata. A hibridação *in situ* é o método mais específico, pois evidencia todas as NORs, inclusive as inativas, uma vez que seqüências de DNAr são fisicamente detectadas. A cromomicina e a mitramicina coram regiões genômicas ricas em GC podendo evidenciar não apenas as NORs, mas também

algumas regiões de heterocromatina. Um exemplo bastante claro na utilização destas colorações diferenciais foi observado por Kasahara *et al.* (2003) nas espécies de hílíneos *Aparasphenodon brunoí*, *Corythomantis greeningi*, *Osteocephalus langsdorffii* e *Scinax fuscovarius* que possuem cariótipos semelhantes constituídos por $2n=24$. Essas técnicas permitiram sugerir que *Scinax fuscovarius* esta filogeneticamente mais distante das outras espécies que são proximamente relacionadas entre si.

O método mais utilizado entre todos os supracitados, é o de impregnação pela prata. Este método, além de mais simples, exhibe resultados bastante esclarecedores. A técnica original de Howell *et al.* (1975) reúne estágios como a fixação dos cromossomos com formalina, o tratamento com uma solução pré-corante de prata amoniacal, um tratamento com hidróxido de sódio diluído, e finalmente a coloração com uma mistura de formalina e prata amoniacal. Algumas modificações foram realizadas posteriormente por Goodpasture & Bloom (1975) que envolvia a utilização de nitrato de prata a 50% e aquecimento do material pelo calor de uma lâmpada. Olert (1979) misturou a solução de nitrato de prata 50% com ácido fórmico, e utilizou esta solução em suas preparações cromossômicas.

Em 1980, Howell & Black aprimoraram a técnica de Olert (1979) utilizando uma solução coloidal ao adicionar ácido fórmico a uma solução de gelatina diluída. Essa solução é misturada a uma solução de prata imediatamente antes do uso e as lâminas são incubadas em uma estufa a 60°C. Esse método recebeu o nome de Ag-NOR.

O método de Ag-NOR está baseado na afinidade do íon prata por proteínas argirófilas associadas à NOR, chamadas genericamente de "proteínas Ag-NOR". Essas proteínas permanecem associadas ao DNAr até o paquíteno da meiose e no percurso de toda a mitose (Howell, 1977; Schwarzach *et al.*, 1978). Considera-se que somente as NORs transcricionalmente ativas apresentam essas proteínas associadas e, portanto, as NORs inativas não responderiam ao método de Ag-NOR (Schwarzach *et al.*, 1978; Buys & Osing, 1980; Schmid *et al.*, 1986; Sumner, 1990; Hernandez-Verdun *et al.*, 1993).

Embora o método Ag-NOR seja muito utilizado, ele não é específico para a NOR, podendo evidenciar outros sítios, como regiões de heterocromatina centromérica e não-centromérica (Sumner, 1990). A fim de evitar marcações inespecíficas, tem sido utilizada frequentemente a técnica de hibridação *in situ* (FISH) aplicando-se uma sonda de DNAr.

A localização da NOR em anuros é de fundamental importância para a citogenética. Segundo Schmid (1978a, 1978b) e Schmid *et al.* (1990), organismos que pertencem a espécies ou grupos muito proximamente relacionados, possuem geralmente a NOR localizada na mesma região cromossômica. A NOR ainda pode ter um caráter filogenético bastante informativo, como por exemplo, o estudo de Odierna *et al.* (2001) que analisaram diversas espécies de anfíbios do gênero *Mantella* e alguns exemplares do gênero *Mantidactylus* através de várias técnicas de bandamento cromossômico, incluindo a detecção da NOR, que inferiu eficazmente a separação do clado de *Blommersia-Mantella* dos outros *Mantidactylus* e *Mantella* estudados, auxiliando na melhor compreensão dos aspectos filogenéticos envolvidos na sistemática desses gêneros.

O método Ag-NOR possibilitou observar que a maioria dos anuros, tanto de famílias tidas como basais quanto derivadas, apresentam um par de NORs por genoma diplóide (King *et al.*, 1990). De acordo com Schmid (1982), em anuros, heteromorfismos de tamanho de NORs são bastante comuns e NORs duplicadas ou triplicadas não ocorrem em homozigose em populações selvagens, estando sempre associadas a NORs de tamanho "normal". Entretanto, diversos anuros apresentam variações no número e localização de NORs como, por exemplo, *Hyla versicolor* e *Hyla chrysoscelis* (Wiley *et al.*, 1989), *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991), *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995), *Hyla ebraccata* (Kaiser *et al.*, 1996), *Physalemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998), *P. cuvieri* (Silva *et al.*, 1999; Quinderé, 2007), *Hyla nana* (Medeiros *et al.*, 2003), *Leptodactylus mystacinus* (Silva *et al.*, 2006), dentre outros.

Análises cuidadosamente realizadas quanto ao número, localização cromossômica e características moleculares das NORs de diferentes indivíduos permitem a identificação de homeologias entre diferentes populações e espécies possibilitando, desta maneira, em alguns casos, o reconhecimento de alguns rearranjos cromossômicos envolvidos em processos de evolução e diferenciação cromossômica que possivelmente se constituirá um caráter filogenético informativo (por exemplo, Odierna *et al.*, 2001).

1.2.2. Heterocromatina

Heterocromatina, termo cunhado por Heitz (1928) e revisado por Brown (1966), foi proposto para definir, em termos morfológicos, a cromatina de regiões específicas de certos

cromossomos, que permanecia condensada durante toda a intérfase, com uma afinidade tão intensa por corantes quanto aquela de cromossomos metafásicos (Mello & Vidal, 2007). Este termo é usado genericamente para descrever a cromatina ou segmentos cromossômicos que permanecem condensados durante todo o ciclo celular, sendo transcricionalmente inativos (Babu & Verma, 1987; Alberts *et al.*, 2004).

Até pouco tempo atrás, a heterocromatina era classificada em facultativa e constitutiva (Brown, 1966). Porém sabe-se hoje que esta classificação não é muito empregada porque ambos os tipos de cromatinas são baseadas no mesmo modelo de interação da cromatina nucleossomal com complexos protéicos (Henning, 1999). Além disso, foi descoberta uma proteína chamada Mr51,000 (p51) em cromossomos meióticos sexuais, que durante a prófase formam uma estrutura chamada de vesícula sexual, o que reforça a generalização do termo heterocromatina. A presença da proteína p51 está relacionada a estas vesículas e também as regiões centroméricas dos cromossomos autossômicos. Essa proteína pode ser um componente do mecanismo que torna inacessível essas regiões de heterocromatina a transcrições ou recombinações gênicas (Smith & Benavente, 1995).

Segundo Hilliker *et al.* (1980) existem muitos genes funcionais nas regiões de heterocromatina em *Drosophila melanogaster*, embora a quantidade destes genes ativos sendo muito inferiores às de regiões de eucromatina. Sumner (1990) acredita que possam existir ainda porções de eucromatina dentro de grandes regiões de heterocromatina, o que poderia explicar também a atividade gênica desse tipo de cromatina. Porém, para muitos pesquisadores a heterocromatina era considerada como “DNA lixo” devido à inexistência de genes (ver revisão de Pardue & Hennig, 1990).

A heterocromatina geralmente compreende pequena porção do genoma, porém em casos especiais pode chegar a 50% do total de DNA da célula (Sumner, 1994). King (1991) sugere que a heterocromatina exerça papel importante na proteção de sítios eucromáticos adjacentes de modificações estruturais acarretadas por recombinação, uma vez que reduz a formação de quiasmas. Outras funções também já foram atreladas à heterocromatina, como a inativação de genes localizados muito próximos a outros transcricionalmente ativos (Reuter & Spierer, 1992).

O processo de heterocromatinização, que requer metilações da histona H3 na lisina 9 e o subsequente recrutamento de proteínas como a HP1, serve de modelo para a regulação da modificação das histonas e associação da cromatina no controle epigenético do genoma. Recentes estudos em *Schizosaccharomyces pombe* indicam que a heterocromatina se porta como uma “plataforma dinâmica” no recrutamento e extensão de proteínas regulatórias através de domínios estendidos para o controle de vários processos cromossômicos, incluindo transcrição e segregação cromossômica (Grewal & Jia, 2007).

Outra importante função também atribuída à heterocromatina é o chamado “silenciamento gênico”. Este processo baseia-se na característica do DNA heterocromático ser constituído frequentemente por uma grande série de pequenas seqüências repetidas *in tandem* que não codificam proteínas (Alberts *et al.*, 2004). O silenciamento gênico pode ser observado em *Drosophila*, onde regiões de eucromatina transcritivamente ativas adquirem um nível maior de compactação transformando-se em heterocromatina e conseqüentemente reprimindo a atividade gênica destas regiões (Spofford, 1976; Reuter & Spierer, 1992; Weiler & Wakimoto, 1995). Outro exemplo é a proteção do material genético contra elementos móveis de DNA, que podem se multiplicar e se inserir no genoma (Alberts *et al.*, 2004). De acordo com essa teoria, uma vez que um grupo de elementos móveis tenha se formado, o DNA que o contém será compactado em heterocromatina para prevenir uma posterior proliferação.

A região organizadora do nucléolo também pode apresentar mecanismos de regulação associados a segmentos de heterocromatina extras não adjacentes a NOR. Em estudos com gafanhotos, Cabrero *et al.* (1986) propuseram a relação da existência desses segmentos heterocromáticos extras a um aumento na atividade das NORs secundárias, sugerindo que esses blocos de heterocromatina possam inativar genes supressores de NORs, encontrados adjacentes a essa heterocromatina. López-Léon *et al.* (1995), também em estudos com gafanhotos, evidenciaram a dependência entre NORs na presença de heterocromatina supranumerária.

Apesar de possuir uma baixa expressão gênica e estar sempre compactada, fato este que limita o acesso de outras proteínas e enzimas naquela região do DNA, a heterocromatina realiza, ainda, outras funções muito importantes para a manutenção e funcionamento bioquímico do núcleo das células, como por exemplo, a proteção de regiões centroméricas e

teloméricas. A heterocromatina inclui outras proteínas adicionais e, provavelmente, representa um maior nível de compactação da cromatina que somente agora esta começando a ser compreendido (Alberts, *et al.*, 2004).

A heterocromatina é geralmente detectada citogeneticamente através da técnica de bandamento C. Também pode ser detectada por outros métodos tais como, bandamento N, impregnação pela prata, bandamentos com enzimas de restrição, colorações com DAPI, mitramicina e cromomicina. Sumner (1990) cita também a reação de Feulgen para investigação de regiões cromossômicas com maior ou menor condensação.

A técnica de bandamento C, hoje considerada como a melhor para se detectar citologicamente as regiões de heterocromatina, teve origem no método clássico de hibridação *in situ* desenvolvido por Pardue & Gall (1970). Esses pesquisadores observaram que as regiões centroméricas dos cromossomos coravam mais intensamente com Giemsa, após terem sido desnaturadas com uma base antes da hibridação. Esses autores sugeriram, então, que as regiões evidenciadas por esse método eram constituídas quase que totalmente de DNA altamente repetitivo, denominado de DNA satélite. Sumner (1990) cita que embora essa correlação entre DNA altamente repetitivo e banda C-positiva ocorra com frequência, existe casos em que não foi detectado esse tipo de DNA em regiões visualizadas pela banda C.

A técnica usada atualmente foi descrita por Sumner (1972). Entretanto, alguns ajustes de tempo e de concentrações das soluções usadas são necessários para diferentes espécies e envelhecimento das preparações dos materiais a serem submetidos à análise.

A técnica de bandamento de C baseia-se em três processos: a hidrólise do material cromossômico em uma solução ácida ou básica, um tratamento alcalino em uma temperatura elevada, e a incubação do material em uma solução salina concentrada.

Quimicamente, o primeiro tratamento do material é uma hidrólise feita em ácido clorídrico, que ocasiona a despurinação do DNA. A incubação posterior em uma solução alcalina saturada a uma elevada temperatura, provoca a lise e a exposição dos sítios apurínicos assim como a desnaturação irreversível do DNA. Finalmente, o tratamento salino remove o material genético despurinado. As regiões de heterocromatina possuem uma despurinação mais lenta, o que explica a visualização destas regiões após a coloração com Giemsa. Ainda

desconhece-se a razão pela qual as regiões de não banda C sofrem remoção preferencial (Holmquist, 1979).

Técnicas de bandamento G, R e Q, tão eficientes e elucidativas em mamíferos, são pouco eficazes em anfíbios.

Espécies muito próximas podem diferir no padrão heterocromático de seus genomas no que se refere ao número, localização e às propriedades de coloração, tornando-se assim, um importante componente nas análises citogenéticas e evolutivas (Sumner, 1990). Ainda segundo o autor, cromossomos que não apresentam bandas C são raros, e provavelmente, não ocorram em cariótipos normais.

King (1991) relata que diferenças nos padrões heterocromáticos entre espécies são encontradas não somente nos anuros basais, mas também nos mais derivados. Após observar a variação na quantidade de heterocromatina banda C positiva em Amphibia, King (1991) propôs o envolvimento de três processos na evolução da heterocromatina nesse grupo. O primeiro seria a adição de heterocromatina a sítios cromossômicos específicos; o segundo, a transformação de regiões cromossômicas eucromáticas em regiões de heterocromatina; e o último, a evolução em conjunto de múltiplos sítios heterocromáticos.

O padrão de distribuição da heterocromatina detectada principalmente pela técnica de banda C tem contribuído para a caracterização citogenética de determinados grupos, auxiliando na sistemática dos anuros (por exemplo, Anderson, 1991; Veiga-Menoncello *et al.*, 2003, 2006, dentre outros).

1.2.3. Cromossomos sexuais em anuros

Os anfíbios estudados até o presente momento possuem mecanismos genéticos de determinação sexual (Wallace *et al.*, 1999) que provavelmente está presente em todos os representantes desta Classe (Hayes, 1998). Entretanto, a presença de cromossomos sexuais heteromórficos como vetor desse mecanismo de determinação sexual é raro (Hillis & Green, 1990; Hayes, 1998; Schmid *et al.*, 1991; Schmid & Steilein, 2001; Wiley, 2003).

Fatores externos tais como temperatura, manipulações físicas e hormônios exógenos podem influenciar na diferenciação sexual (gônadas), mas diferentemente de alguns peixes e

répteis que possuem um mecanismo de determinação sexual ambiental verdadeiro, apenas os hormônios exógenos podem influenciar na determinação sexual dos anfíbios naturalmente (Hayes, 1998). Mecanismos de reversão sexual espontânea também já foram reportados para algumas espécies de anfíbios, em que a temperatura foi fator preponderante para viabilizar esse processo (Wallace *et al.*, 1999). Segundo Schmid *et al.* (1991) a origem de machos por processos de reversão sexual pode demonstrar o tipo de mecanismo de determinação sexual envolvido para estas espécies.

Aproximadamente 900 espécies de anuros já tiveram seus cariótipos estudados e, até o presente momento, apenas 28 revelaram a presença de cromossomos sexuais (Cuevas & Forma, 1996; Ryuazaki *et al.*, 1999; Lourenço *et al.*, 1999; Green, 1988a, 1988b, 2002; Green & Canatella, 1993; Schmid *et al.*, 2002a, 2002b; Schmid & Steilen, 2001, 2003; Odierna *et al.*, 2007; Ananias *et al.*, 2007; Busin *et al.*, 2008). Os cromossomos sexuais podem estar presentes em heterogamia feminina ou heterogamia masculina, nos sistemas ZZ/ZW e XX/XY, respectivamente. Além desses dois sistemas, existe um mecanismo raro de determinação sexual, observado em *Leiopelma hochstetteri*, constituído por apenas um supranumerário, univalente e variável cromossomo W, sem a presença do heterohomólogo cromossomo Z, caracterizando o sistema sexual impar W0/00 (Green, 1988a; Green & Cannatella, 1993).

Sistemas múltiplos de cromossomos sexuais também já foram descritos em anuros para duas espécies até então tidas como *Eleutherodactylus*. Para ambas as espécies há a presença de um par de cromossomos autossômicos juntos ao par sexual. Em *Eleutherodactylus maussi* (atualmente *Strabomantis biporcatus*) o sistema múltiplo XXAA♀/ XAA^Y♂, originou-se por uma fusão cêntrica entre o cromossomo Y original e um autossomo (Schmid *et al.*, 2002c). A outra espécie, *Eleutherodactylus riveroi* (atualmente *Pristimantis riveroi*), também apresentou o sistema múltiplo de cromossomos sexuais similar, entretanto a maioria dos machos analisados (53,8% dos estudados) não possuía o cromossomo Y associado a um autossomo, exibindo então o genótipo XYAA♂ (Schmid *et al.*, 2003a).

Espécies de variados grupos de anuros apresentam diferenciação de cromossomos sexuais (Hillis & Green, 1990; Schmid *et al.*, 1991). Esses cromossomos sexuais podem apresentar grandes diferenças morfológicas entre si, o que facilita muito o reconhecimento de tais cromossomos (Schmid *et al.*, 1991), ou possuírem uma morfologia muito semelhante, cujo

reconhecimento só pode ser feito através da aplicação de alguma técnica de bandamento cromossômico (Schempp & Schmid, 1981; Odierna *et al.*, 2007) ou análises moleculares (Wallace *et al.*, 1999; Wiley, 2003).

Cromossomos heteromórficos são observados tanto no sistema XX/XY, como os encontrados em espécies de *Eupsophus* (Iturra & Veloso, 1989; Cuevas & Formas, 1996), de *Gastrotheca* (Schmid *et al.*, 1983; Schmid *et al.*, 1988; Schmid *et al.*, 2002a) e de *Engystomops petersi* (Lourenço *et al.*, 1998; 1999), como no sistema ZZ/ZW observados, por exemplo, em *Pseudis tocantins* (Busin *et al.*, 2008), *Proceratophrys boei* (Ananias *et al.*, 2007) e em anuros marsupiais primitivos do gênero *Leiopelma* em que a diferenciação dos cromossomos sexuais baseia-se principalmente na aquisição de uma região de heterocromatina que originou um braço curto no cromossomo W (Green, 1988a, Green, 1988b; Green & Sharbel, 1988; Green & Canatella, 1993; Green, 2002).

Alguns cromossomos sexuais apresentam diferenças muito grandes, como os observados em *Eleutherodactylus euphronides* (atualmente *Pristimantis euphronides*) e *E. shrevei* (atualmente *Pristimantis shrevei*), em que o cromossomo W é bem maior que o Z devido à presença de um enorme bloco de heterocromatina evidenciada pela técnica de banda C (Schmid *et al.*, 2002b). Outro curioso heteromorfismo entre cromossomos sexuais é observado em *Hyla femoralis*, em que o cromossomo X é o único portador da NOR devido a uma deleção da região organizadora do nucléolo (NOR) no cromossomo Y, que o faz ser distintivamente menor que seu homólogo (Schmid & Steilein, 2003; Wiley, 2003).

Recentemente, foi observada em *Rana rugosa* (atualmente *Glandirana rugosa*) uma mudança de heterogamia masculina para heterogamia feminina (Ogata *et al.*, 2003). Isso pôde ser comprovado através da presença de ambos os tipos de cromossomos sexuais, XX/XY e ZZ/ZW para diferentes populações oriundas de localidades distintas dentro do território japonês. Populações do oeste do Japão apresentaram heterogamia masculina, e populações advindas de outras regiões mostraram cromossomos sexuais com heterogamia feminina (Ogata *et al.*, 2003). Os autores acreditam que o estado apomórfico seja a heterogamia masculina, suportados principalmente pelos resultados que obtiveram em análises moleculares do gene mitocondrial de RNAr 12S e de cruzamentos artificiais promovidos entre as populações do oeste do Japão (com cromossomos XX/XY) e as outras populações com cromossomos sexuais ZZ/ZW.

Os cromossomos sexuais heteromórficos representam um caráter apomórfico recente na evolução dos sistemas sexuais genéticos em vertebrados e sua provável origem deu-se através da diferenciação de cromossomos autossômicos primitivos (Bull, 1983). Iturra & Veloso (1989) também sugerem em seus estudos que os cromossomos sexuais tiveram sua origem em uma diferenciação de um par autossômico homomórfico ancestral.

De acordo com Ohno (1967), os cromossomos sexuais evoluíram por uma série de eventos. O primeiro evento foi um provável acúmulo de diferenças nos genes responsáveis pela determinação sexual entre os homólogos do par de cromossomos sexuais primitivos. Posteriormente, a redução e a conseqüente supressão de *crossing-over*, seguido pela adição de heterocromatina nos cromossomos sexuais presentes em apenas um dos sexos (Y ou W), culminaram com a diferenciação morfológica do cromossomo heterocromático (Singh *et al.*, 1976; Jones & Singh, 1981; Bull, 1983).

A compensação na dosagem da expressão de genes ligados a diferenciação do sexo é um mecanismo importante observado para muitos mamíferos, durante a evolução dos cromossomos sexuais (Schmid *et al.*, 1991). Entretanto, em anfíbios, assim como em fêmeas de aves (Ohno, 1967; Baverstock, *et al.*, 1982) a compensação na dosagem dos genes ligados ao sexo não é assegurado pela inativação aleatória de um dos dois cromossomos X ou Z no sexo homogamético (Schmid *et al.*, 1991).

De acordo com Hillis & Green (1990), em anfíbios, os sistemas ZZ/ZW e XX/XY originaram-se pela diferenciação de um par de cromossomos autossômicos, em que ZW é o estado ancestral conforme indicado em análises filogenéticas.

Anfíbios são animais ideais para se estudar a história da evolução dos cromossomos sexuais não apenas por causa da variabilidade de heterogametas sexuais no grupo, mas por apresentarem heterocromossomos em diferentes estágios de diferenciação (Hillis & Green, 1990).

Estudos comparativos em espécies em estágios distintos de diferenciação dos heterocromossomos são muito importantes para explicar a seqüência de eventos que levou o heteromorfismo dos cromossomos sexuais (Iturra & Veloso, 1989).

Portanto, a análise da diferenciação desses cromossomos pode constituir uma relevante ferramenta para melhor compreender os mecanismos evolutivos dos cariótipos nos grupos em que cromossomos sexuais heteromórficos são identificados (Cuevas & Formas, 1996).

1.3. A Família Leiuperidae e o gênero *Pseudopaludicola*

A família Leptodactylidae (*sensu* Laurent, 1986) era anteriormente formada por 49 gêneros com cerca de 1100 espécies agrupadas em 5 subfamílias: Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae. As subfamílias Leptodactylinae e Eleutherodactylinae compreendiam aproximadamente dois terços do total de espécies da família, reunindo 22 gêneros com cerca de 850 espécies descritas (Frost, 2004).

A sistemática dos leptodactilídeos sempre foi controversa, de resultados difíceis e, em alguns momentos, especulativos (Nuin, 2002). Uma significativa contribuição para a classificação e entendimento da sistemática da família Leptodactylidae foi feita por Lynch (1971) que o considerou um grupo distinto de Bufonidae, conforme preconizava Noble (1931 *apud* Lynch, 1971). Neste mesmo estudo, Lynch (1971) utilizando caracteres miológicos, osteológicos e morfológicos, reconheceu 4 subfamílias: Ceratophryinae, Hylodinae, Telmatobiinae e Leptodactylinae.

Heyer (1975) utilizando os mesmos caracteres propostos por Lynch (1971), e adicionando dados de cariótipo e biologia reprodutiva, analisou as relações de parentesco para a família Leptodactylidae, e sugeriu a inclusão da subfamília Eleutherodactylinae. Posteriormente, os gêneros da família Leptodactylidae foram separados em 5 subfamílias, com a criação da subfamília Cycloramphinae, na qual foram incorporados os três gêneros de Hylodinae, revalidando novamente a subfamília Eleutherodactylinae (Laurent, 1986 *apud* Nuin, 2002).

Estudos recentes baseados em dados moleculares (Frost *et al.*, 2006) apontaram o polifiletismo da família Leptodactylidae, tendo em vista que as espécies pertencentes a este táxon agrupavam-se em duas unidades. Os gêneros *Pleurodema*, *Edalorhina*, *Physalaemus* e *Pseudopaludicola* foram alocados na unidade Leptodactylinae I e os gêneros *Adenomera*, *Lithodytes*, *Leptodactylus* e *Vanzolinius* pertencem a unidade Leptodactylinae II. Neste estudo ficou demonstrado que Leptodactylinae I é parafilético a Leptodactylinae II + Cycloramphinae I, que compreende os gêneros *Paratelamobius* e *Scythrophrys*. De acordo com estes autores, a unidade Leptodactylinae-I, Leptodactylinae-II somada a Cycloramphinae I passou então a ser reconhecida como Leptodactylidae.

Entretanto, Grant *et al.* (2006) ampliaram o número de táxons analisados e propuseram, também com base em dados moleculares, uma nova estruturação para a família

Leptodactylidae, que passou ser composta por somente quatro gêneros, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys*. Os gêneros anteriormente alocados nesta família, *Edalorhina*, *Physalaemus* (incluindo *Engystomops* e *Eupemphix* – *sensu* Nascimento *et al.*, 2005), *Pleurodema* e *Pseudopaludicola*, foram incorporados à família Leiuperidae, a qual manteve provisoriamente o gênero *Somuncuria*, até que novos estudos forneçam mais suporte para o posicionamento correto desse gênero.

De acordo com Frost (2008), o gênero *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926, que atualmente pertence à família Leiuperidae, é formado por 12 espécies conhecidas: *Pseudopaludicola boliviana* - Parker, 1927, *P. ceratophryes* - Rivero & Serna, 1985, *P. falcipes* - Hensel, 1867, *P. llanera* - Lynch, 1989, *P. mineira* - Lobo, 1994, *P. mirandae* - Mercadal de Barrio & Barrio, 1994, *P. mystacalis* - Cope, 1887, *P. pusilla* - Ruthven, 1916, *P. riopiedadensis* - Mercadal de Barrio & Barrio, 1994, *P. saltica* - Cope, 1887, *P. ternetzi* - Miranda-Ribeiro, 1937 e *P. canga* - Giaretta & Kokubum, 2003. No Brasil há relatos da existência de nove espécies deste gênero, entretanto uma delas, a espécie *Pseudopaludicola riopiedadensis*, não tem sido mais encontrada nos últimos anos (Rossa-Feres, D.C. - comunicação pessoal).

Segundo Lobo (1992), este gênero é constituído por animais extremamente pequenos, geralmente com comprimento inferior a 20 mm, que se apresentam amplamente distribuídos na região oriental da América do Sul. Sua ocorrência vai desde o norte da Colômbia até a Argentina, continuando pelas Guianas e Suriname, seguindo pelas regiões amazônicas da Colômbia e do Brasil, no Cerrado e Mata Atlântica, e regiões do Uruguai.

As relações de parentesco entre *Pseudopaludicola* e outros gêneros da subfamília Leptodactylinae (*sensu* Lynch, 1971) têm sido estudadas por vários autores. Heyer (1974), baseado em análises de morfologia externa de ovos, larvas e adultos, além de miologia e osteologia de adultos sugere, em concordância com o estudo de Lynch (1971), que o gênero *Pseudopaludicola* seja relacionado ao gênero *Physalaemus*, e que *Pleurodema* por sua vez seja o grupo-irmão de *Physalaemus* e *Pseudopaludicola*.

Posteriormente, Heyer (1975) em estudos que envolveram os caracteres analisados anteriormente, acrescidos de outras informações relevantes, sugere que um maior número de espécies deva ser analisado para melhor elucidar as relações de parentesco entre os gêneros *Pleurodema*, *Physalaemus* e *Pseudopaludicola*, uma vez que em suas análises Heyer (1975)

demonstrou que o gênero *Pseudopaludicola* é mais relacionado à *Edalorhina* e não a *Physalaemus* como apontavam os estudos anteriores.

Cannatella e Duellman (1984) também sugeriram uma relação de parentesco entre *Pseudopaludicola* e algumas espécies de *Physalaemus* (*P. cuvieri*, *P. fernandezae*, e *P. henselii*), uma vez que os girinos de ambos os gêneros compartilham entre si uma linha interrompida nas papilas do lábio inferior. Ainda neste mesmo estudo, foi levantada a hipótese que *Pseudopaludicola* seja derivado do gênero *Physalaemus*, baseado em caracteres larvais e morfológicos (osteologia e miologia). Contudo, esta hipótese de relacionamento foi questionada por Lynch (1989) e Lobo (1995), pois dois dos caracteres apresentam variações em ambos os gêneros (dados larvais e osteológicos). Lobo (1995) indicou na árvore de consenso estrito obtida em seus estudos, que nenhum grupo de *Physalaemus* foi intimamente relacionado ao gênero *Pseudopaludicola*.

Questões intragenéricas também são problemáticas em *Pseudopaludicola*. A estrutura taxonômica do gênero tem historicamente sofrido diversas mudanças. Milstead (1963) considerou *Pseudopaludicola ameghini* - Parker, 1927 conhecida somente em sua localidade-tipo na Chapada dos Guimarães (MT), *P. mystacalis* e *P. saltica*, como sinônimos de *P. falcipes*. Porém, Bokermann (1966; *apud* Lynch, 1989) reconheceu essas quatro espécies no oeste e sudeste do Brasil e colocou *P. ternetzi* como sinônimo de *P. ameghini*. Lynch (1971) listou cinco espécies para o sul e sudeste da América do Sul, *P. falcipes*, *P. ameghini*, *P. mystacalis*, *P. saltica* e *P. ternetzi*.

Segundo Lynch (1989), estes autores supracitados não forneceram evidências para suportar essas propostas. Haddad e Cardoso (1987) analisaram as formas encontradas na Chapada dos Guimarães, MT, através de dados de bioacústica e morfométricos, e a partir destes resultados, os autores colocaram *P. ameghini* na sinonímia de *P. mystacalis* e consideraram *P. saltica* e *P. mystacalis* como espécies válidas. Posteriormente, as espécies *P. mystacalis* e *P. ternetzi* foram revalidadas por Lobo (1996).

Lynch (1989) considerou o gênero *Pseudopaludicola* monofilético, baseado na existência de um tubérculo hipertrofiado presente no antebraço. Neste trabalho, as espécies *P. boliviana*, *P. ceratophyes*, *P. llanera* e *P. pusilla* foram incluídas no grupo "pusilla". As espécies deste grupo apresentam falange terminal na forma de "T", uma característica sinapomórfica que confere o monofiletismo ao grupo. As espécies do sudeste do Brasil e

Argentina (*P. falcipes*, *P. mystacalis*, *P. saltica* e *P. ternetzi*), pertencentes ao grupo “falcipes”, possuem uma falange terminal simples e, segundo o autor, diferentemente do grupo “pusilla” não possuem uma característica comum que aponte o monofiletismo a esse grupo.

Em nível específico há também algumas incongruências a serem esclarecidas. Um exemplo claro que denota isso é o caso da espécie *P. falcipes*, com ocorrência relatada no sul e sudeste do Brasil e norte da Argentina, a qual é morfologicamente muito semelhante a *P. mystacalis* (= *P. ameghini*, *sensu* Haddad & Cardoso, 1987) e ocorrem em simpatria em muitas localidades, apresentando dificuldade de identificação. Além dessa problemática, variações morfológicas e de canto também foram observadas em populações de *Pseudopaludicola* dos estados da Bahia (por Del-Grande, M.L.), do Maranhão (por Vasconcelos, G.A) e de Minas Gerais (por Giaretta, A.A.), o que sugere a possibilidade de existência de espécies novas naquelas regiões.

Lobo (1995) realizou um estudo filogenético envolvendo nove espécies de *Pseudopaludicola* por análise de caracteres osteológicos e de morfologia externa, tendo como grupo externo oito espécies de *Physalaemus* e duas de *Leptodactylus*. Neste trabalho foi confirmado o monofiletismo do gênero e também do grupo “pusilla” proposto por Lynch (1989), mas com um arranjo interno diferente para as espécies. As análises de Lobo (1995) resultaram em três topologias distintas, nas quais ocorreram variações nas posições de *P. mineira* e *P. ternetzi*. *Pseudopaludicola saltica* mostrou-se irmã de *P. falcipes* e em algumas árvores, *P. ternetzi* mostrou-se grupo-irmão do par *P. saltica* e *P. falcipes*. A relação de *P. mineira* com as demais espécies permaneceu incerta, no entanto, *P. pusilla* mostrou-se irmã das demais espécies de seu grupo.

Em estudos posteriores, Lobo (1996) afirma que o gênero *Pseudopaludicola* necessita ser melhor estudado, principalmente no que diz respeito às espécies do sul da América do Sul, uma vez que ainda persistem importantes questões a serem elucidadas.

Como ainda persistem dúvidas sobre a taxonomia e as relações filogenéticas do gênero *Pseudopaludicola*, outros tipos de análise como a citogenética atrelada a técnicas de bandamento cromossômico, poderão somar-se aos estudos já realizados, fornecendo novos dados importantes para a elucidação da sistemática do gênero.

1.4. Justificativa

As relações de parentesco inter- e intragenéricas de *Pseudopaludicola* permanecem pouco esclarecidas. Frequentes mudanças na taxonomia foram relatadas para o gênero, o que segundo vários autores (por exemplo, Lobo, 1996) revelam a necessidade de uma ampla revisão para um melhor entendimento da sistemática do grupo.

Em nível inter-genérico, análises baseadas em caracteres morfológicos apontam uma maior proximidade de *Pseudopaludicola* com espécies do gênero *Physalaemus* ou *Edalorhina* (Cannatella & Duellman, 1984). Porém, de acordo com Lynch (1989) os caracteres utilizados por esses autores não são adequados para inferências de parentesco, uma vez apresentam variações tanto no gênero *Pseudopaludicola* como em *Physalaemus*. Posteriormente, Lobo (1995) em um estudo filogenético também baseado em caracteres morfológicos não reconheceu nenhum grupo de *Physalaemus* que fosse mais relacionado às espécies de *Pseudopaludicola*.

Os dados citogenéticos obtidos até o momento para espécies de *Pseudopaludicola* são escassos na literatura além de serem conflitantes e dúbios. Estes estudos apenas determinaram o número e a morfologia dos cromossomos por coloração convencional por Giemsa. Saez e Brum (1960) e Brum e Saez (1968) analisaram os cariótipos de populações de *Pseudopaludicola falcipes* do Uruguai, e relataram um cariótipo com $2n = 22$ cromossomos. Algumas populações atribuídas a *P. falcipes* provenientes de São José do Rio Preto (SP) apresentaram um cariótipo com $2n = 18$ cromossomos e *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) da mesma localidade apresentou, $2n = 20$ cromossomos (Beçak, 1968). Contudo, Batistic *et al.* (1969, 1970) e Batistic (1970) encontraram divergências nos cariótipos de *P. falcipes*, relatando variações incomuns de $2n = 16$ a $2n = 20$ cromossomos em populações do estado de São Paulo e Minas Gerais, de $2n=16$ e $2n = 20$ em Mato Grosso e $2n = 22$ na Bahia. Segundo Batistic (1970) o cariótipo de *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) assemelha-se muito ao de *P. falcipes* de $2n = 20$, diferindo apenas na localização da constrição secundária e na morfologia de um par cromossômico.

Apesar destes estudos citogenéticos terem levantado hipóteses relevantes sobre possíveis mecanismos de diferenciação cariotípica como a fusão cêntrica em cariótipos de $2n = 18$ para originar um cariótipo $2n=16$ (Batistic, 1970), e a especiação em curso dessas populações, nenhuma análise adicional foi posteriormente realizada.

Por outro lado, outras espécies do gênero *Pseudopaludicola* ainda não foram cariotipadas, incluindo representantes do grupo “pusilla”, o que poderá contribuir para um melhor entendimento das relações de parentesco entre os grupos “pusilla” e “falcipes”.

Os dados cromossômicos disponíveis na literatura foram realizados apenas por coloração convencional e, portanto, a utilização de técnicas de bandamento poderá fornecer marcadores que permitam uma melhor caracterização dos cromossomos e uma possível explicação dos processos evolutivos relacionados à variabilidade cromossômica intragenérica. Além disso, poderá sugerir a identificação de novas unidades taxonômicas em *Pseudopaludicola*.

1.5. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos analisar, do ponto de vista citogenético, espécies e populações de *Pseudopaludicola* de diversas regiões do país, com intuito de contribuir para a caracterização de espécies e com a taxonomia do grupo, bem como buscar uma melhor compreensão dos processos envolvidos na evolução cromossômica de *Pseudopaludicola*. Assim, foram analisadas:

- as espécies *P. canga* (grupo “pusilla”), *P. mineira*, e *P. saltica* (grupo “falcipes”), com base em exemplares provenientes de suas localidades-tipo para comparação com populações de outras localidades atribuídas a essas espécies, além de uma população de *P. saltica* oriunda do estado de Minas Gerais,
- populações de *Pseudopaludicola* sp. dos estados da Bahia, Maranhão e de Minas Gerais, suspeitas de serem espécies novas;
- e ainda, *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* e *Pseudopaludicola* aff. *saltica*, provenientes do estado de São Paulo, e morfologicamente muito semelhantes a *P. falcipes* e *P. saltica*, respectivamente.

1.6. Referências

- Aguiar-Jr, O (2003) Estudo citogenético e da ultra-estrutura dos espermatozóides de espécies da subfamília Hylodinae (Leptodactylidae) e da família Dendrobatidae (Amphibia, Anura). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 165 pp.
- Aguiar-Jr, O.; Lima, A.P.; Giaretta, A.A.; & Recco-Pimentel, S.M. (2002) Cytogenetic analysis of four poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura, Dendrobatidae). *Herpetologica* 58: 293-303.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; & Walter, P. (2004) *Biologia Molecular da Célula*. Artmed, Porto Alegre. pp. 1584.
- Ananias, F.; Modesto, A.D.S.; Mendes, S.C.; Napoli, M.F. (2007) Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-band interpopulational polymorphism. *Hereditas* 144: 206-212.
- Anderson, K. (1991) Chromosome evolution in Holoartic treefrogs. *In*: Green, D.M. & Sessions, S.K. (eds). *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, San Diego, pp. 299-331.
- Babu, A. & Verma, R.S. (1987) Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* 108: 115-128.
- Batistic, R.F.; Beçak, M.L. & Vizotto, L.D. (1969) Variação cromossômica no gênero *Pseudopaludicola* (Anura). *Ciênc. Cult.* 21: 260.
- Batistic, R.F. (1970) Estudo cromossômico e mecanismos de especiação em *Pseudopaludicola* (Leptodactylidae, Anura). Mestrado em Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 57 pp.

- Batistic, R.F.; Beçak, M.L.; Beçak, W. & Vizotto, L.D. (1970) Especiação e variação cariotípica em *Pseudopaludicola* (Amphibia, Anura). Res. XXII Reunião Anual da SBPC, E-72, 117
- Baverstock, P.R.; Adams, M.; Polkinghorne, R.W. & Gelder, M. (1982) A sex-linked enzyme in birds: Z-chromosome conservation in dosage gene compensation. *Nature* 296: 763-766.
- Beçak, M.L. (1968) Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia* 21: 191-208.
- Beçak, M.L.; W. Beçak & M.N. Rabello, (1967) Further studies on polyploid amphibians (Ceratophryidae) I. Mitotic and meiotic aspects. *Chromosoma* 22:192-201.
- Bogart, J.P. (1967). Chromosomes of the South American amphibian family Ceratophryidae with a reconsideration of the taxonomic status of *Odontophrynus americanus*. *Can J Genet Citol* 9:531-542.
- Bogart, J.P. (1973) Evolution of Anuran karyotypes. *In*: Vial, J.L. (ed.) *Evolutionary biology of the anurans*. Columbia Univ. Missouri Press, pp. 337-349.
- Bogart, J.P. (1981) Chromosomes studies in *Sminthillus* from Cuba and *Eleutherodactylus* from Cuba and Puerto Rico (Amphibia: Leptodactylidae). *Life Sci. Contr. R. Ont. Mus.* 129: 1-22.
- Bogart, J.P. (1991) The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. *In*: Green, D.M. & Sessions, S.K. (eds), *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, pp. 233-258.
- Bogart, J.P. & Hedges, S.B. (1995) Rapid chromosome evolution in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *J. Zool. Lond.* 235: 9-31.

- Brum, N. & Saez, F.A. (1968) Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Experientia* 24: 969.
- Brown, S.W. (1966) Heterochromatin. *Science* 151: 417-425.
- Busin, C.S. (2005) Estudo citogenético dos gêneros *Pseudis* e *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae). Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 87 pp.
- Busin, C.S.; Vinciprova, G.; & Recco-Pimentel, S.M. (2001) Chromosomal rearrangements as a source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica* 110: 131-141.
- Busin, C.S.; Andrade, G.V.; Bertoldo, J.; Del-Grande, M.L.; Uetanabaro, M. & Recco-Pimentel, S.M. (2008) Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genetica* 133: 119-127.
- Bull, J. (1983) Evolution of sex chromosome mechanisms. Benjamin Cummings, California, pp. 295.
- Buyts, C.H.C.M. & Osing, J. (1980) Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide group at chromosomal nucleolus organizing region. *Chromosoma* 77: 1-11.
- Cabrero, J.; Navas-Castillo, J.; & Camacho, J.P.M. (1986) Effects of supernumerary chromosome segments on the activity of nucleolar organizer regions in the *Chorthippus binotatus*. *Chromosoma* 93: 375-380.
- Cannatella, D.C. & Duellman, W.E. (1984) Leptodactylid frogs of the *Physalaemus postulosus* group. *Copeia* 4: 902 – 921.
- Cuevas, C.C., & Formas, J.R. (1996) Heteromorphic sex chromosomes in *Eupsophus insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Chrom. Res.* 4: 467-470.

- Duellman, W.E.; & Trueb, L. (1994) Biology of Amphibians. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, pp. 696.
- Emerson, S.R.; Richards, C.; Drewers, R.C. & Kjer, K.M. (2000) On the relationship among ranoid frogs: a review of the evidence. *Herpetologica* 56: 209-230.
- Faivovich, J.; Haddad, C.F.B.; Garcia, P.C.; Frost, D.R.; Campbel, J.A. & Wheeler, W.C. (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. Amer. Mus. 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. (2004) Amphibian species of the world: an online reference. V 3.0 (22 August, 2004) Electronic database available at: research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D.R. (2008) Amphibian species of the world: an online reference. V 5.2 (15 July, 2008) Electronic database available at: research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; de Sá, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M. & Wheeler, W.C. (2006) The amphibian tree of life. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 297: 1-370.
- Goessens, G. (1984) Nucleolar Structure. *Int. Rev. Cytol.* 87: 107-58.
- Goodpasture, C. & Bloom, S.E. (1975) Visualization of nucleolar organizer regions in Mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.

- Giaretta, A.A. & Aguiar-Jr., O. (1998) A new species of *Megaelosia* from the Mantiqueira Range, Southeastern Brazil. *J. Herpetol.* 32: 80-83.
- Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P. Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, D.B.; Noonan, B.P.; Schargel, W.E. & Wheeler, W.C. (2006) Phylogenetic systematics of dart poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 299: 1-262.
- Green, D.M. (1988a) Cytogenetics of the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*: an extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex chromosome system. *Chromosoma* 97: 55-70.
- Green, D.M. (1988b) Heteromorphic sex chromosomes in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zealand. *J. Hered.* 79: 165-169.
- Green, D.M. & Sharbel, T.F. (1988) Comparative cytogenetics of the primitive frog, *Leiopelma archeyi* (Anura, Leiopelmatidae). *Cytogent. Cell Genet.* 47: 212-216.
- Green, D.M. & Cannatella, D.C. (1993). Phylogenetic significance of the amphicoelous frogs Ascaphidae and Leiopelmatidae. *Ecol. Ethol. Evol.* 5: 223-245.
- Green, D.M. (2002). Chromosome polymorphism in Archey's Frog (*Leiopelma archeyi*) from New Zealand. *Copeia* 1: 204-207.
- Grewal, S.I. & Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 8 (1): 35-46.
- Haddad, C.F.B. & Cardoso, A.J. (1987). Taxonomia de três espécies de *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae). *Pap. Av. Zool.* 36 (24): 287-300.
- Hayes, T.B. (1998) Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp. Zool.* 281: 373-399.
- Heitz, E. (1928). Das heterchromatin der Moose. I. *Jabet. Wiss. Bot.* 69: 762-818.

- Henderson, A.S.; Warburton, D. & Atwood, K.C. (1972) Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Nat. Acad. Sci* 69: 3394-98.
- Henning, W. (1999) Heterochromatin. *Chromosoma* 108: 1-9.
- Heyer, W.R. (1974) Relationships of the *marmoratus* species group (Amphibia, Leptodactylidae) within the subfamily Leptodactylinae. *Contr. Sci. Nat. Hist. Mus. Los Angeles Country* 253: 1-45.
- Heyer, W.R. (1975) A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog Family Leptodactylidae. *Smithsonian Contr. Zool.* 199: 1-55.
- Hilliker, A.J.; Appels, R. & Schalet, A. (1980) The genetic analysis of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Cell* 21: 607-619.
- Hillis, D.M. (1987) Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 23-42.
- Hillis, D.M. & Green, D.M. (1990) Evolutionary changes of heterogametic sex and sex-determination systems in phylogenetic history of amphibians. *J. Evol. Biol.* 3: 49-64.
- Hillis, D.M.; Ammerman, L.K.; Dixon, M.T. & De Sá, R. (1993) Ribosomal DNA and the phylogeny of frogs. *Herpetol. Monogr.* 7: 118-131.
- Holmquist, G. (1979) The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination. *Chromosoma* 72: 203-224.
- Howell, W.M. (1977) Visualization of ribosomal gene activity: silver staining proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* 62: 361-367.
- Howell, W.M.; Denton, T.E. & Diamond, J.R. (1975) Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* 31: 260-262.

- Howell, W.M. & Black, D. A. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Iturra, P. & Veloso, A. (1989) Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. *Genetica* 78: 25-31.
- Jones, K.W. & Singh, L. (1981) Conserved repeated DNA sequences in vertebrates sex chromosomes. *Chrom. Today* 8: 241-255.
- Kaiser, H.; Mais, C.; Bolan s, F. & 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.
- Kasahara, S.; Silva, A. P. Z.; Gruber, S. L.; Haddad, C. F. B. (2003) Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae), from Brazil. *Citogenet. Gen. Res.* 103: 155-162.
- King, M. (1980) C-banding studies on Australian *Hylid* frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191-217.
- King, M. (1988) The inter-relationship of G-banding, C-banding pattern and nucleolus organizer structure in anuran amphibians. *Kew Chromosome Conference* 111 (P.E. Brandam, ed.), pp. 51-63.
- King, M. (1991) The evolution of the amphibian genome. *In*: Green, D.M. & Sessions, S.K. (ed) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Academic Press, San Diego, pp. 359-391.
- King, M.; Contreras, N. & Honeycutt, R.L. (1990) Variation within and between nucleolar regions in Australian *Hylid* frogs (Anura) shown by 18S and 28S *in situ* hybridization. *Genetics* 80: 17-29.

- Kuramoto, M. & Allison, A. (1989) Karyotypes of microhylid frogs of Papua New Guinea and their systematic implication. *Herpetologica* 45: 250-259.
- Laurent, R.F. (1986). Sous classe des Lissamphibiens (*Lissamphibia*) systématique. In: *Traité de Zoologie*. T. XIV fasc. IB, P. P. Grassé, M. Delsol (ed.) Masson, Paris. pp. 594-797.
- Li, W.H. & Graur, D. (1991) *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Mass.
- Lobo, F. (1992) Distribución y lista de localidades de *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae) en la República Argentina. *Cuad. Herp.* 7: 30-37.
- Lobo, F. (1994) Descripción de una nueva especie de *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae), redescrípción de *P. falcipes* (Hensel, 1887) y *P. saltica* (Cope, 1867) y osteología de las tres especies. *Cuad. Herp.* 8: 177-199.
- Lobo, F. (1995) Análisis filogenéticos del género *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae). *Cuad. Herp.* 9: 21-43.
- Lobo, F. (1996) Evaluación del status taxonómico de *Pseudopaludicola ternetzi* Miranda Ribeiro, 1937 y *P. mystacalis* (Cope, 1887). Osteología y distribución de las dos especies. *Acta Zool. Lilloana* 43: 327-346.
- López-Léon, M.D.; Cabrero, J. & Camacho, J.P.M. (1995) Changes in NOR activity pattern in presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genome* 38: 68-74.
- Lourenço, L.B. (2001) Estudo citogenético e do DNA ribossomal de *Paratelmatobius* e *Scythrophrys* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 124 pp.

- Lourenço, L.B.; Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1998) Polymorphisms of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. 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: 724-731.
- Lourenço, L.B.; Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2000) Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae) with phylogenetic comments. Hereditas 133: 201-209.
- Lourenço, L.B.; Garcia, P.C.A. & Recco-Pimentel S.M. (2003a) Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* and new insights into the relationship with *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae). Ital. J. Zool. 70: 183-190.
- Lourenço, L.B.; Garcia, P.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003b) Cytogenetics of a new species of the *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae) with the description of an apparent case of pericentric inversion. Amphibia-Reptilia 24 (1): 47-55.
- Lynch, J.D. (1971) Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ. 53: 1-238.
- Lynch, J. D. (1989) A review of the leptodactylid frogs of the genus *Pseudopaludicola* in northern South America. Copeia 3: 577-588.
- Medeiros, L.R.; Rossa-Feres, D.C. & Recco-Pimentel, S.M. (2003) Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae), with description of NOR polymorphism in *H. nana*. J. Hered. 94: 149-154.

- Mello, A.S.; Giaretta, A.A.; Recco-Pimentel, S.M. (1995) The karyotype of the stream dwelling frog *Megaelosia massarti* (Anura, Leptodactylidae, Hyloinae). *Cytologia* 60: 49-52.
- Mello, M.L.S. (2007) Nucléolo. *In*: Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. A célula. Ed. Manole, São Paulo, pp. 144-153.
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C. (2007) Cromatina e cromossomos. *In*: Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. A célula. Ed. Manole, São Paulo, pp.128-143.
- Milstead, W.W. (1963) Notes on Brazilian frogs of the genera *Physalaemus* and *Pseudopaludicola*. *Copeia* 1: 565-566.
- 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) Hypotheses on the phylogeny of Salientia, based on karyological data. *Experientia* 24: 964-966.
- Morescalchi, A. (1973) Amphibia. *In*: Chiarelli, A.; Capanna, E. (eds). *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, New York. pp. 233-248.
- Nascimento, L.B.; Caramaschi, U. & Cruz, C.A.G. (2005) Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro* 63: 297-320.
- Nuin, P.A.S. (2002) Análise preliminar das relações de parentesco da subfamília Hyloinae (Anura, Leptodactylidae). Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 185 pp.

- Odierna, G.; Vences, M.; Aprea, G.; Lötters, S. & Andreone, F. (2001) Chromosome data for Malagasy poison frogs (Amphibia: Ranidae: *Mantella*) and their bearing in taxonomy and phylogeny. *Zool Sci* 18: 505-514.
- Odierna, G.; Aprea, G.; Capriglione, T.; Castellano, S. & Balleto, E. (2007) Cytological evidence for population-specific sex chromosome heteromorphism in Palearctic green toads (Amphibia, Anura). *J. Biosci.* 32: 763-768.
- Ogata, M.; Ohtani, H.; Igarashi, T.; Hasegawa, Y.; Ichikawa, Y. & Miura, I. (2003) Change of the heterogametic sex from male to female in the frog. *Genetics* 164: 613-620.
- Ohno, S. (1967) Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer, Berlin/ Heidelberg, New York. 192 p.
- Olert, J. (1979) Interphase studies with a simplified method of silver staining of nucleolus. *Experientia* 35: 283-285.
- Pardue, M.L. & Gall, J.G. (1970) Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-1358.
- Pardue, M.L. & Henning, W. (1990) Heterochromatin: junk or collectors items? *Chromosoma* 100: 1-7.
- Pough, F.H.; Heiser, J.B. & McFarland, W.N. (2003) A vida dos vertebrados. 3 ed., Atheneu, São Paulo. 699 p.
- Quinderé, Y.R.D.S. (2007) Citogenética de populações e espécies de *Physalaemus* do grupo "cuvieri" (Anura, Leiuperidae). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 87 pp.

- 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.
- Reuter, G. & Spierer, P. (1992) Position effect variegation and chromatin protein. *Biossays* 14: 605-612.
- Ryuzaki, M.; Hanada, H.; Okumoto, H.; Takizawa, N. & Nishioka, M. (1999) Evidence for heteromorphic sex chromosome in males of *Rana tagoi* and *Rana sakuraii* in Nishitama district of Tokyo (Anura: Ranidae). *Chrom. Res.* 7: 31-42.
- Saez, F.A. & Brum, N. (1960) Chromosomes of South American Amphibians. *Nature* 185: 950.
- Schempp, W. & Schmid, M. (1981) Chromosome banding in Amphibia VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/ XY sex chromosome in *Rana esculenta*. *Chromosoma* 83: 697-710.
- Schmid, M. (1978a) Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-368.
- Schmid, M. (1978b) Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Cromosoma* 68: 131-148.
- Schmid, M. (1980a) Chromosome banding in amphibia IV. Differentiation of CG- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103.
- Schmid, M. (1980b) Chromosome banding in Amphibia V. Highly differentiated ZW/ZZ Sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Chromosoma* 80: 69-96.

- Schmid, M. (1982) Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-44.
- Schmid, M.; Sims, S.H.; Haaf, T. & McGregor, H.C. (1986) Chromosome Banding in Amphibia X. 18S and 28S ribosomal. RNA genes, nucleolus organizers and nucleolus in *Gastrotheca riobombae*. *Chromosoma* 94: 139-145.
- Schmid, M.; Steilein, C.; Feichtinger, W.; de Almeida, C.G. & Duellman, D.E. (1988) Chromosome banding in Amphibia XIII. Sex chromosome, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs. *Chromosoma* 97: 33-42.
- Schmid, M.; Steinlein, C.; Nanda, I. & Epplen, J.T. (1990) Chromosome banding in Amphibia. *In*: Olmo, E. (ed). *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Birkhäuser Verlag Basel, Berlin, pp 21-45.
- Schmid, M.; Nanda, I.; Steilein, C.; Kausch, K.; Haaf, T. & Epplen, J. (1991) Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. *In*: Green, D.M. & Sessions, S.K. (eds.). *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, San Diego, pp. 393-430.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Weimer, R.; Mais, C.; Bolaños, F. & León, P. (1995) Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 69:18-26.
- Schmid, M. & Steilein, C. (2001) Sex chromosomes, sex-linked genes and sex determination in the vertebrate class Amphibia. *In*: Scherer, G. & Schmid, M. (eds), *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. Birkhäuser, Basel, pp. 143-176.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Nanda, I.; Mais, C.; Haaf, T.; Visbal-Garcia, R. & Fernandez Badillo, A. (2002a) Chromosome banding in Amphibia XXII. Atypical Y chromosomes in *Gastrotheca walkeri* and *Gastrotheca ovifera* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Gen. Res.* 96: 228-238.

- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Rupprecht, A.; Haaf, T. & Kaiser H. (2002b) Chromosome banding in Amphibia XXIII. Giant W sex chromosome and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet. Gen. Res.* 97: 81-94.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Haaf, T.; Scharl, M.; Visbal Garcia, R.; Manzanilla Pupo, J. & Fernandez Badillo, A. (2002c) Chromosome banding in Amphibia XXVI. Coexistence of homomorphic XY sex chromosome and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet. Gen. Res.* 99: 330-343.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Visbal Carcía, R. & Fernandez Badillo, A. (2003a) Chromosome banding in Amphibia XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet. Gen. Res.* 101: 62-73.
- Schmid, M. & Steilein, C. (2003) Chromosome banding in Amphibia XXIX. The primitive XY/XX sex chromosome of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Gen. Res.* 101: 74-79.
- Schwarzacher, H.G. & Wachetler, F. (1993) The nucleolus. *Anat. Embryol.* 188: 515-536.
- Singh, L.; Purdom, I.F. & Jones, K.W. (1976) Satellite DNA and evolution of chromosomes. *Chromosoma* 59: 43-62.
- Silva, A.P.Z.; Haddad, C.F.B. & Kasahara, S. (1999) Nucleolus organizer regions in *Physalemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas* 131: 135-141
- Silva, A.P.Z.; Haddad, C.F.B.; Galassi, G.G. & Kasahara, S. (2006) Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analysis. *Genetica* 127: 35-44

- Siqueira, S.; Ananias, F. & Recco-Pimentel, S.M. (2004) Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocation in *E. binotatus*. Gen. Mol. Biol. 27: 363-372
- Smith, A. & Benavente, R. (1995) An Mr 51,000 protein of mammalian spermatogenic cells that is common to the whole XY body and centromeric heterochromatin of autosomes. Chromosoma 103: 591-596.
- Spofford, J.B. (1976) Position-effect variegation in *Drosophila*. In: Ashburner, M. & Novitsky, E. (eds.), The genetics and biology of *Drosophila*, v. 1, Academic Press, London, pp. 955-1018.
- Sumner, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75: 304-306.
- Sumner, A.T. (1990) C-banding and related methods. 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) Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. In: Green, D.M. & Sessions, S.K. (eds). Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic Press, San Diego, pp. 259-294.
- 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.

- Veiga-Menoncello, A.C.P.; Stüssmann, C.; Lima, A.P.; Recco-Pimentel, S.M. (2006) Chromosomal study of *Colostethus brunneus* from type locality and two related species (Anura, Dendrobatidae). *Genetica* 126: 179-187.
- Vieira, K. S.; Silva, A. P. Z.; Arzabe, C. (2006) Cranial morphology and karyotypic analysis of *Ceratophrys joazeirensis* (Anura: Ceratophryidae, Ceratophryinae): taxonomic considerations. *Zootaxa* 1320: 57-68.
- Wallace, H.; Badawy, G.M.I. & Wallace, B.M.N. (1999) Amphibian sex determination and reversal. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 901-909.
- Weiler, K.S. & Wakimoto, B.T. (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Rev. Genet.* 29: 577-605.
- 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 chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. *Chromosoma* 97: 481-487.
- Wiley, J.E. (2003) Replication banding and FISH analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. *Cytogenet. Gen. Res.* 101: 80-83.

2. ARTIGO

Estudo cromossômico de *P. canga*, *P. mineira* e *P. saltica* e de cinco populações de *Pseudopaludicola* sp. (Anura, Leiuperidae), com a descrição de cromossomos sexuais heteromórficos XX/XY em *P. saltica*

Thiago Cellin Duarte¹, Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello ¹, Janaína Ferreira dos Reis Lima², Maria Lúcia Del-Grande³, Christine Strüssmann⁴, Ariovaldo Antonio Giaretta⁵, Emiliane Gonçalves Pereira⁶ & Shirlei Maria Recco-Pimentel^{1*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil;

² Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil;

³ Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Vitória da Conquista, Bahia, Brasil;

⁴ Departamento de Produção Animal, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Mato Grosso, Brasil;

⁵ Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

⁶ Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

Palavras-chave: Ag-NOR, Banda-C, cariótipo, cromossomos sexuais, evolução cromossômica, *Pseudopaludicola*.

Título curto: Citogenética de *Pseudopaludicola*

*Autor para correspondência: fax 55-19-35216111; E-mail: shirlei@unicamp.br

Resumo

No gênero *Pseudopaludicola*, mudanças taxonômicas freqüentes têm ocorrido em função da grande semelhança morfológica de seus exemplares. No presente trabalho foram analisadas algumas espécies provenientes da localidade-tipo e algumas populações de *Pseudopaludicola* sp. As metáfases, obtidas a partir de suspensões de células de epitélio intestinal e testículo, foram coradas com Giemsa ou submetidas às técnicas de impregnação por prata (Ag-NOR) e bandamento C. *Pseudopaludicola mineira* (Serra do Cipó, MG), *Pseudopaludicola* sp.1 (Andaraí, BA), *P. saltica* de duas populações (Chapada dos Guimarães e Uberlândia) e *Pseudopaludicola* aff. *saltica* (Rio Claro, SP) apresentaram $2n=22$ cromossomos. As duas populações de *P. saltica* apresentaram o par 8 heteromórfico, caracterizando um sistema de determinação do sexo do tipo XX/XY, sendo o X telocêntrico e o Y submetacêntrico, ambos portadores da NOR, enquanto em *Pseudopaludicola* aff. *saltica* o par 8 apresentou-se telocêntrico heteromórfico em tamanho, e apenas o homólogo maior apresenta marcação Ag-NOR positiva e um bloco de heterocromatina. Os dados citogenéticos permitiram diferenciar *P. mineira* e *Pseudopaludicola* sp.1 das demais espécies de 22 cromossomos já cariotipadas, e sugerir que *Pseudopaludicola* sp.1 possa ser uma nova espécie. *Pseudopaludicola canga*, *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* apresentaram cariótipos idênticos com $2n=18$ cromossomos. *Pseudopaludicola canga* e *Pseudopaludicola* sp.2 diferiram das demais pela localização da NOR e pela presença de uma banda heterocromática no par 2. Devido à grande similaridade dos cariótipos com $2n=18$ cromossomos, foi sugerido que *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* possam pertencer ao grupo “pusilla”, o mesmo grupo em que se encontra *P. canga*. Os dados mostraram ainda que *Pseudopaludicola* sp.2 (Barreirinhas, MA) é citogeneticamente idêntica a *P. canga* e que os espécimes de *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* ($2n=18$), apesar das semelhanças morfológicas, não são proximamente relacionados à *P. falcipes* ($2n=22$). Os resultados obtidos relatam o primeiro caso de cromossomos sexuais heteromórficos no gênero e indicam a necessidade de uma extensa revisão taxonômica em *Pseudopaludicola*.

Introdução

O gênero *Pseudopaludicola* Miranda Ribeiro, 1926, atualmente pertencente à família Leiuperidae (Grant *et al.*, 2006), é constituído por 12 espécies (Frost, 2008). Este gênero se distribui amplamente pela América do Sul, desde o norte da Colômbia até a Argentina, incluindo regiões brasileiras onde nove espécies são reconhecidas (Lobo, 1992; Frost, 2008). As espécies são extremamente pequenas, com tamanhos inferiores a 20 mm, muito parecidas morfologicamente e com algumas espécies vivendo em simpatria (Lobo, 1992).

Recentemente, algumas mudanças taxonômicas envolveram o gênero. De acordo com Frost *et al.* (2006) *Pseudopaludicola* pertencia à família Leptodactylidae, assim como os gêneros *Pleurodema*, *Edalorhina*, *Physalaemus*, *Paratelmatobius*, *Scythrophrys*, *Adenomera*, *Lithodytes*, *Leptodactylus* e *Vanzolinius*. No entanto, Grant *et al.* (2006) propuseram, também com base em análises moleculares, uma nova estruturação para a família Leptodactylidae, atualmente constituída por apenas quatro gêneros, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Paratelmatobius* e *Scythrophrys*. Os outros gêneros foram alocados na família Leiuperidae.

As espécies do gênero *Pseudopaludicola* foram divididas em dois grupos de acordo com características morfológicas: grupo “pusilla” e grupo “falcipes” (Lynch, 1989). Dados comportamentais, de bioacústica, características morfológicas e taxonomia foram exaustivamente estudados (Haddad & Cardoso, 1987; Lynch, 1971, 1989; Lobo, 1992, 1994, 1995, 1996), mas algumas questões envolvendo as relações filogenéticas intra- e intergenéricas e a validação de novas espécies permanecem pouco esclarecidas. Mudanças taxonômicas ocorreram com frequência nos últimos anos e, de acordo com vários autores (por exemplo, Lynch, 1989; Lobo, 1996), revelaram a necessidade de uma ampla revisão para melhor compreender a sistemática do gênero *Pseudopaludicola*.

Dados citogenéticos para o gênero são escassos na literatura e os cariótipos descritos até o momento para *P. falcipes* e *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) (grupo “falcipes”) foram analisados apenas por coloração convencional com Giemsa (Saez & Brum, 1960; Brum & Saez, 1968; Beçak, 1968; Batistic *et al.*, 1969; Batistic, 1970). Apesar de simples, as técnicas utilizadas nestes estudos forneceram informações importantes, como a variação incomum do número de cromossomos em *P. falcipes*, de $2n=16$ a $2n=22$ (Beçak, 1968; Batistic *et al.*, 1969; Batistic, 1970). No entanto, após o recente estudo citogenético realizado em *P. falcipes* da

localidade-tipo (2n=22) (Fávero *et al.*, em preparação), verificou-se que a variabilidade no número de cromossomos anteriormente descrita para as populações morfológicamente semelhantes e atribuídas à *P. falcipes* por Beçak (1968) e Batistic (1970) tratava-se na verdade de espécies distintas, cujos cariótipos são relacionados aos de outras espécies, como *P. mystacalis* (2n=16), *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887) e *P. ternetzi* (2n=20) (Fávero *et al.*, em preparação).

Considerando que o estudo dos cromossomos pode ser uma ferramenta importante para auxiliar na caracterização de espécies, especialmente as crípticas, no presente trabalho apresentamos novos dados citogenéticos para o gênero *Pseudopaludicola*, com a análise de três espécies obtidas de suas localidades-tipo (*P. mineira* e *P. saltica*, grupo “falcipes” e *P. canga*, grupo “pusilla”). Além dessas espécies, foram analisadas seis populações de localidades distintas do Brasil, algumas delas com suspeita de serem espécies novas, buscando contribuir para o melhor entendimento da sistemática do gênero. Adicionalmente, descrevemos o primeiro caso de cromossomos sexuais heteromórficos no gênero *Pseudopaludicola*.

Material e métodos

Espécimes

Todos os espécimes analisados (Tabela 1) foram coletados com permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – processo no. 02001.002003/2005-16). Os testemunhos foram depositados no Museu de Zoologia “Prof. Adão José Cardoso” (ZUEC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil. O mapa da Figura 1 indica o local de coleta dos espécimes estudados.

Preparações cromossômicas e técnicas empregadas

Metáfases mitóticas foram obtidas de suspensão de células do epitélio intestinal e do testículo, de animais previamente tratados com uma solução de 2% de colchicina durante 5 horas, conforme descrito por King & Rofe (1976) e Schmid (1978), com modificações. As metáfases foram coradas com Giemsa 10% ou submetidas às técnicas de impregnação por prata (método Ag-NOR) (Howell & Black, 1980) e Bandamento C (Sumner, 1972), com

pequena modificação no pré-tratamento das lâminas que foram submetidas a uma solução de 50% de ácido acético, de acordo com Siqueira *et al.* (em preparação).

As lâminas foram examinadas ao fotomicroscópio Olympus BX60, e as imagens foram capturadas usando-se os softwares QCapture 2.81.0 e Image Pro-plus 4.5. Os cromossomos foram medidos e classificados de acordo com Green & Sessions (1991) (Tabela 2).

Resultados

Os espécimes estudados no presente trabalho apresentaram cariótipos constituídos por $2n=22$ ou $2n=18$ cromossomos.

Cariótipos $2n=22$

As espécies *Pseudopaludicola mineira*, *Pseudopaludicola* sp.1 de Andaraí, as duas populações de *P. saltica* e *Pseudopaludicola* aff. *saltica* apresentaram $2n=22$ cromossomos. Os cariótipos dessas espécies diferiram apenas na morfologia dos pares 6, 7, 8 e 11 (Tabelas 2 e 3; Fig. 2).

A região organizadora do nucléolo (NOR) foi detectada na porção telomérica do braço longo do par 8 da maioria das populações (Fig. 3). Porém, em *Pseudopaludicola* sp.1 a NOR foi detectada intersticialmente próxima ao telômero do braço longo desse mesmo par (Fig. 3B). Com exceção de *P. mineira* e de 2 indivíduos (ZUEC 14255 e 14266) de *Pseudopaludicola* sp.1, a NOR apresentou-se heteromórfica em todos os indivíduos analisados (Fig. 3B – E). Esse heteromorfismo da NOR levou a uma diferença de tamanho entre os cromossomos homólogos do par 8, especialmente nas populações de *Pseudopaludicola* sp.1 (Fig. 2B) e *Pseudopaludicola* aff. *saltica* (Fig. 2E), tendo sido identificados como 8 e 8' nesses casos.

A técnica de bandamento C evidenciou blocos heterocromáticos na região centromérica de todos os cromossomos. *Pseudopaludicola mineira* apresentou bandas pericentroméricas nos braços longos e curtos do par 1, nos braços curtos dos pares 2 e 7 e nos braços longos dos pares 9 e 10 (Fig. 4A). Bandas intersticiais foram ainda observadas em ambos os braços do par 8, sendo a do braço longo associada à constrição secundária e coincidente com a NOR. Em *Pseudopaludicola* sp.1 foram observados blocos intersticiais de

heterocromatina nos braços curtos e longos do par 1 e nos braços longos dos pares 8 e 9 (Fig. 4B). No par 8 esse bloco foi detectado adjacente a uma constrição secundária NOR positiva.

As duas populações de *Pseudopaludicola saltica* analisadas, da Chapada dos Guimarães, MT (localidade-tipo) e de Uberlândia, MG, apresentaram cariótipos idênticos (Tabelas 2 e 3; Figs. 2C e 2D, respectivamente), constituídos por cromossomos metacêntricos (pares 1, 2, 5, 7, 9, 10 e 11) e submetacêntricos (pares 3, 4 e 6). O par 8, portador da NOR, apresentou diferenças quanto à morfologia dos homólogos nos machos, sendo um deles telocêntrico e o outro submetacêntrico (XY) (Figs. 2C e 2D; 3C e D). Nas fêmeas, ambos são telocêntricos (XX) (Figs. 2C e 2D; 3D). *Pseudopaludicola* aff. *saltica* apresentou cariótipo muito parecido com o das duas populações de *P. saltica*, porém com ausência de cromossomos sexuais heteromórficos nos machos (Fig. 2E). Os homólogos do par 8, telocêntricos em ambos os sexos, apresentaram um heteromorfismo marcante de tamanho, sendo a marcação Ag-NOR visível somente no homólogo maior do par (Fig. 3E). Tanto em *P. saltica* quanto em *Pseudopaludicola* aff. *saltica*, além das bandas heterocromáticas centroméricas foram detectadas bandas C positivas nas regiões intersticiais dos braços longos dos pares 1, 2, 3, 4 e 6 e nos braços curtos dos pares 1 e 2. (Fig. 4C– E). Em *P. saltica* foi observada a presença de uma banda no braço longo do par 8, a qual mostrou um heteromorfismo de tamanho nas fêmeas coincidente com a NOR (Figs. 4C e 4D), mas com intensidade de marcação mais fraca e de cor azulada, se comparada aos outros blocos de heterocromatina magenta intensamente corados

A única fêmea da população de *P. saltica* da localidade-tipo apresentou uma diferença entre os homólogos do par 8, devido à presença de um heteromorfismo de tamanho da constrição secundária, banda C positiva, localizada no braço longo, coincidente com a NOR (Fig. 5A). Em machos, o cromossomo submetacêntrico (Y) apresentou tamanho relativo um pouco maior que o cromossomo telocêntrico (X) (Fig. 5B e Tabela 2). No entanto, no indivíduo 248.5 o cromossomo X apresentou-se maior que o Y, sendo constatado nesse caso um aumento também da marcação por prata (Ag-NOR) e do bloco de heterocromatina (Fig. 5C).

No intuito de verificar o comportamento meiótico dos cromossomos sexuais em *P. saltica* foram analisados cromossomos em diacinese de células do testículo, corados com Giemsa (Fig. 6A) e submetidos à técnica de Banda C (Fig. 6B). Observou-se a presença de 11

bivalentes, sem nenhuma diferença no comportamento esperado dos homólogos nessa fase da meiose.

Cariótipos com 2n=18

Pseudopaludicola canga, *Pseudopaludicola* sp.2 de Barreirinhas, *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* e *Pseudopaludicola* sp.3 de Uberlândia apresentaram cariótipo com 2n=18 sem nenhuma diferença na classificação dos cromossomos, sendo os pares 1, 2, 5 e 6 metacêntricos, os pares 3, 4 e 9 submetacêntricos e os pares 7 e 8 telocêntricos (Tabela 2; Fig. 7). Em todas as populações analisadas, o braço longo de um dos homólogos do par 3 apresentou um discreto heteromorfismo de tamanho, o qual não alterou a classificação desse par (Tabela 2).

A NOR foi localizada na região pericentromérica dos braços curtos do par 3 em *P. canga* e em *Pseudopaludicola* sp.2 (Fig. 8A e B), próxima ao telômero dos braços longos do par 9 em *Pseudopaludicola* sp.3 (Fig. 8C) e na região telomérica dos braços longos do mesmo par em *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* (Fig. 8D).

As quatro populações apresentaram um padrão de bandamento C muito semelhante, com poucos blocos heterocromáticos não centroméricos. Uma banda C foi detectada no braço curto do par 1 em todas as populações e apenas *P. canga* e *Pseudopaludicola* sp.2 apresentaram o bloco heterocromático localizado na região pericentromérica dos braços longos do par 2 (Fig. 9).

Discussão

As espécies *P. mineira* e *P. saltica* (localidade-tipo) e as populações de *P. saltica* de Uberlândia, *Pseudopaludicola* sp.1 e *Pseudopaludicola* aff. *saltica* apresentaram cariótipos com 2n=22.

Embora os cariótipos sejam bastante conservados, a morfologia dos cromossomos 7, 8 e 11 permitiu distinguir *P. mineira* de *Pseudopaludicola* sp.1. Além disso, essas espécies puderam ser diferenciadas pela localização da NOR no par 8, terminal em *P. mineira* e sub-terminal em *Pseudopaludicola* sp.1, além de diferenças na distribuição da heterocromatina.

Pseudopaludicola saltica de Uberlândia não diferiu da população da localidade-tipo, Chapada do Guimarães, confirmando ser a mesma espécie. Nessas populações, a morfologia

do par 8 diferiu entre machos e fêmeas, indicando a ocorrência de cromossomos sexuais no sistema XX/XY, sendo esse o primeiro caso no gênero *Pseudopaludicola*. No entanto, a população de *Pseudopaludicola* aff. *saltica* apresentou cariótipo muito parecido com o de *P. saltica*, com todos os pares morfológicamente semelhantes, à exceção do oitavo, o qual tanto em machos quanto fêmeas apresentou ambos os cromossomos telocêntricos, porém com heteromorfismo de tamanho, sendo que a NOR e o bloco de heterocromatina só foram detectados no cromossomo maior do par 8. Possivelmente, o surgimento desse heteromorfismo de tamanho entre os homólogos originou-se da ocorrência de *crossing-over* desigual envolvendo o segmento portador da NOR.

Embora os cariótipos de *Pseudopaludicola saltica* da Chapada dos Guimarães e de Uberlândia, e de *Pseudopaludicola* aff. *saltica* sejam muito semelhantes, quanto à morfologia dos cromossomos, à localização da NOR no mesmo par e mesmo padrão de distribuição de heterocromatina, a diferença na morfologia do par 8 permite sugerir que *Pseudopaludicola* aff. *saltica* seja uma espécie distinta, porém muito proximamente relacionada à *P. saltica*. A diferenciação do par 8 pode ser uma das variações envolvidas no processo de especiação no gênero, uma vez que a NOR também está localizada nesse par em outras espécies do gênero com 22 cromossomos, como *P. mineira*, *Pseudopaludicola* sp.1 (presente trabalho) além de *P. falcipes* e *Pseudopaludicola* sp. de Poconé (MT) estudados por Fávero *et al.* (em preparação).

Como mencionado acima, em *Pseudopaludicola* o cariótipo com $2n=22$ cromossomos foi descrito em outra espécie, *P. falcipes*, proveniente da região de Porto Alegre (RS), localidade-tipo, e para uma população de *Pseudopaludicola* sp. de Poconé (MT), as quais apresentam cariótipos muito parecidos (Fávero *et al.*, em preparação). Ao compararmos os cariótipos dessas duas populações com os das espécies de $2n=22$ estudadas no presente trabalho, verificam-se diferenças significativas na morfologia dos pares 3 e 8. Em todas essas espécies o par 8 é o portador da NOR e apresenta um bloco de heterocromatina associado a essa região. Porém, em *P. falcipes* a NOR localiza-se próximo ao centrômero no braço longo do cromossomo 8 subtelocêntrico (Fávero *et al.*, em preparação). Os dados sugerem que modificações envolvendo a região organizadora do nucléolo e, possivelmente, a heterocromatina possam estar relacionadas às mudanças na estrutura desse par cromossômico e ter contribuído para a diferenciação cariotípica também nessas espécies. Batistic (1970) observou um cariótipo de 22 cromossomos também para uma população atribuída a

Pseudopaludicola falcipes de Feira de Santana (BA), entretanto, não há dados suficientes para uma comparação interespecífica, uma vez que a autora apresenta apenas metáfases meióticas e relatou somente o número de cromossomos.

As espécies *P. canga*, *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* apresentaram cariótipos idênticos com $2n=18$ cromossomos, porém as duas primeiras podem ser distinguidas das duas últimas pela localização da NOR e pela presença de uma banda no cromossomo 2. *Pseudopaludicola canga* é a primeira espécie do grupo “pusilla” a ser cariotipicamente estudada. Em decorrência dos cariótipos das espécies de *Pseudopaludicola* supracitadas terem em comum 18 cromossomos, os quais são morfológicamente muito semelhantes, podemos sugerir que estas populações estejam diretamente relacionadas à *P. canga* e que possam pertencer ao grupo “pusilla”. No entanto, um estudo filogenético envolvendo espécies de ambos os grupos, grupo “falcipes” e grupo “pusilla”, se faz necessário para suportar essa hipótese.

De acordo com Giaretta & Kokubum (2003), *P. canga* é conhecida apenas em sua localidade-tipo, Serra dos Carajás (PA). No entanto, *Pseudopaludicola canga* e *Pseudopaludicola* sp.2 (Barreirinhas, MA) não puderam ser citogeneticamente diferenciadas, não descartando a possibilidade de se tratar do mesmo táxon, o que ampliaria a distribuição geográfica de *P. canga*. Porém, estudos morfológicos e de bioacústica serão necessários para corroborar essa hipótese, já que foram previamente consideradas distintas (G. A. Vasconcelos, informação pessoal). Da mesma forma, os cariótipos de *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* não diferiram entre si, o que também sugere que os exemplares dessas duas populações possam ser da mesma espécie. Apesar da população de Icém ter sido designada *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* ($2n=18$) por apresentar semelhanças morfológicas com *P. falcipes* ($2n=22$), os dados cromossômicos mostraram que essa população é proximamente relacionada à *P. canga*. Da mesma maneira, o cariótipo $2n=18$ descrito por Beçak (1968) e Batistic (1970) para exemplares provenientes da região de São José do Rio Preto, noroeste do estado de São Paulo, e atribuídos também a *P. falcipes*, é também semelhante ao de *P. canga*. Portanto, os nossos dados sugerem que essas populações sejam na verdade relacionadas à *P. canga*, embora apresentem semelhanças morfológicas à *P. falcipes*. Além desse cariótipo $2n=18$, na região de Icém (SP) são encontrados em simpatria mais dois cariótipos distintos ($2n=16$ e $2n=20$), cujos espécimes também são morfológicamente

semelhantes a *P. falcipes* ($2n=22$), mas citogeneticamente relacionados respectivamente a *P. mystacalis* ($2n=16$) e a *P. ameghini* (*sensu* Cope, 1887), e *P. ternetzi*, ambas com $2n=20$ (Fávero *et al.*, em preparação). Isso demonstra que a grande semelhança morfológica entre os exemplares de *Pseudopaludicola* tem induzido a freqüentes confusões taxonômicas, e reforça a necessidade de uma ampla revisão no gênero.

Em vista dos resultados, podemos sugerir que os cariótipos $2n=18$ cromossomos (provavelmente pertencentes ao grupo “pusilla”) são conservados, pois apresentam morfologia dos cromossomos e padrão de heterocromatina bastante semelhante, mas variáveis em relação ao par portador da NOR. Essa característica permite separar claramente dois grupos: um com NOR no par 3 (*P. canga* e *Pseudopaludicola* sp.2 de Barreirinhas, MA) e outro com NOR no par 9 (*Pseudopaludicola* sp.3 de Uberlândia, MG e *Pseudopaludicola* sp. de Icém, SP).

A variação de número de cromossomos entre espécies de um mesmo gênero, como ocorre em *Pseudopaludicola*, é bastante raro em anuros. Diversos mecanismos de rearranjos cromossômicos, envolvendo eventos de fusão e/ou fissão cêntrica (Beçak, 1968; Bogart, 1973, 1991; King, 1990), foram utilizados para explicar a origem dos cariótipos numericamente diferentes, assim como possíveis estágios evolutivos que levaram a essa variação. Batistic (1970) propôs que mecanismos de fusão possam ter originado cariótipos numericamente distintos em *Pseudopaludicola*, além de outros de rearranjos cromossômicos e sugeriu ainda que a origem destes cariótipos tenha se dado a partir de um cariótipo ancestral de $2n=22$ com uma diminuição progressiva até o cariótipo de $2n=16$.

No presente trabalho foram descritos cariótipos $2n=22$ para *P. mineira*, *Pseudopaludicola* sp.1, *P. saltica* e *Pseudopaludicola* aff. *saltica* e $2n=18$ para *P. canga*, *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*, mas os dados citogenéticos não permitem inferir o mecanismo que ocorreu durante a especiação do grupo.

Cromossomos sexuais em P. saltica

Em *P. saltica* foi observado um par de cromossomos heteromórficos no macho e homomórficos na fêmea, caracterizando um sistema de determinação do sexo do tipo $XX^{\text{♀}}/XY^{\text{♂}}$. Tanto o cromossomo X telocêntrico quanto o Y submetacêntrico são portadores de NOR, a qual é coincidente com um bloco de heterocromatina intersticial.

Cromossomos sexuais heteromórficos são raros em anuros. Os sistemas de determinação do sexo XX/XY, ZZ/ZW e W0/00 são encontrados em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1999), *Pseudis tocantins* (Busin *et al.*, 2008), *Leiopelma hochstetteri* (Green, 1988a; Schmid *et al.*, 1991; Green & Canatella, 1993), *Proceratophrys boiei* (Ananias *et al.*, 2007), entre outros. Sistemas sexuais múltiplos envolvendo pares de cromossomos autossômicos como XXAA♀/XYAA♂/ XAA^Y♂ também são descritos em *Eleutherodactylus maussi* (atualmente *Strabomantis biporcatus*) e *E. riveroi* (atualmente *Pristimantis riveroi*) (Schmid *et al.* 2002a, 2003). Em algumas espécies de anuros os cromossomos sexuais só puderam ser diferenciados após alguma técnica de bandamento cromossômico, como por exemplo, em *Pseudepidalea viridis* (Odierna *et al.*, 2007). Na família Leiuperidae apenas *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1999) apresenta cromossomos sexuais diferenciados. No gênero *Pseudopaludicola* cromossomos sexuais não tinham sido descritos até o momento. Em algumas dessas espécies, cromossomos sexuais são portadores de NOR, como em *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998), *Pseudis tocantins* (Busin *et al.*, 2008) e *Leiopelma archeyi* (Green, 2002).

Iturra & Veloso (1989) e Schmid *et al.* (1991) sugerem que os cromossomos sexuais em anfíbios, assim como em outros vertebrados, tiveram uma origem ancestral autossômica. De acordo com Ohno (1967), a diferenciação de pares de cromossomos sexuais ocorreu em etapas que se iniciam com o acúmulo de diferenças entre os homólogos do par de cromossomos responsáveis pela determinação genética do sexo. Posteriormente, outros eventos aconteceram como a supressão de *crossing-over* e uma gradual diferenciação por ganho de heterocromatina em apenas um dos cromossomos de um dos sexos (Y ou W) (Singh *et al.*, 1976; Jones & Singh, 1981; Bull, 1983). O processo de heterocromatinização dos cromossomos Y e W em sua totalidade foi sugerido para mamíferos, aves, em algumas espécies de répteis (Schmid *et al.*, 1988), e também para anfíbios, como salamandras do gênero *Triturus* (Schmid, 1983; Schmid *et al.*, 1979) e o anuro marsupial *Gastrotheca pseustes* (Schmid *et al.*, 1990). Contudo, Schmid *et al.* (1988; 2002b) demonstraram que o cromossomo Y de *Gastrotheca walkeri* e *G. ovifera* apresentou uma quantidade menor de heterocromatina que o esperado, sugerindo que o heteromorfismo, nesse caso, possa ter ocorrido pela perda de heterocromatina no cromossomo Y.

Alguns autores sugerem que os estágios iniciais de diferenciação dos cromossomos sexuais em vertebrados estejam diretamente relacionados a inversões pericêntricas (para exemplos ver John, 1988). A origem dos cromossomos sexuais em *Eupsophus miguelli* e *E. roseus* (Iturra & Veloso, 1989) e *E. insularis* (Cuevas & Formas, 1996) parece ter envolvido esse processo. Já em *Pyxicephalus adspersus* foi sugerido que a diferença entre os cromossomos W e Z parece ter envolvido a inversão de um bloco de heterocromatina no cromossomo W (Schmid, 1980). Busin *et al.* (2008) sugeriram que a origem dos cromossomos sexuais em *Pseudis tocantis* possa ter se iniciado com uma inversão seguida de ganho de heterocromatina e subsequente diferenciação morfológica do cromossomo W. Em *P. saltica*, no entanto, o braço longo do cromossomo Y é homólogo ao do cromossomo X e ambos apresentam um único bloco de heterocromatina coincidente com a NOR. No indivíduo 248.5 em que o X apresentou tamanho relativo maior que o Y, verificou-se que a NOR encontra-se aumentada. Considerando que nas demais espécies com 22 cromossomos, o par 8 portador da NOR também apresenta um bloco de heterocromatina no braço longo, total ou parcialmente coincidente com a NOR, pode-se supor que o par 8 e os cromossomos sexuais tenham uma origem comum, sendo os sexuais provavelmente uma condição derivada. Não há evidências de que mecanismos de inversão possam ter contribuído para a diferenciação desses cromossomos.

Observando a morfologia dos cromossomos sexuais, verifica-se que o X tem morfologia semelhante ao par 8 de *Pseudopaludicola* aff. *saltica* e que o Y é parecido com o par 8 de *Pseudopaludicola* sp.1. Portanto, com base nessas observações, duas hipóteses poderiam ser apontadas para explicar o mecanismo de origem dos cromossomos sexuais de *P. saltica*: a partir de um ancestral portador do par (provavelmente o 8) telocêntrico por mecanismo de translocação originando o braço curto do cromossomo Y ou a partir de um par submetacêntrico por fissão desse mesmo braço. Contudo, ao analisarmos células meióticas em diacinese, não encontramos evidência de que o braço menor do Y possa ter se originado por processo de translocação, uma vez que só foram visualizados bivalentes na meiose, enfraquecendo a primeira hipótese. Além disso, quando comparamos o cariótipo de *P. saltica* com o cariótipo da espécie proximalmente relacionada, *Pseudopaludicola* aff. *saltica*, analisada no presente trabalho, não observamos nenhuma evidência que esse braço curto possa ter surgido de segmentos de outros cromossomos do cariótipo, uma vez que, à exceção do par de cromossomos sexuais, todos os outros cromossomos são aparentemente idênticos. Portanto,

com base nos dados do presente trabalho, a hipótese mais provável é que a diferenciação possa ter ocorrido por fissão do braço curto de um cromossomo submetacêntrico originando o cromossomo X. Possivelmente, os cromossomos sexuais em *P. saltica* estão em estágios iniciais de diferenciação, como proposto também para outros anuros.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 6/60055-0) e Fundação de Ensino de São Paulo (FUNDESP) pelo apoio financeiro; Sérgio Siqueira Junior, Eduardo R. Fávero, Luis Felipe de Toledo R. Pereira, Leandro Magrini, Gilda V. Andrade e Denise C. Rossa-Feres pelo auxílio na coleta de exemplares de algumas populações; e Célio F. B. Haddad pela identificação de alguns espécimes.

Referências

- Ananias, F.; Modesto, A.D.S.; Mendes, S.C.; Napoli, M.F. (2007) Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-band interpopulational polymorphism. *Hereditas* 144: 206-212.
- Batistic, R.F., Beçak, M.L. & Vizotto, L.D. (1969) Variação cromossômica no gênero *Pseudopaludicola* (Anura). *Ciênc. Cult.* 21: 260.
- Batistic, R.F. (1970) Estudo cromossômico e mecanismos de especiação em *Pseudopaludicola* (Leptodactylidae, Anura). Dissertação de Mestrado em Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 57 pp.
- Beçak, M.L. (1968) Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia* 21: 191-208.
- Bogart, J.P. (1973) Evolution of Anuran karyotypes. *In*: Vial, J.L. (ed.) *Evolutionary biology of the anurans*. Columbia Univ. Missouri Press, pp.337-349.
- Bogart, J.P. (1991) The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. *In*: Green, D.M. & Sessions, S.K. (eds), *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, pp.233-258.
- Bogart, J.P. & Hedges, S.B. (1995) Rapid chromosome evolutions in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). *J. Zool. Lond.* 235: 9-31.
- Brum, N. & Saez, F.A. (1968) Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Experientia* 24: 969.
- Busin, C.S.; Andrade, G.V.; Bertoldo, J.; Del-Grande, M.L.; Uetanabaro, M. & Recco-Pimentel, S.M. (2008) Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genetica* 133: 119-127.

- Bull, J. (1983) Evolution of sex chromosome mechanisms. Benjamin Cumming, California, pp. 295.
- Cuevas, C.C. & Formas, J.R. (1996) Heteromorphic sex chromosomes in *Eupsophus insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). Chrom. Res. 4: 467-470.
- Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; de Sá, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M. & Wheeler, W.C. (2006) The amphibian tree of life. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 297: 1-370.
- Frost, D.R. (2008) Amphibian species of the world: an online reference. V 5.2 (15 July, 2008) Electronic database available at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Giaretta, A.A. & Kokubum, M.N. (2003) A new species of *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae) from northern Brazil. Zootaxa 383: 1-8.
- Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, D.B.; Noonan, B.P.; Schargel, W.E. & Wheeler, W.C. (2006) Phylogenetic systematics of dart poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 299: 1-262.
- Green, D.M. (1988a) Cytogenetics of the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*: a extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex chromosome system. Chromosoma 97: 55-70.
- Green, D.M. (1988b) Heteromorphic sex chromosomes in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zealand. J. Hered. 79 (3): 165-169.
- Green, D.M. & Sessions, S.K. (1991) Nomenclature for chromosomes In: Green, M.D. and Sessions, S.K. (eds.) Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic Press, San Diego, pp. 431-432.

- Green, D.M. & Cannatella, D.C. (1993). Phylogenetic significance of the amphicoelous frogs Ascaphidae and Leiopelmatidae. *Ecol. Ethol. Evol.* 5: 223-245.
- Green, D.M. (2002). Chromosome polymorphism in Archey's Frog (*Leiopelma archeyi*) from New Zealand. *Copeia* 1: 204-207.
- Gruber, S.L.; Haddad, C.F.B. & Kasahara, S. (2007) Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae) with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and the reduction of diploid number of $2n=24$ to $2n=22$ in the genus. *Genetica* 130: 281-291.
- Haddad, C.F.B. & Cardoso, A.J. (1987). Taxonomia de três espécies de *Pseudopaludicola* (Anura, Leptodactylidae). *Pap. Av. Zool.*, 36 (24): 287-300.
- Howell, W.M. & Black, D. A. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Iturra, P. & Veloso, A. (1989) Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. *Genetica* 78: 25-31.
- John B. (1988) The biology of heterochromatin. *In*: Verma, R.S. (ed.). *Heterochromatin: molecular and structural aspects*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 1-147.
- Jones, K.W. & Singh, L. (1981) Conserved repeated DNA sequences in vertebrates sex chromosomes. *Chrom. Today* 8: 241-255.
- King, M. (1990) *Animal cytogenetics*. vol. 4: Chordata 2. Amphibia. Gebrüder Borntraeger, Berlin, pp 241.
- King, M. & Rofe, R. (1976) Karyotypic Variation in the Australian Gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma* 54: 75-87.

- Kuramoto, M. (1990) A list of chromosome numbers of anuran amphibians. Bull. Fukuoka Univ. Educ. 39: 83-127.
- Lobo, F. (1992) Distribución y lista de localidades de *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae) en la República Argentina. Cuad. Herp. 7 (5): 30-37.
- Lobo, F. (1994) Descripción de una nueva especie de *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae), redescrípción de *P. falcipes* (Hensel, 1887) y *P. saltica* (Cope, 1867) y osteología de las tres especies. Cuad. Herp. 8 (2): 177-199.
- Lobo, F. (1995) Análisis filogenéticos del género *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae). Cuad. Herp. 9 (1): 21-43.
- Lobo, F. (1996) Evaluación del status taxonómico de *Pseudopaludicola ternetzi* Miranda Ribeiro, 1937 y *P. mystacalis* (Cope, 1887). Osteología y distribución de las dos especies. Acta Zool. Lilloana 43 (2): 327-346.
- Loureço, L.B.; Recco-Pimentel, S.M. & Cardoso, A.J. (1998) Polymorphisms of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. Chrom. Res. 6: 621-628.
- Loureço, 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: 724-731.
- Lynch, J.D. (1971) Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Misc. Publ. 53: 1-238.
- Lynch, J. D. (1989) A review of the leptodactylid frogs of the genus *Pseudopaludicola* in northern South America. Copeia 3: 577-588.

- Miura, I.; Nishioka, M.; Borkin, L.J. & Wu, Z. (1995) The origin of the brown frogs with $2n = 24$ chromosomes. *Experientia* 51: 179-188.
- Odierna, G.; Aprea, G.; Capriglione, T.; Castellano, S. & Balleto, E. (2007) Cytological evidence for population-specific sex chromosome heteromorphism in Palearctic green toads (Amphibia, Anura). *J. Biosci.* 32: 763-768.
- Ohno, S. (1967) Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer, Berlin/ Heidelberg, New York, pp.192.
- Saez, F.A., Brum, N. (1960) Chromosomes of South American Amphibians. *Nature* 185: 950.
- Schmid, M. (1978) Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-388.
- Schmid, M. (1980) Chromosome banding in Amphibia V. Highly differentiated ZW/ZZ Sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Chromosoma* 80: 69-96.
- Schmid, M. (1983) Evolution of the sex chromosomes and heterogametic systems in Amphibia. *Differentiation* 23 (suppl.): 13-22.
- Schmid, M.; Olert, J. & Klett, C. (1979) Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71: 29-55.
- Schmid, M.; Steilein, C.; Feichtinger, W.; de Almeida, C.G. & Duellman, D.E. (1988) Chromosome banding in Amphibia XIII. Sex chromosome, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs. *Chromosoma* 97: 33-42.
- Schmid, M.; Steilein, C.; Friedl, R.; de Almeida, C.G.; Haff, T; Hillis, D.M & Duellman, W.E. (1990) Chromosome banding in Amphibia XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrophysa pfeifferi* (Anura: Hylidae). *Chromosoma* 97: 413-423.

- Schmid, M.; Nanda, I., Steilein, C., Kausch, K., Haaf, T., Epplen, J. (1991) Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. *In*: Green, D.M. & Sessions, S.K. (eds.). Amphibian cytogenetics and evolution. Academic Press, San Diego, pp. 393-430.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Haaf, T.; Scharl, M.; Visbal Garcia, R.; Manzanilla Pupo, J. & Fernandez Badillo, A. (2002a) Chromosome banding in Amphibia XXVI. Coexistence of homomorphic XY sex chromosome and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet. Gen. Res.* 99: 330-343.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Nanda, I.; Mais, C.; Haaf, T.; Visbal-Garcia, R. & Fernandez Badillo, A. (2002b) Chromosome banding in Amphibia XXII. Atypical Y chromosomes in *Gastrotheca walkeri* and *Gastrotheca ovifera* (Anura, Hylidae). *Cytogenet. Gen. Res.* 96: 228-238.
- Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steilein, C.; Visbal Carcía, R. & Fernandez Badillo, A. (2003a) Chromosome banding in Amphibia XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet. Gen. Res.* 101: 62-73.
- Singh, L.; Purdom, I.F. & Jones, K.W. (1976) Satellite DNA and evolution of chromosomes. *Chromosoma* 59: 43-62.
- Sumner, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

Tabela 1. Número de indivíduos das espécies de *Pseudopaludicola* estudadas e seus respectivos locais de coleta. (ZUEC= Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, DZSJRP = Museu de Zoologia da Unesp, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). * Exemplar ainda não depositado no Museu.

Espécie	Localidade	Número de indivíduos	Número de acesso
<i>P. mineira</i>	Serra do Cipó, MG (localidade-tipo) (19°14'S; 43°33'W)	8 ♂ e 1 ♀	ZUEC 14319 – 14323, 14326, 14329 e 14330.
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 1	Andaraí, BA (12°48'S; 41°19'W)	10 ♂ e 3 ♀	ZUEC 14255, 14256, 14257, 14260, 14261, 14264 – 14271.
<i>P. saltica</i>	Chapada dos Guimarães, MT (localidade-tipo) (15°27'S; 55° 44' W)	12 ♂ e 1 ♀	ZUEC 14172, 14227, 14228, 14232, 14234, 14236, 14237, 14240, 14242 – 14247. *Lab 248.5
<i>P. saltica</i>	Uberlândia, MG (18°55'S; 48°16'W)	8 ♂ e 2 ♀	ZUEC 14291, 14292, 14295, 14296, 14301, 14302, 14304, 14305, 14307, 14310.
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>saltica</i>	Rio Claro, SP (22°24'S; 47°33'W)	4 ♂ e 1 ♀	ZUEC 14284 – 14288.
<i>P. canga</i>	Serra dos Carajás, PA (localidade-tipo) (6°03'S; 50°28'W)	3 ♂ e 12 ♀	ZUEC 14343, 14353, 14363, 14364, 14366, 14369 – 14374, 14376, 14378, 14379, 14380.
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 2	Barreirinhas, MA (2°44'S; 42°49'W)	2 ♂	ZUEC 13860 e 13867.
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 3	Uberlândia, MG (18°55'S; 48°16'W)	8 ♂ e 3 ♀	ZUEC 14181, 14185, 14186, 14187, 14209, 14212, 14214, 14216, 14217, 14222 e 14223.
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i>	Icém, SP (20°20'S; 49°11'W)	6 ♂ e 1 ♀	DZSJRP 8727, 8728, 8747, 8749, 8750, 8752

Tabela 2. Análise morfométrica dos cromossomos das espécies de *Pseudopaludicola* estudadas. Classificação de acordo com Green & Sessions (1991). M=metacêntrico; SM=submetacêntrico; T=telocêntrico; †cromossomo X; ♦cromossomo Y.

	Número do cromossomo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	8'	9	10	11
<i>P. mineira</i> (Serra do Cipó, Minas Gerais)												
Tamanho relativo	15.66	13.47	11.29	10.33	9.20	8.49	7.92	6.71	-	6.11	5.72	5.03
Razão de braços	1.16	1.19	1.85	1.81	1.14	1.15	1.71	1.34	-	1.16	1.17	1.18
Classificação	M	M	SM	SM	M	M	SM	M	-	M	M	M
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 1 (Andaraí, Bahia)												
Tamanho relativo	14.71	12.53	11.06	10.28	8.90	8.07	7.45	6.91	5.79	5.35	5.01	3.93
Razão de braços	1.15	1.37	1.99	1.87	1.19	1.31	1.39	2.31	1.85	1.25	1.25	1.93
Classificação	M	M	SM	SM	M	M	M	SM	SM	M	M	SM
<i>P. saltica</i> (Chapada dos Guimarães, Mato Grosso)												
Tamanho relativo	14.65	12.50	11.80	10.90	8.23	7.77	7.33	5.72	6.10	5.37	4.95	4.64
Razão de braços	1.19	1.43	2.46	2.47	1.24	1.94	1.09	8.30	2.27	1.16	1.21	1.17
Classificação	M	M	SM	SM	M	SM	M	T [†]	SM [♦]	M	M	M
<i>P. saltica</i> (Uberlândia, Minas Gerais)												
Tamanho relativo	14.75	12.60	11.60	10.80	9.23	8.31	7.67	5.68	6.26	4.94	4.87	4.53
Razão de braços	1.18	1.46	2.59	2.60	1.20	1.87	1.12	8.98	2.13	1.18	1.19	1.21
Classificação	M	M	SM	SM	M	SM	M	T [†]	SM [♦]	M	M	M
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>saltica</i> (Rio Claro, São Paulo)												
Tamanho relativo	17.23	14.08	12.40	11.19	8.60	7.62	7.24	4.59	3.01	4.99	4.61	4.39
Razão de braços	1.12	1.44	2.57	2.34	1.19	1.80	1.11	9.09	8.42	1.19	1.16	1.13
Classificação	M	M	SM	SM	M	SM	M	T	T	M	M	M
<i>P. canga</i> (Serra dos Carajás, Pará)												
Tamanho relativo	14.89	12.31	11.49	10.55	9.68	8.88	7.46	6.64	-	6.57	-	-
Razão de braços	1.15	1.31	2.41	2.01	1.31	1.19	10.0	9.30	-	1.72	-	-
Classificação	M	M	SM	SM	M	M	T	T	-	SM	-	-
<i>Pseudopaludicola</i> sp.2 (Barreirinhas, Maranhão)												
Tamanho relativo	14.73	13.13	12.16	9.63	9.15	8.61	7.56	6.86	-	5.97	-	-
Razão de braços	1.10	1.26	2.38	1.84	1.34	1.25	10.0	11.0	-	2.02	-	-
Classificação	M	M	SM	SM	M	M	T	T	-	SM	-	-
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 3 (Uberlândia, Minas Gerais)												
Tamanho relativo	14.85	13.05	10.37	10.54	9.52	9.23	8.17	6.56	-	7.30	-	-
Razão de braços	1.27	1.39	2.59	2.08	1.28	1.41	13.6	10.72	-	2.01	-	-
Classificação	M	M	SM	SM	M	M	T	T	-	SM	-	-
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>falcipes</i> (Icém, São Paulo)												
Tamanho relativo	15.29	12.17	10.98	10.25	9.51	8.83	8.42	6.65	-	6.87	-	-
Razão de braços	1.18	1.47	2.09	2.68	1.19	1.39	14.8	12.0	-	1.87	-	-
Classificação	M	M	SM	SM	M	M	T	T	-	SM	-	-

Tabela 3. Resumo das diferenças observadas entre as espécies de 2n=22 cromossomos. M = metacêntrico; SM = submetacêntrico; T = telocêntrico.

Espécies	Pares				NOR	Bandas C
	6	7	8	11		
<i>P. mineira</i>	M/ M	SM/ SM	M/ M	M/ M	Telomérica Par 8	1, 2, 7, 8, 9 e 10.
<i>Pseudopaludicola</i> sp. 1	M/ M	M/ M	SM/SM	SM/ SM	Sub-telomérica Par 8	1, 8 e 9
<i>P. saltica</i>	SM/SM	M/ M	T/SM	M/ M	Telomérica Par 8 (XY)	1, 2, 3, 4, 6 e 8
	SM/SM	M/M	T/T	M/M	Telomérica Par 8 (XX)	1, 2, 3, 4, 6 e 8
<i>Pseudopaludicola</i> aff. <i>saltica</i>	SM/SM	M/ M	T/ T	M/ M	Telomérica, em apenas um homólogo do par 8	1, 2, 3, 4, 6 e 8

Legendas

Figura 1. Mapa do Brasil mostrando os locais de coleta dos espécimes estudados, listados na tabela 1.

Figura 2. Cariótipos com $2n=22$ cromossomos corados com Giemsa. (A) *P. mineira*, (B) *Pseudopaludicola* sp.1, (C) macho de *P. saltica* da Chapada dos Guimarães, (D) macho de *P. saltica* de Uberlândia, (E) *Pseudopaludicola* aff. *saltica*. Em destaque, o par 8 homomórfico de *Pseudopaludicola* sp.1 (B) e os cromossomos sexuais XX de *P. saltica* (C, D). Barra=5 μ m

Figura 3. Localização de NOR por impregnação por prata nas espécies com cariótipos $2n=22$. (A) *P. mineira*, (B) *Pseudopaludicola* sp.1. (C) *P. saltica* da Chapada dos Guimarães, (D) *P. saltica* de Uberlândia, (E) *Pseudopaludicola* aff. *saltica*. Em (B), o destaque mostra o par 8 heteromórfico; e em (C) e (D) o par 8 homomórfico. Barra = 5 μ m

Figura 4. Cariótipos com $2n=22$ cromossomos submetidos à técnica de banda C. (A) *P. mineira* (B) *Pseudopaludicola* sp.1, (C) macho de *P. saltica* da Chapada dos Guimarães, (D) macho de *P. saltica* de Uberlândia, (E) *Pseudopaludicola* aff. *saltica*. Em destaque, o par 8 heteromórfico (B) e os cromossomos sexuais XX de *P. saltica* (C e D). Barra = 5 μ m.

Figura 5. Cromossomos sexuais de *P. saltica* da localidade-tipo submetidos à coloração convencional com Giemsa, bandamento C e Ag-NOR. (A) cromossomos X da fêmea ZUEC 14234 (B) cromossomos XY de macho ZUEC 14172 (C) cromossomos XY do indivíduo 248.5 (nº do laboratório de citogenética). Barra = 5 μ m.

Figura 6. Diacinese da prófase I da meiose de células germinativas de macho de *P. saltica* da Chapada dos Guimarães. Os cromossomos foram corados com Giemsa (A) e submetidos ao método de bandamento C (B). As setas indicam o par de cromossomos sexuais. Barra = 5 μ m.

Figura 7. Cariótipos com $2n=18$ cromossomos corados com Giemsa. (A) *P. canga*, (B) *Pseudopaludicola* sp.2, (C) *Pseudopaludicola* sp.3., (D) *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*. Barra = 5 μ m.

Figura 8. Localização de NOR por impregnação por prata nas espécies com cariótipos $2n=18$. (A) *P. canga*, (B) *Pseudopaludicola* sp.2, (C) *Pseudopaludicola* sp.3 (D) *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*. Barra = 5 μ m.

Figura 9. Cariótipos com $2n=18$ cromossomos submetidos à técnica de banda C. (A) *P. canga*, (B) *Pseudopaludicola* sp.2, (C) *Pseudopaludicola* sp.3, (D) *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*. Em destaque, o par 2 de outra metáfase de *P. canga* mostrando nitidamente a banda C positiva na região pericentromérica do braço longo. Barra = 5 μ m.



Figura 1

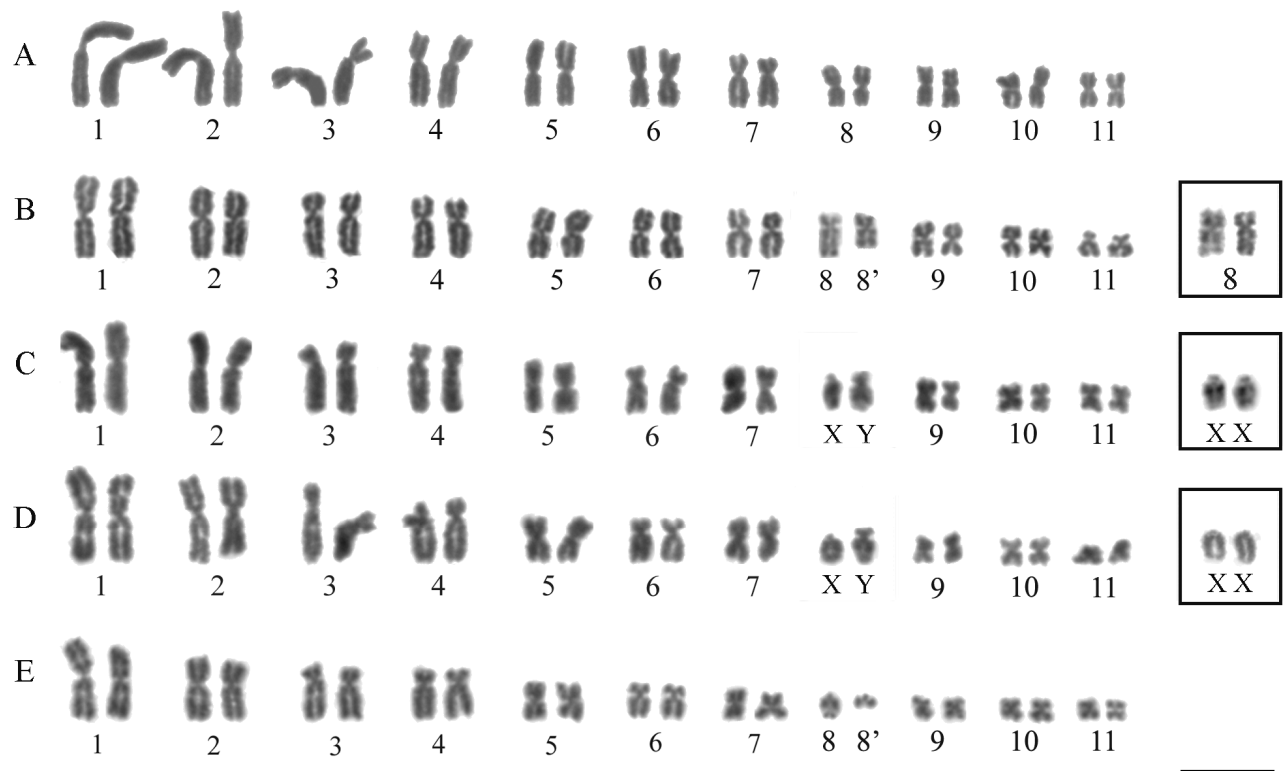


Figura 2

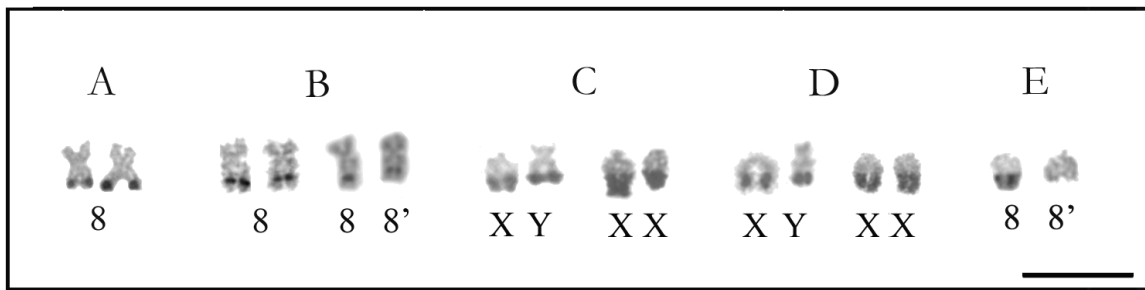


Figura 3

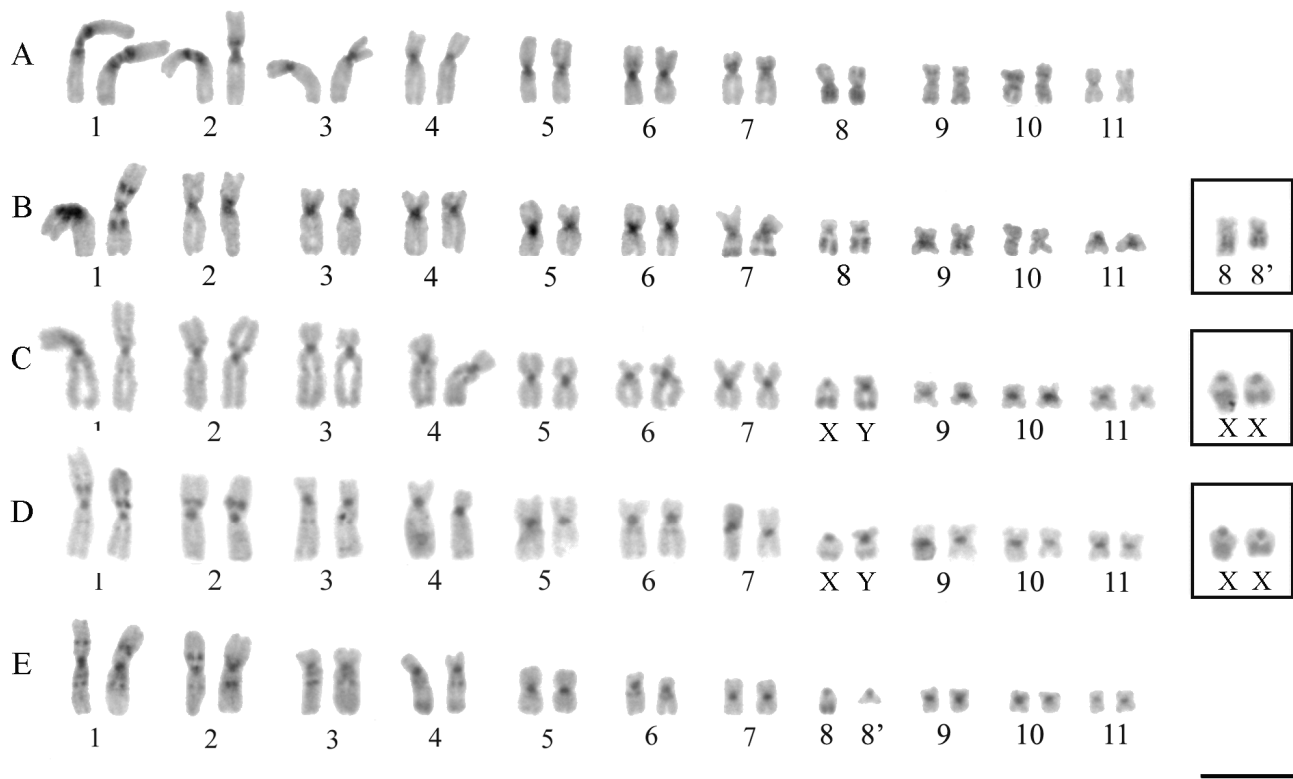


Figura 4

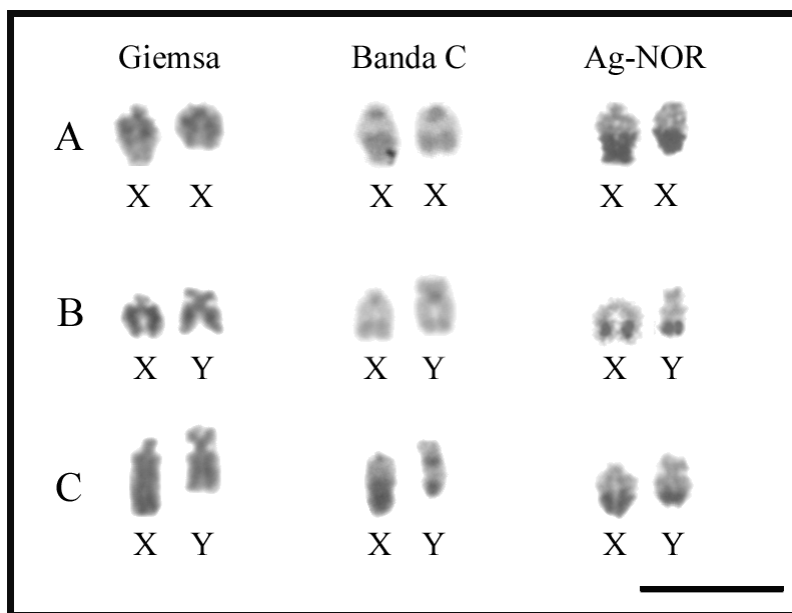


Figura 5

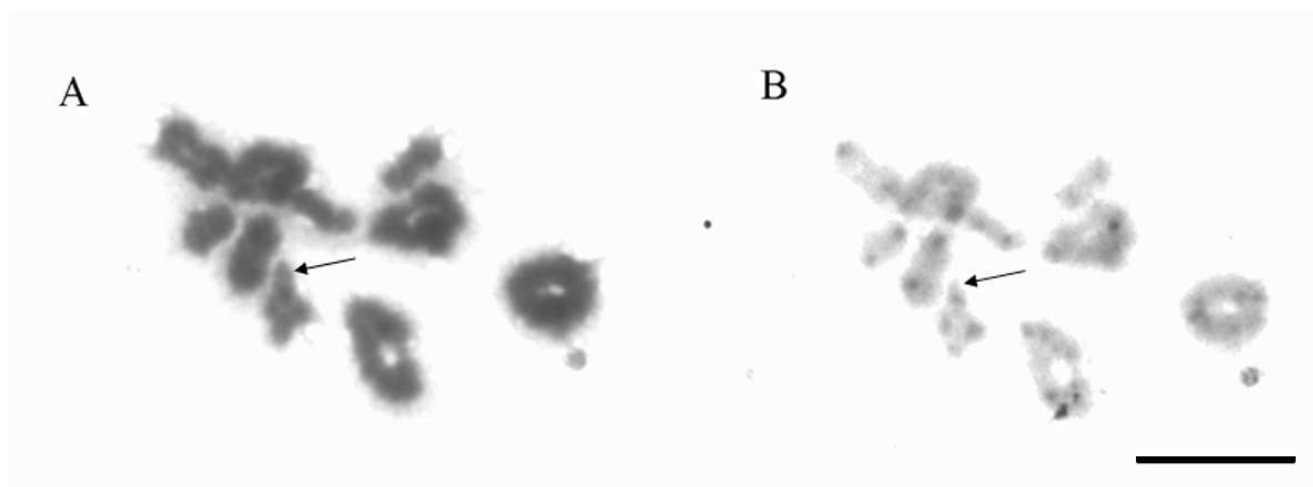


Figura 6

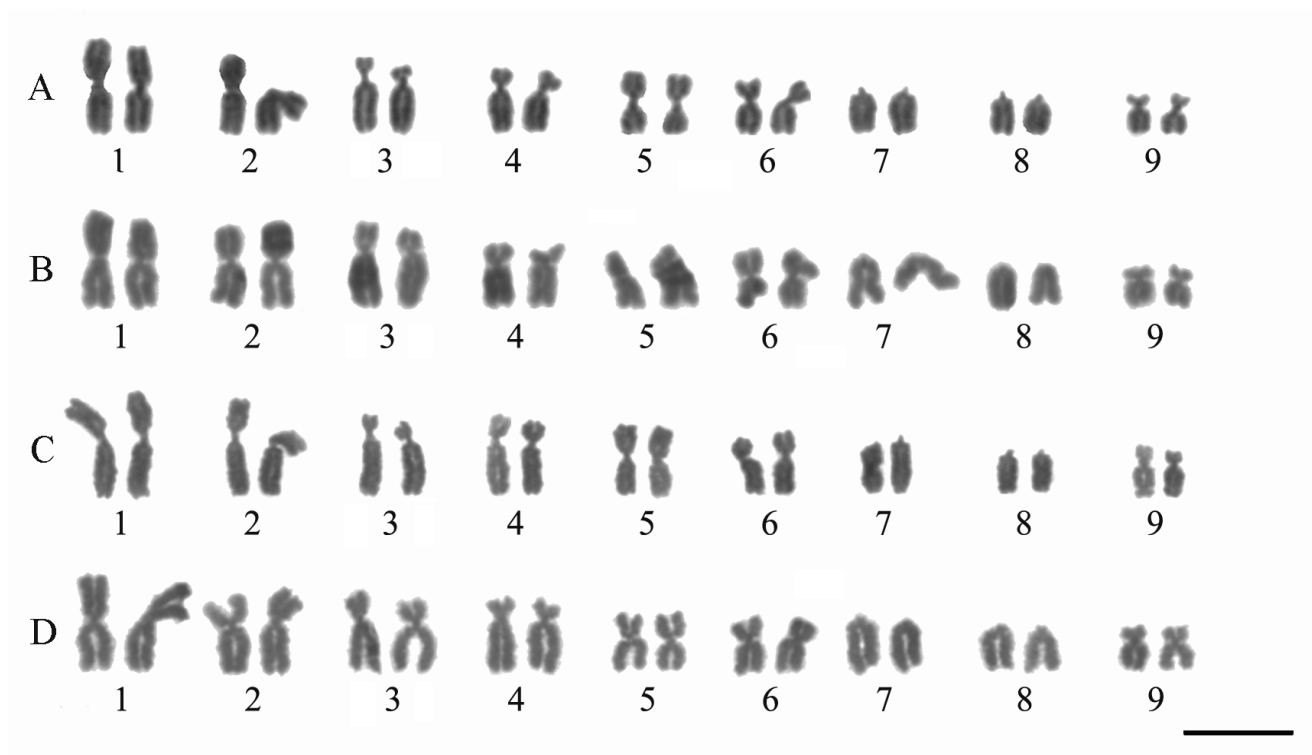


Figura 7

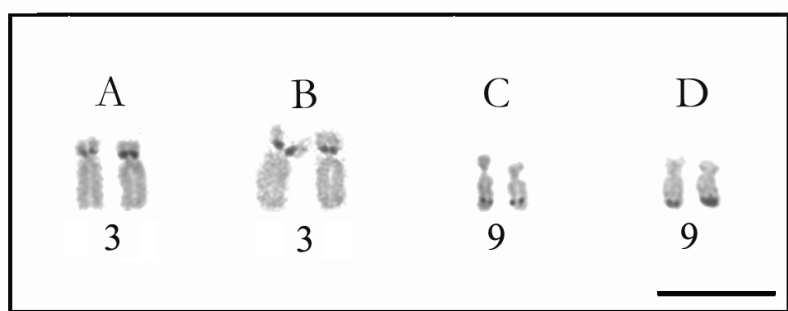


Figura 8

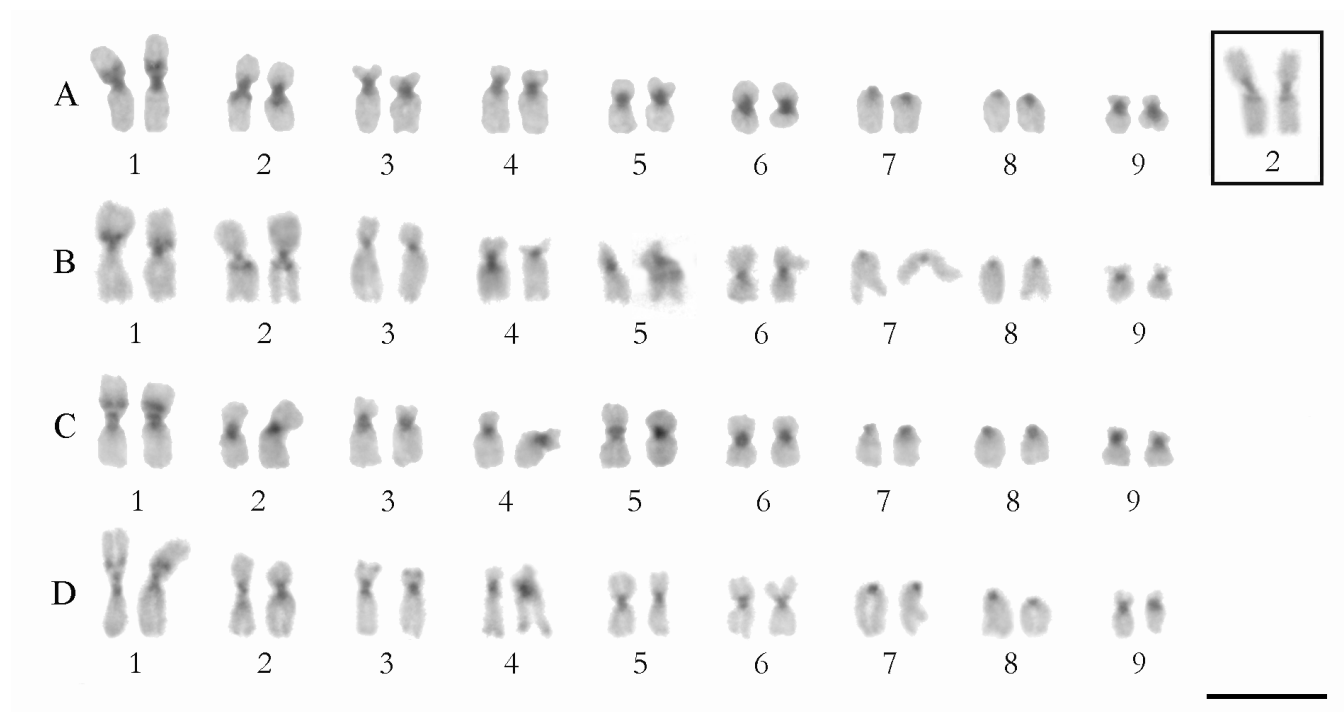


Figura 9

3. CONCLUSÕES GERAIS

1. A variação no número de cromossomos, fenômeno incomum em anuros, foi verificada nas populações de *Pseudopaludicola* estudadas. No presente trabalho foram descritos cariótipos $2n=22$ e $2n=18$.
2. Representantes das espécies *P. mineira* e *P. saltica*, provenientes de suas respectivas localidades-tipo, assim como as populações de *Pseudopaludicola* sp.1 de Andaraí (BA), *P. saltica* de Uberlândia (MG), e *Pseudopaludicola* aff. *saltica* de Rio Claro (SP) apresentaram cariótipos $2n=22$, enquanto espécimes de *P. canga* da localidade-tipo, Serra dos Carajás (PA), *Pseudopaludicola* sp. 2 de Barreirinhas (MA), *Pseudopaludicola* sp. 3 de Uberlândia (MG) e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* de Icém (SP) apresentaram cariótipos $2n= 18$.
3. A morfologia de alguns pares cromossômicos (6, 7, 8 e 11), a localização da NOR no par 8 e o padrão de distribuição da heterocromatina permitiram diferenciar as espécies *P. mineira* de *Pseudopaludicola* sp.1.
4. *Pseudopaludicola saltica* da Chapada dos Guimarães, MT, localidade-tipo e de Uberlândia, MG, não diferiram citogeneticamente. Porém, distinguiram-se de *Pseudopaludicola* aff. *saltica* apenas em relação ao par 8, portador da NOR nas três populações. Nas duas populações de *P. saltica*, o par 8 mostrou-se heteromórfico no macho e homomórfico na fêmea, caracterizando um sistema de determinação do sexo do tipo $XX♀/XY♂$. A presença de cromossomos sexuais heteromórficos não foi relatada anteriormente para o gênero *Pseudopaludicola*, sendo esse o primeiro caso.
5. Observando a morfologia dos cromossomos sexuais em *P. saltica*, verifica-se que o X (telocêntrico) tem a mesma morfologia do par 8 de *Pseudopaludicola* aff. *saltica* e que o Y (submetacêntrico) é morfologicamente semelhante ao par 8 de *Pseudopaludicola* sp.1. Portanto, duas hipóteses poderiam ser apontadas para explicar o mecanismo de origem dos cromossomos sexuais em *P. saltica*: um par de cromossomos telocêntricos (provavelmente o 8) de um cariótipo ancestral por mecanismo de translocação teria adquirido o braço curto em

um dos homólogos dando origem ao cromossomo Y ou em um par de cromossomos submetacêntricos por fissão seguida de perda em um dos homólogos teria originado o cromossomo X. A segunda parece mais provável, à luz dos resultados obtidos no presente trabalho.

6. Em todas as espécies do gênero *Pseudopaludicola* que apresentaram 22 cromossomos, *P. mineira*, *P. saltica*, *Pseudopaludicola* sp.1 e *Pseudopaludicola* aff. *saltica* (presente trabalho), *P. falcipes* e *Pseudopaludicola* sp. de Poconé (MT) (Fávero *et al.*, em preparação), a NOR foi localizada no par 8, e no entanto, esse par parece sempre envolvido nas variações citogenéticas observadas entre essas espécies, o que faz supor que a diferenciação morfológica desse par parece estar associada ao processo de especiação dentro do gênero.

7. As espécies *P. canga* (grupo “pusilla”), *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* apresentaram cariótipos idênticos com $2n=18$ cromossomos. A localização da NOR e a presença de uma banda no cromossomo 2 permitiu diferenciar *P. canga* e *Pseudopaludicola* sp.2 de *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*. Devido à grande semelhança entre os cariótipos $2n=18$ estudados, podemos sugerir que *Pseudopaludicola* sp.2, *Pseudopaludicola* sp.3 e *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* possam pertencer ao grupo “pusilla”.

8. Apesar das semelhanças morfológicas dos espécimes de *Pseudopaludicola* aff. *falcipes* com os de *P. falcipes*, estes diferem quanto ao número de cromossomos. Portanto, sugerimos que *Pseudopaludicola* aff. *falcipes*, seja relacionada à *P. canga*. No entanto, um estudo filogenético envolvendo espécies de ambos os grupos, grupo “falcipes” e grupo “pusilla” se faz necessário para suportar essa hipótese.

9. Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a necessidade de uma extensa revisão taxonômica no gênero *Pseudopaludicola*.