

**LÍVIA SARTORATTO RODRIGUES TEIXEIRA
ROCHA**

**"ESTUDO CITOGENÉTICO DE ESPÉCIES DE
DENDROPSOPHUS (ANURA: HYLIDAE)"**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LÍVIA SARTORATTO RODRIGUES TEIXEIRA ROCHA

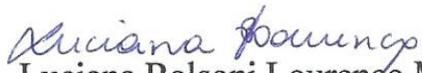
"ESTUDO CITOGENÉTICO DE ESPÉCIES DE
DENDROPSOPHUS (ANURA: HYLIDAE)"

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Lívia Sartatto Rodrigues
Teixeira Rocha

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural do Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.


Orientadora: Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Campinas, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R582e Rocha, Livia Sartoratto Rodrigues Teixeira, 1985-
Estudo citogenético de espécies de *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) / Livia Sartoratto Rodrigues Teixeira Rocha. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Luciana Bolsoni Lourenço Morandini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. Microdissecção. 3. Hylidae. I. Lourenço, Luciana Bolsoni, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cytogenetic studies of species of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae)

Palavras-chave em inglês:

Cytogenetics

Microdissection

Hylidae

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini [Orientador]

Carmen Sílvia Busin

Odair Aguiar Junior

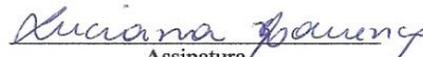
Data de defesa: 19-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 19 de dezembro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini (Orientadora)


Assinatura

Dra. Carmen Sílvia Busin


Assinatura

Dr. Odair Aguiar Junior


Assinatura

Dr. Maurício Papa de Arruda

Assinatura

Dr. João Reinaldo da Cruz de Campos

Assinatura

Resumo

O gênero *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) é composto por 94 espécies neotropicais, das quais somente 31 foram estudadas citogeneticamente. Embora as espécies desse gênero apresentem o mesmo número cromossômico ($2n=30$), diferem quanto ao número fundamental e em relação à localização de NORs. Entretanto, a escassez de marcadores citogenéticos e o alto número de espécies com cariótipos ainda não descritos impedem inferências acerca dos possíveis eventos envolvidos na diferenciação cariotípica nesse gênero. Com o intuito de fornecer novos dados para a análise evolutiva cariotípica em *Dendropsophus*, no presente trabalho foram descritos os cariótipos de duas espécies do grupo de *D. marmoratus*, *D. seniculus* e *D. soaresi*, ampliada a caracterização dos cariótipos de *D. decipiens*, *D. meridianus* e descrito o de *D. werneri*, três espécies do grupo de *D. microcephalus*. Para a localização cromossômica do gene ribossomal 5S foram utilizadas sequências isoladas de *D. soaresi*. Também foram utilizadas sondas para verificar a localização cromossômica de sequências teloméricas em todas as espécies estudadas. Por fim, na tentativa de gerar sondas cromossômicas para futuros estudos dos cromossomos telocêntricos encontrados em *Dendropsophus*, experimentos de pintura cromossômica foram conduzidos com *D. nanus* e *D. walfordi*. *Dendropsophus seniculus* e *D. soaresi* apresentaram cariótipos muito semelhantes, com a NOR localizada no braço longo dos cromossomos do par 9. Tais cariótipos se assemelham também àqueles das outras três espécies já cariotipadas do grupo de *D. marmoratus* (*D. marmoratus*, *D. melanargyreus* e *D. nahdereri*), embora o cariótipo de *D. nahdereri* difira dos demais por apresentar a NOR no braço curto dos cromossomos do par 1. Dois tipos de sequências de DNAr 5S foram isolados de *D. soaresi*. A sequência identificada como do tipo I é composta por 512 pb, dos quais 390 pb pertencem à região não-transcritora (NTS); já a sequência do tipo II apresenta NTS com apenas 249 pb. A sequência nucleotídica do DNAr 5S do tipo I é idêntica a uma sequência encontrada no hilídeo *Gastrotheca riobambae*. Quando utilizado como sonda, esse segmento de DNAr 5S foi mapeado no braço longo dos cromossomos do par 2 de *D. seniculus* e *D. soaresi*. Sondas compostas por sequências teloméricas detectaram exclusivamente as regiões cromossômicas terminais de *D. seniculus*, assim como previamente observado em *D. marmoratus* e *D. melanargyreus*. Já em *D. soaresi*, as sondas teloméricas também resultaram em marcações centroméricas e pericentroméricas, exceto nos pares telocêntricos identificados como 5 e 6. Dentre as três espécies do grupo *D. microcephalus* aqui

analisadas, *D. decipiens*, *D. meridianus* e *D. weneri*, algumas diferenças puderam ser notadas. Enquanto *D. meridianus* e *D. weneri* apresentaram apenas um par de cromossomos telocêntricos de tamanho mediano, no cariótipo de *D. decipiens* três pares de cromossomos telocêntricos de tamanho mediano puderam ser observados. *D. berthaltzae*, espécie considerada do mesmo clado de *D. decipiens*, também apresenta cariótipo com três pares de telocêntricos de tamanho mediano. Em relação à localização da NOR, os cariótipos de *D. decipiens*, *D. meridianus* e *D. weneri* se assemelham, já que em todos a NOR foi localizada na região terminal do braço longo de cromossomos telocêntricos/subtelocêntricos identificados como 12. A partir de cromossomos telocêntricos microdissecados de *D. nanus* foi construída uma sonda capaz de identificar o par de cromossomos 15 dessa espécie. A sonda obtida, quando hibridada em cariótipos de outras linhagens de *D. nanus* e no cariótipo de *D. walfordi*, também detectou cromossomos telocêntricos de tamanho pequeno, sugerindo a homeologia entre eles. Este é o primeiro estudo que utiliza a técnica de pintura cromossômica para analisar os cromossomos telocêntricos de *Dendropsophus* e os resultados preliminares aqui apresentados sugerem que essa pode vir a ser uma interessante ferramenta na investigação da evolução cromossômica no gênero.

Abstract

The genus *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) comprises 94 neotropical species, from which only 31 were studied cytogenetically. The species of this genus have the same chromosome number ($2n=30$) but differ on fundamental number and NORs location. Cytogenetic markers, however, are scarce for this genus and a large number of species has not been karyotyped yet. Therefore, it is still not possible to infer about the possible events involved in the karyological divergence in this genus. In order to provide new data for evolutionary karyotype analysis in *Dendropsophus*, we described cytogenetically two species of *D. marmoratus* group, *D. seniculus* and *D. soaresi*, and one species of *D. microcephalus* group, *D. weneri*; we also detailed the karyotypes of two other species of *D. microcephalus* group, *D. decipiens* and *D. meridianus*. Sequences isolated from *D. soaresi* genome were used for chromosomal localization of the 5S rDNA gene. Probes were also used to observe the chromosomal localization of telomeric sequences in all the species in study. Finally, in an attempt to generate chromosomal probes for future studies of the telocentric chromosomes found in *Dendropsophus*, chromosome painting experiments were conducted with *D. nanus* and *D. walfordi*. *Dendropsophus seniculus* and *D. soaresi* had very similar karyotypes, with the NOR located on the long arm of chromosome pair 9. These karyotypes are similar to those of the other three species of *D. marmoratus* group already karyotyped (*D. marmoratus*, *D. nahdereri* and *D. melanargyreus*), although the karyotype of *D. nahdereri* differs from the others by presenting the NOR in the short arm of chromosome pair 1. Two types of 5S rDNA sequences were found in *D. soaresi*. While type I 5S rDNA sequence consists of 512 bp and includes a NTS composed of 390 bp, the NTS of type II 5S rDNA has only 249 bp. Type I 5S rDNA nucleotide sequence is identical to the 5S RNA gene found in *Gastrotheca riobambae*. When used as a probe, the type I 5S rDNA of *D. soaresi* was mapped in the long arm of chromosome pair 2 of *D. seniculus* and *D. soaresi*. Telomeric sequences used as probes detected chromosomal ends in *D. seniculus*, as previously observed in *D. marmoratus* and *D. melanargyreus*. However, the telomeric probes also resulted in centromeric and pericentromeric signals in the chromosomes of *D. soaresi*, except the telocentric pairs identified as 5 and 6. Among the three species of the *D. microcephalus* group analyzed herein, *D. decipiens*, *D. meridianus* and *D. weneri*, some differences could be noted. While *D. meridianus* and *D. weneri* had only one pair of telocentric chromosomes of medium size, *D. decipiens* karyotype had three telocentric pairs. The

species *D. berthaltzae*, which is included in the same clade of *D. decipiens*, has also three telocentric pairs of a medium size. The karyotypes of *D. decipiens*, *D. meridianus* and *D. wernerii* are also similar with regards to the NOR, which was located terminally in the long arm of a telocentric/subtelocentric chromosome identified as 12. The smallest telocentric chromosomes of *D. nanus* were microdissected and used to construct a probe, which was able to detect chromosome pair 15 of this species. When this probe was hybridized to the karyotype of different lineages of *D. nanus* and *D. walfordi*, a small telocentric chromosome pair was also detected, which suggests their homeology. This is the first work that includes chromosome painting to study the telocentric chromosomes in *Dendropsophus* and preliminary results presented here suggest that this may be an interesting tool to assess the chromosomal evolution in this genus.

Dedico à minha família, que me deu
todo o apoio que precisei, sempre.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo.

A Profa. Luciana Bolsoni Lourenço, principalmente pela oportunidade e por me abrir as portas. Por todos os conselhos, puxadas de orelha, e pela orientação inestimável.

Aos membros da banca por aceitar o convite, cujas críticas e questionamentos são sempre bem vindos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelo suporte durante o mestrado.

A CAPES/DS pela concessão da bolsa e à FAEPEX pelo auxílio financeiro em congressos.

Aos professores do programa, em especial a Profa. Cristina Pontes Vicente, pela orientação no PED, pelas aulas, dicas para meu crescimento profissional, e sempre pela companhia e conversas de corredor, e à Profa. Ana Cristina Veiga-Menoncello pela amizade e companhia em vários momentos.

A todos os colegas das disciplinas que cursei, pelo companheirismo e momentos durante as aulas. Levo cada um para sempre no meu coração.

A técnica de nosso laboratório, Alessandra Ferreira da Costa, pelo apoio nas atividades de rotina do laboratório, e pelas conversas e desabafos.

Aos colegas de laboratório: Débora, Juliana, Kaleb, Cintia, Daniel, Stenio, Maria, Julio, Karin, William, Lenita, Maurício, Reinaldo, Ariane, Raffael e Caique, e todos aqueles que passaram temporariamente, pelas contribuições na rotina de laboratório, troca de experiências e risadas eventuais. Em especial, à amiga linda, Débora Rodrigues, que sempre está pronta pra ouvir minhas reclamações e divagações, pela companhia sempre.

A secretária da pós-graduação, Liliam Panagio, pelas orientações burocráticas e atenção quando foi preciso.

Aos meus pais, Rosa Maria e Carlos Eduardo, pelo apoio constante, conselhos, discussões e orientações durante este período. Sem eles, eu não seria nada hoje. Eles me deram tudo o que precisei e até o que não precisei e sou muito grata por tudo o que fizeram por mim. Apesar de tudo, eles sabem o que é melhor sempre.

Ao meu amado marido, Felipe Franco da Rocha, que é quem mais me apoia em tudo que quero fazer, pensando na minha felicidade. Você foi a minha melhor escolha. Te amo infinito!

Aos meus amigos queridos que, além de agradecer, peço perdão pela ausência constante nas saídas, confraternizações, aniversários, mas que amo cada um como a um irmão.

Ao Coral Unicamp Zíper na Boca, em especial à regente Vívian Nogueira Dias e aos amigos que fiz ali, que eu não poderia deixar de agradecer. Por todos os momentos que passei no grupo nestes dois anos, pelas apresentações, saídas, bagunças no “busão” e por ter me ajudado a ser uma pessoa melhor e mais feliz.

Aos novos amigos que conheci nesse período e que tiveram um papel muito importante na minha vida. E a todos aqueles que não foram citados aqui por algum motivo, mas que passaram pela minha vida em algum momento e deixaram a sua marquinha.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

Sumário

Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxiii
1. Introdução	1
1.1. O gênero <i>Dendropsophus</i> : problemática taxonômica.....	2
1.2. Características citogenéticas de <i>Dendropsophus</i>	4
1.3. Sequências teloméricas e o gene ribossomal 5S como marcadores em estudos cromossômicos.....	8
1.3.1. Sequências teloméricas.....	8
1.3.2. O Gene ribossomal 5S.....	10
1.4. Avanços da pintura cromossômica na citogenética de Anura.....	12
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Espécimes utilizados.....	16
3.2. Obtenção das preparações cromossômicas.....	17
3.1.1. Coloração convencional, Impregnação por Prata e Bandamento C.....	17
3.3. Hibridação <i>in situ</i> utilizando sondas teloméricas.....	18
3.4. Análise do gene ribossomal 5S.....	18
3.5. Análise dos cromossomos telocêntricos por pintura cromossômica.....	19
4. Resultados	22
4.1. DNAr 5S de <i>D. soaresi</i>	23
4.2. Citogenética de <i>D. seniculus</i> e <i>D. soaresi</i> (pertencentes ao grupo de <i>D. marmoratus</i>).....	30
4.3. Citogenética de <i>D. decipiens</i> , <i>D. meridianus</i> e <i>D. werneri</i> (pertencentes ao grupo de <i>D. microcephalus</i>).....	32
4.4. Pintura do cromossomo 14 de <i>D. nanus</i>	36
5. Discussão	39
5.1. DNA ribossomal 5S em <i>Dendropsophus</i>	40
5.2. Citogenética no grupo <i>D. marmoratus</i>	40
5.3. Citogenética no grupo <i>D. microcephalus</i>	42
5.4. Pintura Cromossômica.....	44
6. Conclusões	47
7. Referências	49

Lista de Figuras

Figura 1. Metáfase de *Dendropsophus nanus* (ZUEC-18686) antes (**A**) e depois (**B**) da microdissecção de um cromossomo telocêntrico. O cromossomo microdissecado (circulado em vermelho em **A**) é presumivelmente referente a um dos cromossomos do par 15.

Figura 2. Sequências nucleotídicas de fragmentos de DNAr 5S isolados de *D. soaresi*. A região sombreada em cinza corresponde à presumida região transcritora composta por 120 pb. A região sombreada em rosa indica a região não transcritora do DNAr 5S. Setas vermelhas correspondem à região de anelamento dos primers 5S-A e 5S-B.

Figura 3. Constituição do inserto de 878 pb, que inclui duas unidades repetitivas do DNAr 5S de *D. soaresi*. **A.** Esquema do arranjo da sequência de DNAr 5S no inserto com 878 pb; **B.** Sequência nucleotídica do fragmento de 878 pb. Em cinza, as regiões presumivelmente transcritoras de 120 pb; em vermelho, as regiões de NTS.

Figura 4. Alinhamento das sequências de DNAr 5S obtidas de *D. soaresi*. As duas unidades contidas no inserto com 878 pb foram aqui representadas separadamente (368.1 5SC2-tipol e 368.1 5SC2-tipoll). A região presumivelmente transcritora está destacada em cinza.

Figura 5. Alinhamento das regiões presumivelmente transcritoras do DNAr 5S de *D. soaresi* com aquelas de *Engystomops freibergi*, *E. petersi*, *Pseudis tocantins*, *Physalaemus cuvieri*, *Gastrotheca riobambae*, *Pelophylax lessonae* e *P. ridibundus*. As caixas em lilás correspondem às regiões não sequenciadas.

Figura 6. Alinhamento da sequência de DNAr 5S do tipo I de *D. soaresi* (do clone 368.1 5SIC2) com a sequência de *Gastrotheca riobambae*. Destaque em azul para a região que apresenta similaridade entre os dois indivíduos. Regiões destacadas em cinza representa a região presumivelmente transcritora, em rosa representa o NTS e a linha representa a região do pseudogene observado em *Gastrotheca* por del Pino *et al.* (1992).

Figura 7. Cariótipos de *D. seniculus* (A-D) e *D. soaresi* (E-H) corados com Giemsa (A, E), submetidos ao bandamento C seguido de coloração com Giemsa (B, F) ou com DAPI (C, G) e hibridados com sonda telomérica (D, H). As setas indicam constrições secundárias.

Figura 8. Localização da NOR (A, C) e do DNA ribossomal 5S (B, D) no cariótipo de *D. seniculus* (A,B) e *D. soaresi* (C, D). As setas em B e D indicam os sinais de hibridação da sonda de DNAr 5S construída a partir da sequência do tipo I isolada de *D. soaresi*.

Figura 9. Cariótipos de *D. decipiens* (A-C), *D. meridianus* (D-F) e *D. weneri* (G-I) corados com Giemsa (A, D e G), submetidos ao bandamento C seguido de coloração com Giemsa (B, E e H) ou com DAPI (C, F e I). A seta indicam constrições secundárias. Em destaque em A, D e G, pares cromossômicos 12 com a NOR revelada pelo método Ag-NOR.

Figura 10. Hibridação de sondas teloméricas nos cariótipos de *D. decipiens* (A) e de *D. meridianus* (B).

Figura 11. Hibridação de sondas teloméricas em metáfase de *D. weneri*. A. Coloração com DAPI. B. Sobreposição da imagem dos sinais de hibridação das sondas com a imagem dos cromossomos corados com DAPI.

Figura 12. Hibridação da sonda construída a partir de cromossomos microdissecados do exemplar ZUEC 18686 de *D. nanus* (de Rio Claro/SP) em metáfases do mesmo exemplar. A. Cariótipo de *D. nanus* corado com Giemsa, com destaque para o cromossomo microdissecado. B-D. Metáfase do exemplar ZUEC 18686 de *D. nanus* (de Rio Claro/SP) hibridada com a sonda. B. Coloração com DAPI. C. Sinal de hibridação da sonda. D. Sobreposição das imagens mostradas em A e B. E. Cariograma montado com os cromossomos da metáfase mostrada em D. F-G. Cromossomos de outras duas metáfases do exemplar ZUEC 18686, também hibridados com a sonda. Note que em G, além dos cromossomos 15, algumas regiões de um dos homólogos do par 14 também apresentam sinais de hibridação da sonda.

Figura 13. Hibridação da sonda do cromossomo 15 de *D. nanus* (construída a partir de um exemplar de Rio Claro/SP) com metáfases de *D. nanus* de Serra da Bodoquena/MS

(ZUEC-12398) (A), *D. walfordi* de Guajará-Mirim/RO (ZUEC-12204) (B). À esquerda, imagens do DAPI e à direita, imagens de DAPI sobrepostas com as da sonda.

Figura 14. Relações filogenéticas entre *D. nanus* e *D. walfordi*. (Cladograma reproduzido de Medeiros *et al.*, 2013). Os números acima dos ramos constituem valores do *bootstrap* (em porcentagem).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies de *Dendropsophus* já cariotipadas.

Tabela 2. Espécimes utilizados na análise citogenética. ¹SMRP: Coleção de tecidos e suspensões celulares do Laboratório de Estudos Cromossômicos, IB/ UNICAMP; ²ZUEC-AMP: Coleção de anfíbios do Museu de Zoologia Prof. Dr. Adão José Cardoso, IB/UNICAMP.

Tabela 3. Similaridade entre as sequências da região presumivelmente transcritora do DNAr 5S de *D. soaresi* com as de outras espécies de anuros. *1Nº de acesso do GenBank.

1.INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Dendropsophus*: problemática taxonômica

A Classe Amphibia, com mais de 7.000 espécies já descritas e catalogadas, está dividida em três ordens, Caudata, Gymnophiona e Anura, sendo esta última a que contém o maior número de espécies conhecidas. A ordem Anura conta atualmente com 6.200 espécies distribuídas em 54 famílias (Frost, 2013), que são encontradas por todo o globo, com exceção dos polos, e observadas em diferentes tipos de clima, vegetação e altitude (Frost, 2013; Duellman e Trueb, 1986).

A família Hylidae Rafinesque, 1815 é a que possui maior riqueza de espécies da ordem Anura, com aproximadamente 920 espécies, encontradas principalmente em regiões tropicais (Américas, Ásia e África) e temperadas (Eurásia temperada). Estas espécies estão divididas em três subfamílias (Hylinae, Pelodriadinae e Phyllomedusinae) (Frost, 2013). A subfamília Hylinae é composta por 667 espécies, distribuídas em 40 gêneros, e *Dendropsophus*, objeto do presente estudo, está dentre os gêneros mais ricos dessa subfamília.

O gênero *Dendropsophus* Fitzinger, 1843 juntamente com os gêneros *Lysapsus*, *Pseudis*, *Scarthyia*, *Scinax*, *Sphaenorhynchus* e *Xenohyla* formam a tribo Dendropsophini (Faivovich *et al.*, 2005), e abriga 94 espécies neotropicais distribuídas desde o sul do México na América Central até regiões tropicais da América do Sul (Brasil, e Norte da Argentina e Uruguai) (Frost, 2013). Espécies deste gênero já foram encontradas em vários tipos de ambientes; algumas ocorrem em áreas de grande altitude, como é o caso de *D. labialis* e de *D. minutus*, que ocorrem em áreas com até 2.000 m de altitude (Ruiz-Carranza *et al.*, 1996; McDiarmid e Donnelly, 2005).

O gênero *Dendropsophus* foi revalidado por Faivovich *et al.* (2005) para abrigar espécies de hílídeos que confirmada ou presumivelmente apresentem o número diploide de $2n=30$. O monofiletismo de *Dendropsophus* é suportado por várias sinapomorfias moleculares, referentes a genes nucleares e, principalmente, a genes mitocondriais (Faivovich *et al.*, 2005). Por outro lado, possíveis sinapomorfias morfológicas para esse táxon ainda são apontadas com cautela. Faivovich *et al.* (2005) sugerem apenas duas aparentes sinapomorfias morfológicas para esse gênero, que consistem na extrema redução do osso quadratojugal e na fórmula dentária de girino representada pelo símbolo 1/2.

A maioria das espécies de *Dendropsophus* foi distribuída por Faivovich *et al.* (2005) em nove grupos, levando em consideração as semelhanças morfológicas

compartilhadas dentre elas. Foram eles: *D. columbianus* (3 espécies), *D. garagoensis* (4 espécies), *D. labialis* (3 espécies), *D. leucophyllatus* (8 espécies), *D. marmoratus* (8 espécies), *D. microcephalus* (33 espécies), *D. minimus* (4 espécies), *D. minutus* (4 espécies) e *D. parviceps* (15 espécies). Três desses grupos, *i.e.* *D. leucophyllatus*, *D. marmoratus* e *D. microcephalus*, receberam algum suporte dos dados moleculares analisados por Faivovich *et al.* (2005), mas sinapomorfias morfológicas foram sugeridas apenas para os dois últimos. Em relação ao grupo *D. parviceps*, os autores expressam especial cautela e argumentam que optaram por reconhecê-lo em função dos trabalhos anteriores, já que não encontraram evidências que pudessem rejeitar seu monofiletismo.

Confirmando as suspeitas de Faivovich *et al.* (2005), Wiens *et al.* (2010), com base em um maior número de espécies de *Dendropsophus*, puderam demonstrar o parafiletismo do grupo *D. parviceps*. Nesse mesmo trabalho, Wiens e colaboradores dão suporte ao grupo *D. labialis* e reconhecem o parafiletismo do grupo *D. microcephalus* em relação a *D. riveroi*, espécie previamente alocada no grupo *D. minimus*. Além disso, questionam o monofiletismo do grupo de *D. leucophyllatus* e de *D. minimus*.

Uma característica que dificulta ainda mais o esclarecimento dos relacionamentos interespecíficos do gênero é a grande similaridade morfológica observada entre diferentes espécies, que frequentemente tem gerado importantes problemas taxonômicos, como a identificação errônea de exemplares e a subestimativa da riqueza de espécies no grupo. Tais questões são especialmente observadas em relação ao grupo *D. microcephalus*, não apenas por ser o grupo com maior número de espécies dentre os nove reconhecidos atualmente, mas principalmente por reunir espécies de tamanho bastante reduzido (ver Napoli e Caramaschi, 1999a, b; e Moravec *et al.*, 2008, para alguns exemplos).

As questões taxonômicas referentes a *D. nanus* são exemplos representativos desse tipo de problema. Espécies como *D. sanborni*, *D. jimi* e *D. walfordi* já foram confundidas com *D. nanus*, devido à semelhança morfológica observada entre elas (ver discussão em Medeiros *et al.*, 2013). É interessante destacar que, apesar da semelhança morfológica, *D. nanus* não é proximamente relacionada filogeneticamente a *D. sanborni* e *D. jimi* (Faivovich *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2013) e que podem ser facilmente diferenciadas cariotipicamente (Medeiros *et al.*, 2003). Enquanto indivíduos de *D. nanus* apresentam quatro pares de cromossomos telocêntricos, e a NOR localizada em um par de cromossomos metacêntricos (região organizadora de nucléolo), *D. sanborni* apresenta cinco pares de cromossomos telocêntricos e um deles é portador de NOR (Medeiros *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2013). Com base nessas

diferenças citogenéticas, Medeiros *et al.* (2003) puderam esclarecer que espécimes previamente identificados como *D. sanborni* por Skuk e Langone (1992) correspondiam a exemplares de *D. nanus*, e espécimes previamente identificados como *D. nanus* por Bogart (1973) eram, na verdade, *D. sanborni*.

Por outro lado, *D. nanus* e *D. walfordi* apresentam cariótipos idênticos (Medeiros *et al.*, 2013) e recentes estudos filogenéticos têm recuperado o parafiletismo dessas espécies (Fouquet *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2013). Estas espécies já foram alvo de alguns estudos taxonômicos devido à sua grande semelhança morfológica, e por isso, espécimes de *D. walfordi* foram previamente considerados como sinonímia de *D. nanus* (Lutz, 1973). Entretanto, Langone e Basso (1989), com base em dados de vocalização e morfologia dos girinos, revalidaram *D. walfordi*, apontando assim a necessidade de uma ampla revisão desses táxons.

Situação diferente daquelas citadas é também a referente ao cariótipo de *D. jimi*, que se mostra muito similar ao cariótipo de *D. sanborni*, embora essas não sejam espécies proximamente relacionadas filogeneticamente (Medeiros *et al.*, 2013).

No grupo *D. labialis*, outros exemplos de problemas na delimitação de espécies podem ser vistos. Guarnizo *et al.* (2012), utilizando caracteres morfológicos, acústicos e de DNA, identificaram a existência de mais de uma espécie dentre indivíduos previamente considerados exemplares de *D. labialis*. A morfologia se mostrou bastante conservada dentre os indivíduos analisados, mas os cantos dos espécimes e as sequências de DNA mitocondrial e nuclear divergiram a ponto de permitirem o reconhecimento de diferentes linhagens, caracterizadas como distintas espécies.

Fica claro, portanto, que apesar dos recentes estudos envolvendo as espécies de *Dendropsophus*, não apenas o relacionamento filogenético nesse gênero permanece um interessante assunto para estudos como também a delimitação de diversas espécies nele contidas.

1.2. Características citogenéticas de *Dendropsophus*

Até hoje, apenas 31 das 94 espécies de *Dendropsophus* foram cariotipadas (Tabela 1) (Beçak, 1968; Rabello, 1970; Foresti, 1972; Bogart, 1973; Anderson, 1991; Skuk e Langone, 1992; Kaiser *et al.*, 1996; Medeiros *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2005; Nunes, 2006; Medeiros *et al.*, 2013; Suárez *et al.*, 2013).

Embora os cariótipos dessas espécies apresentem o mesmo número cromossômico ($2n=30$), diferem em relação ao número de cromossomos telocêntricos e, conseqüentemente, em relação ao NF (número fundamental), que varia de 60 [como visto em *D. minutus* (Gruber *et al.*, 2005)] até 50 [como é o caso de *D. sanborni* (Medeiros *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2005) e *D. jimi* (Medeiros *et al.*, 2013)]. Apesar de o número de cromossomos telocêntricos ser uma relevante característica na distinção de espécies de *Dendropsophus*, ainda não foi possível inferir os passos evolutivos que resultaram na divergência cariotípica hoje observada nesse gênero. Os relacionamentos filogenéticos entre essas espécies ainda não estão bem elucidados, no entanto alguns dados obtidos em estudos recentes (Medeiros *et al.*, 2013), que reúnem análises citogenéticas e filogenéticas, mostraram que as espécies com quatro pares de cromossomos telocêntricos estão presentes tanto em clados mais basais como em clados mais derivados.

Além do número de cromossomos telocêntricos, a localização da NOR tem sido outra característica informativa na análise de *Dendropsophus*. Como comentado no item anterior, *D. nanus* e *D. sanborni*, duas espécies do grupo de *D. microcephalus* morfologicamente muito semelhantes e frequentemente envolvidas em questões taxonômicas, podem ser facilmente distinguidas pela análise citogenética, tanto pela diferença no número de cromossomos telocêntricos, como pela localização diferencial de NOR em seus cariótipos (ver trabalhos de Skuk e Langone, 1992; Medeiros *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2005).

Já as análises citogenéticas que utilizaram a técnica de bandamento C têm mostrado que as espécies de *Dendropsophus* apresentam a heterocromatina predominantemente distribuída nas regiões centroméricas dos cromossomos (Anderson, 1991; Kaiser *et al.*, 1996; Medeiros *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2013). Algumas pequenas bandas heterocromáticas não-centroméricas já foram encontradas em algumas espécies, como, por exemplo, em *D. microcephalus*, *D. phlebodes* e *D. ebraccatus* (Kaiser *et al.*, 1996), mas apesar disso, a presença da heterocromatina neste gênero não tem se destacado como um bom marcador citogenético para as espécies.

Tabela 1. Espécies de *Dendropsophus* já cariotipadas.

Grupo	Espécie	Nome usado na descrição original	Pares telocêntricos	Publicação original
<i>D. columbianus</i>	<i>D. carnifex</i>	<i>Hyla carnifex</i>	Não citado	Duellman e Trueb, 1983
<i>D. labialis</i>	<i>D. labialis</i>	<i>Hyla labialis</i>	5, 6, 7, 13 e 15	Bogart, 1973
	<i>D. anceps</i>	<i>Hyla anceps</i>	5,6 e 12 (Foresti, 1972) 7 (Bogart, 1973)	Foresti, 1972; Bogart, 1973
	<i>D. ebraccatus</i>	<i>Hyla ebraccata</i>	10	Duellman e Cole, 1965; Kaiser <i>et al.</i> , 1996
<i>D. leucophyllatus</i>	<i>D. elegans</i>	<i>Hyla elegans</i>	5, 11, 14 e 15	Gruber <i>et al.</i> , 2005
	<i>D. leucophyllatus</i>	<i>Hyla leucophyllata</i>	6, 12, 14 e 15	Bogart, 1970, 1973; Bogart e Bogart, 1971; Foresti, 1972
	<i>D. gr. leucophyllatus</i>	<i>Hyla gr. leucophyllata</i>	Não citado	Bogart e Bogart, 1971
	<i>D. marmoratus</i>	<i>Hyla marmorata</i>	5, 6, 7, 13 e 15	Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973; Suárez <i>et al.</i> , 2013
<i>D. marmoratus</i>	<i>D. nahdereri</i>	<i>Hyla nahdereri</i>	5, 6, 7, 11 e 15	Gruber <i>et al.</i> , 2005
	<i>D. melanargyreus</i>	<i>Dendropsophus melanargyreus</i>	5, 6, 7, 13 e 15	Suárez <i>et al.</i> , 2013
	<i>D. berthalutzae</i>	<i>Hyla berthalutzae</i>	5, 6, 11 e 15	Foresti, 1972; Skuk e Langone, 1992; Gruber <i>et al.</i> , 2005
	<i>D. bipunctatus</i>	<i>Dendropsophus bipunctatus</i> <i>Hyla bipunctata</i>	6 e 14	Foresti, 1972; Bogart, 1973; Nunes, 2006
<i>D. microcephalus</i>	<i>D. branneri</i>	<i>Dendropsophus branneri</i> <i>Hyla branneri</i>	6, 11 e 14	Foresti, 1972; Nunes, 2006
	<i>D. cruzi</i>	<i>Hyla cruzi</i>	5, 11 e 15	Gruber <i>et al.</i> , 2005
	<i>D. decipiens</i>	<i>Hyla decipiens</i>	5, 6 e 8 (Foresti, 1972) 5 e 6 (Bogart, 1973)	Foresti, 1972; Bogart, 1973

Tabela 1. Espécies de *Dendropsophus* já cariotipadas. (cont.)

	<i>D. elianeae</i>	<i>Hyla elianeae</i>	5 e 6	Gruber <i>et al.</i> , 2005; Medeiros <i>et al.</i> , 2013
	<i>D. jimi</i>	<i>Dendropsophus jimi</i>	5, 6, 12, 13 e 15	Medeiros <i>et al.</i> , 2013
	<i>D. leali</i>	<i>Hyla leali</i>	-	Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973
	<i>D. meridianus</i>	<i>Hyla meridiana</i>	6 e 12	Foresti, 1972
	<i>D. microcephalus</i>	<i>Hyla microcephala</i>	5	Duellman e Cole, 1965; León, 1970;
<i>Hyla microcephala</i>		Bogart, 1973; Anderson, 1991; Kaiser <i>et al.</i> , 1996		
<i>martini</i>				
<i>Hyla microcephala</i> <i>microcephala</i>				
<i>D. microcephalus</i>	<i>D. nanus</i>	<i>Dendropsophus nanus</i>	6, 12, 14 e 15	Rabello, 1970; Rabello <i>et al.</i> , 1971; Bogart, 1973; Skuk e Langone, 1992; Medeiros <i>et al.</i> , 2003; Gruber <i>et al.</i> , 2005; Medeiros <i>et al.</i> , 2013
		<i>Hyla nana</i>		
	<i>D. oliveirai</i>	<i>Hyla oliveirai</i>	3, 6 e 7	Foresti, 1972
	<i>D. phlebodes</i>	<i>Hyla phlebodes</i>	5 e 13	Duellman e Cole, 1965; Duellman, 1967; Kaiser <i>et al.</i> , 1996
	<i>D. rhodopeplus</i>	<i>Hyla rhodopepla</i>	7	Bogart, 1973
	<i>D. rubicundulus</i>	<i>Hyla rubicundula</i>	5, 6 e 15	Rabello, 1970; Bogart, 1973; Gruber <i>et al.</i> , 2005
				Skuk e Langone, 1992; Medeiros <i>et al.</i> , 2003; Gruber <i>et al.</i> , 2005
	<i>D. sanborni</i>	<i>Hyla sanborni</i>	5, 6, 12, 13 e 15	Medeiros <i>et al.</i> , 2013
	<i>D. walfordi</i>	<i>Dendropsophus walfordi</i>	6, 12, 14 e 15	Rabello, 1970; Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973, Gruber <i>et al.</i> , 2005; Nunes, 2006
<i>D. minutus</i>	<i>D. minutus</i>	<i>Dendropsophus minutus</i> <i>Hyla minuta</i>	-	

Tabela 1. Espécies de *Dendropsophus* já cariotipadas. (cont.)

	<i>D. microps</i>	<i>Hyla microps</i>	5, 6, 7 e 15	Beçak, 1968; Bogart, 1973; Gruber <i>et al.</i> , 2005
<i>D. parviceps</i>	<i>D. parviceps</i>	<i>Hyla parviceps</i>	5, 6, 7 e 13	Duellman e Cole, 1965; Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973
	<i>D. ruschii</i>	<i>Dendropsophus ruschii</i>	Não informado	Nunes, 2006
	<i>D. subocularis</i>	<i>Hyla subocularis</i>	Não citado	Duellman, 1970

Apesar dos interessantes achados citogenéticos relativos à *Dendropsophus*, a maioria das espécies deste gênero ainda não teve o cariótipo descrito, o que dificulta o avanço das análises citogenéticas evolutivas. A escassez de informações afeta principalmente alguns grupos, como *D. microcephalus* e *D. marmoratus*, cuja descrição citogenética foi feita apenas para 16 de 33 espécies no grupo *D. microcephalus* e três das oito espécies incluídas no grupo *D. marmoratus* (Tabela 1). Desta forma, torna-se necessária a ampliação da descrição citogenética para espécies deste gênero, o que poderá contribuir com outros dados da literatura, como dados comportamentais, filogenéticos e taxonômicos. Além disso, o estudo de outros marcadores cromossômicos, ainda pouco utilizados em espécies de *Dendropsophus*, como o DNA ribossomal 5S e sequências teloméricas, dentre outros possíveis, pode promover uma melhor caracterização dos cariótipos de *Dendropsophus*, e auxiliar na comparação destes.

1.3. Sequências teloméricas e o gene ribossomal 5S como marcadores em estudos cromossômicos

1.3.1. Sequências teloméricas

É amplamente conhecido que os telômeros, regiões das extremidades dos cromossomos, têm a função de proteção e estabilidade dos cromossomos. Estas regiões cromossômicas são caracterizadas por sequências repetitivas curtas e muito conservadas entre os vertebrados (Meyne *et al.*, 1989; 1990). A sequência telomérica mais comumente encontrada em espécies já estudadas, principalmente vertebrados, é a sequência (5' TTAGGG 3')_n (Moyzis *et al.*, 1988; Meyne *et al.*, 1989, 1990; Faravelli *et al.*, 2002), mas

em algumas espécies de plantas o telômero é composto por $(5' \text{TTTAGGG } 3')_n$ (Richards e Ausubel, 1988; Ganai *et al.*, 1991; Begum *et al.*, 2009).

Embora em muitos casos cópias repetidas *in tandem* de sequências 5' TTAGGG3' possam ser evidenciadas por hibridação *in situ* como marcações muito tênues exclusivamente nos telômeros dos cromossomos (Meyne *et al.*, 1990; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008), ocasionalmente sequências desse tipo podem ser observadas em regiões intersticiais dos cromossomos de muitas espécies (revisão em Ruiz-Herrera *et al.*, 2002; Ocalewicz, 2012).

Esses sítios intersticiais de sequências teloméricas – chamados de ITSs, Interstitial Telomeric Sites - estão distribuídos em genomas de algumas espécies e podem se apresentar de duas formas: as ITSs heterocromáticas (Het-ITS), que são blocos heterocromáticos de sequências teloméricas observadas principalmente em regiões pericentroméricas, presentes em número limitado no genoma; e as ITSs curtas (short-ITS ou s-ITS) que são sequências caracterizadas por apenas alguns hexâmeros de sequências teloméricas distribuídas internamente nos cromossomos e presumivelmente presente em todas as espécies de vertebrados (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). Há várias hipóteses acerca da origem destes dois tipos de sequências intersticiais. As ITSs heterocromáticas são consideradas remanescentes de rearranjos cromossômicos ancestrais, como fusões e translocações, em diferentes táxons (Hastie e Allshire, 1989; Meyne *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1993; Thomsen *et al.*, 1996; Fagundes e Yonenaga-Yassuda, 1998; Metcalfe *et al.*, 1998; Pellegrino *et al.*, 1999; Faravelli *et al.*, 2002). Além disso, estas regiões podem ter alta susceptibilidade à fissão, podendo causar, desta forma, uma grande instabilidade cromossômica (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). Já as ITSs curtas podem ser originadas a partir da inserção de sequências teloméricas pelo sistema de reparo do DNA, através da ação direta da telomerase ou a partir da captura e inserção de um fragmento telomérico (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008).

Sendo assim, o estudo da localização e caracterização destas sequências se torna uma importante estratégia de estudos de evolução cariotípica (ver revisão de Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). Essa abordagem tem sido utilizada em muitos grupos de vertebrados (Scherthan, 1990; Wiley *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993; Vermeesch *et al.*, 1996; Garagna *et al.*, 1997; Fagundes *et al.*, 1997; Faravelli *et al.*, 2002; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008).

Em anfíbios, a localização exclusivamente telomérica de sequências $(5' \text{TTAGGG } 3')_n$ já foi observada em espécies das famílias Leptodactylidae, Bufonidae e

Brachycephalidae (Meyne *et al.*, 1990; Foote *et al.*, 1991; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008). No entanto, ITSs também já foram encontradas em algumas espécies, a saber: *Xenopus laevis* [de acordo com Meyne *et al.* (1990), com base na análise das imagens mostradas em Meyne *et al.* (1989); Nanda *et al.*, 2008], *Xenopus clivii* (Nanda *et al.*, 2008), *Pristimantis cruentus* (Schmid *et al.*, 2010) e nos hílídeos *Hyla versicolor*, *H. squirella*, *H. chrysoscelis*, *H. femoralis*, *H. cinerea*, *Pseudacris nigrita*, *P. brimleyi*, *Aplastodiscus albofrenatus*, *A. arildae*, *Scarthyia goinorum*, *Sphaenorhynchus lacteus* e *S. dorisae* (Meyne *et al.*, 1990; Wiley *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 2009; Suárez *et al.*, 2013).

No caso de *Scarthyia goinorum*, espécie pertencente à tribo Dendropsophini, foi observada a presença de uma ITS centromérica em apenas um par cromossômico, tendo sido esta característica interpretada pelos autores como uma evidência de possível fusão envolvida na redução do número cromossômico de $2n=24$ para $2n=22$ observada nesse gênero (Suárez *et al.*, 2013). Por outro lado, Wiley *et al.* (1992), analisando os dados obtidos para *H. versicolor*, *H. squirella*, *H. chrysoscelis*, *H. femoralis*, *H. cinerea*, *Pseudacris nigrita*, *P. brimleyi*, e Carvalho *et al.* (2009), analisando *A. albofrenatus*, não encontraram nenhuma evidência da relação das ITSs observadas nessas espécies com rearranjos cromossômicos, como fusões, fissões e inversões.

No gênero *Dendropsophus* ainda não foi observada nenhuma ITS nas espécies estudadas até o momento.

1.3.2. O Gene ribossomal 5S

Outro gene que tem se mostrado valioso marcador cromossômico em análises citogenéticas comparativas é o DNA ribossomal 5S. Nos genomas nucleares de eucariotos superiores, a família gênica de DNAr 5S é composta por múltiplas cópias organizadas *in tandem* de regiões de 120 pb, altamente similares e susceptíveis à transcrição, intercaladas por espaçadores não transcritos e variáveis (NTS), que podem diferir tanto em comprimento quanto em composição nucleotídica (revisões de Gerbi, 1985; e Martins e Wasko, 2004).

Estudos apontam que a região transcrita (de 120 pb) do gene ribossomal 5S é muito conservada evolutivamente na sua estrutura e composição, o que faz com que esse gene seja considerado como um bom marcador para estudos citogenéticos e genéticos comparativos, permitindo a análise inclusive de espécies não tão próximas

filogeneticamente (Vitelli *et al.*, 1982; Martins e Galetti, 1999; Ferreira *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2012).

Já o NTS tem se mostrado altamente variável nos diferentes organismos, mesmo entre espécies mais relacionadas (para exemplos, ver trabalhos de Hallenberg e Frederiksen, 2001; Martins e Wasko, 2004; Vittorazzi *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2012). Apesar desta grande variação, o NTS contém elementos conservados com o importante papel regulador da transcrição do gene ribossomal 5S (Martins e Wasko, 2004; Rodrigues *et al.*, 2012).

Distintas classes de sequências de DNAr 5S, que diferem particularmente no tamanho e na composição nucleotídica do NTS têm sido descritas. Estas características têm sido amplamente notadas em peixes (Martins e Galleti, 2001), e também em outras classes de organismos como mamíferos e plantas (Frederiksen *et al.*, 1997; Falistocco *et al.*, 2007). Alguns estudos evidenciaram que diferentes classes de DNAr 5S ocupam preferencialmente diferentes sítios cromossômicos (exemplos em Komiya *et al.*, 1986; Murakami e Fujitani 1998; Martins e Galleti, 1999, 2001; e Cai *et al.*, 2005), podendo o DNAr 5S ser também considerado um marcador citogenético informativo.

Em anfíbios, principalmente os anuros, o tema ainda é pouco estudado, mas em algumas espécies já foram encontrados e localizados diferentes tipos de sequências de DNAr 5S como, por exemplo, em *Xenopus laevis* e *X. borealis* (Brown e Sugimoto, 1973; Korn e Brown, 1978; Peterson *et al.*, 1980; Harper *et al.*, 1983), *Physalaemus ephippifer* (Nascimento *et al.*, 2010), *Physalaemus cuvieri* (Vittorazzi *et al.*, 2011), em *Engystomops petersi* e *E. freibergi* (Rodrigues *et al.*, 2012), e outras espécies das famílias Ascaphidae, Discoglossidae e Ranidae (Vitelli *et al.*, 1982; Schmid *et al.*, 1987).

Apesar do crescimento do número de estudos de localização cromossômica e organização molecular do gene ribossomal 5S, para o gênero *Dendropsophus* ainda não há descrições da localização cromossômica deste gene e, levando em conta a escassez de marcadores citogenéticos efetivos para o gênero, o estudo do 5S pode ser muito útil para auxiliar na diferenciação de cariótipos de espécies muito semelhantes.

1.4. Avanços da pintura cromossômica na citogenética de Anura

Uma interessante estratégia que permite a análise de possíveis relações de homeologias e evolução cromossômica envolve o emprego da técnica de pintura

cromossômica. Essa técnica depende da construção de sondas cromossômicas, que podem ser obtidas a partir de cromossomos inteiros, que podem ser isolados por citometria de fluxo (Gray *et al.*, 1975; Telenius *et al.*, 1992) ou isolados de preparações cromossômicas pela técnica de microdissecção (Meltzer *et al.*, 1992; Kubickova *et al.*, 2002).

A pintura cromossômica tem sido amplamente utilizada e bem sucedida em muitos grupos de vertebrados, como mamíferos (Chowdhary e Raudsepp, 2001; Kubickova *et al.*, 2002; Ferguson-Smith e Trifonov, 2007), aves (Shetty *et al.*, 1999; Guttenbach *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2008), peixes (Rab *et al.*, 2008; Vicari *et al.*, 2011) e alguns invertebrados (Fukova *et al.*, 2007; Teruel *et al.* 2009; Martins *et al.*, 2013), tendo auxiliado a elucidar vários eventos de rearranjos cromossômicos ocorridos nesses grupos.

Entretanto, para alguns grupos, como anfíbios e répteis, a técnica da pintura cromossômica ainda permanece com algumas limitações (Krylov *et al.*, 2010, Trifonov *et al.*, 2011), mas com grande potencial para estudos evolutivos nestes grupos.

Em anuros, o primeiro trabalho que mostrou resultados satisfatórios de pintura cromossômica foi publicado em abril de 2010, por Krylov e colaboradores e nele os autores comentam as várias dificuldades encontradas na padronização da técnica, principalmente em hibridações *in situ* entre espécies diferentes (Krylov *et al.*, 2010).

No caso do gênero *Dendropsophus*, ainda não há estudos utilizando a técnica de pintura cromossômica. Entretanto, a partir de cromossomos microdissecados, poderiam ser obtidas sondas para diferentes cromossomos telocêntricos e a hibridação dessas sondas em cariótipos com diferentes números de braços cromossômicos poderiam revelar a presença ou não de segmentos homeólogos entre cariótipos distintos. Frente a este cenário, o uso da pintura cromossômica no estudo da origem de cromossomos telocêntricos em *Dendropsophus* poderia ajudar a elucidar os eventos que resultaram na variação do número deste tipo cromossômico, encontrada nas diferentes espécies do gênero, levando em consideração a manutenção do número diploide $2n=30$.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Ampliar as informações cariotípicas disponíveis para o gênero *Dendropsophus*, buscando contribuir para a inferência de possíveis homeologias cromossômicas.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever o cariótipo de *D. weneri* (do grupo *D. microcephalus*), *D. seniculus* e *D. soaresi* (do grupo *D. marmoratus*).
- Fornecer novas informações sobre o cariótipo de *D. meridianus* e *D. decipiens* (do grupo *D. microcephalus*), acrescentando a descrição da localização de NORs, bandas heterocromáticas e sequências teloméricas.
- Microdissecar um dos cromossomos telocêntricos de uma linhagem evolutiva de *D. nanus* (que apresenta NF = 52), construir sondas cromossômicas a partir do material microdissecado e hibridá-las nos cariótipos de outra linhagem evolutiva reconhecida para essa espécie e em *D. walfordi*.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Espécimes utilizados

Para análise citogenética clássica foram utilizados espécimes de *D. decipiens*, *D. meridianus* e de *D. werneri*, do grupo *D. microcephalus*, e de *D. seniculus* e *D. soaresi*, do grupo *D. marmoratus*, provenientes de diversas localidades, como consta na Tabela 2. Para os ensaios de pintura cromossômica, foram utilizados espécimes de *D. nanus* e *D. walfordi* (Tabela 2).

Tabela 2. Espécimes utilizados na análise citogenética. ¹SMRP: Coleção de tecidos e suspensões celulares do Laboratório de Estudos Cromossômicos, IB/ UNICAMP; ²ZUEC-AMP: Coleção de anfíbios do Museu de Zoologia Prof. Dr. Adão José Cardoso, IB/UNICAMP.

Espécie	SMRP ¹	Voucher ²	Localidade
<i>D. decipiens</i>	SMRP 346.1	ZUEC-AMP 18095	Alta Floresta/MT
	SMRP 346.2	ZUEC-AMP 18096	Alta Floresta/MT
	SMRP 346.3	ZUEC-AMP 18097	Alta Floresta/MT
	SMRP 346.4	ZUEC-AMP 18098	Alta Floresta/MT
	SMRP 346.5	ZUEC-AMP 18099	Alta Floresta/MT
	SMRP 346.8	ZUEC-AMP 16976	Viçosa/MG
	SMRP 346.9	ZUEC-AMP 16977	Viçosa/MG
<i>D. meridianus</i>	SMRP 328.1	ZUEC-AMP 23642	Rio de Janeiro/RJ
	SMRP 328.2	ZUEC-AMP 23643	Rio de Janeiro/RJ
	SMRP 328.3	ZUEC-AMP 23644	Rio de Janeiro/RJ
	SMRP 328.4	ZUEC-AMP 23645	Rio de Janeiro/RJ
	SMRP 328.5	ZUEC-AMP 23646	Rio de Janeiro/RJ
	SMRP 328.6	ZUEC-AMP 23647	Rio de Janeiro/RJ
	SMRP 328.7	ZUEC-AMP 23648	Rio de Janeiro/RJ
	SMRP 328.8	ZUEC-AMP 23649	Rio de Janeiro/RJ
<i>D. seniculus</i>	SMRP 373.1	ZUEC-AMP 17225	Ribeirão Grande/SP
	SMRP 373.2	ZUEC-AMP 17226	Ribeirão Grande/SP
	SMRP 373.3	ZUEC-AMP 17227	Ribeirão Grande/SP
	SMRP 373.4	ZUEC-AMP 17228	Ribeirão Grande/SP
<i>D. soaresi</i>	SMRP 368.1	ZUEC-AMP 16867	Barreiras/BA
	SMRP 368.2	ZUEC-AMP 16868	Barreiras/BA
	SMRP 368.3	ZUEC-AMP 16869	Barreiras/BA
	SMRP 368.4	ZUEC-AMP 16870	Barreiras/BA
	SMRP 368.5	ZUEC-AMP 16871	Barreiras/BA
	SMRP 368.6	ZUEC-AMP 16872	Barreiras/BA
	SMRP 368.7	ZUEC-AMP 16873	Barreiras/BA
	SMRP 368.8	ZUEC-AMP 16874	Barreiras/BA
	SMRP 368.9	ZUEC-AMP 16875	Barreiras/BA
<i>D. werneri</i>	SMRP 329.1	ZUEC-AMP 16316	São Vicente/SP
	SMRP 329.2	ZUEC-AMP 16317	São Vicente/SP
	SMRP 329.3	ZUEC-AMP 16318	São Vicente/SP
	SMRP 329.4	ZUEC-AMP 16319	São Vicente/SP
	SMRP 329.5	ZUEC-AMP 16320	São Vicente/SP
	SMRP 329.6	ZUEC-AMP 16321	São Vicente/SP
<i>D. nanus</i>	SMRP 47.234	ZUEC-AMP 18686	Rio Claro/SP
	SMRP 47.177	ZUEC-AMP 12398	Serra da Bodoquena/MS
<i>D. walfordi</i>	SMRP 177.14	ZUEC-AMP 12204	Guajará-Mirim/RO

3.2. Obtenção das preparações cromossômicas

As preparações cromossômicas foram obtidas de amostras de suspensões celulares de intestino e testículos, retirados dos exemplares de *Dendropsophus* tratados previamente com colchicina, segundo o método descrito por Schmid (1978) e Schmid *et al.* (1979), com algumas modificações. O tratamento com colchicina foi feito “in vivo”, por meio da injeção subcutânea de solução (Sigma-Aldrich) a 2% (0,02 mL por grama do animal), no mínimo, 5 horas antes da eutanásia do animal para remoção dos testículos e intestino. Depois de removido, o intestino foi aberto com auxílio de uma tesoura cirúrgica, para a exposição de seu epitélio, e colocado em um recipiente contendo solução de citrato de sódio 0,9%. Depois de cerca de 40 minutos, o intestino foi transferido para uma placa de Petri contendo fixador metanol-ácido acético (3:1), onde foi raspado vigorosamente. O material obtido foi desagregado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e mantido no fixador por aproximadamente 5 minutos.

Já os testículos foram removidos dos exemplares e prontamente submersos em água gelada, onde permaneceram por cerca 20 minutos. Após esse tempo, os testículos foram transferidos para uma placa de Petri contendo fixador metanol-ácido acético (3:1) e picotados com o auxílio de uma tesoura cirúrgica.

Tanto o material obtido de intestino quanto o de testículos foi centrifugado a 800 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em metanol-ácido acético (3:1). Essa etapa foi repetida duas vezes.

As suspensões obtidas foram gotejadas em lâminas e armazenadas a uma temperatura de 4° C, para serem analisadas posteriormente.

3.1.1. Coloração convencional, Impregnação por Prata e Bandamento C

Alguns dias após a preparação das lâminas, estas foram submetidas sequencialmente ou não às técnicas de coloração convencional com solução de Giemsa, bandamento C e impregnação por prata.

Para coloração convencional do material cromossômico, as lâminas foram cobertas com solução de Giemsa a 10% por cerca de 10 minutos. A impregnação por prata foi realizada segundo o método Ag-NOR, utilizando solução de nitrato de prata (AgNO_3) a 50% e solução de gelatina a 2%, na proporção de 2:1, conforme descrito por

Howell e Black (1980), substituindo a temperatura de incubação descrita pelos autores por 60° C e o tempo para aproximadamente 10 minutos.

O bandamento C foi realizado conforme descrito por Sumner (1972), utilizando tratamentos com ácido clorídrico (HCl) a 0,2N por 30 minutos, hidróxido de bário (BaOH) a 5% por 40 segundos a 53°C, e lavagem em 2XSSC a 60°C por 15 minutos.

Após a técnica de bandamento C, os cromossomos foram corados com Giemsa a 10% ou com DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) a 0,5 µg/mL por 15 minutos.

3.3. Hibridação *in situ* utilizando sondas teloméricas

Para localizar sequências teloméricas (5' TTAGGG 3') no cariótipo das espécies em estudo, foram feitos experimentos de hibridação *in situ* utilizando sonda (CCCTAA)₃ - PNA-Peptid Nucleic Acid TelC-Cy3 - PNA Bio Inc., seguindo as instruções do fabricante. Para tanto, as preparações cromossômicas foram imersas em PBS, fixadas em Paraformaldeído 1% (diluído em PBS) e tratadas com RNase a 100 µg/mL a 37°C. Após o tratamento com RNase, as preparações cromossômicas foram imersas em solução de pepsina 0,005% e, em seguida, desidratadas com etanol 70%, 85% e 100%.

A sonda diluída em tampão de hibridação [Tris-HCl (20 mM) pH 7,4; Formamida – (60%); Esperma de salmão (0,1 µg/mL)] a uma concentração de 200 nM e o material contido nas lâminas foram pré-aquecidos a 85°C por 5 minutos. A sonda foi adicionada à lâmina, e esta foi coberta com lamínula e mantida a 85°C por 10 minutos e, posteriormente, a 37°C por 2h em câmara úmida no escuro.

Após a etapa de hibridação acima descrita, a lâmina foi imersa em soluções de lavagem (2xSSC; Tween 20 0,1%) a 60°C duas vezes, e à temperatura ambiente uma vez, contra corada com DAPI (0,5 µg/mL) coberta com lamínula e observada ao microscópio de fluorescência.

3.4. Análise do gene ribossomal 5S

Amostras de DNA genômico foram isoladas a partir de fragmentos de fígado, previamente estocados a -80°C e depositados na coleção do Laboratório de Estudos Cromossômicos / IB-UNICAMP, de um espécime de *Dendropsophus soaresi* (ZUEC-AMP

16867), pelo método descrito por Medeiros *et al.* (2013). A qualidade do DNA foi avaliada após eletroforese em gel de agarose 1% e sua concentração estimada utilizando o NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific).

Fragmento de DNAr 5S foram isolados por PCR utilizando os primers 5S-A (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5S-B (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Pendás *et al.*, 1994). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit de purificação Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e clonados utilizando o vetor pGEM-T (pGEM-T Easy Vector – Promega), seguindo instruções do fabricante. Os vetores recombinantes foram utilizados para transformar bactérias competentes *Escherichia coli* da linhagem JM109 (Fermentas), e os clones obtidos foram sequenciados após amplificação por PCR utilizando os primers universais T7 e SP6. As sequências foram editadas e alinhadas utilizando o programa BioEdit 7.0.1. Os fragmentos isolados e sequenciados foram marcados com dUTP-Dig (Roche) por PCR e utilizados como sondas em experimentos de hibridação, utilizando preparações cromossômicas de *D. soaresi* (ZUEC-AMP 16867) e *D. seniculus* (ZUEC-AMP 17225) previamente preparadas. A etapa de hibridação das sondas com as preparações cromossômicas seguiu o protocolo descrito por Viegas-Péquignot (1992) e as sondas foram detectadas com a utilização de anticorpos anti-digoxigenina acoplados à rodamina (Roche) (0,06 µg/mL) por no mínimo 45 minutos.

3.5. Análise dos cromossomos telocêntricos por pintura cromossômica

Para a microdissecção de cromossomos, foram utilizadas suspensões celulares de um espécime de *D. nanus* (ZUEC-AMP 18686; Tabela 2) já disponível no Laboratório de Estudos Cromossômicos de Anuros do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da UNICAMP. Amostras dessas suspensões celulares foram gotejadas em lâminas contendo uma membrana de polietileno-naftalato (PEN) previamente exposta à radiação UV por 30 minutos, e coradas com Giemsa 10%. Os menores cromossomos telocêntricos foram microdissecados de 17 metáfases, utilizando o sistema P.A.L.M. Microbean (Zeiss) (Figura 1). Os cortes foram feitos com UV a 0,5-0,6 µJ/pulso e a captura da região isolada, com um pulso de 0,2 µJ. Os cromossomos foram coletados na tampa de tubos eppendorf com capacidade para 200 µL. No total,

foram coletados 20 cromossomos, presumivelmente do par telocêntrico classificado como 15.

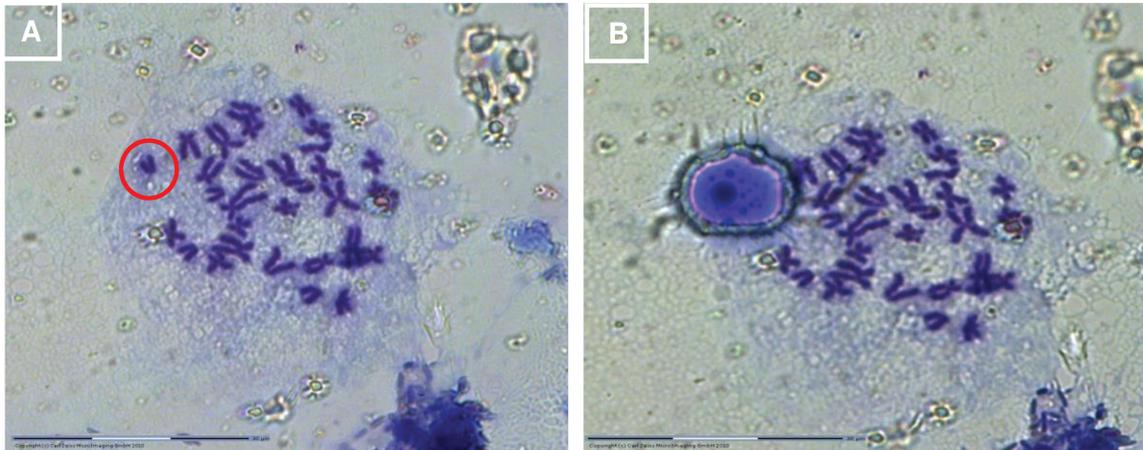


Figura 1. Metáfase de *Dendropsophus nanus* (ZUEC-18686) antes (A) e depois (B) da microdissecção de um cromossomo telocêntrico. O cromossomo microdissecado (circulado em vermelho em A) é presumivelmente referente a um dos cromossomos do par 15.

Após a coleta dos cromossomos microdissecados, foram adicionados 9 μ L de água milli-Q autoclavada na tampa de cada tubo. Depois de fechado, cada tubo foi mantido a 4°C. Depois de cerca de 16 horas, cada tubo foi submetido à centrifugação para o material ser levado ao fundo do tubo.

O material resultante de cada experimento de microdissecção cromossômica foi submetido ao método de amplificação do genoma total (WGA – Whole Genome Amplification), que envolve fragmentações randômicas do DNA genômico dos cromossomos microdissecados e construção de bibliotecas a partir da conversão de pequenos fragmentos de DNA em moléculas flanqueadas por sequências específicas, que serão utilizadas para o anelamento dos primers na subsequente reação de PCR. Para este procedimento foi utilizado o kit de amplificação GenomePlex®Single Cell WGA4 (Sigma-Aldrich), segundo instruções do fabricante. O material foi incubado em termociclador, cumprindo a seguinte programação: 95°C por 3 min; 25 ciclos de 94°C por 30 seg e 65°C por 5 min. O material resultante foi purificado utilizando o kit GeneJet PCR Purification (Fermentas), quantificado no NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific) e mantido a -20°C.

Cerca de 20 ng do produto obtido conforme descrito acima foi amplificado utilizando o kit GenomePlex®Single Cell WGA3 (Sigma-Aldrich), substituindo os nucleotídeos do kit

por um mix contendo dATP (Roche) (10 mM), dCTP (Roche) (10 mM), dGTP (Roche) (10 mM), dTTP (Roche) (6,5 mM) e dUTP-digoxigenina (Roche) (0,027 mM), conforme descrito em Krylov *et al.* (2010). O programa de PCR utilizado para essa amplificação foi o mesmo utilizado na primeira amplificação, descrita acima. O material resultante foi também purificado e quantificado, e utilizado em experimentos de hibridação *in situ* intra e interespecíficos.

Para a hibridação *in situ*, foi preparada uma solução contendo a sonda produzida conforme descrito acima (concentração final: 200 ng/ μ L), tampão de hibridação (formamida 50%, dextran-sulfato 10%, 2xSSC) e DNA competidor extraído da própria espécie (concentração final: aproximadamente 2 μ g/ μ L¹). A sonda foi desnaturada a 72°C por 10 min e permaneceu posteriormente a 37°C por 80 min. Simultaneamente, preparações cromossômicas previamente preparadas foram desnaturadas em solução de formamida 70% a 72°C por 2 min, e desidratadas em banhos sequenciais de metanol 70%, 90% e 100% à temperatura ambiente (3 min em cada banho), sob agitação, conforme recomendado por Krylov *et al.* (2010).

A sonda foi adicionada nas lâminas e estas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 37°C por aproximadamente 48 h em câmara úmida. Após esse tempo, as lâminas foram submetidas a dois banhos (de 5 min cada) de formamida 50% a 42°C, seguidos de três banhos (de 5 min cada) de 2xSSC e um banho (de 5 min) de PBT (BSA-Bovine Serum Albumin 0,4%; Tween 20 0,1%; PBS), sob agitação. Após esta etapa, as preparações cromossômicas foram submetidas a uma solução de anticorpos anti-digoxigenina acoplados à rodamina (Roche) (0,06 μ g/mL) por no mínimo 45 minutos. Posteriormente, o material foi lavado em três banhos de 5 min cada de PBT contra corados em DAPI 0,5 μ g/mL, analisados ao microscópio de fluorescência Olympus BX-60. As imagens foram editadas com o programa Image-Pro Plus v.4.5.0.19.

¹ Para a obtenção de DNA competidor, uma amostra do DNA genômico obtido a partir de fragmentos de fígado de espécimes de *D. nanus* foi diluída em NaCl 0,3M e autoclavada a 1,4 ATM/ 120°C por 15 minutos.

4. RESULTADOS

4.1. DNAr 5S de *D. soaresi*

Após eletroforese em gel de agarose do produto amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *D. soaresi*, utilizando os primers 5S-A e 5S-B, foram observadas duas bandas que corresponderam ao acúmulo de fragmentos com aproximadamente 500 pb e 1.000 pb. Após clonagem, foram obtidos doze clones recombinantes com insertos de 512 pb, dos quais 392 pb correspondem à região não transcritora (NTS) (Figura 2). Possivelmente, os fragmentos com cerca de 1.000 pb isolados por PCR citados anteriormente correspondam a sequências portadoras de duas unidades repetitivas de 512 pb.

Quando comparadas entre si, as regiões presumivelmente transcritoras (região sombreada em cinza na Figura 2) das sequências de 512 pb obtidas de *D. soaresi* se mostraram idênticas e as regiões de NTS foram muito semelhantes (Figura 2).

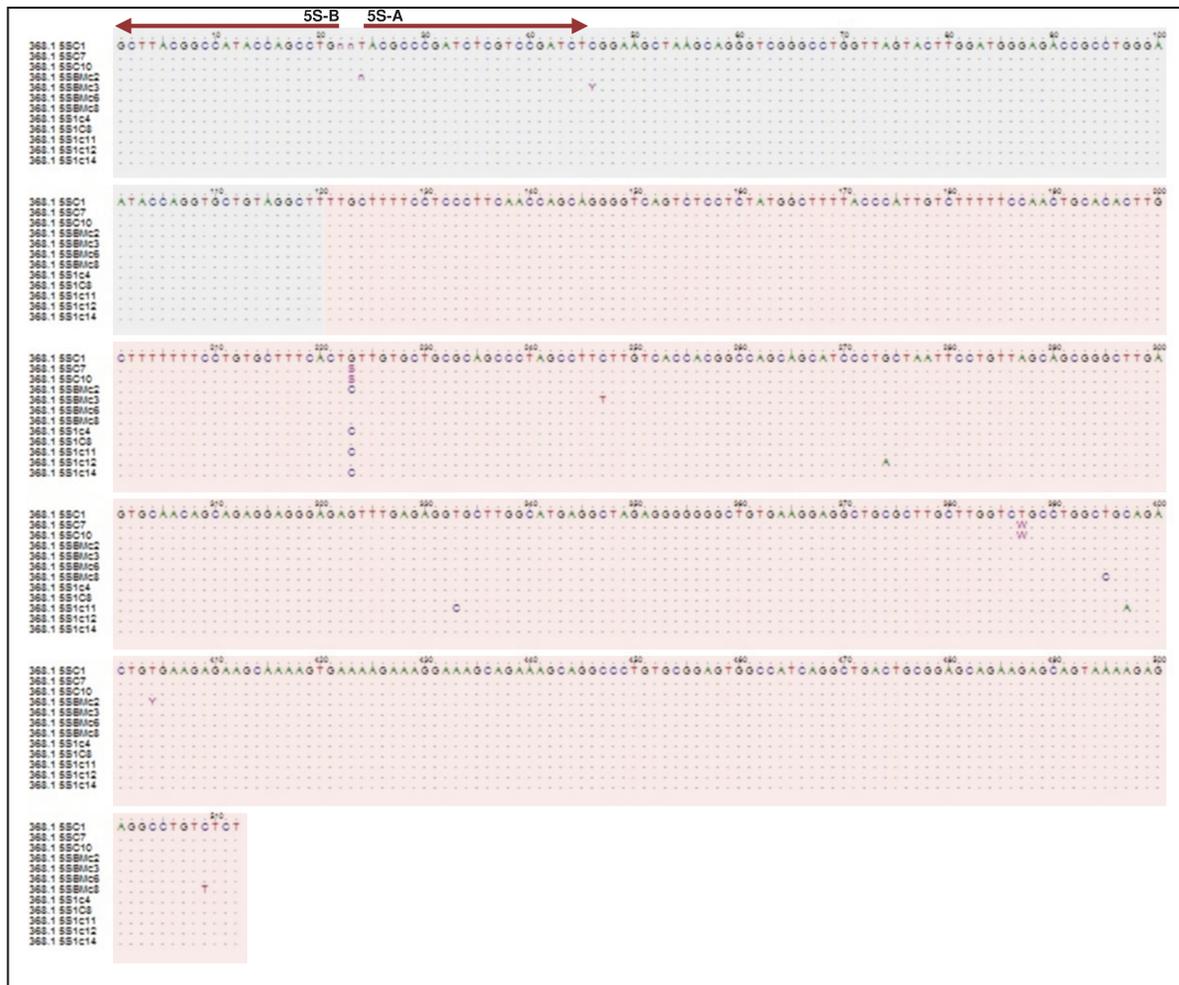


Figura 2. Sequências nucleotídicas de fragmentos de DNAr 5S isolados de *D. soaresi*. A região sombreada em cinza corresponde à presumida região transcritora composta por 120 pb. A região sombreada em rosa indica a região não transcritora do DNAr 5S. Setas vermelhas correspondem à região de anelamento dos primers 5S-A e 5S-B.

Curiosamente, além dos clones citados anteriormente, foi também obtido um clone cujo inserto apresentou 878 pb. O sequenciamento do fragmento clonado mostrou tratar-se de duas unidades repetitivas do DNAr 5S, uma parcial, cujo NTS é composto de 249 pb, e uma unidade completa, composta por 512 pb, dos quais 120 pb são da região presumivelmente transcritora e 392 pb correspondem ao NTS (Figura 3).

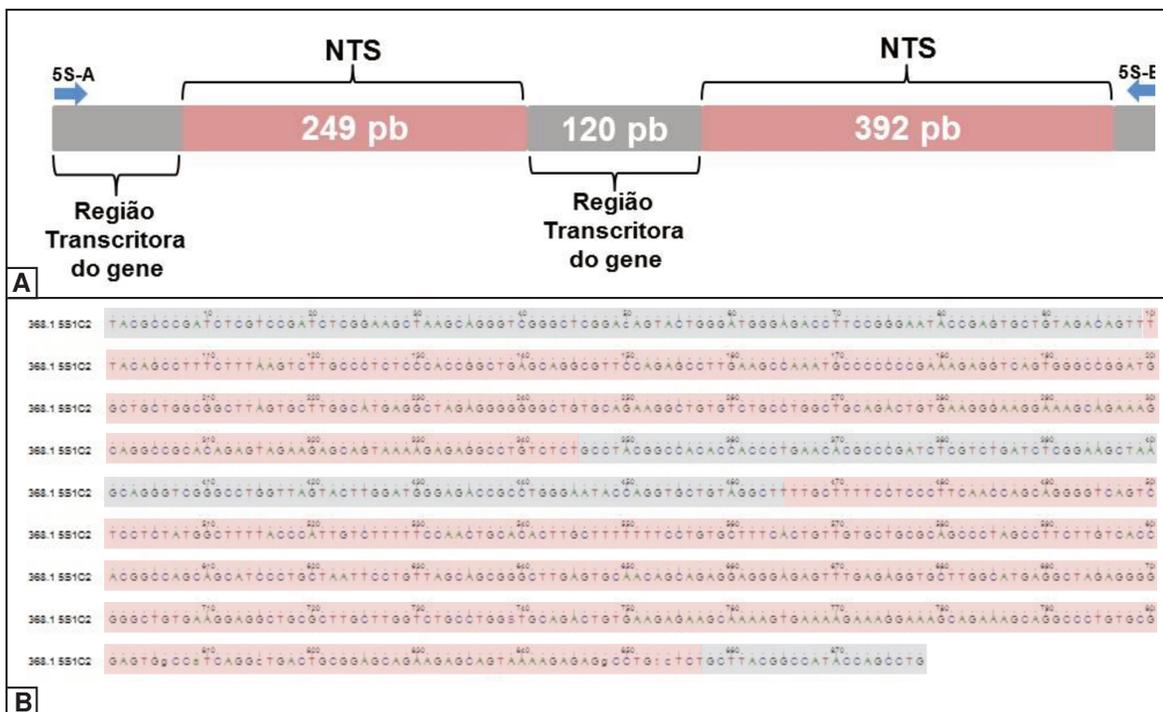


Figura 3. Constituição do inserto de 878 pb, que inclui duas unidades repetitivas do DNAr 5S de *D. soaresi*. **A.** Esquema do arranjo da sequência de DNAr 5S no inserto com 878 pb; **B.** Sequência nucleotídica do fragmento de 878 pb. Em cinza, as regiões presumivelmente transcritoras de 120 pb; em rosa, as regiões de NTS.

Comparando as duas unidades repetitivas contidas no inserto com 878 pb com as demais sequências clonadas, nota-se que a unidade composta por 512 pb apresenta alta similaridade em relação àquelas sequências presentes nos outros doze clones obtidos. A similaridade média do NTS dessas sequências é de 99%, enquanto suas regiões presumivelmente transcritoras são idênticas – as regiões equivalentes às dos *primers* usados para o isolamento das sequências não foram consideradas nessa análise (Figura 4). Já a outra unidade de DNAr 5S contida no inserto com 878 pb difere bastante das demais sequências de DNAr 5S isoladas de *D. soaresi*, especialmente em relação ao NTS. Entre as regiões presumivelmente transcritoras dessas sequências, 85% de similaridade foi notada (Figura 4). Para maior clareza do texto, a partir daqui a unidade de DNAr 5S composta por 512 pb será referida como do tipo I, enquanto a outra unidade será considerada do tipo II.



Figura 4. Alinhamento das sequências de DNAr 5S obtidas de *D. soaresi*. As duas unidades contidas no inserto com 878 pb foram aqui representadas separadamente (368.1 5SC2-tipoI e 368.1 5SC2-tipoII). A região presumivelmente transcritora está destacada em cinza.

As regiões presumivelmente transcritoras do DNAr 5S do tipo I e do tipo II de *D. soaresi* apresentaram grande similaridade com aquelas do DNAr 5S de outras espécies de anuros já publicadas (Tabela 3). As maiores porcentagens de similaridade do DNAr 5S do tipo I de *D. soaresi* foram observadas com sequências de 5S de *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae), *Pelophylax* (Ranidae) e 5S do tipo I de *Engystomops* e *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae), enquanto o DNAr 5S do tipo II de *D. soaresi* foi mais similar ao DNAr 5S do tipo II do hilídeo *Pseudis tocantins* (Tabela 3; Figura 5).

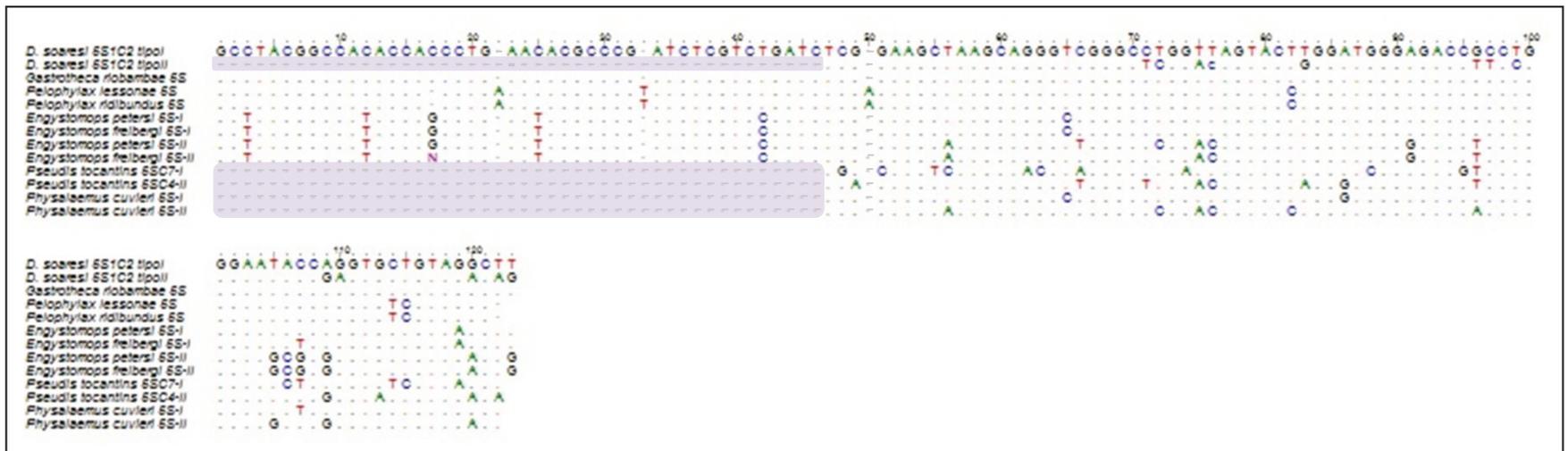


Figura 5. Alinhamento das regiões presumivelmente transcritoras do DNAr 5S de *D. soaresi* com aquelas de *Engystomops feibergi* (nº de acesso do Genbank: JF325870.1 e JF325845.1), *E. petersi* (nº de acesso do Genbank: JF325867.1 e JF325858.1), *Pseudis tocantins* (SMRP-190.6 – Gatto, 2013), *Physalaemus cuvieri* (nº de acesso do Genbank: JF- 281127.2 e JF-281134.2), *Gastrotheca riobambae* (nº de acesso do Genbank: M74438.1), *Pelophylax lessonae* (nº de acesso do Genbank: FJ572051.1) e *P. ridibundus* (nº de acesso do Genbank: FJ572052.1). As caixas em lilás correspondem às regiões não sequenciadas.

Tabela 3. Similaridade entre as sequências da região presumivelmente transcritora do DNAr 5S de *D. soaresi* com as de outras espécies de anuros. *1Nº de acesso do GenBank.

Espécie	DNAr 5S do tipo I de <i>Dendropsophus soaresi</i>	DNAr 5S do tipo II de <i>Dendropsophus soaresi</i>
<i>Engystomops petersi</i> – tipo I (JF325867.1)*1	97%	81%
<i>Engystomops freibergi</i> – tipo I (JF325870.1)*1	96%	80%
<i>Physalaemus cuvieri</i> – tipo I (JF281127.2)*1	96%	80%
<i>Pseudis tocantins</i> – tipo I (Gatto, 2013)	78%	65%
<i>Engystomops petersi</i> – tipo II (JF325858.1)*1	84%	84%
<i>Engystomops freibergi</i> – tipo II (JF325845.1)*1	86%	84%
<i>Physalaemus cuvieri</i> – tipo II (JF281134.2)*1	88%	86%
<i>Pseudis tocantins</i> – tipo II (Gatto, 2013)	84%	89%
<i>Pelophylax lessonae</i> – oocítico (FJ572051.1)*1	93%	79%
<i>Pelophylax ridibundus</i> – oocítico (FJ572052.1)*1	93%	79%
<i>Gastrotheca riobambae</i> (M74438.1)*1	100%	84%

É interessante notar também que, quando comparadas as sequências de DNAr 5S do tipo I de *D. soaresi* e a disponível para *Gastrotheca riobambae*, uma alta similaridade foi observada não apenas em relação à região presumivelmente transcritora, mas também em cerca de 105 pb do NTS (Figura 6).



Figura 6. Alinhamento da sequência de DNAr 5S do tipo I de *D. soaresi* (do clone 368.1 5SIC2) com a sequência de *Gastrotheca riobambae*. Destaque em azul para a região que apresenta similaridade entre os dois indivíduos. Regiões destacadas em cinza representa a região presumivelmente transcritora, em rosa representa o NTS e a linha representa a região do pseudogene observado em *Gastrotheca* por del Pino *et al.* (1992).

4.2. Citogenética de *D. seniculus* e *D. soaresi* (pertencentes ao grupo de *D. marmoratus*)

Dendropsophus seniculus e *D. soaresi* apresentaram cariótipos muito similares, sendo compostos por três pares cromossômicos submetacêntricos (pares 1, 2, 4), sete pares metacêntricos (3, 8, 9, 10, 11, 12 e 14) e cinco pares telocêntricos (pares 5, 6, 7, 13 e 15) (Figura 7). Uma constrição secundária distal foi observada no braço longo dos cromossomos do par 9 em ambas as espécies (Figuras 7A e 7E) e, após a técnica de Ag-NOR, correspondeu à localização da NOR (Figuras 8A e 8C).

Após bandamento C, foram reveladas as regiões centroméricas de todos os cromossomos tanto de *D. seniculus* quanto de *D. soaresi* (Figuras 7B e 7F), evidenciadas também após coloração com DAPI (Figuras 7C e 7G). Nenhuma banda C não centromérica foi encontrada nesses cariótipos (Figuras 7C e 7G).

A hibridação *in situ* utilizando sondas teloméricas detectou marcações nos telômeros de todos os cromossomos de *D. seniculus* e *D. soaresi* (Figuras 7D e 7H). Adicionalmente, em *D. soaresi* foram observados fortes sinais de hibridação dessas sondas também em regiões centroméricas e pericentroméricas de todos os pares cromossômicos, exceto nos pares telocêntricos 5 e 6 (Figuras 7H).

A sequência de DNAr 5S do tipo I isoladas de *D. soaresi* (ver item anterior) foi mapeada no cromossomo 2 de ambas as espécies (Figuras 8B e 8D).

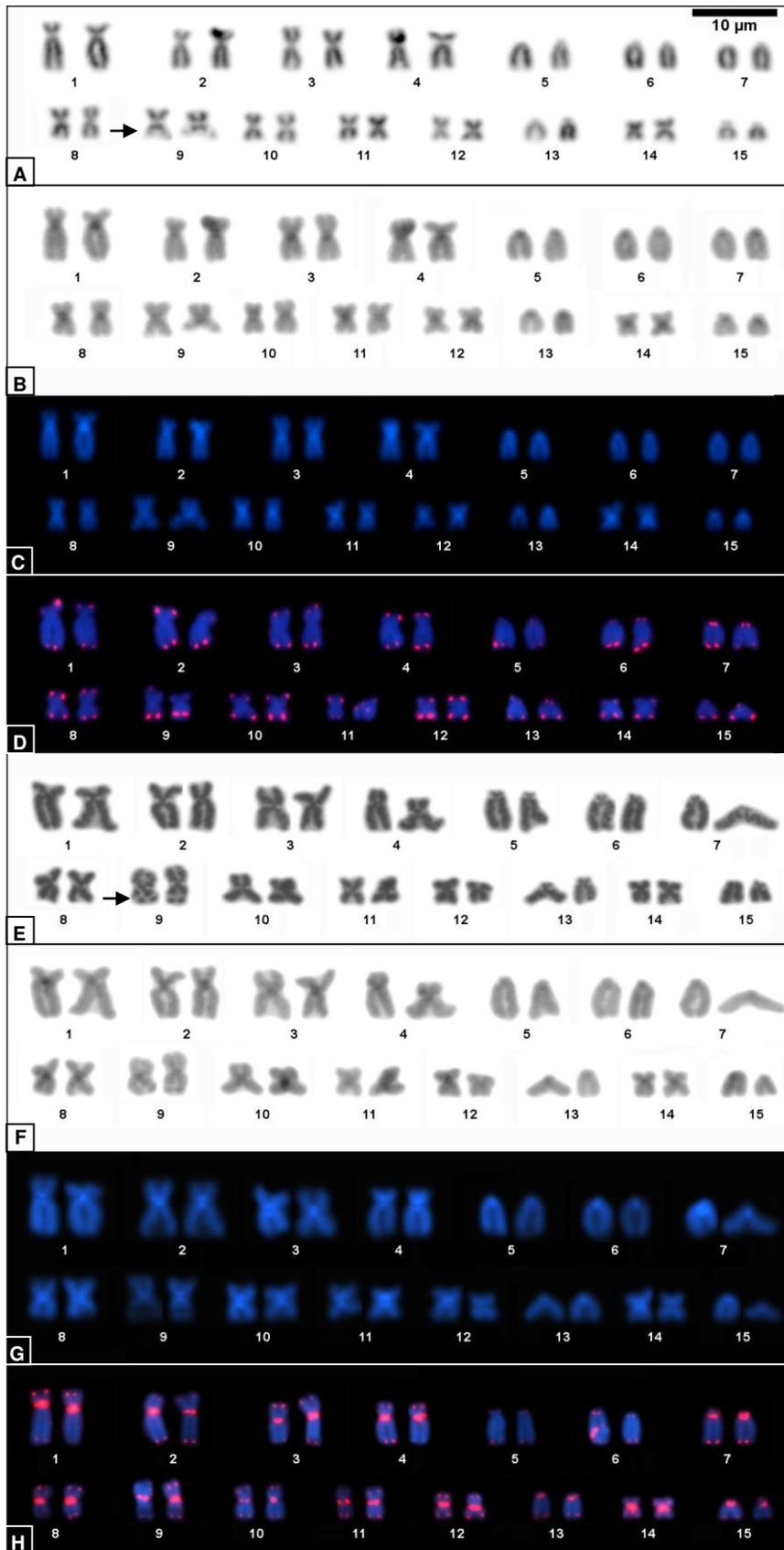


Figura 7. Cariótipos de *D. seniculus* (A-D) e *D. soaresi* (E-H) corados com Giemsa (A, E), submetidos ao bandamento C seguido de coloração com Giemsa (B, F) ou com DAPI (C, G) e hibridados com sonda telomérica (D, H). As setas indicam constrições secundárias.

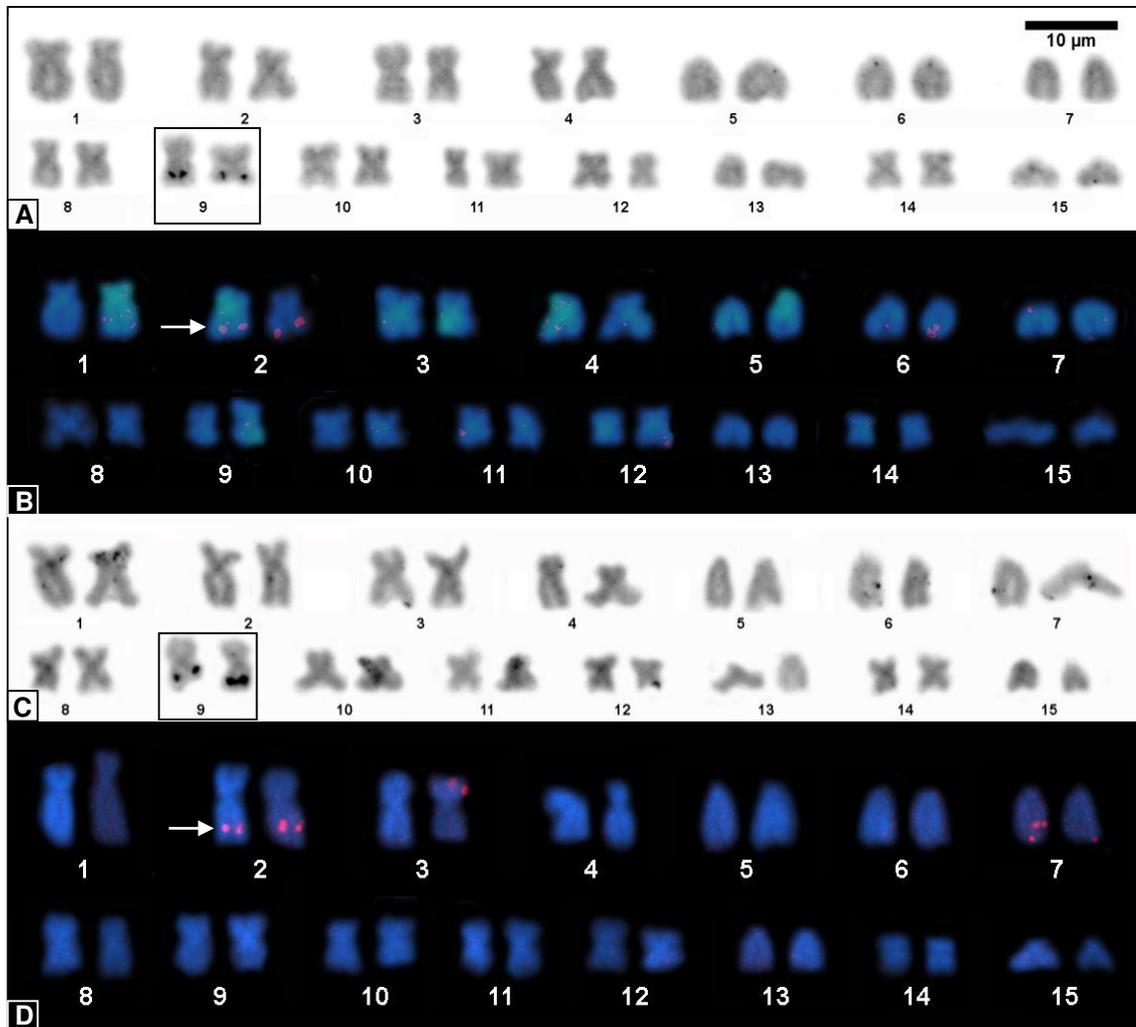


Figura 8. Localização da NOR (A, C) e do DNA ribossomal 5S (B, D) no cariótipo de *D. seniculus* (A,B) e *D. soaresi* (C, D). As setas em B e D indicam os sinais de hibridação da sonda de DNAr 5S construída a partir da sequência do tipo I isolada de *D. soaresi*.

4.3. Citogenética de *D. decipiens*, *D. meridianus* e *D. wernerii* (pertencentes ao grupo de *D. microcephalus*)

Os cariótipos de *D. decipiens*, *D. meridianus* e *D. wernerii* apresentaram $2n=30$, mas diferiram em relação ao número de cromossomos telocêntricos. Em *D. decipiens*, foram observados quatro pares de cromossomos submetacêntricos (pares 1, 2, 3 e 4), sete pares de metacêntricos (pares 8, 9, 10, 11, 13, 14 e 15), três pares de telocêntricos (pares 5, 6 e 7), e apenas um par subteloicêntrico (par 12) (Figura 9A). Nesse último par foi observada uma constrição secundária distal, que correspondeu à NOR nessa espécie (Figura 9A). O bandamento C revelou as regiões centroméricas de todos os cromossomos

(Figura 9B). A coloração com DAPI de metáfases submetidas ao bandamento C revelou as mesmas bandas detectadas pelo bandamento C seguido de coloração com Giemsa (Figuras 9C).

Em *Dendropsophus meridianus*, foram observados oito pares de cromossomos submetacêntricos (pares 1, 2, 4, 5, 7, 8, 11 e 13), cinco pares de metacêntricos (pares 3, 9, 10, 14 e 15), e dois pares de telocêntricos (pares 6 e 12) (Figura 9D). A NOR foi observada no par telocêntrico 12, em uma região adjacente aos telômeros (Destaque na Figura D). O bandamento C, seguido ou não de coloração com DAPI, revelou as regiões centroméricas de todos os cromossomos (Figuras 9E e 9F). Após a coloração com DAPI, foi possível observar uma banda pericentromérica sutil no par 12 (Figura 9F).

Já em *Dendropsophus werneri*, dentre os 15 pares observados, seis pares são submetacêntricos (pares 1, 2, 4, 5, 8 e 10), sete pares são metacêntricos (pares 3, 7, 9, 11, 13, 14 e 15), e dois pares são telocêntricos (pares 6 e 12) (Figura 9G). Nessa espécie, a NOR se localiza também no braço longo dos cromossomos telocêntricos do par 12, adjacente aos telômeros (Destaque na Figura 9G). Uma pequena e sutil banda C pericentromérica foi observada no braço longo dos cromossomos do par telocêntrico 12, (Figura 6H), mais evidente quando observada após coloração com DAPI (Figura 9I). Todas as regiões centroméricas banda C-positivas (Figura 9H) foram coradas com DAPI (Figura 9I).

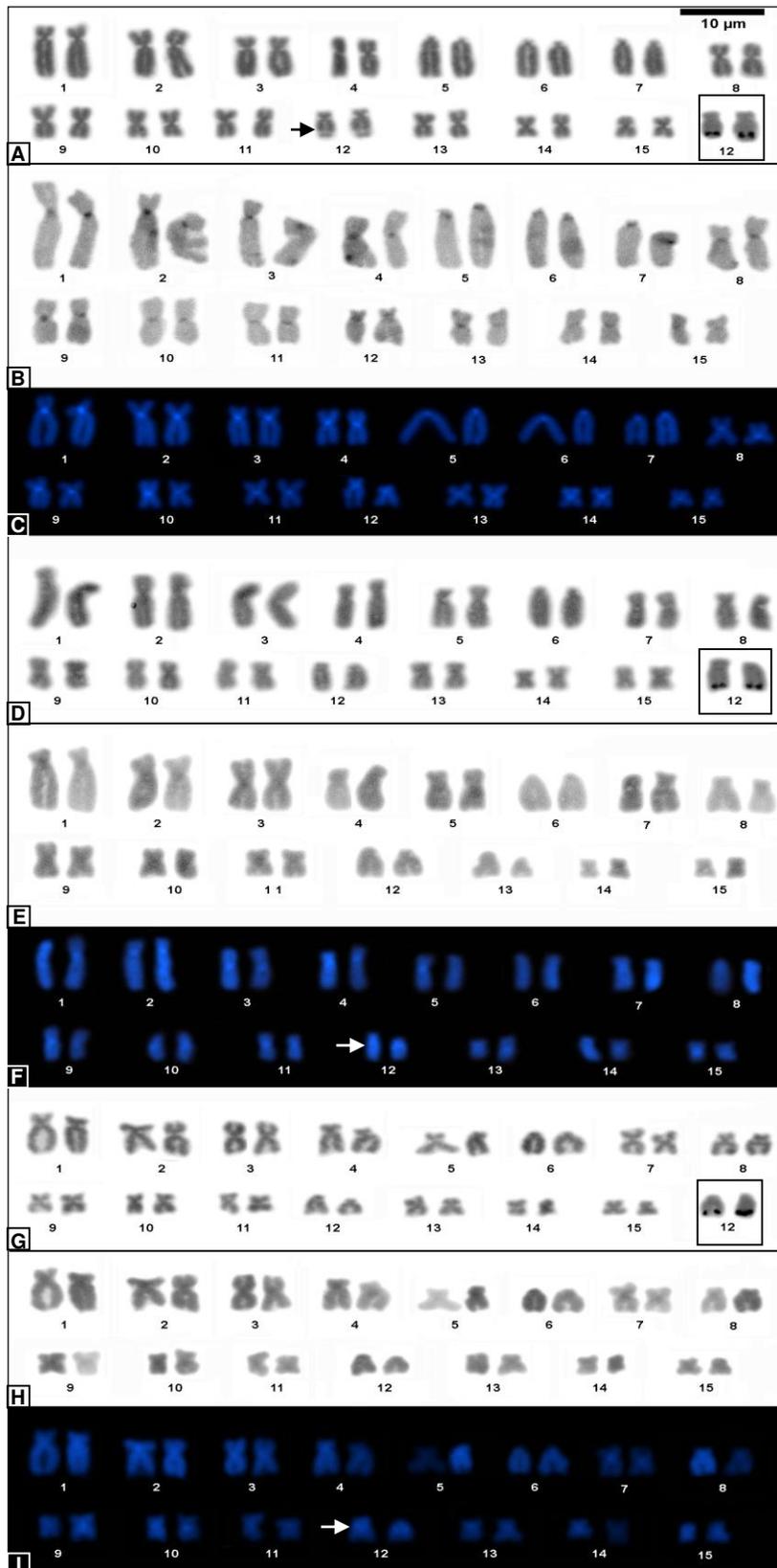


Figura 9. Cariótipos de *D. decipiens* (A-C), *D. meridianus* (D-F) e *D. wernerii* (G-I) corados com Giemsa (A, D e G), submetidos ao bandamento C seguido de coloração com Giemsa (B, E e H) ou com DAPI (C, F e I). A seta indicam constrições secundárias. Em destaque em A, D e G, pares cromossômicos 12 com a NOR revelada pelo método Ag-NOR.

Após a hibridação *in situ* utilizando sondas teloméricas, foram observadas marcações nos telômeros de todos os cromossomos de *D. decipiens*, *D. meridianus* e *D. weneri* (Figuras 10 e 11).

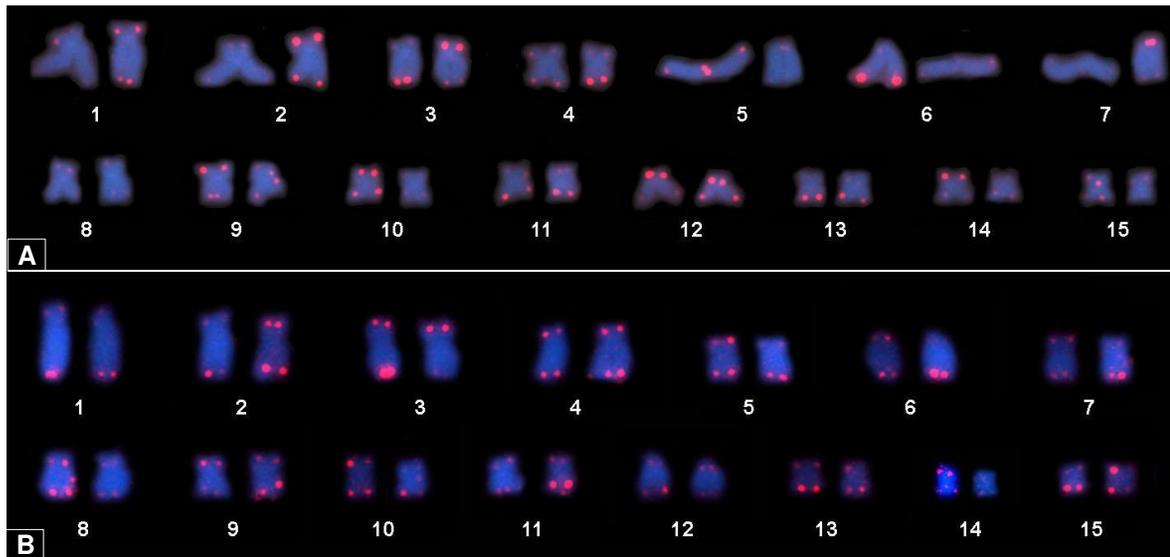


Figura 10. Hibridação de sondas teloméricas nos cariótipos de *D. decipiens* (A) e de *D. meridianus* (B).

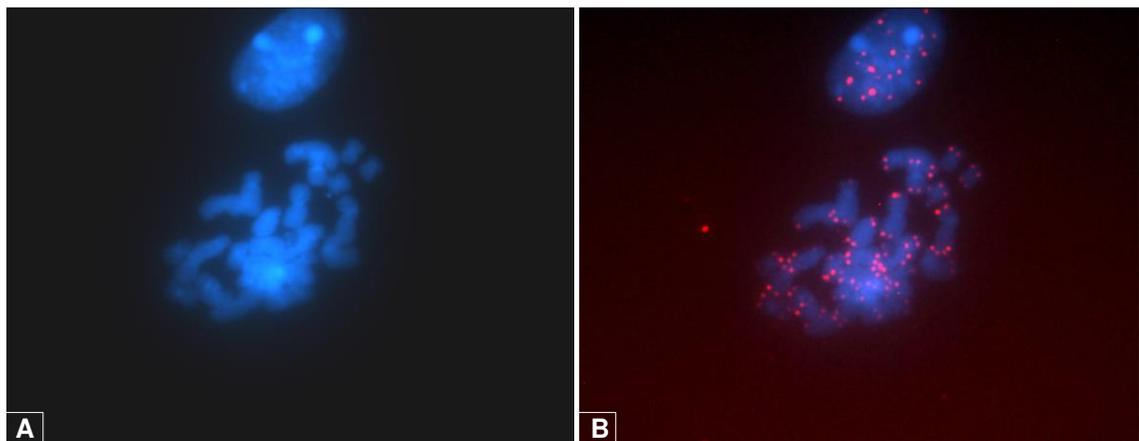


Figura 11. Hibridação de sondas teloméricas em metáfase de *D. weneri*. A. Coloração com DAPI. B. Sobreposição da imagem dos sinais de hibridação das sondas com a imagem dos cromossomos corados com DAPI.

Devido à grande similaridade em tamanho e morfologia de alguns pares de cromossomos e da escassez de marcadores citogenéticos que os diferenciem, a classificação numérica destes cromossomos em *Dendropsophus* é bastante dificultada e, portanto, a ordenação dos pares aqui apresentada deve ser tratada com cautela e deve

estar sujeita a ajustes quando futuras hipóteses de homeologias cromossômicas forem inferidas.

4.4. Pintura do cromossomo 15 de *D. nanus*

A partir da microdissecção de 20 cromossomos telocêntricos pequenos do cariótipo do exemplar de *D. nanus* ZUEC-18686 (de Rio Claro/SP), foi obtida uma sonda (pDn15) que detectou, em 38 metáfases desse mesmo exemplar, especificamente um dos pares cromossômicos desse cariótipo, considerado como o par 15 (Figura 12).

Quando hibridada com metáfases de exemplares de *D. nanus* de Serra da Bodoquena/MS, a sonda cromossômica pDn15 também detectou um par de cromossomos telocêntricos (Figura 13A). Já em relação ao cariótipo de *D. walfordi*, os dados gerados com essa sonda ainda foram inconclusivos. Em duas metáfases de um exemplar de *D. walfordi* de Guajará-Mirim/RO, a sonda pDn15 detectou fortemente um cromossomo telocêntrico pequeno (Figura 13B). No entanto, a má qualidade das preparações cromossômicas desse exemplar não permite descartar a possibilidade de que outros cromossomos também tenham hibridado com a sonda. Novos testes ainda serão realizados para confirmar esses resultados.

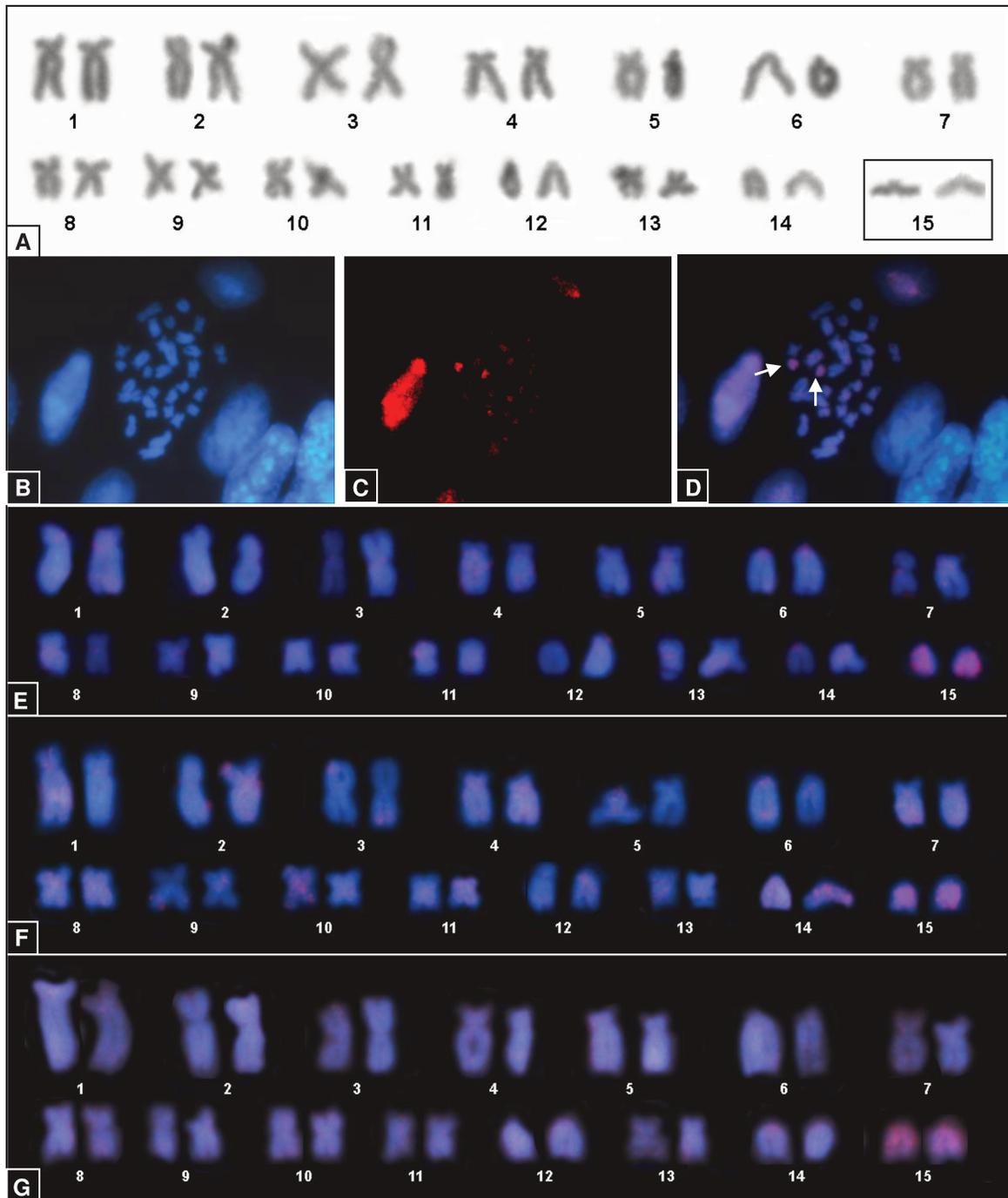


Figura 12. Hibridação da sonda construída a partir de cromossomos microdissecados do exemplar ZUEC 18686 de *D. nanus* (de Rio Claro/SP) em metáfases do mesmo exemplar. **A.** Cariótipo de *D. nanus* corado com Giemsa, com destaque para o cromossomo microdissecado. **B-D.** Metáfase do exemplar ZUEC 18686 de *D. nanus* (de Rio Claro/SP) hibridada com a sonda. **B.** Coloração com DAPI. **C.** Sinal de hibridação da sonda. **D.** Sobreposição das imagens mostradas em **A** e **B**. **E.** Cariograma montado com os cromossomos da metáfase mostrada em **D**. **F-G.** Cromossomos de outras duas metáfases do exemplar ZUEC 18686, também hibridados com a sonda. Note que em **G**, além dos cromossomos 15, algumas regiões de um dos homólogos do par 14 também apresentam sinais de hibridação da sonda.

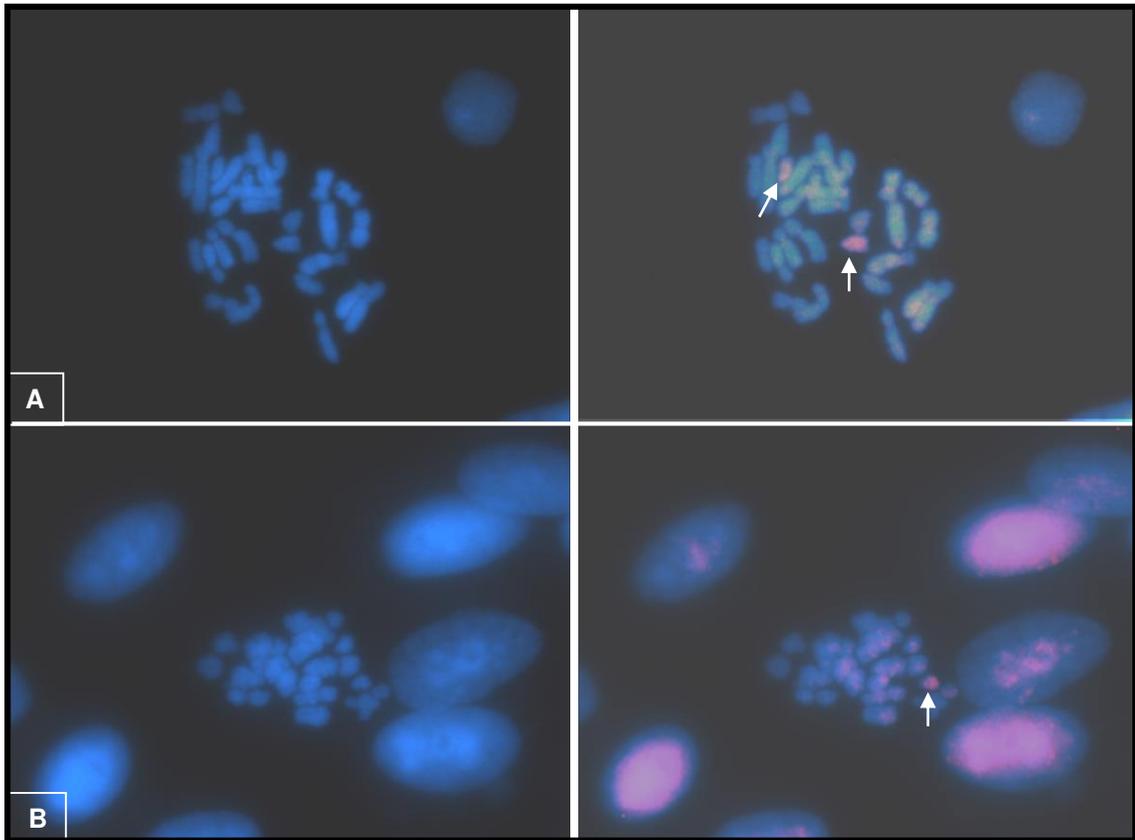


Figura 13. Hibridação da sonda do cromossomo 15 de *D. nanus* (construída a partir de um exemplar de Rio Claro/SP) com metáfases de *D. nanus* de Serra da Bodoquena/MS (ZUEC-12398) (**A**), *D. walfordi* de Guajará-Mirim/RO (ZUEC-12204) (**B**). À esquerda, imagens do DAPI e à direita, imagens de DAPI sobrepostas com as da sonda.

5.DISSCUSSÃO

5.1. DNA ribossomal 5S em *Dendropsophus*

No presente estudo foi possível isolar dois tipos de sequência de DNAr 5S de um indivíduo de *D. soaresi*, que diferiram principalmente em relação ao NTS, que é composto por 392 pb nas sequências do tipo I, e por 249 pb na sequência do tipo II. A alta similaridade entre as regiões presumivelmente transcritoras das sequências isoladas de *D. soaresi* com as sequências de DNAr 5S de outros anuros disponíveis no GenBank permitiu confirmar que os fragmentos isolados se tratavam de DNAr 5S. No entanto, testes de funcionalidade ainda devem ser realizados a fim de verificar se essas sequências são realmente transcritas.

Já que os dois tipos de DNAr 5S foram encontrados em um mesmo inserto, é possível que eles estejam intercalados no genoma de *D. soaresi*. No entanto, é também possível que o inserto obtido corresponda a um segmento da região de transição entre um *cluster* de sequências do tipo I e um *cluster* de sequências do tipo II. Para testar essas hipóteses e melhor compreender a organização das sequências de DNAr 5S no genoma de *D. soaresi*, outras análises ainda são necessárias, tais como hibridação *in situ* de sondas para as sequências do tipo I e do tipo II em fibras cromatínicas de *D. soaresi* (técnica de “double Fiber FISH”).

A sequência do tipo I de *D. soaresi* foi mapeada em uma região distal do par submetacêntrico 2 dessa espécie e também em *D. seniculus*. Estudos envolvendo a localização do DNAr 5S ainda são escassos na literatura, mas ainda assim é possível notar que este tipo de sequência pode fornecer valiosos dados para estudos citogenéticos de anuros (para exemplos, ver Harper *et al.*, 1983; Nascimento *et al.*, 2010; Vittorazzi *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2012).

5.2. Citogenética no grupo *D. marmoratus*

As espécies *D. seniculus* e *D. soaresi* estão alocadas no grupo *D. marmoratus*, juntamente com outras seis espécies (*D. acreanus*, *D. dutrai*, *D. marmoratus*, *D. melanargyreus*, *D. nahdereri*, *D. novaisi*) (Faivovich *et al.*, 2005). Destas, somente três espécies já tinham sido estudadas citogeneticamente (*D. marmoratus*, *D. melanargyreus* e *D. nahdereri*) (Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973; Gruber *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2013). Após as análises citogenéticas do presente estudo, foi possível notar uma grande

semelhança morfológica entre os cariótipos já descritos e os cariótipos de *D. seniculus* e *D. soaresi* aqui estudados. Todos esses cariótipos apresentam cinco pares de cromossomos telocêntricos, que são provavelmente homeólogos, embora em *D. nahdereri* os cromossomos telocêntricos tenham sido classificados como 5-7, 11 e 15 (Gruber *et al.*, 2005), e em *D. marmoratus* (Suárez *et al.*, 2013), *D. melanargyreus* (Suárez *et al.*, 2013), *D. soaresi* e *D. seniculus*, como pertencentes aos pares 5-7, 13 e 15.

A presença de cinco pares de cromossomos telocêntricos caracteriza também o cariótipo de *D. labialis* (gr. *D. labialis*) (Bogart, 1973), que se assemelha àqueles encontrados no grupo *D. marmoratus*. Já *D. jimi* e *D. sanborni*, espécies pertencentes ao grupo *D. microcephalus*, também apresentam cinco pares de telocêntricos (Medeiros *et al.*, 2013), mas esses foram identificados como cromossomos 5, 6, 12, 13 e 15. Não podemos descartar, no entanto, que o cromossomo 12 de *D. jimi* e *D. sanborni* sejam homeólogos ao cromossomo 7 das espécies do grupo *D. marmoratus* e de *D. labialis*, embora o cromossomo 12 de *D. jimi* e *D. sanborni* difiram daqueles por serem portadores de NOR (Medeiros *et al.*, 2013).

Em *D. soaresi* e *D. seniculus*, a NOR ocupa uma posição distal no cromossomo metacêntrico 9, assim como em *D. marmoratus* e *D. melanargyreus* Suárez *et al.* (2013). Já em *D. nahdereri*, a NOR é observada no braço curto do par 1 submetacêntrico (Gruber *et al.*, 2005).

Em relação à presença de heterocromatina, Suárez *et al.* (2013) encontraram algumas bandas intersticiais e distais em *D. marmoratus*, o que difere do padrão heterocromático encontrado em *D. soaresi* e *D. seniculus* (presente estudo), e *D. melanargyreus* (Suárez *et al.*, 2013), que apresentaram somente bandas centroméricas.

Um resultado interessante reportado aqui foi a presença de sequências teloméricas em regiões centroméricas e pericentroméricas de *D. soaresi*. A presença destas sequências adicionais em regiões cromossômicas não-teloméricas já foi reportada para vários outros grupos animais, principalmente em mamíferos (Meyne *et al.*, 1990) e em algumas espécies de plantas (Tek e Jiang, 2004). Em anfíbios, há exemplos em *Xenopus laevis* e *Xenopus clivii* (Meyne *et al.*, 1990; Nanda *et al.*, 2008), *Eleutherodactylus riveroi* (Meyne *et al.*, 1990; Schmid *et al.*, 2003), *Hyla versicolor*, *H. chrysoscelis*, *H. femoralis*, *H. squirella* e *H. cinerea*, *Pseudacris nigrita* e *P. brimleyi* (Meyne *et al.*, 1990; Wiley *et al.*, 1992), *Aplastodiscus albofrenatus* e *A. arildae* (Carvalho *et al.*, 2009), *Pristimantis cruentus* (Schmid *et al.*, 2010), *Scarthyla goinorum*, *Sphaenorhynchus dorisae* e *S. lacteus* (Suárez *et al.*, 2013). No gênero *Dendropsophus*,

esta é a primeira vez em que esse tipo de sequência é observado em regiões cromossômicas não-teloméricas e essa característica não é compartilhada por todas as espécies do grupo *D. marmoratus*, já que em *D. seniculus* (presente estudo), *D. melanargyreus* e *D. marmoratus* (Suárez *et al.* 2013) a sonda (5' TTAGGG 3')_n detecta apenas as regiões de telômeros.

Essas sequências teloméricas em regiões distintas no genoma são conceitualmente caracterizadas como sequências teloméricas intersticiais (ou ITSs, do inglês “Interstitial Telomeric Sequences”) e vários estudos correlacionam a presença destas sequências com eventos de rearranjos cromossômicos. Desta forma, a localização destas sequências tem sido de grande importância em estudos de evolução cromossômica em muitos grupos de espécies (Schmid *et al.*, 1994; Garagna *et al.*, 1997; Fagundes *et al.*, 1997, Silva e Yonenaga-Yassuda, 1997).

O estudo aprofundado dessas sequências em anuros ainda é escasso, mas há algumas hipóteses discutidas acerca de sua origem (ver revisão de Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). As três principais hipóteses se referem a: 1) rearranjos cromossômicos, como inversões e fusões cêntricas envolvendo telômeros, cujas sequências se mantiveram conservadas nessas regiões (Lee *et al.*, 1993; Vermeesch *et al.*, 1996); 2) crossing-over desigual, transposição ou amplificação de sequências endógenas; e 3) mecanismos de reparo do DNA que deixaram as sequências teloméricas como “cicatrizes” no DNA (Vermeesch *et al.*, 1996; Garagna *et al.*, 1997).

Embora não seja possível esclarecer a origem das ITSs de *D. soaresi*, o resultado observado nessa espécie abre novas perspectivas de estudo. É também interessante o fato de dois dos três pares de cromossomos telocêntricos grandes (pares 5 e 6) não apresentarem ITSs, o que os diferencia do par de cromossomos telocêntricos 7, morfologicamente muito semelhante aos pares 5 e 6.

5.3. Citogenética no grupo *D. microcephalus*

As espécies *D. decipiens*, *D. meridianus* e *D. werneri* aqui estudadas estão alocadas no grupo *D. microcephalus* (Faivovich *et al.*, 2005), juntamente com outras 29 espécies. Dessas, somente 17 espécies foram estudadas citogeneticamente (*D. berthallutzae*, *D. bipunctatus*, *D. branneri*, *D. cruzi*, *D. elianae*, *D. decipiens*, *D. leali*, *D. meridianus*, *D. microcephalus*, *D. nanus*, *D. oliveirai*, *D. phlebodes*, *D. rhodopeplus*, *D.*

rubicundulus, *D. sanborni*, *D. walfordii*), algumas delas com informações disponíveis apenas sobre a morfologia dos cromossomos (para referências, ver Tabela 1 na seção Introdução). No presente estudo é apresentada a descrição do cariótipo de *D. werneri*, informações detalhadas do cariótipo de *D. meridianus* e de *D. decipiens*, como uma contribuição adicional para os dados citogenéticos já publicados sobre o grupo.

Uma característica interessante observada nos cariótipos em estudo é a diferença no número de telocêntricos. Enquanto *D. decipiens* apresentou três pares de cromossomos telocêntricos, *D. meridianus* e *D. werneri* apresentaram apenas dois pares. Outras espécies do mesmo grupo também diferem em relação ao número de pares de cromossomos telocêntricos. *D. sanborni* e *D. jimi* apresentam cinco pares de cromossomos telocêntricos (Medeiros *et al.*, 2013), *D. nanus*, *D. walfordii* e *D. berthalutzae* apresentam quatro pares (Gruber *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2013), e *D. oliveirai*, *D. rubicundulus*, *D. cruzi* e *D. branneri* apresentam três pares (Foresti, 1972; Gruber *et al.*, 2005;). Já as espécies *D. elianae*, *D. phlebodes* e *D. bipunctatus* possuem dois pares de telocêntricos (Bogart, 1973; Kaiser *et al.*, 1996; Medeiros *et al.*, 2013), e *D. microcephalus* e *D. rhodopeplus* apresentam apenas um par (Bogart, 1973; Kaiser *et al.*, 1996). Ainda neste grupo, somente uma das espécies cariotipadas até hoje, *D. leali*, não apresenta nenhum par telocêntrico em seu cariótipo (Bogart, 1973), característica semelhante ao que ocorre na espécie *D. minutus*, pertencente ao grupo *D. minutus*, que possui um NF= 60 (Gruber *et al.*, 2005).

É interessante notar que espécies de outros grupos de *Dendropsophus* também apresentam os mesmos números de telocêntricos encontrados nas espécies em estudo. *Dendropsophus microps* (grupo *D. parviceps*), por exemplo, e *D. anceps* (grupo *D. leucophyllatus*) apresentam três pares de cromossomos telocêntricos (Foresti, 1972; Bogart, 1973). Vale ressaltar que do clado de *D. decipiens*, que inclui *D. berthalutzae*, *D. decipiens*, *D. haddadi* e *D. oliveirai*, haviam sido estudadas citogeneticamente apenas *D. berthalutzae* e *D. oliveirai* (Foresti, 1972; Gruber *et al.*, 2005), e seus cariótipos diferem daquele de *D. decipiens* em relação ao número e ao tamanho dos cromossomos telocêntricos. Enquanto em *D. decipiens* foram observados três pares de cromossomos telocêntricos (pares 5, 6 e 7), em *D. berthalutzae* e *D. oliveirai* foram descritos quatro (pares 5, 6, 11 e 15) e três pares (pares 3, 6 e 7), respectivamente.

A variação no número de cromossomos telocêntricos é esperada para espécies desse gênero. Os primeiros autores a estudarem o cariótipo de *Dendropsophus* (Beçak, 1968; Rabello, 1970; Foresti, 1972) já verificaram uma variação no número de pares

telocêntricos, e rearranjos cromossômicos, como translocações e inversões pericêntricas, foram considerados como possíveis causas disso (Foresti, 1972).

No entanto, até o momento a inferência de homeologia entre quaisquer desses cromossomos telocêntricos das diferentes espécies de *Dendropsophus* não pode ser fortemente corroborada, já que não há marcadores cromossômicos suficientes para uma comparação interespecífica mais precisa. Essa escassez de dados impossibilita, portanto, que os rearranjos envolvidos na variação cromossômica observada em *Dendropsophus* sejam satisfatoriamente identificados. É nesse contexto que iniciamos a construção de sondas para cromossomos telocêntricos, cujos resultados estão discutidos no próximo item.

5.4. Pintura Cromossômica

Dendropsophus nanus e *D. walfordi* são duas espécies muito semelhantes em vários aspectos biológicos (Lutz, 1983; Langone e Basso, 1989; Fouquet *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2013). Estudos taxonômicos envolvendo estas duas espécies, baseados em caracteres morfológicos, propuseram a sinonimização desses táxons (Lutz, 1983), mas Langone e Basso (1989), avaliando dados de vocalização e morfologia dos girinos, revalidaram *D. walfordi*. Estudos recentes baseados em inferências filogenéticas sugerem o parafiletismo entre essas duas espécies, levantando a necessidade de uma nova revisão do grupo (Fouquet *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2013; Figura 14).

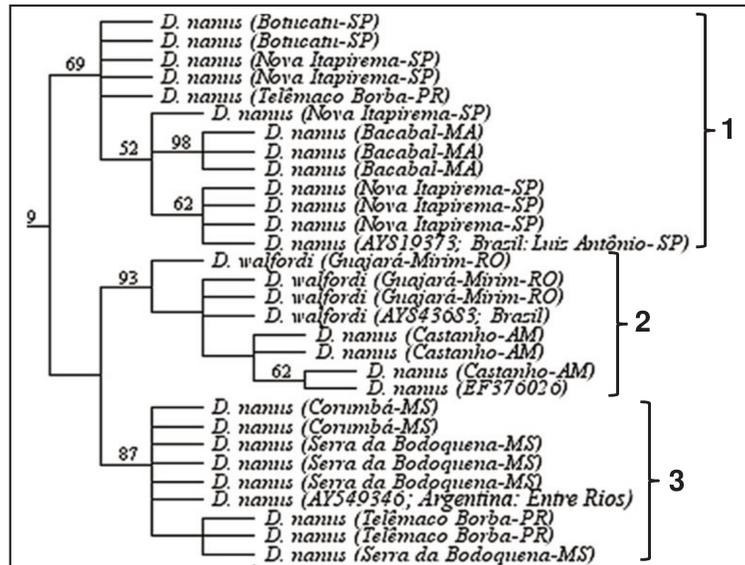


Figura 14. Relações filogenéticas entre *D. nanus* e *D. walfordi*. (Cladograma reproduzido de Medeiros et al., 2013). Os números acima dos ramos constituem valores do *bootstrap* (em porcentagem).

No presente estudo, foi construída uma sonda (pDn15), do cromossomo telocêntrico classificado como 15 de um exemplar de *D. nanus* pertencente à linhagem identificada como 1 na Figura 14. Essa sonda é capaz de detectar o cromossomo telocêntrico 15 de um exemplar de *D. nanus* de Serra da Bodoquena/MS, pertencente à outra linhagem de *D. nanus* (linhagem 3 na Figura 14). Aparentemente, a sonda pDn15 também detecta o cromossomo 15 de *D. walfordi*, embora fortes sinais de hibridação cobrindo todo o cromossomo tenham sido observados em apenas um dos homólogos do par cromossômico 15 nas duas metáfases dessa espécie analisadas até o momento. Tais resultados do emprego da sonda pDn15 sugerem a homeologia dos cromossomos 15 de *D. nanus* (linhagens referidas como 1 e 3 na Figura 14) e *D. walfordi*. Embora esse dado não permita qualquer inferência sobre o *status* taxonômico dos anuros em estudo, representa um importante avanço no estudo citogenético de *Dendropsophus*.

A técnica de pintura cromossômica vem sendo aplicada em muitos tipos de organismos, principalmente em mamíferos (Yang et al., 1995; Yang et al., 1997; Huang et al., 2011; Bugno-Poniewierska et al., 2012; Dumas et al., 2012) e peixes (Phillips et al., 2001; Wang et al., 2009; Nagamachi et al., 2010; Cioffi et al., 2011; Machado et al., 2011) na tentativa de estudar homeologias cromossômicas entre diferentes espécies. Para os dois grupos citados, esta técnica é atualmente bem padronizada e tem trazido

informações bastante relevantes para cada grupo. Outros grupos, como répteis, aves e alguns insetos, são relativamente bastante estudados com alguns exemplos de estudos que utilizaram a pintura cromossômica interespecífica (Trifonov *et al.*, 2011; Kawagoshi *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013).

Em anuros, no entanto, a técnica tem sido ainda pouco aplicada. O primeiro e único estudo até o momento envolvendo anuros foi conduzido por Krylov *et al.* (2010), que tinham por objetivo verificar a origem do cariótipo de *Xenopus leavis*. Neste estudo, os autores hibridaram sondas construídas a partir de cromossomos microdissecados de *X. tropicalis* em cariótipos de *X. leavis*, e verificaram algumas regiões de homeologias entre estes cariótipos. Apesar dos resultados obtidos neste estudo, os autores ressaltam que há ainda algumas dificuldades na padronização da técnica para anuros.

O presente estudo constitui, portanto, um dos raros exemplos da utilização da técnica de pintura cromossômica em anuros, e as dificuldades técnicas aqui encontradas são decorrentes da inexistência de um protocolo eficaz para a realização dessa técnica. Apesar dos problemas relatados, alguns resultados satisfatórios foram obtidos, sugerindo que a pintura de cromossomos telocêntricos pode vir a ser uma interessante ferramenta para verificar homeologias cromossômicas entre espécies de *Dendropsophus*.

6.CONCLUSÕES

- Dois tipos de DNAr 5S, que diferiram principalmente em relação ao NTS, foram encontrados em *D. soaresi*. O DNAr 5S do tipo I foi mapeado no cromossomo 2 de *D. soaresi* e *D. seniculus*, mostrando que os cariótipos dessas espécies são similares também em relação à localização desse tipo de sequência.
- A hibridação *in situ* com sondas teloméricas revelou ITSs no cariótipo de *D. soaresi*, embora nos cariótipos de *D. seniculus* e *D. melanargyreus* apenas as regiões terminais dos cromossomos tenham sido detectadas por essas sondas. Embora seja uma característica interessante para estudos futuros, ainda não há evidências de que a origem das ITSs observadas em *D. soaresi* seja relacionada a eventos de fusão cromossômica em *Dendropsophus*.
- A ausência de ITSs em dois pares de cromossomos telocêntricos de *D. soaresi* permitiu diferenciá-los de outros cromossomos telocêntricos morfológicamente muito semelhantes.
- Com base em experimentos de pintura cromossômica, foi inferida a homeologia entre o cromossomo 15 de *D. nanus* e o menor cromossomo telocêntrico de *D. walfordi*.
- Os dados citogenéticos obtidos no presente estudo permitiram o aumento do número de espécies de *Dendropsophus* cariotipadas de 31 para 36, utilizando inclusive técnicas citogenéticas ainda pouco ou não utilizadas até o momento para o gênero, como o mapeamento de sequências teloméricas e o isolamento e mapeamento de DNAr 5S. Além disso, foram realizados os primeiros passos para o emprego da técnica de pintura cromossômica para o estudo de homeologias cromossômicas em *Dendropsophus*.

7.REFERÊNCIAS

- Amaro-Ghilardi, R.C., Silva, M.J.J, Rodrigues, M.T., Yonenaga-Yassuda, Y. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetica**, 134:159–168, 2008.
- Anderson, K. **Chromosome evolution in Holarctic Hyla treefrogs**. In: Green, D.M., Sessions, S.K. (eds.). Amphibian Cytogenetics and Evolution, Academic Press, San Diego, p. 299-328, 1991.
- Beçak, M.L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**, 21: 191-208, 1968.
- Begum, R., Alam, S.S., Menzel, G., Schmidt, T. Comparative molecular cytogenetics of major repetitive sequence families of three *Dendrobium* species (Orchidaceae) from Bangladesh. **Annals of Botany**, 104: 863–872, 2009.
- Bogart, J.P. Cromosomas en algunos generos de anuros. Acta IV Congreso Latino de Zoología, 1: 79-85, 1970.
- Bogart, J.P. **Evolution of anuran karyotypes**. In: Vial, J.L. (ed.) Evolutionary Biology of the Anurans. University of Missouri Press. Columbia, p. 337-349, 1973.
- Bogart, J.P., Bogart, J.E. Genetic Compatibility Experiments between Some South American Anuran Amphibians. **Herpetologica**, 27 (3): 229-235, 1971.
- Brown, D.D., Sugimoto, K., Structure and Evolution of ribosomal and 5-S DNAs in *Xenopus laevis* and *Xenopus muelleri*. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 38: 501-505, 1973.
- Bugno-Poniewierska, M., Sojecka, A., Pawlina, K., Jakubczak, A., Jeżewska-Witkowska, G. Comparative Cytogenetic Analysis of Sex Chromosomes in Several Canidae Species Using Zoo-FISH. **Folia Biologica (Kraków)**, 60: 1-2, 2012.
- Cai, Q., Zhang, D., Liu, Z., Wang, X. Chromosomal Localization of 5S and 18S rDNA in Five Species of Subgenus *Strobos* and their Implications for Genome Evolution of *Pinus*. **Annals of Botany**, 97: 715–722, 2006.
- Carvalho, K.A., Garcia, P.C.A., Recco-Pimentel, S.M. NOR Dispersion, Telomeric Sequence Detection in Centromeric Regions and Meiotic Multivalent Configurations in Species of the *Aplastodiscus albofrenatus* Group (Anura, Hylidae). **Cytogenetic Genome Research**, 126:359–367, 2009.

- Chowdhary, B.P., Raudsepp, T. Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. **Methods Cell Science**, 23 (1–3): 37–55, 2001.
- Cioffi, M.B., Sánchez, A., Marchal, J.A., Kosyakova, N., Liehr, T., Trifonov, V., Bertollo, L.A.C. Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamiliar Erythrinidae fishes. **BMC Evolutionary Biology**, 11:186, 2011.
- del Pino, E.M., Murphy, C., Masson, P.H., Gall, J.G. 5S rRNA-encoding genes of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. **Gene**, 111: 235-238, 1992.
- Duellman, W.E. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. **Systematic Zoology**, 16: 38-43, 1967.
- Duellman, W.E. **The hylids frogs of Middle America**. Monografia do Museu de História Natural, University of Kansas, (1): 1-753, 1970.
- Duellman, W.E., Cole, C.J. Studies of Chromosomes of Some Anuran Amphibians (Hylidae and Centrolenidae). **Systematic Zoology**, 14 (2): 139-143, 1965.
- Duellman, W.E., Trueb, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 670p, 1986.
- Duellman, W.E., Trueb, L. **Frogs of the *Hyla columbiana* group: taxonomic and phylogenetics relationships**. In: Advances in herpetology and evolutionary biology: essays in honor of Ernest E. Williams. Cambridge, Mass: Museum of Comparative Zoology, 1983.
- Dumas, F., Houck, M.L., Bigoni, F., Perelman, P., Romanenko, S.A., Stanyon, R. Chromosome Painting of the Pygmy Tree Shrew Shows that No Derived Cytogenetic Traits Link Primates and Scandentia. **Cytogenetic and Genome Research**, 136: 175–179, 2012.
- Fagundes, V., Vianna-Morgante, A.M., Yonenaga-Yassuda, Y. Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* (2n = 14, 15 and 16). **Chromosome Research**, 5:228–232, 1997.
- Fagundes, V., Yonenaga-Yassuda, Y. Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae,

- Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. **Chromosome Research**, 6: 643–648, 1998.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A., Wheeler, W.C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 294: 1-240, 2005.
- Falstocco, E., Passeri, V., Marconi, G. Investigations of 5S rDNA of *Vitis vinifera* L.: sequence analysis and physical mapping. **Genome**, 50: 927-938, 2007.
- Faravelli, M., Azzalina, C.M., Bertonia, L., Chernovab, O., Attolinia, C., Mondelloc, C., Giulotto, E. Molecular organization of internal telomeric sequences in Chinese hamster chromosomes. **Gene**, 283: 11–16, 2002.
- Ferguson-Smith, M.A., Trifonov, V. Mammalian karyotype evolution. **Nature Reviews Genetics**, 8: 950–962, 2007.
- Ferreira, I.A., Oliveira, C., Venere, P.C., Galetti, P.M. Jr, Martins, C. 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Genetica**, 129: 253-257, 2007.
- Foote, D.L., Wiley, J.E., Little, M.L., Meyne, J. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 57:196–199, 1991.
- Foresti, F. **Aspectos Cromossômicos da Família Hylidae (Amphibia - Anura)**. Dissertação de Mestrado, ESALQ-USP, Piracicaba, SP, 1972.
- Fouquet, A., Noonan, B., Blanc, M., Orrico, V.G.D. Phylogenetic position of *Dendropsophus gaucheri* (Lescure and Marty 2000) highlights the need for an in-depth investigation of the phylogenetic relationships of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae). **Zootaxa**, 3035: 59–67, 2011.
- Frederiksen, S., Cao, H., Lomholt, B., Levan, G., Hallenberg, C. The rat 5S rRNA bona fide gene repeat maps to chromosome 19q12 – qter and the pseudogene repeat maps to 12q12. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 76: 101–106, 1997.
- Frost, Darrel R. 2013. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 5.6 (9 January 2013). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

- Fukova, I., Traut, W., Vitkova, M., Nguyen, P., Kubickova, S., Marec, F. Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. **Chromosoma**, 116 (2): 135–145, 2007.
- Ganal, M.W., Lapitan, N.L.V., Tanksley, S.D. Macrostructure of tomato telomeres. **Plant Cell**, 3: 87–94, 1991.
- Garagna, S., Ronchetti, E., Mascheretti, S., Crovella, S., Formenti, D., Rumpler, Y., Romanini, M. Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. **Chromosome Research**, 5:487–491, 1997.
- Gatto, K.P. **Análise dos Cromossomos Sexuais de *Pseudis tocantins* (Anura: Hylidae)**. Dissertação de Mestrado, IB-UNICAMP, Campinas, SP, 2013.
- Gerbi, S.A. **Evolution of Ribosomal DNA**. In: Molecular Evolutionary Genetics. MacIntyre RJ. New York: Plenum Publishing, 419-517, 1985.
- Gray, J.W., Carrano, A.V., Steinmetz, L.L., van-Dilla, M.A., Moore II, D.H., Mayall, B.H., Mendelsohn, M.L. Chromosome measurement and sorting by flow systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 72: 1231-1234, 1975.
- Griffin, D.K., Robertson, L.B., Tempest, H.G., Vignal, A., Fillon, V., Crooijmans, R.P.M.A., Groenen, M.A.M., Deryusheva, S., Gaginskaya, E., Carré, W., Waddington, D., Talbot, R., Völker, M., Masabanda, J.S., Burt, D.W. Whole genome comparative studies between chicken and turkey and their implications for avian genome evolution. **BMC Genomics**, 14 (9): 168, 2008.
- Gruber, S.L., Haddad, C.F.B., Kasahara, S. Evaluating the Karyotypic Diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with 2n=30 chromosomes based on the analysis of ten species. **Folia Biologica (Praha)**, 51: 68-75, 2005.
- Guarnizo, C.E., Escallón, C., Cannatella, D., Amézquita, A. Congruence between acoustic traits and genealogical History reveals a new species of *Dendropsophus* (anura: Hylidae) in the high Andes of Colombia. **Herpetologica**, 68 (4): 523–540, 2012.
- Guttenbach, M., Nanda, I., Feichtinger, W., Masabanda, J.S., Griffin, D.K., Schmid, M. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1–9 in nine different bird species. **Cytogenetic and Genome Research**, 103 (1–2): 173–184, 2003.

- Hallenberg, C., Frederiksen, S. Effect of mutations in the upstream promoter on the transcription of human 5S rRNA genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1520 (2): 169-173, 2001.
- Harper, M.E., Price, J., Korn, L.J. Chromosomal mapping of *Xenopus* 5S genes: somatic-type versus oocyte-type. **Nucleic Acids Research**, 11 (8): 2313-2323, 1983.
- Hastie, N.D., Allshire, R.C. Human telomeres: fusion and interstitial sites. **Trends Genetics**, 5: 326–331, 1989.
- Howell, W.M., Black, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015, 1980.
- Huang, L., Jing, M., Nie, W., Robinson, T.J., Yang, F. Chromosome homologies between Tsessebe (*Damaliscus lunatus*) and Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*) facilitate tracing the evolutionary history of *Damaliscus* (Bovidae, Antilopinae, Alcelaphini). **Cytogenetic and Genome Research**, 132:264–270, 2011.
- Kaiser, H., Mais, C. Bolānos, F., Steinlein, C., Feichtinger, W., Schmid, M. Chromosomal, investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica**, 98: 95-102, 1996.
- Kawagoshi, T., Nishida, C., Matsuda, Y. The origin and differentiation process of X and Y chromosomes of the black marsh turtle (*Siebenrockiella crassicollis*, Geoemydidae, Testudines). **Chromosome Research**, 20: 95–110, 2012.
- Komiya, H., Hasegawa, M., Takemura, S. Differentiation of Oocyte- and Somatic-Type 5S rRNAs in Animals. **Journal of Biochemistry**, 100: 369-374, 1986.
- Korn, L.J., Brown, D.D. Nucleotide sequence of *Xenopus borealis* oocyte 5S DNA: Comparison of sequences that flank several related eukaryotic genes. **Cell**, 15: 1145-1156, 1978.
- Krylov, V., Kubickova, S., Rubes, J., Macha, J., Tlapakova, T., Seifertova, E., Sebkova, N. Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. **Chromosome Research**, 18: 431–439, 2010.

- Kubickova, S., Cernohorska, H., Musilova, P., Rubes, J. The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. **Chromosome Research**, 10 (7): 571–577, 2002.
- Langone, J.A., Basso, N.G. Distribución geográfica y sinonimia de *Hyla nana* Boulenger, 1889 y *Hyla sanborni* Schmidt, 1944 (Anura, Hylidae) y observaciones sobre formas afines. **Comunidad Zoológica del Museo Historia Natural del Montevideo**, 164: 1–17, 1987.
- Lee, C., Sasi, R., Lin, C.C. Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 63:156–159, 1993.
- León, P.E. Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. **Revista de Biología Tropical**, 17 (1): 1 19-124, 1970.
- Lutz B: **Brazilian species of *Hyla***. Austin and London: University of Texas Press; 1973.
- Machado, T.C., Pansonato-Alves, J.C., Pucci, M.B., Nogaroto, V., Almeida, M.C., Oliveira, C., Foresti, F., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O., Artoni, R.F., Vicari, M.R. Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genetics**, 12:65, 2011.
- Martins, C., Galetti Jr., P.M. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, 44: 903-910, 2001.
- Martins, C., Galetti, P.M. Jr. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, 7:363-367, 1999.
- Martins, C., Wasko, A.P. **Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome**. In: Focus on Genome Research Chapter X. Nova Science Publishers, New York, USA, Inc; p335-363, 2004.
- Martins, C.C.C., Diniz, D., Sobrinho-Scudeler, P.E., Foresti, F., Campos, L.A.O., Costa, M.A. Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. **Apidologie**, 44: 75–81, 2013.

- McDiarmid, R.W., Donnelly, M.A. **The herpetofauna of the Guayana Highlands: amphibians and reptiles of the Lost World.** *In*: Donnelly, M.A., Crother, B.I., Guyer, C., Wake, M.H., White, M.E. (Eds), *Ecology & Evolution in the Tropics; A Herpetological Perspective.* University of Chicago Press, Chicago. p. 461–560, 2005.
- Medeiros, L.C., Lourenço, L.B., Rossa-Feres, D.C., Lima, A.P., Andrade, G.V., Giaretta, A.A., Egito, G.T.B.T., Recco-Pimentel, S.M. Comparative cytogenetic analysis of some species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) in the light of phylogenetic inferences. **BMC Genetics**, 14:59, 2013.
- Medeiros, L.R., Rossa-Feres, D.C., Recco-Pimentel, S.M. Chromosomal Differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. **Journal of Heredity**, 94: 149-154, 2003.
- Meltzer, P.S., Guan, X.Y., Burgess, A., Trent, J.M. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. **Nature Genetics**, 1: 24-28, 1992.
- Metcalfe, C.J., Eldridge, M.D., Toder, R., Johnston, P.G. Mapping the distribution of the telomeric sequence (T2AG3)_n in the Macropodoidea (Marsupialia), by fluorescence in situ hybridization. I. The swamp wallaby, *Wallabia bicolor*. **Chromosome Research**, 6: 603–610, 1998.
- Meyne, J., Baker, R.J., Hobart, H.H., Hsu, T.C., Ryder, O.A., Ward, O.G., Wiley, J.E., Wurster-Hill, D.H., Yates, T.L., Moyzis, R.K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, 99: 3-10, 1990.
- Meyne, J., Ratliff, R.L., Moyzis, R.K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 86: 7049-7053, 1989.
- Moravec, J., Aparicio, J., Guerrero-Reinhard, M., Calderon, G., Köhler, J. Diversity of small Amazonian *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): another new species from northern Bolivia. **Zootaxa**, 1918: 1–12, 2008.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Crams, L.S., Dani, M., Deavent, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 85: 6622-6626, 1988.

- Murakami, M., Fujitani, H. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). **Genes & Genetic Systems**, 73: 9-20, 1998.
- Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Milhomem, S.S.R., O'Brien, P.C.M., Souza, A.C.P., Ferguson-Smith, M.A. Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. **BMC Genetics**, 11: 28, 2010.
- Nanda, I., Fugate, M., Steinlein, C., Schmid, M. Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. **Cytogenetic Genome Research**, 122 (3-4): 396-400, 2008.
- Napoli, M.F., Caramaschi, U. Geographic variation of *Hyla rubicundula* and *Hyla anataliasiasi*, with the description of a new species (Anura, Hylidae). **Alytes**, 16: 165-189, 1999b.
- Napoli, M.F., Caramaschi, U. The taxonomic status of *Hyla elongata* A. Lutz, 1925. **Journal of Herpetology**, 33: 484-487, 1999a.
- Nascimento, J., Quinderé, Y.R.S.D., Recco-Pimentel, S.M., Lima, J.R.F., Lourenço, L.B. Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). **Genetica**, 138: 1127-1132, 2010.
- Nunes, R.R.A. **Citogenética de anfíbios da família Hylidae do Espírito Santo**. 71p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.
- Ocalewicz, K. **Genomic Distribution of Telomeric DNA Sequences – What Do We Learn from Fish About Telomere Evolution?**. In: Li, B. (Ed.), Reviews on Selected Topics of Telomere Biology, ISBN: 978-953-51-0849-8, InTech, DOI: 10.5772/38397, 2012.
- Pellegrino, K.C., Rodrigues, M.T., Yonenaga-Yassuda, Y. Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. **Hereditas**, 131: 15–21, 1999.
- Pendás, A.M., Moran, P., Freije, J.P., Garcia-Vazquez, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5SrDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 67: 31-36, 1994.

- Peterson, R.C., Doering, J.L., Brown, D.D. Characterization of two *Xenopus* somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA. **Cell**, 20: 131-141, 1980.
- Phillips, R.B., Konkol, N.R., Reed, K.M., Stein, J.D. Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). **Genetica**, 111: 119–123, 2001.
- Rab, P., Rabova, M., Pereira, C.S., Collares-Pereira, M.J., Pelikanova, S. Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker—the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting. **Chromosome Research**, 16 (6): 863–873, 2008.
- Rabello, M.N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, 23: 45-59, 1970.
- Rabello, M.N., Beçak, M.L., Beçak, W. Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. **Arquivos do Museu Nacional**, 54: 285-286, 1971.
- Richards, E.J., Ausubel, F.M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, 53 (1): 127-36, 1988.
- Rodrigues, D.S., Rivera, M., Lourenço, L.B. Molecular organization and chromosomal localization of 5S rDNA in Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). **BMC Genetics**, 13: 17, 2012.
- Ruiz-Carranza, P.M., Ardila-Robayo, M.C., Lynch, J.D. Lista actualizada de la fauna Amphibia de Colombia. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, 20: 365–415, 1996.
- Ruiz-Herrera, A., Nergadze, S.G., Santagostino, M., Giulotto, E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, 122: 219–228, 2008.
- Scherthan, H. Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)_n in two muntjac species and implications for their karyotypic evolution. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 53:115–117, 1990.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, 66: 361-388, 1978.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Nanda, I., Schakowski, R., Visbal Garcia, R., Manzanilla Puppó, J., Fernández Badillo, A. An extraordinarily low diploid chromosome number in

- the reptile *Gonatodes taniae* (Squamata, Gekkonidae). **The Journal of Heredity**, 85:255–260, 1994.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Steinlein, C., García, R.V., Badillo, A.F. Chromosome Banding in Amphibia XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 101: 62–73, 2003.
- Schmid, M., Olert, J., Klett, C. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma**, 71: 29-55, 1979.
- Schmid, M., Vitelli, I., Batistoni, R. Chromosome Banding in Amphibia XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma**, 95: 271-284, 1987.
- Schmid, M., Steinlein, C., Bogart, J.P., Feichtinger, W., León, P., La Marca, E., Díaz, L.M., Sanz, A., Chen, S-H., Hedges, S.B. The chromosomes of terraranan frogs - Insights into vertebrate cytogenetics. **Cytogenetic Genome Research**, 130/131, 1–568, 2010.
- Shetty, S., Griffin, D.K., Graves, J.A. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. **Chromosome Research**, 7 (4): 289–295, 1999.
- Silva, M.J.J., Yonenaga-Yassuda, Y. New karyotypes of two related species of *Oligoryzomys* genus (Cricetidae, Rodentia) involving centric fusion with loss of NORs and distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences. **Hereditas**, 127: 217-229, 1997.
- Skuk, G., Langone, J.A. Los cromosomas de cuatro especies del género *Hyla* (Anura: Hylidae) con número diploide de $2n = 30$. **Acta Zoologica Lilloana**, 41: 165–171, 1992.
- Suárez, P., Cardozo, D., Baldo, D., Pereyra, M.O., Faivovich, J., Orrico, V.G.D. Catroli, G.F., Grabile, M., Bernarde, P.S., Nagamachi, C.Y., Haddad, C.F.B., Pieczarka, J.C. Chromosome Evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hylinae). **Cytogenetic and Genome Research**, 141:295–308, 2013.
- Sumner, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 83: 438-442, 1972.

- Tek, A.L., Jiang, J. The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence. **Chromosoma**, 113: 77–83, 2004.
- Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjöld, M., Ponder, B.A.J., Tunnacliffe, A. Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: General Amplification of Target DNA by a Single Degenerate Primer. **Genomics**, 13: 718–725, 1992.
- Teruel, M., Cabrero, J., Montiel, E.E., Acosta, M.J., Sánchez, A., Camacho, J.P. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome Research**, 17 (1): 11–18, 2009.
- Thomsen, P.D., Høyheim, B., Christensen, K. Recent fusion events during evolution of pig chromosomes 3 and 6 identified by comparison with the babirusa karyotype. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 73: 203–208, 1996.
- Trifonov, V.A., Giovannotti, M., O'Brien, P.C.M., Wallduck, M., Lovell, F., Rens, W., Parise-Maltempi, P.P., Caputo, V., Ferguson-Smith, M.A. Chromosomal evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting between *Gekko* and *Hemidactylus* species reveals phylogenetic relationships within the group. **Chromosome Research**, 19: 843–855, 2011.
- Vermeesch, J.R., De Meurichy, W., Van Den Berghe, H., Marynen, P., Petit, P. Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in the chromosomes of the Giraffidae, okapi (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob(4;26) fusion site. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 72:310–315, 1996.
- Vicari, M.R., Pistune, H.F.M., Castro, J.P., Almeida, M.C., Bertollo, L.A.C, Moreira-Filho, O., Camacho, J.M.P., Artoni, R.F. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, 139: 1073–1081, 2011.
- Viegas-Péquignot, E. **“In situ” hybridization to chromosomes with biotinylated probes**. In: Willernson, D. (ed.). “In situ” hybridization: a practical approach. Oxford/New York/Tokyo: IRL Press, p. 137-158, 1992.
- Vitelli, L., Batistoni, R., Andronico, F., Nardi, I., Barsacchipilone, G. Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal-RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. **Chromosoma**, 84 (4): 475-491, 1982.

- Vittorazzi, S.E., Lourenço, L.B., Del-Grande, M.L., Recco-Pimentel, S.M. Satellite DNA Derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 134 (2): 101-107, 2011.
- Wang, X., Zhang, Q., Ren, J., Jiang, Z., Wang, C., Zhuang, W., Zhai, T. The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Aquaculture**, 297: 78-94, 2009.
- Wiens, J.J., Kuczynski, C.A., Hua, X., Moen, D.S. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55: 871–882, 2010.
- Wiley, J.E., Meyne, J., Little, M.L., Stout, J.C. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 61:55–57, 1992.
- Yang, E., Carter, N.P., ShiU, L., Ferguson-Smith, M.A. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. **Chromosoma**, 103:642-652, 1995.
- Yang, F., O'Brien, P.C.M., Wienberg, J., Neitzel, H., Lin, C.C., Ferguson-Smith, M.A. Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). **Chromosoma**, 106: 37–43, 1997.