
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Biologia Celular e Molecular

**Marcadores Citológicos no Cariótipo de Espécies de *Leptodactylus*
(Amphibia, Anura, Leptodactylidae) Analisado com Técnicas de
Citogenética Clássica e Molecular**

Thiago Gazoni

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular e Molecular)

**Abril
2011**

Thiago Gazoni

**Marcadores Citológicos no Cariótipo de Espécies de
Leptodactylus (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) Analisado
com Técnicas de Citogenética Clássica e Molecular**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular e Molecular)

Orientador: Profa. Dra. Sanae Kasahara

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri

Rio Claro

2011

597.8 Gazoni, Thiago
G291m Marcadores citológicos no cariótipo de espécies de *Leptodactylus*
(Amphibia, Anura, Leptodactylidae) analisado com técnicas de
citogenética clássica e molecular / Thiago Gazoni. - Rio Claro : [s.n.],
2011
99 f. : il., figs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro
Orientador: Sanae Kasahara
Co-Orientador: Ana Paula Zampieri Silva de Pietri

1. Anuro. 2. Bandas de replicação. 3. Hibridação in situ. 4. Evolução
cromossômica. 5. Anuros - Gênero *Leptodactylus*. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Marcadores Citológicos no Cariótipo de Espécies de Leptodactylus (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), Analisado com Técnicas de Citogenética Clássica e Molecular

AUTOR: THIAGO GAZONI

ORIENTADORA: Profa. Dra. SANAÉ KASAHARA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA PAULA ZAMPIERI SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SANAÉ KASAHARA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. CHRISTINE STRÜSSMANN

Depto. de Ciências Básicas e Produção Animal/Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade Federal de Mato Grosso

Profa. Dra. PATRÍCIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 26 de abril de 2011.

*Dedico este trabalho especialmente à minha família,
meu maior exemplo, rocha sobre a qual edifico os
princípios que me motivam a lutar em busca de meus
ideais e da realização de todos os meus sonhos.*

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein

Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Sanae Kasahara, exemplo de dedicação e competência a todo e qualquer cientista e cidadão, por ter-me concedido o privilégio de sua orientação, amizade, paciência, ensinamentos e apoio muito além de sua obrigação.

À Profa. Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri pela imprescindível co-orientação, e por estar sempre disposta a ajudar.

À Doutoranda Simone Lilian Gruber, companheira de orientação, pela amizade e pela importante ajuda, nas mais diversas áreas, que tem prestado na realização deste trabalho.

Ao Pós-Doutorando João Reinaldo Cruz de Campos, meu amigo e também companheiro de orientação, pelos ensinamentos e auxílio desde o início de minhas atividades científicas.

Ao Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad e seus colaboradores, em especial à Mestre Olívia Gabriela dos Santos Araújo, e à Profa. Dra. Christine Strüssmann, ao Prof. Dr. Fernando Ananias e ao biólogo Álvaro Dhimas Serra Modesto, pela coleta e identificação dos espécimes e pela fundamental assessoria nas questões de taxonomia e sistemática de anuros.

Ao biólogo Hideki Narimatsu por sua amizade, apoio e esforços de coleta junto ao nosso grupo de pesquisa.

Ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Biologia, pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa de Mestrado concedida.

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

Ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) pelas licenças de coleta concedidas

À Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise-Maltempi e à Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider, pelas valiosas contribuições no aprimoramento do trabalho, pela atenção e amizade.

Aos técnicos de laboratório do Departamento, Gerson Mello Souza, Sandra Veloso e Mônica Lamonte, pelo suporte técnico e simpatia.

Aos professores do Departamento de Biologia pela amizade, empenho e qualidade das aulas.

À coordenadora do Programa de Biologia Celular e Molecular Maria Izabel de Souza, à Seção de Pós Graduação, em especial à Rosemary D. Oliveira S. Cardoso e à Josiele Fernanda Magri e à secretária do Departamento de Biologia, Lucila de L. Segalla Franco, pela prontidão em resolver questões burocráticas.

À desenhista Cristiane M. Miléo, pela amizade, bom humor e pela disponibilidade em ajudar com seus conhecimentos em computação.

A todos que passaram pelo grupo de pesquisa deixando, de alguma forma, sua colaboração à elaboração deste trabalho, especialmente à Glaucilene Ferreira Catroli, André Luís Bombeiro.

Aos colegas Pós-Graduandos e de Iniciação Científica do Departamento, pelo agradável convívio e colaboração, em especial ao doutorando Edson Lourenço, pela ajuda com as técnicas de citogenética molecular.

Aos meus pais Célia Floriano Gazoni e Roberto Gazoni, meus primeiros e principais exemplos de luta e vida, determinantes à minha educação e formação, e pelo incondicional apoio emocional e financeiro.

Aos meus irmãos Juliano Gazoni e Thaís Roberta Gazoni, por todo apoio, incentivo e compreensão durante a minha ausência.

À Weilan Gomes da Paixão Melo, pelo companheirismo, pela ajuda e paciência durante a finalização da dissertação.

Aos meus avós, tios e primos pelo incentivo, carinho e amizade durante toda minha existência.

Aos meus amigos de graduação, que estão sempre presentes, e a todas as amizades construídas ao longo de minha formação acadêmica.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

"Diante da vastidão do tempo e da imensidão do espaço é uma alegria para mim compartilhar uma época e um planeta com vocês."

Carl Sagan

Resumo

O gênero *Leptodactylus* é um dos mais diversificados em número de espécies e distribuição geográfica, sendo, particularmente, abundante em território brasileiro, onde novas espécies têm sido descritas nos últimos anos. Apesar de o gênero ser, desde longa data, objeto de estudos de taxonomia e sistemática, com base em múltiplos caracteres e, principalmente, naqueles com suporte no sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear e outros marcadores moleculares, persistem ainda muitos questionamentos. As informações citogenéticas obtidas no gênero são, relativamente, escassas e têm revelado que, de um modo geral, a maioria das espécies compartilha cariótipos similares, com $2n=22$ e $NF=44$, mesmo em análises com técnicas de coloração diferencial, não se descartando, contudo, diferenças marcantes na constituição cariotípica de algumas espécies. Foram, então, cariotipados, com técnicas de citogenética clássica e molecular, 27 exemplares identificados como *Leptodactylus labyrinthicus*, *L. rhodomystax*, *L. chaquensis*, *L. petersii*, *Leptodactylus* cf. *petersii*, *L. podicipinus*, *Leptodactylus* aff. *podicipinus* e *L. pentadactylus*, com o intuito de buscar marcadores cromossômicos relevantes para o entendimento da evolução cromossômica, conhecimento da estrutura e organização molecular, bem como para a taxonomia e sistemática. Cariótipo modal com $2n=22$ e $NF=44$ é compartilhado pela maioria das espécies, com diferenças pequenas no tamanho e morfologia de alguns cromossomos. Cariótipos discrepantes estão presentes em *L. podicipinus*, ($2n=22$, $NF=36$), *Leptodactylus* aff. *podicipinus* ($2n=20$, $NF=40$) e *L. pentadactylus* ($2n=22$, $NF=44$), na primeira pela presença de quatro pares de telocêntricos, na segunda pela redução do número diploide e na terceira, pela ocorrência de translocações sequenciais múltiplas, reconhecidas, também, na meiose pela formação de cadeias cromossômicas em anel. O padrão de RON pela impregnação do nitrato de prata e pelo FISH com sonda de DNAr diferencia o cariótipo de algumas espécies, tendo sido o marcador localizado nos cromossomos 3 ou 4 e nos homólogos do par 8, na maioria das espécies, ainda que ocupando, eventualmente, sítios distintos nos braços cromossômicos. A localização e a quantidade de heterocromatina visualizada pelo bandamento C podem indicar diferenças cromossômicas conspícuas ou

sutis, interespecíficas e mesmo interpopulacionais, principalmente, no que se refere às marcações C-positivas terminais e intersticiais, embora tais bandas sejam, às vezes, de difícil demonstração. A coloração com o fluorocromo GC-específico CMA₃ ou AT-específico DAPI forneceu informações sobre a natureza molecular de regiões repetitivas, indicando, também, algumas diferenças nos cariótipos das espécies. As bandas de replicação obtidas por incorporação de BrdU permitiram a identificação mais precisa dos pares de homólogos no cariótipo de cada espécie e a comparação interespecífica dos cromossomos mostrou correspondência dos padrões em grande parte deles. Alguns dos rearranjos estruturais puderam ser confirmados, enquanto outros necessitam ainda de análises adicionais. O FISH com sonda de telômero exibiu sinais fluorescentes nas regiões teloméricas, sem que fosse notado vestígio de possíveis rearranjos estruturais ocorridos na diferenciação dos cariótipos. Marcações teloméricas intersticiais em alguns cromossomos de *L. podicipinus* devem indicar que DNA repetitivo na região dos seus centrômeros contêm sequências similares às dos telômeros. Sem dúvida, uma análise conjunta dos dados citogenéticos com aqueles obtidos a partir de sequenciamento molecular, de estudos de morfologia e de ecologia, será fundamental para se entender a diversificação cariotípica dos anuros do gênero *Leptodactylus*.

Abstract

The genus *Leptodactylus* is one of the most diversified in species number and geographic distribution, being particularly abundant in Brazil, where new species have been described in recent years. The genus has been, since long time, object of studies on taxonomy and systematics based on multiple characters, and especially on those supported by the sequencing of mitochondrial and nuclear DNA and other molecular markers. Nevertheless, there are still many unsolved questions. The cytogenetic data obtained in the genus are relatively scarce and revealed that, in general, most species share similar karyotypes, with $2n = 22$ and $NF = 44$, even in analysis carried out with differential staining techniques. However, conspicuous differences in karyotype constitution of some species can not be excluded. The karyotype of 27 specimens, identified as *Leptodactylus labyrinthicus*, *L. rhodomystax*, *L. chaquensis*, *L. petersii*, *Leptodactylus* cf. *petersii*, *L. podicipinus*, *Leptodactylus* aff. *podicipinus*, and *L. pentadactylus*, were analyzed, using techniques of classical and molecular cytogenetic. The aim of this study was searching for chromosomal markers relevant to understand chromosome evolution, knowledge of molecular structure and organization, as well as for taxonomy and systematics. Modal karyotype with $2n = 22$ and $FN = 44$ is shared by most species, with small differences in size and morphology of some chromosomes. Discrepant karyotypes are present in *L. podicipinus* ($2n = 22$, $NF = 36$), *Leptodactylus* aff. *podicipinus* ($2n = 20$, $NF = 40$), and *L. pentadactylus* ($2n = 22$, $NF = 44$), the former by the presence of four pairs of telocentric chromosomes, the second by the reduced diploid number and the latter, by the occurrence of multiple sequential translocations, recognized also by a multivalent ring shaped chain in meiosis. The NOR pattern by silver nitrate impregnation and by FISH with rDNA probe differentiates the karyotypes of some species. This marker was located on chromosomes of pairs 3 or 4, and, in most species, in the homologues of pair 8, though, possibly in different sites on chromosome arms. The location and amount of heterochromatin visualized by C-banding might indicate conspicuous or subtle chromosomal differences, at interspecific or interpopulation level, especially as regards the C-positive terminal and interstitial bands, even though these bands are sometimes difficult

to demonstrate. Staining with the GC-specific fluorochrome CMA₃ or AT-specific DAPI provided information on the molecular nature of repetitive regions, indicating also some differences in the karyotypes of the species. The replication banding obtained by BrdU incorporation allowed more precise identification of homologue chromosome pairs in the karyotype of each species and the interspecific comparison of chromosomes showed that the banding patterns are similar for the majority of them. Some of the structural rearrangements could be confirmed, while others still require further analysis. The FISH with telomere probe showed fluorescent signals just in the telomeric regions, with no evidence of possible structural rearrangements, during the differentiation of karyotypes. Telomeric interstitial labels in some chromosomes of *L. podicipinus* should indicate that repetitive DNA in the centromeric regions has similar sequences present in the telomere. Undoubtedly, an analysis of cytogenetic data with those obtained from molecular sequencing, studies on morphology traits and ecology will be fundamental to understanding the karyotypic diversification in the frog genus *Leptodactylus*.

Sumário

	Página
I. Introdução	14
1. Coloração diferencial dos cromossomos	15
1.1. Identificação de regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON).....	15
1.2. Identificação de regiões de heterocromatina pelas bandas C.....	17
1.3. Identificação da constituição molecular de sequências repetitivas por fluorocromos base-específicos.....	19
1.4. Bandas de replicação por incorporação de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) no DNA	22
1.5. Técnica de citogenética molecular com hibridação <i>in situ</i> de sondas fluorescentes	24
2. O gênero <i>Leptodactylus</i> : características gerais, distribuição, taxonomia e citogenética	28
II. Objetivos	34
III. Material e Métodos	35
Obtenção das preparações citológicas a partir de medula óssea, fígado e testículo	35
Obtenção de preparações citológicas a partir de epitélio intestinal	36
Obtenção de preparações citológicas a partir de cultura de linfócitos	37
Confecção das lâminas	37
Coloração convencional com Giemsa	38
Marcação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON).....	38
Marcação das regiões de heterocromatina (bandamento C).....	39
Detecção do conteúdo molecular de regiões repetitivas por fluorocromos base-específicos (coloração CMA ₃ e DAPI)	39
Diferenciação de bandas de replicação após incorporação de BrdU por coloração FPG (<i>Fluorochrome Plus Giemsa</i>).....	40

Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda de DNAr HM123.....	40
Hibridação <i>in situ</i> fluorescente com uso da sonda telomérica (TTAGGG) _n	41
Análise cromossômica.....	42
IV. Resultados	46
Constituição Cariotípica.....	46
Análise meiótica.....	47
Ag-RON	47
Bandamento C.....	48
Coloração com fluorocromos base-específicos	49
Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com Sonda ribossômica e sonda telomérica	50
Bandas de replicação	51
V. Discussão	72
VI. Conclusões	82
VII. Referências Bibliográficas.....	84

I. Introdução

Atualmente são descritas para a ordem Anura 5966 representantes com distribuição em quase todos os continentes, exceto na Antártida (FROST, 2011), sendo que no Brasil é registrada a ocorrência de 849 espécies, segundo a Lista de Anfíbios Brasileiros (SBH, 2010). Esses números têm aumentado, substancialmente, nos últimos anos, pois somente na atual década foram descritas cerca de 15% do total das espécies brasileiras. Tal fato, associado à grande similaridade morfológica observada nos anuros, faz com que muitas dúvidas sejam geradas com relação à taxonomia e sistemática desse grupo. Na tentativa de resolver tais questionamentos, estudos têm sido realizados com base em caracteres de morfologia externa, osteologia, bioacústica, biologia reprodutiva, ecologia, distribuição geográfica, entre outros parâmetros, e levando-se, também, em conta dados de sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear, além de outros marcadores moleculares.

Extensas revisões, baseadas principalmente em dados moleculares, foram ser realizadas a partir de 2005, como as de Faivovich et al. (2005), Frost et al. (2006), Grant et al. (2006) e Hedges et al. (2008), resultando em grandes modificações na taxonomia e sistemática de toda a classe Amphibia, mas, dados cromossômicos não foram considerados na maioria desses trabalhos. É importante enfatizar que análises de dados de sequenciamento de DNA associados com informações cariotípicas têm produzido relevantes trabalhos sobre a filogenia de certos grupos de anuros da fauna brasileira (AGUIAR JR. et al., 2007; LOURENÇO et al., 2008; TARGUETA et al., 2010), mostrando que a citogenética pode, efetivamente, contribuir no esclarecimento de questões de taxonomia e sistemática.

Segundo revisões sobre citogenética de anfíbios (MORESCALCHI, 1973; KING, 1990; KURAMOTO, 1990; GREEN e SESSIONS, 2007), os cromossomos dos anuros começaram a ser observados por volta de 1930, com o uso da técnica de esmagamento de testículos, o que permitia a análise de fases meióticas e, algumas vezes, de metáfases espermatogoniais. Foi a partir da década de 1960 que houve um grande avanço da citogenética de anuros, decorrente do desenvolvimento de metodologias e técnicas de obtenção das preparações cromossômicas, com uso da colchicina e do tratamento hipotônico e, sobretudo, dos procedimentos de análise e identificação de cromossomos (SCHMID et al., 1990a; GREEN e SESSIONS, 2007; SCHMID et al., 2010). Os primeiros dados cromossômicos em anuros da fauna

brasileira foram obtidos com uso apenas de coloração convencional (BEÇAK, 1968; RABELLO et al., 1971; DENARO, 1972; FORESTI, 1972; BOGART, 1973; LUCCA et al., 1974), e tais trabalhos estabeleceram os eventos de fusão/fissão cêntricas e a poliploidia como os mecanismos mais prováveis de evolução cromossômica. De fato, apesar de bastante simples, a análise cromossômica com coloração convencional de cromossomos mitóticos e meióticos pode fornecer informações relevantes para se determinar a constituição cariotípica da espécie e, também, para estudos citogenéticos comparativos.

Ao longo do tempo, o aperfeiçoamento dos procedimentos de obtenção direta dos cromossomos e a introdução do cultivo de linfócitos e de fibroblastos na citogenética de anuros, tiveram como consequência uma melhoria na qualidade das preparações citológicas, condição essa que propicia a obtenção de uma gama maior de informações, após aplicação das técnicas usuais e avançadas de diferenciação cromossômica. Desse modo, é possível a detecção de um número cada vez mais diversificado de marcadores nos cromossomos, importantes para a citogenética comparativa e, também, para um melhor conhecimento de sua estrutura e organização molecular.

1. Coloração diferencial dos cromossomos

São inúmeras as técnicas de coloração diferencial (VERMA e BABU, 1995) que surgiram com o desenvolvimento da citogenética humana, e que foram aplicadas nos cromossomos dos vertebrados, incluindo os anfíbios (SCHMID et al., 2010). Apresentamos a seguir os procedimentos que têm sido mais frequentemente empregados nos trabalhos de anfíbios anuros, por citogeneticistas do mundo todo.

1.1. Identificação de regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON)

A técnica de impregnação pelo nitrato de prata, desenvolvida por Goodpasture e Bloom (1975) e aperfeiçoada por Howell e Black (1980), tem sido amplamente utilizada na citogenética animal para detecção do número, tamanho e posição das Ag-RON, pela rapidez, simplicidade, e, em certa extensão, por sua especificidade. Esse marcador é bastante útil para o estudo cromossômico

comparativo, principalmente, para os grupos de animais que apresentam cariótipos com número diploide e morfologia cromossômica semelhantes, como é o caso de algumas famílias e gêneros de anfíbios. Antes do advento da técnica de Ag-RON, os citogeneticistas se baseavam na localização de constrição secundária para identificação eventual de cromossomos marcadores no cariótipo (BOGART, 1973), lembrando que, além de não serem sempre visualizados, os sítios heteropicnóticos negativos nem sempre são RON, e, mesmo que impregnados pela prata, podem corresponder a outro tipo de DNA repetitivo.

A importância de um marcador como a constrição secundária, mesmo que observada pela coloração convencional, tem no trabalho de Abramyan et al. (2009) um caso ilustrativo. Ao analisarem exemplares de *Bufo marinus* (atualmente *Rhinella marina*) notaram um heteromorfismo acentuado no tamanho da constrição secundária, apenas nos cromossomos do par 7 das fêmeas, porém, nunca nos dos machos, relacionando-o com a presença de cromossomos Z e W, comprovado, posteriormente, por outras técnicas citogenéticas.

Diferentemente do observado no grupo dos mamíferos, em geral, com mais de um par de cromossomos portador de Ag-RON, as espécies de anfíbios apresentam com frequência um único par de regiões organizadoras de nucléolo (SCHMID et al., 1990a; GREEN e SESSIONS, 2007), de modo que a análise desse marcador pode ser de grande importância citotaxonômica. De fato, a localização da Ag-RON em um par particular de cromossomos, principalmente, em gêneros, cujas espécies mostram cariótipos indistinguíveis pela coloração convencional, pode constituir um marcador espécie-específico. Amaro-Ghilardi et al. (2006) observaram, por exemplo, em *Leptodactylus petersii*, Ag-RON no par 4 e não no par 8, como nas demais espécies por eles cariotipadas. Mesmo nos casos nos quais a localização da Ag-RON é no par cromossômico 8, as Ag-RON podem ocupar sítios distintos, ou seja, na região terminal ou intersticial, nos braços curtos ou nos braços longos (SILVA et al., 2000). Embora à primeira vista se possa supor que rearranjos estruturais são responsáveis pelas mudanças de posição, reordenamentos grosseiros, como uma inversão pericêntrica no cromossomo portador de RON dos lagartos do gênero *Tropidurus* (atualmente *Eurolophosaurus*), *E. amathites* e *E. divaricatus* (KASAHARA et al., 1987), são, raramente, comprovados. Como discutido em Silva et al. (1999), são sugeridos vários outros tipos de eventos para explicar as variantes de Ag-RON, porém, nenhum com comprovação experimental.

Vários casos têm sido descritos em que espécies de anuros mostram marcações adicionais, ou seja, além do par de Ag-RON característico, por exemplo, de um determinado gênero, alguns representantes apresentam um padrão múltiplo, com Ag-RON variáveis em número e também localização (SCHMID et al., 1990a). Isso foi observado, entre inúmeras outras espécies, em *Physalaemus cuvieri* por Silva et al. (1999) e Quinderé et al. (2009), e em *Barycholos ternetzi* por Campos et al. (2008).

A caracterização dos padrões múltiplos de Ag-RON nem sempre é uma tarefa fácil, pelas limitações da própria técnica, uma vez que o íon prata se impregna nas proteínas não-histônicas associadas ao RNAr nascente, identificando somente as sequências de DNAr que estiveram ativas. Desse modo, o estabelecimento do número correto de RON pode ser mascarado pelo fato de existirem regiões que não transcreveram anteriormente. Outro complicador é a possível associação da prata a proteínas argirofílicas ligadas a sequências repetitivas do cromossomo, seja nas regiões teloméricas, centroméricas ou mesmo intersticiais, casos em que sítios que se mostram Ag-positivos não constituem RON verdadeiras, tal como já observado em anuros (KASAHARA et al., 1996; SILVA et al., 2006; ANANIAS et al., 2007a), assim como em mamíferos e peixes (SÁNCHEZ et al., 1995; DOBIGNY et al., 2002; GROMICHO et al., 2005).

A relevância do marcador Ag-RON não se restringe em diferenciar cariótipos, mas, é também muito útil para comprovar, de fato, a ocorrência de um rearranjo estrutural, como, por exemplo, uma inversão pericêntrica presumida em cromossomos que, além de apresentarem morfologia alterada, exibem Ag-RON em posição invertida, como nos lagartos *Eurolophosaurus* acima citados (KASAHARA et al., 1987). Por outro lado, o número distinto de Ag-RON em cariótipos de machos e fêmeas de certas espécies de anuros foram importantes para indicar a possível ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais XX:XY, em que o X e o Y não são diferenciados por suas respectivas morfologias (ANDERSON, 1991).

1.2. Identificação de regiões de heterocromatina pelas bandas C

O bandamento C permite a visualização das regiões de heterocromatina graças à sua coloração diferencial nos cromossomos. Tais regiões correspondem a sequências altamente repetitivas ou de DNA satélite e, sendo a técnica, em geral

aquela baseada em Sumner (1972), que é relativamente simples e rápida, tem sido também muito utilizada na citogenética de anfíbios e demais vertebrados. Nos vertebrados ectotérmicos, nos quais a aplicação de outros tipos de bandamento cromossômico nem sempre é bem sucedida, a identificação das bandas C, assim como também da Ag-RON, é, praticamente, obrigatória para a caracterização inicial dos cariótipos.

A maioria dos anuros apresenta muita heterocromatina (SCHMID et al., 1990a) e, conforme têm evidenciado os dados de bandamento C, está distribuída, predominantemente, na região centromérica/pericentromérica, e, também, em sítios terminais dos cromossomos, sendo não raro localizada nas regiões intersticiais ou associada às RON.

Os incontáveis trabalhos da literatura sobre citogenética de anuros que utilizaram procedimentos de obtenção das bandas C têm mostrado a relevância desse marcador para melhorar a descrição dos cariótipos, na medida em que se pode determinar a quantidade de bandas, o tamanho e a distribuição delas em cada cromossomo de uma espécie em particular, embora a visualização das mesmas nem sempre seja muito clara, quando se trata de blocos pequenos, com leve coloração pelo Giemsa. Por essa razão, a qualidade das preparações cromossômicas e a regularidade, nem sempre alcançada, nos resultados do bandamento C, são de grande importância para detectar possíveis casos de heteromorfismos, decorrentes de perda (total ou parcial) ou ganho (duplicação, por exemplo) de regiões de heterocromatina em cromossomos homólogos, tal como foi descrito em *Eupemphix nattereri* (ANANIAS et al., 2007a).

Os padrões de bandas C em anuros, principalmente, naqueles que formam um complexo de espécies, com cariótipos muitas vezes indistinguíveis pela coloração convencional, têm um grande valor citotaxonômico. Pode-se mencionar um trabalho, no qual Matsui et al. (1985) mostraram distintos padrões de banda C, característicos para cada uma das seis espécies ou subespécies pertencentes ao complexo *Bufo bufo*, todas com $2n=22$ e cariótipos semelhantes com coloração convencional. Desde então se seguiram inúmeros outros, os quais relatam padrões de bandas C diferenciando cariótipos em nível interespecífico ou mesmo interpopulacional, como os realizados no gênero *Leptodactylus* (SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2006), assim como em vários outros grupos (CAMPOS et al., 2008, entre outros). Contudo, é oportuno lembrar que existem casos em que os

padrões de bandas C não se diferenciam nas espécies de um mesmo gênero, como relatado em representantes de *Bufo* (atualmente *Rhinella*) do Brasil (KASAHARA et al., 1996), dentre outros exemplos.

Outra importante aplicação do bandamento C é na detecção e confirmação de cromossomos sexuais heteromórficos (SCHMID et al., 1991), visto que a heterocromatina está estreitamente ligada ao processo de diferenciação desses cromossomos no cariótipo de vertebrados (OHNO, 1967; SINGH et al., 1976). De fato, pares cromossômicos com morfologia indistinguível podem mostrar um dos homólogos totalmente ou parcialmente heterocromatinizado (BARALE et al., 1990; ANANIAS et al., 2007b), podendo tratar-se de XY ou ZW.

A obtenção de bandas C serviu para a comprovação de rearranjo do tipo inversão pericêntrica em um par heteromórfico de cromossomos, pela alteração na posição da banda (SILVA et al., 2000) e de cromossomo supernumerário heterocromático, cuja morfologia se assemelha à de cromossomos de um par particular do complemento A (GRUBER et al., 2007). A técnica de bandamento C foi, também, de grande utilidade para se sugerir um indício de diploidização do cariótipo do anuro tetraploide *Odontophrynus americanus* e do octaploide *Ceratophrys ornata*, tendo Schmid et al. (1985) observado uma variação na distribuição de heterocromatina nos cromossomos de certos quartetos e octetos, respectivamente.

A aplicação do bandamento C na citogenética de anuros, em conjunto com outras técnicas citológicas, como as que empregam coloração por fluorocromos base-específicos e mesmo procedimentos mais avançados de citogenética molecular, com uso de sondas de DNA repetitivo, tem sido de grande relevância para se entender a constituição molecular e organização dos cromossomos, principalmente, no que concerne às regiões de heterocromatina. A coloração distinta de regiões sabidamente heterocromáticas ou mesmo a ausência de marcação pelo bandamento C são um indício da heterogeneidade da heterocromatina.

1.3. Identificação da constituição molecular de sequências repetitivas por fluorocromos base-específicos

A identificação de regiões de heterocromatina pelo bandamento C pode se tornar ainda mais eficiente na busca de marcadores citológicos nos cromossomos,

se for empregada conjuntamente com a coloração por fluorocromos base-específicos. A grande vantagem dessa técnica é a de possibilitar a caracterização citológica da constituição molecular das sequências repetitivas nos cromossomos, se rica em bases AT ou GC, pois, quando os fluorocromos são excitados pela radiação UV, emitem fluorescência brilhante de diferentes intensidades, de acordo com a composição das bases nitrogenadas das regiões.

Existe uma grande variedade de fluorocromos (por exemplo, quinacrina mostarda, cromomicina A₃, abreviadamente CMA₃, mitramicina, olivomicina, 4'-6-diamidino-2-fenilindol, abreviadamente DAPI, entre outros) que podem ser usados nas análises citogenéticas (VERMA e BABU, 1995), alguns dos quais são antibióticos. Embora se encaixem em duas categorias quanto à sua especificidade, isso não significa que todos que são AT-específicos produzam resultados idênticos, podendo o mesmo ser dito em relação àqueles que são GC-específicos. Daí, então, a vantagem de se empregar vários fluorocromos para que algum deles seja revelador de um ou vários sítios marcadores, em um ou vários cromossomos. A variedade de resultados pode ser ainda maior se os fluorocromos são usados em combinação com outros corantes, em geral não fluorescentes, mas, que têm, também, afinidade para bases AT, como é o caso da distamicina A (DA), ou bases GC, como a actinomicina D (AMD). Quando se trata de um fluorocromo AT-específico, a coloração combinada com DA, por exemplo, pode resultar em uma marcação distinta daquela produzida pelo corante primário; já se for empregado o contracorante GC-específico, o resultado do corante primário é potencializado, assim como quando se usa o fluorocromo GC-específico, com o contracorante AT-específico (KASAHARA, 2009). Com isso, pode-se aumentar a possibilidade de se identificar um marcador espécie-específico.

É importante ressaltar que, embora os fluorocromos possam identificar sequências repetitivas particulares nos cromossomos de representantes de qualquer grupo zoológico, a coloração, no caso dos mamíferos, pode diferenciar um padrão de bandas eucromáticas do tipo G ou R. O exemplo mais conhecido é o da quinacrina e de seus derivados, responsáveis pela diferenciação das chamadas bandas Q, regiões cromossômicas ricas em bases AT (KASAHARA, 2009).

Entre os anfíbios, os trabalhos com emprego de fluorocromos são numerosos, destacando-se aqueles realizados por Schmid e seus colaboradores (SCHMID 1978a, 1978b, 1980, 1982; SCHMID et al., 1987; SCHMID e GUTTENBACH, 1988;

SCHMID et al., 1989; SCHMID et al., 1990a; SCHMID et al. 1990b; SCHMID et al., 1993a; SCHMID et al. 1993b; SCHMID et al., 1995; SCHMID et al., 2002; SCHMID et al., 2010). Os citogeneticistas têm utilizado, principalmente, a coloração com quinacrina mostarda, mitramicina, cromomicina A₃ e DAPI, com ou sem contracorantes, permitindo chegar a algumas conclusões sobre a natureza molecular da heterocromatina dos anfíbios. Segundo avaliação feita já na década de 1990 (SCHMID et al., 1990a), heterocromatina rica em bases AT é frequentemente observada no genoma de anfíbio, diferentemente do encontrado em outras classes de vertebrados, nas quais essas regiões seriam mais raras.

Nos trabalhos de citogenética de anuros realizados no Brasil, observa-se uma tendência ao uso frequente da coloração com fluorocromos base-específicos, na medida em que pode fornecer informações mais detalhadas sobre as regiões repetitivas dos cromossomos. De fato, o bandamento C revela, muitas vezes, bandas sutis, quando não ausência de marcação positiva de certas regiões que, sabidamente, são heterocromáticas. Isso justifica, então, o uso rotineiro da coloração das preparações cromossômicas com fluorocromos, pelo menos com o CMA₃ e o DAPI, contracorados ou não pelo DA, principalmente, naqueles casos em que espécies próximas mostram padrões de banda C similares.

Um exemplo ilustrativo da aplicação da coloração com fluorocromos na citogenética comparada de anuros é o do trabalho de Kasahara et al. (2003), em que quatro espécies da subfamília Hyalinae, todas com 2n=24, têm constituição cariotípica similar pela coloração convencional e bandamento C. No que se refere às espécies próximas *Aparasphenodon brunoi* e *Corythomantis greeningi*, um dado interessante é que, embora ambas mostrassem marcações centroméricas de bandas C similares e relativamente pequenas, somente os cromossomos da primeira delas exibiram blocos grandes, com fluorescência intensa após coloração DA/CMA₃ na região centromérica de todos os elementos, além de uma marcação intersticial nos braços dos cromossomos de um par, que não fora identificada pelo bandamento C.

Um dado curioso, ainda no trabalho de Kasahara et al. (2003), diz respeito à fluorescência brilhante das RON pelo DA/CMA₃ no cariótipo de três das espécies analisadas e ausência de qualquer vestígio de sinal brilhante nos cromossomos portadores desse marcador em *Aparasphenodon brunoi*. Tal fato vem confirmar que, embora as RON tenham predominância de bases GC, a sua coloração pelo CMA₃ ou pela mitramicina é eventual e indicativa de que outros fatores, e não apenas a

riqueza de bases, devem intervir na produção do sinal fluorescente nessas regiões (SCHMID et al., 1990a). Muito provavelmente, a forma com que a heterocromatina se associa às RON deve ter algum papel na marcação pelos fluorocromos GC-específicos.

1.4. Bandas de replicação por incorporação de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) no DNA

Embora a marcação de RON e de bandas C forneça uma grande quantidade de informações para análises comparativas dos cariótipos, a citogenética de anfíbios carece de dados fornecidos por bandamentos do tipo G ou R. De fato, é sabido que a diferenciação em bandas eucromáticas, muito úteis para reconhecimento dos pares de homólogos, é pobre ou ausente nos cromossomos de vertebrados ectotérmicos. Foram aventadas várias explicações, porém, todas sem comprovação experimental, mesmo a mais aceita dentre elas, que é a da falta de compartimentalização do genoma em *isochores* (SCHMID et al., 1990a; SUMNER, 2003).

Frente às dificuldades em se obter bandas G e R nos cromossomos de anfíbios, a técnica de incorporação pelo BrdU, para diferenciar bandas de replicação ao longo dos cromossomos, constitui-se, então, em uma importante alternativa para os estudos citogenéticos em anuros (KASAHARA, 2009). Dependendo da finalidade, o BrdU é empregado em concentrações variáveis, em tratamentos contínuo ou descontínuo, com duração de alguns minutos ou várias horas (DUTRILLAUX e COUTURIER, 1981; VERMA e BABU, 1995; GUSTASHAW, 1997; KASAHARA, 2009), podendo ser aplicados em animais vivos ou nas células em cultura. Do ponto de vista de aplicabilidade para a caracterização dos cariótipos, são indicados aqueles tratamentos que produzem um padrão de bandas do tipo R ou G nos cromossomos. Para obtenção de bandas R, o análogo de base deve estar presente no período S tardio, quando se replicam as bandas G, que são aquelas ricas em AT; por outro lado, para as bandas G, o tratamento é durante o período S precoce, quando se replicam as bandas R, ricas em GC. Independentemente do conteúdo de bases, as regiões de heterocromatina são as mais tardias na cronologia de replicação. Qualquer que seja o tratamento pelo BrdU, a diferenciação posterior dos cromossomos pode ser feita por métodos e técnicas variadas, sendo empregados

como corantes o Giemsa ou mesmo fluorocromos como, por exemplo, a acridina orange.

Um dos primeiros trabalhos relatando uso do BrdU em cromossomos de vertebrados ectotérmicos foi o de Schempp e Schmid (1981) no anuro *Rana esculenta*, atualmente *Pelophylax lessonae*, no qual os autores conseguiram não só identificar cada par de homólogos, como, também, um par sexual XY. Embora os elementos do par 4 fossem indistinguíveis nos dois sexos por coloração convencional e, também, por bandamento C, os cromossomos exibiram padrões distintos de replicação somente nos machos, confirmando ser o sexo heterogamético na referida espécie.

Subsequentemente, inúmeros trabalhos na literatura relataram o emprego do BrdU em vertebrados ectotérmicos, não só para identificação de pares de homólogos, como, também, para confirmação de rearranjos estruturais e para análises comparativas de cariótipos de espécies com o mesmo ou distintos números diploides, com destaque para peixes (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1988; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2005) e lagartos (KASAHARA et al., 1987; YONENAGA-YASSUDA et al., 1988; PELLEGRINO et al., 1997) da fauna brasileira. O tratamento com BrdU *in vitro*, portanto, em condições experimentais mais facilmente controladas, produziu em lagartos do gênero *Tropidurus* preparações com prometáfases, cujos cromossomos muito alongados permitiram análises cromossômicas comparativas de alta resolução (YONENAGA-YASSUDA et al., 1988).

Entre os anfíbios, existem na literatura vários relatos de uso da incorporação pelo BrdU, como nos cromossomos de salamandras do gênero *Hynobius* (KURO-O et al., 1986; KOHNO et al., 1991) e de anuros, com destaque para os realizados em espécies de *Rana* (NISHIOKA et al., 1993; NISHIOKA et al., 1994; MIURA, 1994; MIURA, 1995), mostrando que a ocorrência de cromossomos sexuais pode ser, de fato, demonstrada por padrões diferenciais de replicação, e, principalmente, aqueles produzidos pelo grupo de Schmid e seus colaboradores (SCHEMPP e SCHMID, 1981; SCHMID e KLETT, 1994; SCHMID et al., 2003, entre inúmeros outros), em distintas espécies de anuros. Desses últimos grupos de autores, é interessante comentar o trabalho realizado por Schmid e Steinlein (1991) que realizaram uma análise detalhada das bandas de replicação dos cromossomos de *Xenopus laevis* ($2n=4x=36$), confirmando, também, pela citogenética, a sua origem poliploide.

Análises comparativas de cariótipos baseadas nos padrões de replicação nem sempre constituem uma tarefa fácil, porém, MIURA (1995) conseguiu estabelecer homeologias cromossômicas em representantes dos gêneros *Rana*, *Hyla* e *Bufo*, demonstrando uma proximidade citogenética maior entre os dois últimos gêneros, do que em relação a *Rana*, o que é condizente com conclusões anteriores baseadas, exclusivamente, em caracteres de morfologia externa.

Entre os anuros da fauna brasileira, o emprego do BrdU como técnica para aumentar a quantidade e qualidade das informações sobre os cariótipos tem sido bastante restrito, sendo a maior parte dos trabalhos realizados por Kasahara e seus colaboradores (KASAHARA et al., 1998; SILVA et al., 2000; KASAHARA et al., 2003; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2006; GRUBER et al., 2007, dentre os publicados); existem outros ainda em andamento, como nas espécies diploide de *Phyllomedusa distincta*, tetraploide *P. tetraploidea* e seus híbridos triploides, em *Scinax similis* com demonstração de ocorrência de uma translocação recíproca (Kasahara, dados não publicados). Em alguns trabalhos foram realizadas análises comparativas dos cariótipos baseadas nas bandas de replicação dos cromossomos de diferentes espécies (SILVA et al., 2000; KASAHARA et al., 2003; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2006; GRUBER et al., 2007), revelando até o momento alto grau de conservação cariotípica, também, em relação às bandas de replicação dos cromossomos, em grande parte inteiramente homeólogos.

1.5. Técnica de citogenética molecular com hibridação *in situ* de sondas fluorescentes

Os procedimentos até aqui apresentados, além de identificar marcadores cromossômicos, podem fornecer subsídios para a composição e organização molecular de certas regiões. No entanto, o grande salto qualitativo nas análises cromossômicas ocorreu com o desenvolvimento das chamadas técnicas de citogenética molecular, que são aquelas nas quais há manipulação do material genético para a obtenção de sondas e sua posterior visualização nos cromossomos (VERMA E BABU, 1995; GUERRA, 2004). Como o próprio nome diz, as sondas servem para a prospecção de marcadores particulares nos cromossomos e são utilizadas em experimentos de hibridação *in situ*, cujo princípio é baseado na marcação de sequências particulares de DNA ou RNA e subsequente hibridação por

complementaridade no DNA-alvo. Essas sondas podem ser marcadas, tanto por fluorocromos (*Fluorescent in situ hybridization* - FISH), atualmente o processo mais rotineiramente empregado, assim como por moléculas contendo isótopos radioativos.

A grande vantagem do FISH decorre do fato de que praticamente qualquer sequência pode ser identificada nos cromossomos, como a de DNA satélite ou de DNA repetitivo em geral, de genes ribossômicos 45S ou 5S, de telômeros, de centrômeros, de DNA relacionado à diferenciação de cromossomos sexuais Y ou W, de gene estrutural e até cromossomos inteiros. A utilização dessas diferentes sondas depende das informações que se quer obter, mas, também, da facilidade maior ou menor em construí-las e da padronização dos protocolos de FISH, pois, embora o princípio seja o mesmo, há incontáveis variantes técnicas introduzidas, algumas vezes, para cada tipo de sonda.

Nas análises citogenéticas de anfíbios anuros, o uso de técnicas de FISH é ainda, em certa extensão, bastante incipiente, principalmente no que diz respeito às espécies da fauna brasileira, sendo que nos seus cromossomos o emprego tem se restringido majoritariamente às sondas ribossômicas 18S + 28S e às sondas teloméricas. Mesmo em trabalhos realizados no grupo dos mamíferos, pode-se dizer que os tipos de sondas empregadas não têm sido tão variados, como se tem observado para o grupo dos mamíferos.

As sondas de DNAr 18S + 28S têm sido usadas para se complementar as informações obtidas pela técnica de Ag-RON, pois a hibridação se dá na própria sequência gênica, portanto, independentemente de sua atividade genética. Com isso, é mais seguro decidir sobre a ocorrência de RON múltiplas e RON inativas, afastar como RON verdadeiras as marcações eventuais de sequências repetitivas pela prata, esclarecer se os heteromorfismos de Ag-RON são decorrentes de atividade diferencial ou resultado de um número maior de unidades de repetição (SILVA et al., 2006; ANANIAS et al., 2007a; SIQUEIRA et al., 2009, entre incontáveis outros).

Quanto ao marcador 5S, sua localização nos cromossomos não é possível pela técnica de Ag-RON, embora seja, também, gene ribossômico. Sua identificação é feita pela técnica de hibridação *in situ*, mas tem sido de uso pouco frequente na citogenética de anfíbios anuros. Os primeiros trabalhos datam da década de 1980, porém, ainda com sondas marcadas por radioisótopos (VITELLI et al., 1982;

SCHMID et al., 1987). A construção de sondas do gene ribossômico 5S para uso rotineiro em experimentos de FISH é um objetivo a ser buscado, pois, sem dúvida, a sua localização eventual em sítios distintos nos cromossomos de espécies que mostram cariótipos altamente similares é de grande aplicação para a citogenética comparativa de anuros.

Embora à primeira vista o FISH com sondas teloméricas possa parecer um procedimento redundante, já que os sinais de hibridação esperados são aqueles localizados na região dos telômeros dos cromossomos, o seu emprego nas análises citogenéticas pode ser útil para se comprovar, eventualmente, a ocorrência de rearranjos estruturais. São especialmente ilustrativos dessa situação os trabalhos em roedores em que sequências teloméricas intersticiais (ITS) foram observadas nas regiões onde houve quebra e fusão de braços cromossômicos em reordenamentos dos tipos fusão cêntrica ou fusão em tandem (FAGUNDES et al., 1997; VENTURA et al., 2006), correspondendo a remanescentes de telômeros. Contudo, é importante enfatizar que mesmo nos casos em que a indicação de rearranjo estrutural na evolução cromossômica seja bastante forte, ITS nos cromossomos podem não ser observadas.

Os primeiros trabalhos mencionando a ocorrência de sítios de hibridação intersticial nos cromossomos de anfíbios com sondas teloméricas são da década de 1990 (MEYNE et al., 1990; WILEY et al., 1992). Embora o uso de sondas teloméricas em análises citogenéticas de anuros da fauna brasileira seja ainda incipiente, tem-se observado um aumento nos últimos anos (AMARO-GHILARDI et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; Kasahara e seus colaboradores, dados não publicados). Espera-se com isso a detecção eventual de sítios de DNA repetitivo que contenham sequências equivalentes àquelas típicas de telômeros, tal como descrito por Nanda et al. (2008) no anuro *Xenopus clivii*. Nessa espécie, ocorrem sítios de hibridação intersticiais que se mostraram, também, C positivos, não sendo vestígios teloméricos resultantes de fusão cromossômica.

Nos últimos anos, tem-se observado na literatura um aumento nos trabalhos em anfíbios, nos quais se empregam como sondas sequências de DNA satélite ligado aos cromossomos sexuais ou mesmo sondas de genes estruturais, cujas localizações podem dar pistas importantes para se entender o processo de diferenciação e evolução dos sistemas de cromossomos sexuais (MURAKAMI et al., 2007; UNO et al., 2008a; UNO et al., 2008b). Independentemente dessa aplicação, a

localização gênica de grupos de ligação constitui uma abordagem bastante útil para se comprovar homeologias cromossômicas nem sempre possíveis de serem identificadas com outras técnicas citogenéticas.

Há, atualmente, uma grande expectativa em relação à técnica de FISH, com emprego de partes ou de cromossomos inteiros como sondas. Tais experimentos são denominados de pintura cromossômica ou ZOO-FISH, quando um ou todos os cromossomos de espécies diferentes são comparados (PIECZARKA et al., 2004), com muito maior acuidade do que com outros tipos de bandamento. Em mamíferos, essa técnica tem sido bem sucedida quando utilizada em estudos citogenéticos comparativos (PIECZARKA et al., 2005; HASS et al., 2008, entre outros), decorrente em parte da facilidade maior de isolamento individual dos cromossomos, pela técnica de citometria de fluxo (*flow sorting*) e realização do FISH-multicor, embora exista o recurso da microdissecção cromossômica, que é realizada diretamente das preparações de cromossomos vistas ao microscópio.

Nos últimos anos, tem-se observado cada vez mais os procedimentos de pintura cromossômica serem usados nas análises comparativas dos cariótipos de outros grupos de vertebrados, como aves (OLIVEIRA et al., 2005) e mais, raramente, em peixes (NAGAMACHI et al., 2010) e anfíbios (KRYLOV et al., 2010). Sem dúvida, uma das limitações para se aplicar a pintura cromossômica em espécies de anfíbios pode ser atribuída às dificuldades de obtenção de culturas de fibroblastos bem sucedidas para fornecerem uma grande quantidade de metáfases, condição fundamental para a realização da citometria de fluxo. Contudo, é importante enfatizar que o trabalho de Krylov et al. (2010) se baseou na microdissecção a laser de cromossomos de *Xenopus tropicalis* para a construção de sondas empregadas em experimentos de pintura cromossômica em *X. laevis*.

2. O gênero *Leptodactylus*: características gerais, distribuição, taxonomia e citogenética

Os anfíbios do gênero *Leptodactylus* apresentam oviposição em ninhos de espuma, variação quanto ao modo de reprodução, sendo esse pouco ou bastante dependente do ambiente aquático, além de grande variação de tamanho, desde pequeno a médio porte e, alguns deles, gigantes (DUELLMAN e TRUEB, 1994; ZUG, 1993; PRADO et al., 2002). Atualmente, totalizam 89 espécies que mostram ampla distribuição geográfica, com ocorrência desde o sul dos Estados Unidos, na América do Norte, América Central, até a Argentina na América do Sul, com predominância nas regiões tropicais (FROST, 2011). No Brasil, o número de espécies registradas é de 65 (SBH, 2010), com tendência a aumentar, já que novos representantes têm sido descritos (GIARETTA e COSTA, 2007; ANGULO e REICHLE, 2008; BERNECK et al., 2008; CARAMASCHI, 2008; CARAMASCHI et al., 2008; KWET et al. 2009).

O gênero *Leptodactylus* pertence à família Leptodactylidae, a qual, a exemplo de toda a Classe Amphibia, tem sofrido grandes mudanças na taxonomia e sistemática, baseadas, principalmente, em estudos moleculares. As mudanças mais proeminentes na família ocorreram com Frost et al. (2006) e, logo em seguida, com Grant et al. (2006) e, subsequentemente, com Hedges et al. (2008), os quais em conjunto provocaram alterações drásticas no que diz respeito à nomenclatura tradicional de espécies, gêneros ou mesmo em níveis mais elevados de subfamílias e famílias, e às suas relações filogenéticas.

Dentre as mudanças, ainda objeto de muitas discussões, cabe destacar a redução do número de representantes de Leptodactylidae, anteriormente a família mais numerosa da ordem Anura. Nos anos 1970, Lynch (1971) havia distribuído as espécies nas subfamílias Ceratophryinae, Hylodinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae, mas, logo em seguida, Heyer (1975) organizou as espécies em cinco unidades, subsequentemente, reconhecidas como Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae. Com algumas pequenas variações, tal divisão em cinco subfamílias foi mantida nos trabalhos de Frost, de 1985 até 2006, quando os leptodactídeos passaram por extensas modificações taxonômicas (FROST, 2006).

A idéia de que a família Leptodactylidae não seria monofilética, já sugerida por Lynch (1971), com base em caracteres morfológicos, foi, também, constatada em anos mais recentes por autores como Ford e Canatella (1993), Ruvinsky e Maxson (1996), Haas (2003), Darst e Canatella (2004) e Faivovich et al. (2005), entre outros, devido à falta de sinapomorfias evidentes. No entanto, nenhum deles sugeriu um arranjo taxonômico distinto, a não ser pequenas modificações, talvez por insuficiência de dados. Apenas Faivovich et al. (2005), ao realizarem uma revisão sobre a família Hylidae, tentativamente consideraram os Hemiphractinae como uma subfamília dos parafiléticos membros de Leptodactylidae, pois verificaram que estavam mais distantemente relacionados às espécies das outras três subfamílias de hílideos; por outro lado, verificaram que representantes de Hemiphractinae e das famílias Brachycephalidae, Centrolenidae e Dendrobatidae formam grupos-irmãos com alguns gêneros de Leptodactylidae, o que fortaleceria ainda mais a mudança proposta.

Sem dúvida, as alterações mais proeminentes na família Leptodactylidae ocorreram primeiro com Frost et al. (2006) e, logo em seguida, com Grant et al. (2006). As subfamílias Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae, até então aceitas, sofreram grandes modificações, já que famílias, subfamílias, gêneros e espécies foram criadas, revalidadas ou mesmo suprimidas. Inicialmente, Frost et al. (2006) mantiveram em Leptodactylidae a quase totalidade dos antigos gêneros de Leptodactylinae (*Edalorhina*, *Engystomops*, *Eupemphix*, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Adenomera*, *Lithodytes*, *Vanzolinius*, *Physalaemus*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola*, com exceção de *Limnomedusa*), dois (*Paratelmatobius* e *Scythrophrys*) de Cycloramphinae e um (*Somuncuria*) de Telmatobiinae, porém, *Adenomera*, *Vanzolinius* e *Lythodytes* foram sinonimizados com *Leptodactylus*, de modo que os 57 gêneros da família Leptodactylidae foram reduzidos a 11. Com Grant et al. (2006), entre outras mudanças, houve redução ainda maior no número de representantes da família Leptodactylidae que passou a englobar apenas quatro gêneros, isto é, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Paratelmatobius* e *Scythrophrys*. Os demais sete passaram a compor a família Leiuperidae, mas existe ainda alguma restrição quanto à posição taxonômica do gênero *Hydrolaetare*.

Grande parte dos estudos relacionados à taxonomia e sistemática dos *Leptodactylus* foi, tradicionalmente, baseada em caracteres morfológicos e esse critério foi o utilizado de início por Heyer (1969) para arranjar as espécies nos grupos de *L. fuscus*, *L. melanonotus*, *L. ocellatus* e *L. pentadactylus*. Mais tarde, o mesmo autor (HEYER, 1973) renomeou o leptodactilíneo *Adenomera marmorata* como *Leptodactylus marmoratus*, devido à sua distribuição geográfica e por compartilhar com alguns representantes desse último gênero várias características morfológicas, como tamanho, forma, textura e padrão de coloração, justificando a criação do grupo de *L. marmoratus*. Tal proposta foi logo abandonada, tendo sido revalidado o gênero *Adenomera*, uma vez que na revisão realizada, subsequentemente, por Heyer (1974) ficou evidente que a relação na subfamília Leptodactylinae era melhor explicada com os representantes do grupo *L. marmoratus* em um gênero distinto. Muitos outros autores abordaram essa questão, com base em diferentes caracteres (HEYER, 1975, 1977, 1998; HEYER e MAXSON, 1982; ANGULO et al., 2003; KOKUBUM e GIARETTA, 2005) e, embora os gêneros *Adenomera* e *Leptodactylus* fossem aceitos, a separação de ambos não era muito evidente. Heyer (1998) e Kokubum e Giaretta (2005) enfatizaram a relação filogenética próxima entre *Adenomera* e alguns *Leptodactylus*, o que reforça a natureza parafilética do gênero *Leptodactylus*.

A divisão das espécies de *Leptodactylus* nos cinco grupos reconhecidos por Heyer (1973) foi mantida nos trabalhos de Maxson e Heyer (1988) e Frost et al. (2006), porém, com várias espécies, principalmente, dos antigos gêneros *Adenomera*, *Lithodytes* e *Vanzolinius*, não alocadas em nenhum dos grupos estabelecidos. Foi a partir da revisão de Frost et al. (2006) que as espécies desses três gêneros foram incluídas em *Leptodactylus*, de modo a torná-lo monofilético, sugestão essa que já tinha suporte na literatura (DE SÁ et al., 2005; KOKUBUM e GIARETTA, 2005). É importante, contudo, enfatizar que embora a nomenclatura recomendada por Frost et al. (2006) seja seguida majoritariamente nos dias de hoje, existem, segundo Angulo e Reichle (2008), restrições por parte de diversos pesquisadores que não aceitam a inclusão de *Adenomera* em *Leptodactylus*.

A espécie *Leptodactylus latrans* foi revalidada por Lavilla et al. (2010), a partir de exemplares depositados em museus e identificados, inicialmente, como *Rana latrans* e *Leptodactylus ocellatus*. Após esse trabalho, todos os exemplares

identificados como *L. ocellatus* passaram a ser denominados como *Leptodactylus latrans* e, a partir de então, o grupo de *L. ocellatus* passou a ser denominado de grupo de *L. latrans*.

São, atualmente, reconhecidos para o gênero *Leptodactylus* os grupos de *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. marmoratus*, *L. melanonotus* e *L. pentadactylus* (FROST, 2011; PONSSA et al., 2011), porém, autores como Kwet et al. (2009) e Zaracho e Hernando (2011), não reconhecem a sinonimização de *Adenomera* a *Leptodactylus* proposta por Frost et al. (2006) e que mantiveram o grupo de *L. marmoratus* para alocar algumas espécies de *Adenomera*.

Até o presente, o número de espécies cariotipadas de *Leptodactylus* totaliza cerca de 40 (revisões em KING, 1990, KURAMOTO, 1990, AMARO-GHILARDI, 2005 e GREEN e SESSIONS, 2007, complementadas com os trabalhos de AMARO-GHILARDI et al., 2006; CAMPOS et al., 2009; ZARACHO e HERNANDO, 2011). Observa-se que $2n=22$ está presente em grande parte dos *Leptodactylus*, com exceção de *L. silvanimbus* com $2n=24$ (AMARO-GHILARDI et al., 2006) e as espécies que eram, anteriormente, incluídas nos gêneros *Lithodytes* ou *Adenomera*, *L. lineatus* com $2n=18$, *L. andreae*, *L. diptyx* e *L. hylaedactylus* com $2n=26$, *L. marmoratus* com $2n=24$ e *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) com $2n=23$ (BOGART, 1970a, 1973, 1974; CAMPOS et al., 2009; ZARACHO e HERNANDO, 2011). A espécie *Leptodactylus discodactylus*, anteriormente, *Vanzolinus discodactylus*, apresenta, também, $2n=22$ (HEYER e DIMENT, 1974). Segundo revisão de Kuramoto (1990), é mencionada, também, a espécie *L. lutzii* com $2n=26$, que teria sido cariotipada por Bogart (1970b). No entanto, nessa publicação não há nenhuma referência a essa espécie.

A grande maioria das análises citogenéticas em *Leptodactylus* foi realizada com coloração convencional, fornecendo apenas a descrição do número e da morfologia cromossômica. Somente a partir do ano de 1990, foram obtidos, também, dados com técnicas de coloração diferencial e de FISH com sondas de DNAr e de sequências teloméricas (BARALE et al., 1990; SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; SILVA et al., 2006; ARRUDA e MORIELLE-VERSUTE, 2008; CAMPOS et al., 2009; ZARACHO e HERNANDO, 2011), embora existam relatos (BIANCHI e MOLINA,

1967; BIANCHI et al., 1973) de análises cromossômicas por método autorradiográfico em *L. latrans* (*L. ocellatus*).

De modo geral, os cariótipos com $2n=22$ das espécies de *Leptodactylus* são bastante similares entre si, tendo cromossomos dos tipos metacêntrico, submetacêntrico ou subtelocêntrico. Ainda que, com pequenas variações na proporção dos braços de alguns cromossomos, presumivelmente homeólogos, tais cariótipos são vistos como conservados.

É importante enfatizar que *L. silvanimbus*, apesar de ter $2n=24$, possui constituição cariotípica altamente semelhante à das espécies com 22 cromossomos, tendo, porém, um par adicional, totalizando cinco pares pequenos e não quatro, justificando o seu $NF=48$. Os cariótipos com $2n=22$ e NF diferentes de 44 de *L. latinus*, *L. natalensis*, *L. podicipinus* e *L. wagneri* apresentam majoritariamente cromossomos de dois braços, semelhantes em tamanho e morfologia, aos descritos nos *Leptodactylus* com $2n=22$ e $NF=44$, porém, estão presentes telocêntricos em número e posição variáveis (BOGART, 1974; SILVA et al. 2000; ARRUDA e MORIELLE-VERSUTE, 2008). Em contraste, o padrão cariotípico dos antigos representantes dos gêneros *Adenomera* e *Lithodytes* ($2n=18, 23, 24$ e 26) são discrepantes, não só em número, como, também, na morfologia cromossômica, podendo seus cariótipos ser considerados como pouco conservados. Além disso, exemplos de diferenciação intraespecífica foram apresentados por Campos et al. (2009) em *L. marmoratus* de duas localidades, assim como um caso de fusão cêntrica heteromórfica em *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*).

Entre as espécies de *Leptodactylus*, existe uma única sugestão de cromossomos sexuais XY, possivelmente, em início de diferenciação, pois o par heteromórfico foi reconhecido somente pelas bandas C, na espécie *L. chaquensis*, proveniente da Argentina (BARALE et al., 1990). As técnicas de coloração diferencial têm produzido alguns resultados indicativos de que variações cromossômicas podem modificar, em certa extensão, a constituição cariotípica inter e intraespecífica de espécies de *Leptodactylus* (SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; SILVA et al., 2006; ARRUDA e MORIELLE-VERSUTE, 2008). De fato, Ag-RONs em distintos sítios dos cromossomos 8 ou localizados em outros pares, Ag-RONs múltiplas, assim como padrões diferentes de distribuição, quantidade e localização de heterocromatina,

visualizada por bandamento C, têm sido relatos relativamente frequentes. Uma inversão pericêntrica esporádica foi descrita por Silva et al. (2000) em um único exemplar de *L. latrans*, rearranjo esse confirmado, também, pelo bandamento C.

É importante enfatizar que, até a presente data, o gênero *Leptodactylus* tem sido um dos mais representativos em espécies cujos cromossomos foram apresentados com bandas de replicação por incorporação de BrdU (SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2006). Uma estreita correspondência nos padrões de replicação pôde ser estabelecida, principalmente, entre os cromossomos de maior tamanho, e permitindo, no caso de *L. pentadactylus*, a identificação dos elementos envolvidos em uma translocação recíproca que, segundo Amaro-Ghilardi et al. (2004), fora adquirida *in vitro*.

O presente trabalho foi desenvolvido com intuito de buscar marcadores cromossômicos em espécies de *Leptodactylus*, com o emprego de técnicas de citogenética clássica e molecular, considerando que:

- o gênero é abundante, com muitos representantes no Brasil, sendo que novas espécies têm sido descritas nos últimos anos;
- apenas uma pequena parcela das espécies foi, até o momento, cariotipada, sendo as análises restritas, na maioria das vezes, ao uso de coloração convencional e técnicas de Ag-RON ou bandamento C, revelando um cariótipo pouco variável, majoritariamente, com $2n=22$;
- grandes modificações na taxonomia e sistemática ocorreram, a partir de 2006, na família Leptodactylidae e no gênero *Leptodactylus*, baseadas, principalmente, em sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear, porém, com pouca ênfase dada às informações citogenéticas;
- existem questões de taxonomia ainda não resolvidas, como aquelas relativas à dificuldade de alocar algumas das espécies nos grupos conhecidos.

II. Objetivos

O objetivo foi o de avaliar a relevância dos marcadores cromossômicos obtidos com coloração convencional e com técnicas usuais de bandamento, assim como as de citogenética molecular, para caracterização dos cariótipos e para esclarecimento de sua diversificação em nível de espécies ou populações.

Desse modo, foram empregados:

- a coloração convencional dos cromossomos mitóticos e meióticos para estabelecimento da constituição cariotípica;
- a marcação de Ag-RON para identificação do número e localização das regiões organizadoras de nucléolo;
- o bandamento C para mostrar o padrão de distribuição e a quantidade da heterocromatina;
- o FISH com sonda de DNAr para confirmar ou não como RONS verdadeiras, as regiões de constrição secundária e aquelas impregnadas pelo nitrato de prata, ou, eventualmente, RONS inativas;
- o FISH com sondas teloméricas para identificação de possíveis sítios intersticiais ou pericentroméricos, como vestígios de rearranjos estruturais, ou identificação de regiões repetitivas similares às regiões teloméricas;
- a coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI para identificação da constituição molecular de regiões repetitivas particulares.
- a diferenciação de bandas de replicação pela incorporação de BrdU no DNA para emparelhamento mais preciso dos pares de homólogos.

Estes procedimentos serão úteis para a detecção de variações cariotípicas devidas a rearranjos estruturais, heteromorfismos de banda C, variantes de RON, cromossomos sexuais e mecanismos cromossômicos de determinação do sexo, bem como para o entendimento acerca da diversificação cariotípica interespecífica e interpopulacional. Tais informações constituem subsídios valiosos para a elucidação da evolução cromossômica, conhecimento da estrutura e organização molecular dos cromossomos de anfíbios anuros, assim como para a taxonomia e relação de parentesco entre os taxa, com esclarecimento de questões relativas a espécies crípticas e complexo de espécies.

III. Material e Métodos

Análises citogenéticas foram realizadas em exemplares do gênero *Leptodactylus*, pertencentes a oito espécies, das quais quatro, *Leptodactylus petersii*, *Leptodactylus* cf. *petersii*, *L. podicipinus* e *Leptodactylus* aff. *podicipinus*, estão alocadas no grupo de *L. melanonotus*, três, *L. labyrinthicus*, *L. pentadactylus* e *L. rhodomystax*, no grupo de *L. pentadactylus* e uma, *L. chaquensis*, no grupo de *L. latrans* (Fig. 1, Tabela 1). Os 27 animais são procedentes dos estados de Amapá (AP), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP) (Fig. 2). Três exemplares (dois machos e uma fêmea) foram identificados como *Leptodactylus labyrinthicus*; três jovens como *L. rhodomystax*; dois machos e um jovem como *L. chaquensis*; um jovem como *L. petersii*; um macho como *Leptodactylus* cf. *petersii*; nove (dois machos, três fêmeas e quatro jovens) como *L. podicipinus*; seis (cinco machos e uma fêmea) como *Leptodactylus* aff. *podicipinus*; e um macho como *L. pentadactylus*.

Os espécimes foram coletados e identificados pela Profa. Dra. Christine Strüssmann, do Departamento de Ciências Básicas e Produção Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UFMT, Cuiabá, MT, pelo Prof. Dr. Célio F. B. Haddad do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, pela Mestre Olívia Gabriela dos Santos Araújo, integrante de seu grupo de pesquisa, e pelo Prof. Dr. Ricardo Jannini Sawaya, do Departamento de Ciências Biológicas, UNIFESP, Diadema, SP. Colaboraram, também, com envio de material vivo o Dr. Fernando Ananias, então docente da Universidade Braz Cubas, Mogi das Cruzes, SP, e o Biólogo Álvaro Dhimas Serra Modesto de Macapá, AP. Após a eutanásia, os animais foram depositados na coleção "CFBH", do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, e na coleção pessoal de Ricardo Jannini Sawaya (RJS).

Obtenção das preparações citológicas a partir de medula óssea, fígado e testículo

Preparações cromossômicas diretas foram obtidas de células da medula óssea, fígado e testículo, quando do sexo masculino, de animais injetados intraperitonealmente com solução de colchicina a 0,01%, (na proporção de 0,01mL/g

de massa corpórea), tendo os tratamentos duração de cerca de 12 horas, como descrito em Baldissera Jr et al. (1993). Para promover aumento do índice mitótico, foi injetada nos animais solução de fitohemaglutinina, na mesma proporção da colchicina, 48 a 72 horas antes da eutanásia. Em alguns exemplares foi injetada *in vivo* solução dos análogos de base 5-bromodesoxiuridina e 5-fluorodesoxiuridina (BrdU+FudR), conforme descrição em Silva et al (2000), em igual proporção da colchicina, cerca de 16 horas antes da retirada dos tecidos e órgãos. O objetivo era o de permitir a incorporação do BrdU no DNA no momento da sua replicação, tornando possível a obtenção de bandas de replicação após aplicação da coloração FPG (*Fluorochrome Plus Giemsa*).

Minutos antes da dissecação, os animais foram anestesiados com lidocaína 5%, retiradas as tíbias e os fêmures, cortadas as epífises para extração da medula óssea por meio de sucessivas injeções de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl 0,075M). Fragmentos de fígado e os túbulos seminíferos dos testículos foram dissociados diretamente em solução hipotônica. O tratamento hipotônico teve duração de 45 minutos a 37°C, seguindo-se a pré-fixação em duas etapas de cinco minutos cada, com adição em cada frasco de cerca de seis gotas de fixador Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) recém-preparado e gelado. A suspensão foi centrifugada e, após o descarte do sobrenadante, foram realizados dois banhos com fixador. Após a última centrifugação, as suspensões foram mantidas na geladeira por, pelo menos, 24 horas antes da confecção das lâminas ou podiam ser armazenadas no *freezer* a -20°C, para posterior preparo das lâminas.

Obtenção de preparações citológicas a partir de epitélio intestinal

De alguns exemplares, a preparação citológica foi obtida a partir de células do epitélio intestinal segundo Schmid (1978), com modificações. Os animais recebiam injeção intraperitoneal de colchicina a 1% (0,01mL/g de massa corpórea), cerca de 4 horas antes da eutanásia. Após a sua retirada, o intestino foi cortado longitudinalmente e colocado em solução de KCl 0,0075M por 45 minutos. Em seguida, foi colocado em fixador Carnoy 3:1 recém-preparado e gelado, procedendo-se a raspagem do epitélio com o uso de uma espátula para a remoção das células. A suspensão foi centrifugada e, após o descarte do sobrenadante, o material foi submetido a sucessivas lavagens com fixador, repetindo-se o procedimento por,

pelo menos, duas vezes. Após a última centrifugação, as suspensões foram mantidas em geladeira por, no mínimo, 24 horas para uma boa fixação das células antes da confecção das lâminas ou armazenadas em *freezer* a -20°C para preparação posterior das lâminas.

Preparações citológicas de medula óssea, fígado e testículo foram obtidas, também, dos animais tratados com colchicina a 1% durante quatro horas.

Obtenção de preparações citológicas a partir de cultura de linfócitos

Para a obtenção de preparações cromossômicas a partir de cultura de linfócitos, foram empregados os procedimentos descritos por Kasahara et al. (1998). Após limpeza cuidadosa da superfície do tórax e abdômen com álcool 70%, procedeu-se à punção do coração, introduzindo-se a agulha acoplada a uma seringa heparinizada (Heparina Liquémine Roche, 5000UI/mL), diretamente, no ventrículo. O sangue colhido foi inoculado no frasco de cultura, na proporção aproximada de cinco gotas para 5mL de meio MEM, suplementado com fitohemaglutinina, soro bovino fetal e antibióticos. Caso a amostra de sangue fosse grande, a seringa era mantida em posição vertical por alguns minutos, para que ocorresse a sedimentação das hemácias. O material inoculado no frasco de cultura (cerca de 5 gotas por 5mL de meio) consistia, principalmente, de plasma com leucócitos. O material semeado foi incubado a 28°C por aproximadamente 4 dias. Foram adicionadas duas gotas da solução de BrdU+FudR, cerca de 15 horas antes do término da cultura, e uma gota da solução de colchicina 0,01%, 1 hora antes da colheita das células. O material foi, então, centrifugado, o sobrenadante, descartado, e procedeu-se a hipotonização, a fixação e os demais passos, conforme descrito para a obtenção das preparações diretas de medula óssea.

Confecção das lâminas

Antes da confecção das lâminas, foi feita uma troca pelo fixador fresco e a suspensão foi gotejada na superfície de uma lâmina mantida em banho-maria a 60°C , a qual foi, logo em seguida, colocada à temperatura ambiente para a sua secagem completa. Para melhorar o espalhamento dos cromossomos e a qualidade das preparações, fez-se um tratamento prévio com Cytoclear, empregado para

retirar o excesso de citoplasma, seguindo-se as especificações do fabricante. As lâminas foram destinadas às diferentes técnicas, após envelhecimento por, pelo menos 24 horas, à temperatura ambiente, ou armazenadas no *freezer* a -20°C , para posterior aplicação dos procedimentos de marcação cromossômica.

Coloração convencional com Giemsa

A lâmina foi incubada por cinco minutos em solução de ácido clorídrico 1N a 60°C e, após a hidrólise, lavada com água destilada e corada por 7 minutos com Giemsa, preparado com 1mL da solução comercial, diluído em 29mL de solução tampão de sódio e fosfato, pH6,8. A lâmina foi lavada com água destilada e seca à temperatura ambiente.

Marcação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON)

A marcação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata foi realizada segundo os procedimentos descritos por Howell e Black (1980). Após hidrólise em solução de HCl 1N a 60°C , durante 3 minutos, a lâmina foi lavada com água destilada e seca à temperatura ambiente. Sobre ela, pingou-se uma gota de solução coloidal reveladora, preparada com 1g de gelatina dissolvida em 50mL de água destilada e 0,5mL de ácido fórmico, e duas gotas de solução a 50% de nitrato de prata. O material foi coberto com lamínula e a lâmina, incubada em câmara úmida a 60°C , durante cerca de dois a três minutos. Após a lavagem com água destilada, foi feita uma coloração com solução de Giemsa, como a utilizada na coloração convencional, por 30 segundos. Seguiu-se a lavagem com água destilada e secagem à temperatura ambiente.

Em alguns casos, a técnica de Ag-RON foi realizada após a lâmina ter sido submetida a outras técnicas citogenéticas, como coloração convencional, banda C ou FISH com sonda de DNAr.

Marcação das regiões de heterocromatina (bandamento C)

Foram seguidos os procedimentos descritos por Sumner (1972), com algumas modificações. A lâmina foi incubada por 45 minutos em ácido clorídrico 0,2N à temperatura ambiente e, após a hidrólise, imersa em solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, aquecida a 60°C, durante 10 a 30 segundos. Em seguida, foi lavada rapidamente, em solução de ácido clorídrico 1N a 60°C e incubada em 2xSSC a 60°C, durante 45 minutos. Decorrido esse tempo, a lâmina foi lavada e corada com solução de Giemsa, a mesma da coloração convencional, durante 15 a 20 minutos. Uma nova lavagem em água destilada foi feita, seguida de secagem à temperatura ambiente.

Em alguns casos, o bandamento C foi empregado em lâmina previamente submetida à coloração convencional.

Detecção do conteúdo molecular de regiões repetitivas por fluorocromos base-específicos (coloração CMA₃ e DAPI)

Para a detecção das regiões repetitivas ricas em bases GC ou AT, foi empregada a técnica modificada de Christian et al. (1998), a qual dispensa o uso do contracolorante distamicina A (DA). A lâmina foi incubada em solução de formamida a 70% em 2xSSC, aquecida a 70°C, por 2 minutos. Em seguida, imersa duas vezes em banhos de 2xSSC, à temperatura ambiente, por 2 minutos cada e passada em bateria de etanol gelado (70, 85 e 100%) por 2 minutos cada banho. Depois de seca, sobre ela foram colocados 80µL do fluorocromo GC-específico cromomicina A₃ (CMA₃ 20µg/mL em 32mM Cl₂Mg). O material foi coberto com lamínula e a lâmina permaneceu em câmara escura na geladeira por cerca de 30 minutos. Seguiram-se três banhos de PBS 1x, à temperatura ambiente, por 2 minutos cada. Sem que ocorresse a secagem completa da lâmina, a lamínula foi montada com 30µL de *antifading*, preparado em solução do fluorocromo AT-específico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Depois de, no mínimo, 10 minutos de coloração, o excesso de líquido foi retirado da lâmina com papel-filtro e observada ao microscópio de fluorescência com uso de filtros adequados.

Diferenciação de bandas de replicação após incorporação de BrdU por coloração FPG (*Fluorochrome Plus Giemsa*)

A técnica de FPG foi realizada segundo Dutrillaux e Couturier (1981), com modificações baseadas em Matsuda e Chapman (1995). A lâmina foi imersa em solução de Hoechst 33258 (10µg/mL) durante 20 minutos, à temperatura ambiente, lavada em água destilada e passada, rapidamente, em solução de 2xSSC. Sobre o material, foram pingadas duas a três gotas de solução 2xSSC e coberto com lamínula. A lâmina foi aquecida em estufa a 65°C e exposta à luz negra por 6 minutos. A lamínula foi retirada, por meio de lavagens sucessivas com jatos de água e, em seguida, a lâmina incubada em solução de 2xSSC a 60°C, durante 15 minutos. Após a lavagem em água destilada, a lâmina foi corada em solução de Giemsa, a mesma utilizada para a coloração convencional, durante 7 minutos. Seguiu-se nova lavagem em água destilada e secagem à temperatura ambiente.

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr HM123

Para a detecção de regiões organizadoras de nucléolo, foi utilizada a sonda HM123, contendo fragmentos de DNAr (18S+28S) de *Xenopus laevis* (MEUNIER-ROTIVAL et al., 1979). A metodologia utilizada nas preparações cromossômicas de anfíbios anuros no Laboratório de Citogenética Animal do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, foi adaptada a partir da técnica descrita por Pinkel et al. (1986), com modificações.

A lâmina foi desidratada em série de etanol gelado (70, 90 e 100%) por cinco minutos cada e incubada em 100µL de RNase (0,4% RNase em 2xSSC) a 37° C por 1 hora em câmara úmida. Após passagem em três banhos de 5 minutos cada em 2xSSC, foi lavada durante 5 minutos em Triton 1x. A lâmina foi desidratada em série etanólica (70, 90 e 100%) e procedeu-se a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70% em 2xSSC a 70° C, por cerca de 2 minutos, seguida de desidratação em série etanólica gelada a - 20° C (70, 90 e 100%), por 5 minutos cada.

A solução de hibridação, contendo 3µL da sonda marcada com digoxigenina e 10µL do tampão de hibridação (Hybuffer), foi colocada em termociclador a 95° C por 10 minutos e, em seguida, foi pingada na área da lâmina previamente selecionada,

coberta com lamínula e mantida a 37° C em câmara úmida por aproximadamente 15 horas. Após esse período de hibridação, a lâmina foi enxaguada em 0,4xSSC + 0,3% Triton por exatos 2 minutos, em 2xSSC + 0,1% Triton por 2 minutos e, em seguida, foram colocados sobre a lâmina 30µL de tampão de bloqueio e o material coberto com lamínula. Após incubação da lâmina por 5 minutos à temperatura ambiente, foi feita uma breve lavagem em 2xSSC à temperatura ambiente.

Para a detecção da sonda, a lâmina foi incubada com 4µL de anti digoxigenina conjugada-rodamina e 26µL de tampão de bloqueio durante 1 hora em câmara escura, à temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem em 2xSSC a 43° C sob agitação e lavagens por duas vezes em 2xSSC + 0,1% Triton a 43° C, também, sob agitação, por 2 minutos cada. A montagem da lamínula foi feita com 15µL de *antifading* com DAPI.

Hibridação *in situ* fluorescente com uso da sonda telomérica (TTAGGG)_n

Para a identificação das regiões teloméricas pela técnica de FISH, foi empregado o kit K5325 “Telomere PNA FISH Kit/FITC” da marca DAKO, seguindo-se as instruções do fabricante.

A lâmina foi imersa em solução salina TBS, fornecida pelo kit, à temperatura ambiente por aproximadamente 2 minutos. Em seguida, foi incubada por 2 minutos em formaldeído a 3,7% em TBS, e lavada duas vezes em TBS por 5 minutos cada lavagem. A lâmina foi imersa na solução de pré-tratamento do kit, por 10 minutos, novamente lavada duas vezes em TBS por 5 minutos cada lavagem. A lâmina foi passada por uma série etanólica (70, 85 e 95%) e, então, seca ao ar. Pingou-se no material 10µL da sonda, que está associada à solução de hibridação, contendo formamida a 70%, em uma área da lâmina de 18x18mm, previamente selecionada, cobrindo-a, em seguida, por lamínula de mesma dimensão. A incubação da lâmina foi feita em estufa a 80° C por 5 minutos e, em seguida, deixada no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após esse período, a lamínula foi retirada por imersão em solução de enxágue que acompanha o kit e a lâmina passada em solução de lavagem, a 65° C por 5 minutos. Procedeu-se nova desidratação em série etanólica gelada (70, 85 e 95%), por 2 minutos em cada, e, em seguida, a lâmina foi seca ao ar por

aproximadamente 5 minutos. Para a montagem da lamínula, foi utilizado 15 mL de *antifading* com DAPI.

Análise cromossômica

As preparações cromossômicas foram analisadas ao microscópio de luz e as melhores metáfases, assim como as fases meióticas, foram documentadas utilizando-se microscópio BX51 da Olympus. Quando coradas com fluorocromos, as lâminas foram examinadas sob luz ultra-violeta e com uso de filtros específicos. A captura digital das imagens foi realizada com câmera DP71 acoplada a um microcomputador.

Para a montagem dos cariogramas, os cromossomos foram emparelhados de acordo com a morfologia e em ordem decrescente de tamanho, com base em inspeção visual. Para a classificação morfológica e o estabelecimento do número fundamental de braços cromossômicos (NF), foi adotada a nomenclatura de Green e Sessions (1991, 2007), segundo a qual os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos ou subtelocêntricos possuem dois braços e os telocêntricos, apenas um.

Tabela 1. Relação das espécies de *Leptodactylus* do presente trabalho e respectivos grupos (*sensu* HEYER, 1969), número, sexo, número de tombo, localidade e coordenadas.

Espécie	Número	Sexo	Nº de tombo	Localidade	Coordenadas
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (gr. de <i>L. pentadactylus</i>)	3	♂	CFBH23257	Rio Claro, SP	22° 24'S ; 47° 33'O
		♂	CFBH28553		
		♀	RJS1420	São Joaquim da Barra, SP	20° 34'S ; 47° 51'O
<i>Leptodactylus rhodomystax</i> (gr. de <i>L. pentadactylus</i>)	3	J	CFBH28565	Paranaíta, MT	9° 39'S ; 56° 28'O
		J	CFBH566		
		J	CFBH28567		
<i>Leptodactylus chaquensis</i> (gr. De <i>L. latrans</i>)	3	♂	CFBH28569	Três Lagoas, MS	20° 45'S ; 51° 40'O
		♂	CFBH28570		
		J	CFBH28611	Nossa Senhora do Livramento, MT	16° 14'S ; 56° 22'O
<i>Leptodactylus petersii</i> (gr. de <i>L. melanonotus</i>)	1	J	CFBH28614	Paranaíta, MT	9° 39'S ; 56° 28'O
<i>Leptodactylus cf. petersii</i> (gr. de <i>L. melanonotus</i>)	1	♂	CFBH28645	Serra do Navio, AP	00° 53'N ; 52° 00' O
<i>Leptodactylus podicipinus</i> (gr. de <i>L. melanonotus</i>)	9	♀	CFBH28622	Cáceres, MT	16° 04'S ; 57° 40'O
		♀	CFBH28623		
		♀	CFBH28624		
		J	CFBH28625		
		J	CFBH28626		
		♂	CFBH28644	Gurinhata, MG	19° 12'S ; 49° 46'O
		♂	CFBH28605	Nossa Senhora do Livramento, MT	16° 14'S ; 56° 22'O
<i>Leptodactylus aff. podicipinus</i> (gr. de <i>L. melanonotus</i>)	6	J	CFBH28606		
		J	CFBH28607		
		♂	CFBH28597	Lucas do Rio Verde, MT	13° 03'S ; 55° 54'O
		♂	CFBH28598		
		♂	CFBH28599		
		♂	CFBH28600		
<i>Leptodactylus pentadactylus</i> (gr. de <i>L. pentadactylus</i>)	1	♂	CFBH28601		
		♀	CFBH28602		
		♂	CFBH28618	Paranaíta, MT	9° 39'S ; 56° 28'O

J: Indivíduo jovem

CFBH: Coleção Célio Fernando Baptista Haddad, UNESP, Rio Claro, SP

RJS: Coleção pessoal de Ricardo Jannini Sawaya



Figura 1. Exemplos de *Leptodactylus*. (a) *L. labyrinthicus* (crc 15cm), (b) *L. rhodomystax* (crc 7cm), (c) *L. chaquensis* (crc 7cm), (d) *L. petersii* (crc 3,5cm), (e) *L. podicipinus* (crc 3,5cm), (f) *Leptodactylus* aff. *podicipinus*, (g) *Leptodactylus pentadactylus* (crc 12cm). crc=comprimento rostró-cloacal médio. Fotos cedidas por: Célio F.B. Haddad (a), Olívia Gabriela dos Santos Araújo (b, d, g) e Christine Strüssmann (c, e, f).

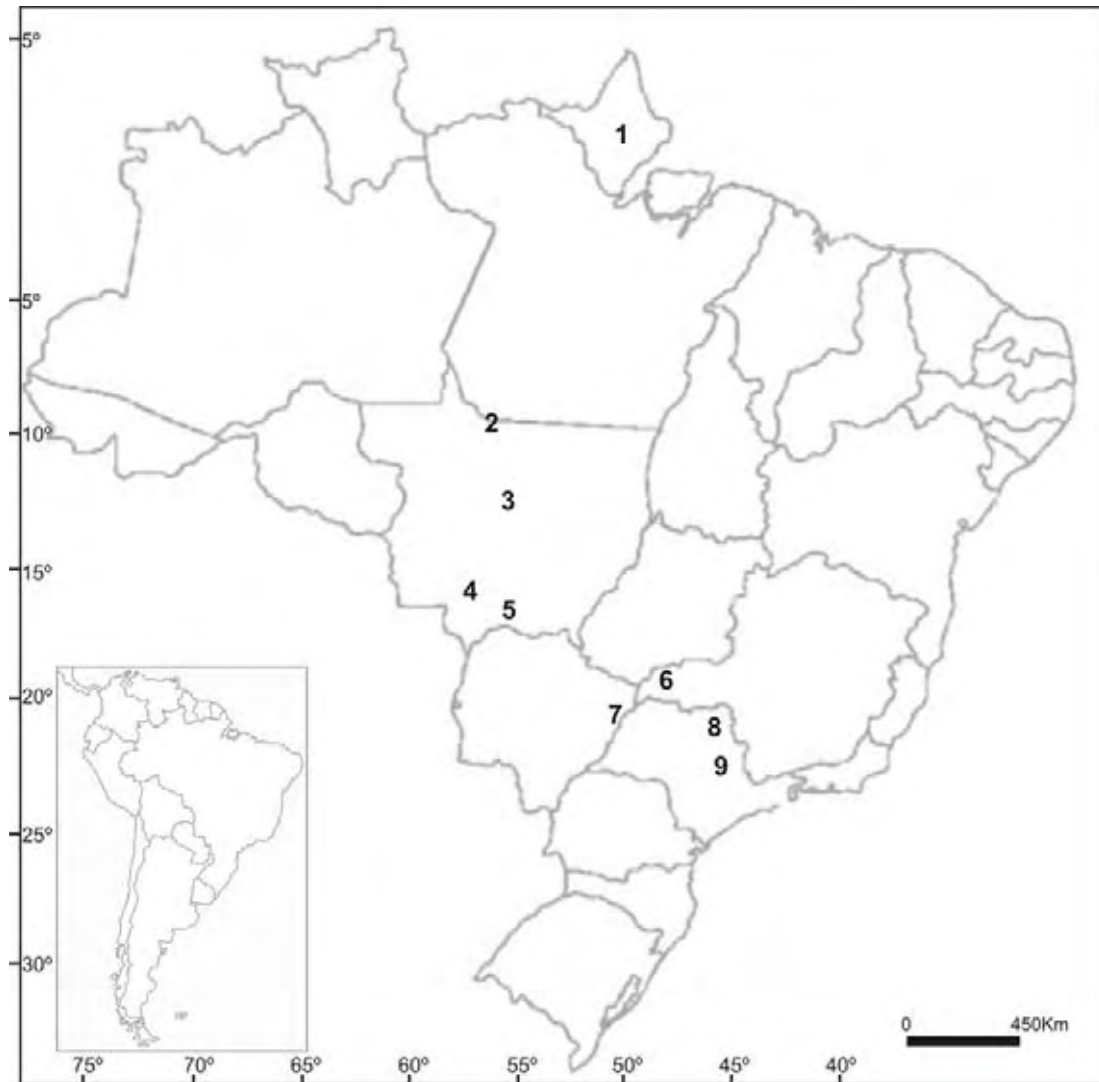


Figura 2. Mapa do Brasil situando as localidades de coleta dos exemplares de *Leptodactylus*, nos estados de Amapá (AP), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP). 1. Serra do Navio, AP; 2. Paranaíta, MT; 3. Lucas do Rio Verde, MT; 4. Cáceres, MT; 5. Nossa Senhora do Livramento, MT; 6. Gurinhata, MG; 7. Três Lagoas, MS; 8. São Joaquim da Barra, SP; 9. Rio Claro, SP.

IV. Resultados

Constituição Cariotípica

Os exemplares de *Leptodactylus labyrinthicus*, *L. rhodomystax* e *L. chaquensis*, de todas as localidades amostradas, possuem cariótipo com $2n=22$ e $NF=44$ (Fig. 3). Nessas espécies, o primeiro par cromossômico é grande e do tipo metacêntrico; os pares 2 a 7 são grandes e médios, diminuindo gradativamente de tamanho, sendo os pares 2, 3 e 7 submetacêntricos, o par 4 subtelocêntrico, enquanto os pares 5 e 6 metacêntricos; os pares 8 a 11 são pequenos, com diminuição gradual de tamanho, sendo dos tipos metacêntrico ou submetacêntrico. Constrições secundárias foram observadas em algumas metáfases, com localização nos cromossomos do par 8 em *L. labyrinthicus*, nos pares 3 e 8 em *L. rhodomystax* e nos pares 5 e 8 em *L. chaquensis* (Fig. 3, Fig. 6a).

Leptodactylus petersii e *Leptodactylus* cf. *petersii* apresentaram, também, $2n=22$ e $NF=44$ (Fig. 4a, Fig. 4b) e constituição cariotípica semelhante à descrita para as três primeiras espécies, quanto ao tamanho e morfologia dos cromossomos, exceto em relação aos pares 5 e 7 que são, respectivamente, dos tipos submetacêntrico e metacêntrico. Os cromossomos do par 4 de ambas as espécies mostraram constrição secundária na região proximal dos braços longos.

Os exemplares de *L. podicipinus* das três localidades amostradas possuem $2n=22$, porém, $NF=36$ (Fig. 4c), sendo os pares 7, 9, 10 e 11 do tipo telocêntrico. Os demais cromossomos são equivalentes em tamanho e morfologia aos observados em *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax* e *L. chaquensis*. Constrição secundária foi observada na região proximal dos braços longos dos cromossomos do par 8.

O cariótipo encontrado nos exemplares de *Leptodactylus* aff. *podicipinus* tinha $2n=20$ e $NF=40$ (Fig. 4d). O par 1 é constituído por cromossomos metacêntricos grandes, enquanto os pares 2 a 8 são grandes e médios, variando gradativamente de tamanho, sendo os pares 2 e 3 do tipo submetacêntrico, os pares 4 e 5 subtelocêntricos e os pares 6, 7 e 8 metacêntricos; e os pares 9 e 10 são pequenos e do tipo metacêntrico ou submetacêntrico. Constrição secundária foi observada na região proximal dos braços longos dos cromossomos do par 4.

O único exemplar de *L. pentadactylus* possui $2n=22$ e $NF=44$ (Fig. 5). O espécime apresentou constituição cariotípica na qual foram reconhecidos apenas os

pares 1, 2, 6, 7 e 8. Os cromossomos 3, 4, 5, 9, 10 e 11 são ímpares, assim como seis outros, designados como **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f**. Os cromossomos de 1 a 11 possuem tamanho e morfologia equivalentes aos dos pares 1 a 11 das espécies *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax* e *L. chaquensis*. O cromossomo **a** é um subteloentríco grande, o **b**, um submetacêntrico grande, o **c**, um submetacêntrico pequeno, enquanto **d**, **e** e **f** são pequenos e dos tipos metacêntrico ou submetacêntrico. Em algumas metáfases, os cromossomos **a** e **b** exibiram uma região com heteropícnose negativa, nos braços longos, a qual aparece com o aspecto de uma constrição, como pode ser visto no cromossomo **a** da Fig. 5.

Análise meiótica

Foram analisadas preparações citológicas de testículos de machos de *L. labyrinthicus*, *L. chaquensis*, *L. cf. petersii*, *L. podicipinus*, *L. aff. podicipinus* e *L. pentadactylus*. Os exemplares de *L. rhodomystax* e *L. petersii* são jovens, não permitindo a análise meiótica nas referidas espécies, já que nenhuma gônada pôde ser identificada.

Em quatro espécies, isto é, *L. labyrinthicus*, *L. chaquensis*, *L. cf. petersii* e *L. podicipinus*, a análise das células em diplóteno/diacinese e metáfase I mostrou 11 bivalentes e em metáfase II, 11 cromossomos (Fig. 7a, Fig. 7b, Fig. 7c, Fig. 7d, Fig. 7e). *Leptodactylus aff. podicipinus* apresentou, respectivamente, 10 bivalentes e 10 cromossomos, nessas fases meióticas (Fig. 7f). As células de *L. pentadactylus* em diplóteno/diacinese e metáfase I apresentaram 5 bivalentes, presumivelmente, correspondentes aos pares 1, 2, 6, 7 e 8, e cadeia com 12 cromossomos, correspondendo aos elementos ímpares 3, 4, 5, 9, 10, 11, e aqueles designados como **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** (Fig. 8a, Fig. 8b). Em metáfase II, foram observados 11 cromossomos, porém, apresentando constituições distintas (Fig. 8c). As duas células da referida figura são, presumivelmente, resultantes da segregação de uma mesma célula em metáfase I.

Ag-RON

A impregnação pelo nitrato de prata ocorreu na região terminal dos braços curtos dos cromossomos do par 8 em *L. labyrinthicus*, *L. chaquensis* e *L.*

pentadactylus (Fig. 3a, Fig. 3c, Fig. 5); na região proximal dos braços longos dos cromossomos 8 de *L. podicipinus* (Fig. 4c); na região terminal dos braços longos dos cromossomos do par 3 de *L. rhodomystax* (Fig. 3b, Fig. 6b); e na região proximal dos braços longos dos cromossomos 4 de *L. petersii* (Fig. 4a), *L. cf. petersii* (Fig. 4b) e *L. aff. podicipinus* (Fig. 4d). Diferenças pequenas no tamanho da Ag-RON foram observadas, esporadicamente, nas metáfases dos animais, tendo sido notado um heteromorfismo mais acentuado em *L. aff. podicipinus*, com aparente duplicação da marcação de tamanho maior.

As constrições secundárias observadas nos cromossomos do par 8 em *L. rhodomystax* (Fig. 3b, Fig. 6) e nos cromossomos do par 5 de *L. chaquensis* (Fig. 3c) não foram impregnadas pelo nitrato de prata.

Bandamento C

O padrão de distribuição de heterocromatina é, predominantemente, do tipo centromérico/pericentromérico em *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax*, *L. chaquensis*, *L. cf. petersii*, *L. podicipinus* e *L. aff. podicipinus* (Fig. 9, Fig. 10). De *L. petersii*, não foi obtido bandamento C e da espécie *L. pentadactylus*, na qual a técnica foi aplicada em preparação citológica de testículo, foi evidenciado, também, padrão centromérico/pericentromérico nos cromossomos, como mostra a metáfase espermatogonial e a metáfase I (Fig. 11). Fato compartilhado por, praticamente, todas as espécies da amostra é a marcação C positiva nos sítios das Ag-RON, muito intensa no caso de *L. cf. petersii*, *L. podicipinus* e *L. aff. podicipinus* (Fig. 10a, Fig. 10b, Fig. 10c).

Bandas terminais e intersticiais em alguns dos cromossomos de todas as espécies foram, também, visualizadas, mas o padrão é de difícil caracterização, por serem as marcações nem sempre conspícuas, como as bandas C centroméricas, e nem sempre observadas em todas as metáfases. Algumas delas, no entanto, podem ser destacadas, como na região terminal dos braços longos ou curtos dos cromossomos 1 em *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax*, *L. cf. petersii*, *L. podicipinus* e *L. aff. podicipinus*. Na primeira espécie dessa lista, os cromossomos 2 têm uma leve banda C na região distal dos braços longos, enquanto os elementos do par 7, na região intersticial dos braços longos (Fig. 7a).

Em *L. rhodomystax*, foi observada marcação intersticial heteromórfica nos braços curtos dos cromossomos do par 2, em que um dos homólogos possui banda C vestigial (Fig. 9b). Nessa espécie, ocorre, também, banda C intersticial nos braços curtos dos cromossomos 3, nas regiões terminais, tanto dos braços curtos como longos, dos cromossomos 4, nas regiões terminal dos braços longos dos cromossomos 7 e terminal dos braços curtos dos cromossomos 10. Os cromossomos do par 8 da espécie mostraram blocos relativamente grandes de banda C na região proximal dos braços curtos.

Leptodactylus chaquensis apresentou marcações de bandas C intersticiais nos braços curtos dos cromossomos dos pares 4, 5 e 7 (Fig. 9c), sendo bem nítidas nos cromossomos 4 e 7 de outra metáfase, em destaque na referida figura. Os cromossomos pequenos dos pares 9 a 10 mostraram, com frequência, marcações nas regiões terminais dos braços curtos e longos.

Vários cromossomos de *Leptodactylus* cf. *petersii* apresentaram marcações terminais, como aquelas presentes nos braços longos dos cromossomos 1, 3, 4 e 7, bem como nos braços curtos e longos dos cromossomos 5 e 6. Já *L. podicipinus* apresentou marcações adicionais na região terminal dos braços longos dos cromossomos 3, 4, 11 e dos braços curtos dos homólogos do par 6 (Fig. 10b). Um dos exemplares (A1246 de Nossa Senhora do Livramento, MT) mostrou heteromorfismo de banda C nos braços longos dos cromossomos 8 e dos cromossomos 11, com um dos homólogos mostrando marcação distal, porém, intersticial, enquanto o outro, tem marcação terminal, como se nota no destaque da Fig. 10b.

Coloração com fluorocromos base-específicos

A dupla coloração CMA₃/DAPI dos cromossomos foi obtida na maioria das espécies, (Fig. 12, Fig. 13) exceto para *Leptodactylus* cf. *petersii*. *Leptodactylus labyrinthicus* apresentou marcação brilhante por CMA₃ somente no sítio da Ag-RON (Fig. 12a), enquanto a coloração com DAPI não discriminou nenhuma região, particularmente, fluorescente, tendo corado os cromossomos de maneira homogênea. *L. rhodomystax* apresentou, também, sítio da Ag-RON brilhante com CMA₃, assim como, na região intersticial dos braços curtos dos cromossomos 2, 3 e de outros cromossomos grandes ou médios não identificados, e na região terminal

dos braços curtos dos cromossomos pequenos de 8 a 11 (Fig. 12b). Com DAPI, somente sítios com vestígios de fluorescência foram notados nas regiões intersticiais dos braços curtos dos cromossomos 2 e 3 (Fig. 12d). O sítio da Ag-RON de *L. chaquensis* mostrou-se brilhante pelo CMA₃ (Fig. 12c) e pelo DAPI foram observadas metáfases com marcações centroméricas brilhantes em alguns cromossomos (Fig. 12f), porém, não visualizadas em outras (Fig. 12e).

As regiões centroméricas e terminais de alguns cromossomos e o sítio da Ag-RON de *L. petersii* mostraram-se brilhantes pelo CMA₃ (Fig. 13a). A coloração DAPI não evidenciou nenhuma região fluorescente. *L. podicipinus* apresentou fluorescência brilhante nos centrômeros de todos os cromossomos telocêntricos e na Ag-RON (Fig. 13b), enquanto nenhuma região brilhante foi observada pelo DAPI (Fig. 13d). Com esse fluorocromo, a Ag-RON, as regiões centroméricas de todos os telocêntricos e as intersticiais do 9, 10 e distal do 11 apareceram como sítios marcadamente negativos. *Leptodactylus* aff. *podicipinus* mostrou somente a Ag-RON brilhante pelo CMA₃, enquanto pelo DAPI notou-se fluorescência em um sítio adjacente, porém, distal à Ag-RON (Fig. 13c, no detalhe). *L. pentadactylus* apresentou o sítio da Ag-RON e regiões centromérica, intersticial e terminal de alguns cromossomos, principalmente, pequenos, fluorescentes pelo CMA₃ (Fig. 13e). Embora a coloração DAPI tivesse sido homogênea, sem nenhuma região brilhante, as metáfases submetidas à técnica do FISH com sonda telomérica exibiram, com esse fluorocromo, fluorescência na região centromérica, principalmente, dos cromossomos pequenos (Fig. 13f).

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda ribossômica e sonda telomérica

A técnica de FISH com sonda HM123 revelou hibridação nos sítios correspondentes aos das Ag-RON em todas as espécies de *Leptodactylus* da amostra (Fig. 14, Fig. 15). A técnica não mostrou sinal de hibridação na constrição secundária dos cromossomos 8 de *L. rhodomystax*, nem na dos cromossomos 5 de *L. chaquensis*.

A técnica de FISH com sonda telomérica não foi empregada apenas no material de *L. cf. petersii*. Nas espécies *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax*, *L. chaquensis*, *L. petersii*, *L. aff. podicipinus*, as marcações estavam restritas às

regiões teloméricas dos cromossomos (Fig. 16a, Fig. 16b, Fig. 16c, Fig. 16d, Fig. 17c). Do exemplar *L. pentadactylus*, foram obtidos resultados de FISH em células meióticas (Fig. 17d, Fig. 17e, Fig. 17f). Nos cromossomos em diplóteno/diacinese ou metáfase I, sinais de hibridação foram visualizados, muito provavelmente, apenas nos telômeros, assim como em paquíteno, fase na qual os cromossomos apresentaram configuração em buquê e polarização dos sinais de hibridação das regiões teloméricas. Dois exemplares de *L. podicipinus*, um de Gurinhatã, MG (A665) e um de Nossa Senhora do Livramento, MT (A1248) apresentaram, além das marcações teloméricas, sinais de hibridação nas regiões centroméricas dos cromossomos dos pares 1 e 2, e de alguns outros cromossomos grandes e médios, ainda que, muitas vezes, os sinais não fossem muito fluorescentes (Fig. 17a, Fig. 17b).

Bandas de replicação

A técnica de FPG permitiu a obtenção de bandas de replicação nos cromossomos de todas as espécies (Fig. 18, Fig. 19, Fig. 20), possibilitando a identificação mais precisa dos pares de homólogos. Foi possível, também, uma comparação preliminar dos cromossomos das oito espécies, como se pode observar na montagem da Fig. 21, tendo sido constatada correspondência nos padrões da maioria dos cromossomos. Não foi reconhecida identidade nas bandas de replicação dos cromossomos 5 e 8 de *Leptodactylus aff. podicipinus*, com o padrão de nenhum outro elemento das espécies aqui estudadas. Tampouco, em *Leptodactylus aff. podicipinus* não ocorre elemento correspondente ao cromossomo 11 das demais espécies. No destaque dessa figura, foram comparados os cromossomos telocêntricos 7, 9, 10 e 11 de *L. podicipinus* e os correspondentes cromossomos submetacêntricos ou metacêntricos em *L. labyrinthicus*. A diferença na morfologia dos três primeiros cromossomos é compatível com um rearranjo do tipo inversão pericêntrica, enquanto em relação ao 11^o, o mecanismo responsável pela alteração estrutural não é claro.

Os padrões de bandas de replicação em *L. pentadactylus* confirmaram, em certa extensão, as translocações presumidas para explicar os cromossomos ímpares e a ocorrência da cadeia de 12 cromossomos (Fig. 22). Apenas o cromossomo **a**, que corresponde majoritariamente ao 4, deve ter recebido segmentos de dois

elementos distintos, isto é, o 3 e o 5. Já os demais, isto é, o **b**, **c**, **d**, **e** e **f**, que têm, respectivamente, homologia com os cromossomos 3, 5, 9, 10 e 11, receberam apenas um segmento, translocado em um dos braços.

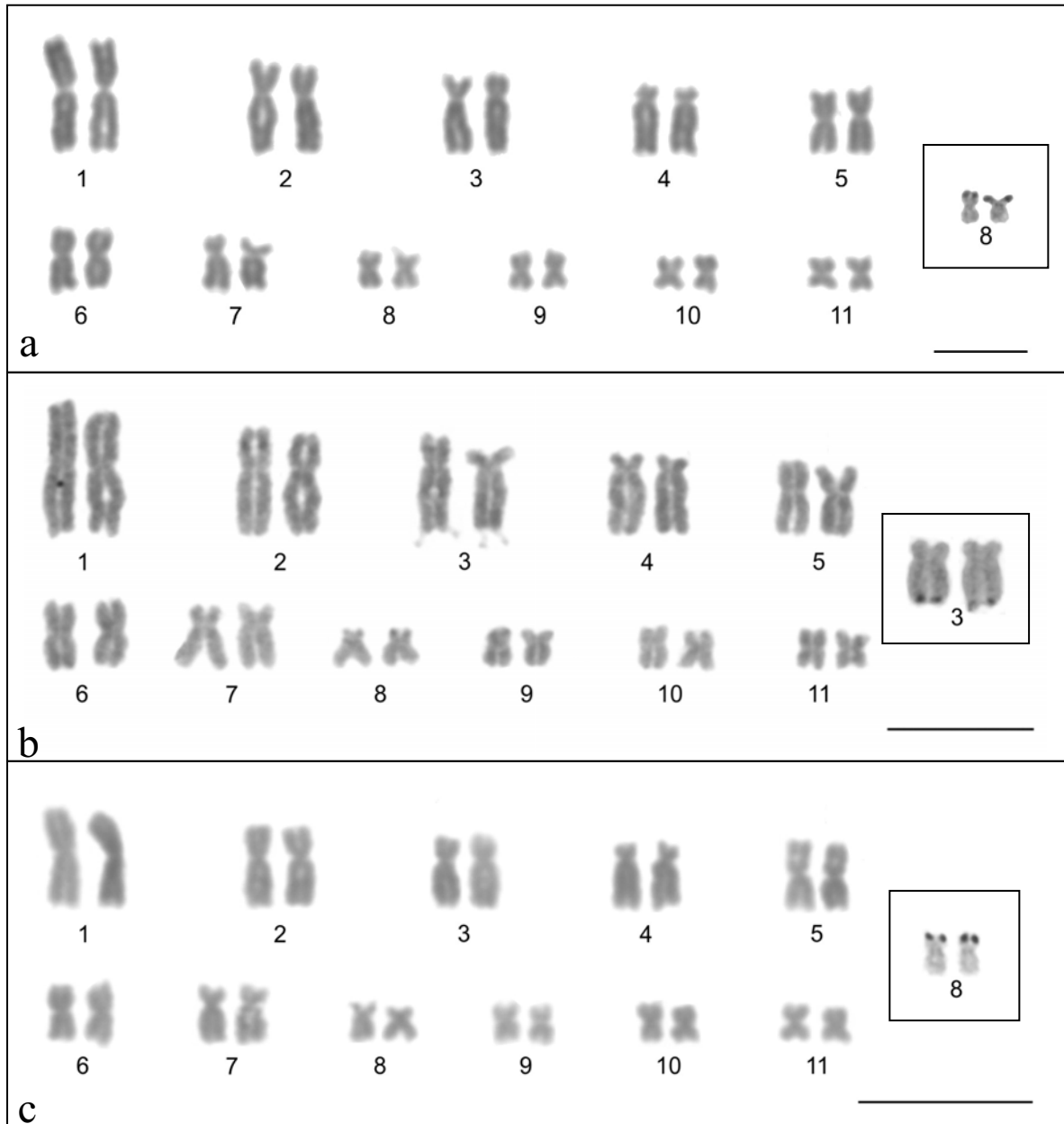


Figura 3. Cariogramas em coloração convencional ($2n=22$) e cromossomos portadores de Ag-RON nos destaques de *Leptodactylus labyrinthicus* (a), *L. rhodomystax* (b) e *L. chaquensis* (c). Constrição secundária em cromossomos 8 em (a), 3 e 8 em (b) e 5 em (c). Barra= $10\mu\text{m}$

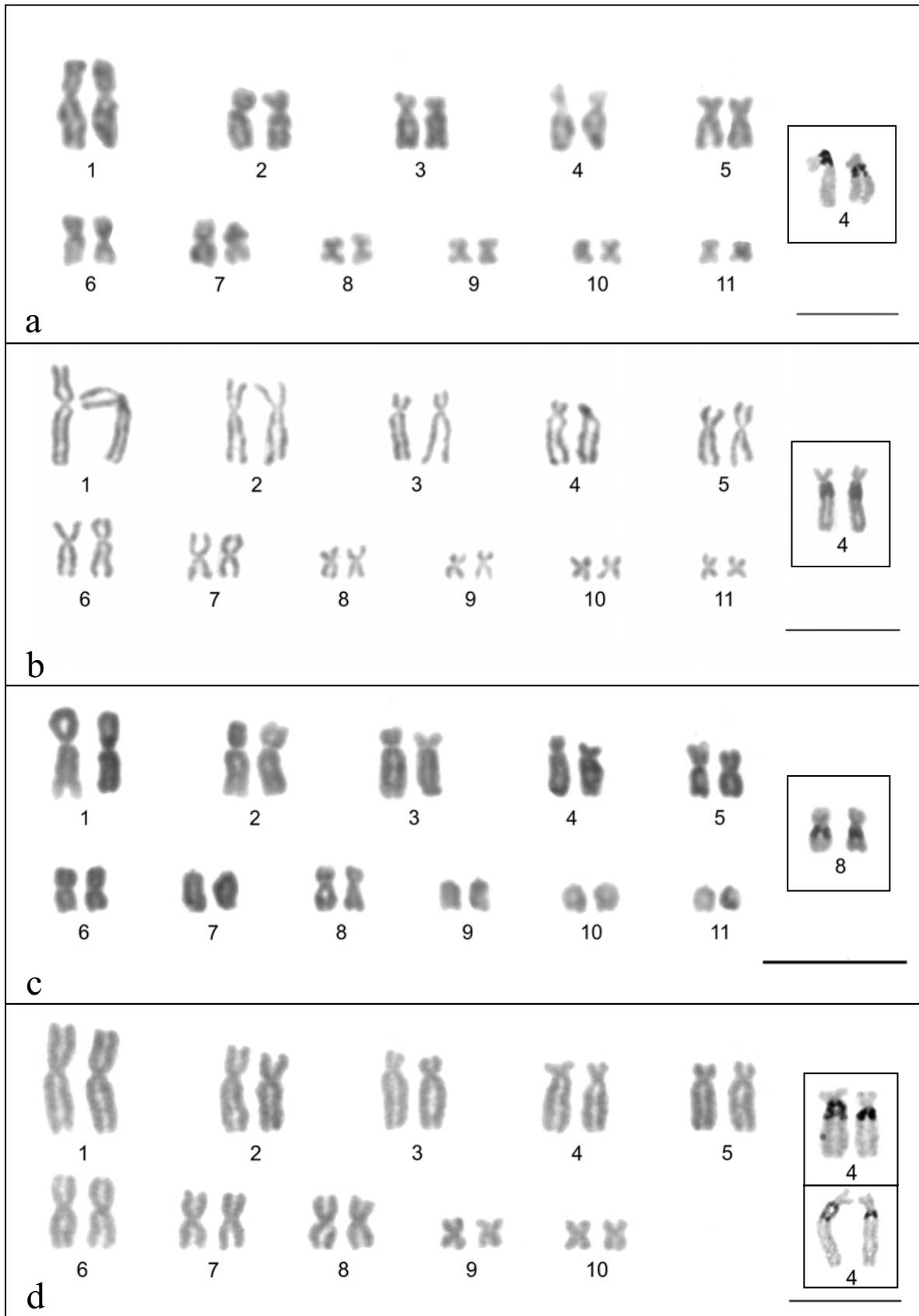


Figura 4. Cariogramas em coloração convencional ($2n=22$ em a-c e $2n=20$ em d) e cromossomos portadores de Ag-RON nos destaques de *Leptodactylus petersii* (a), *Leptodactylus* cf. *petersii* (b), *L. podicipinus* (c) e *Leptodactylus* aff. *podicipinus* (d). Constrição secundária em cromossomos 4 em (a), (b) e (d) e 8 em (c). Barra=10μm

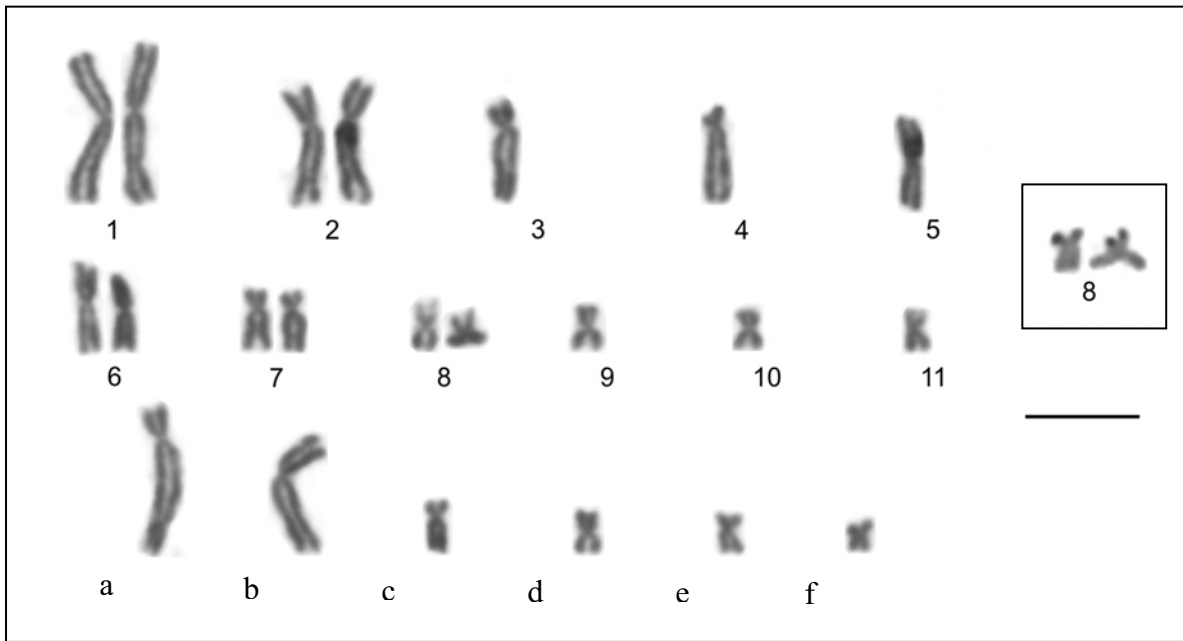


Figura 5. Cariograma em coloração convencional ($2n=22$) e cromossomos portadores de Ag-RON no destaque de *Leptodactylus pentadactylus*. Notar cromossomos ímpares 3, 4, 5, 9, 10, 11 e cromossomos não identificados a, b, c, d, e, f. Constrição secundária em cromossomos 8. Barra= $10\mu\text{m}$

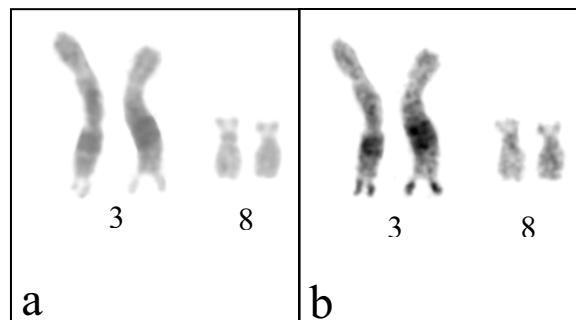


Figura 6. Cromossomos 3 e 8 de *Leptodactylus rhodomystax* com coloração convencional (a) e os mesmos pares com marcação de Ag-RON (b). Barra= $10\mu\text{m}$

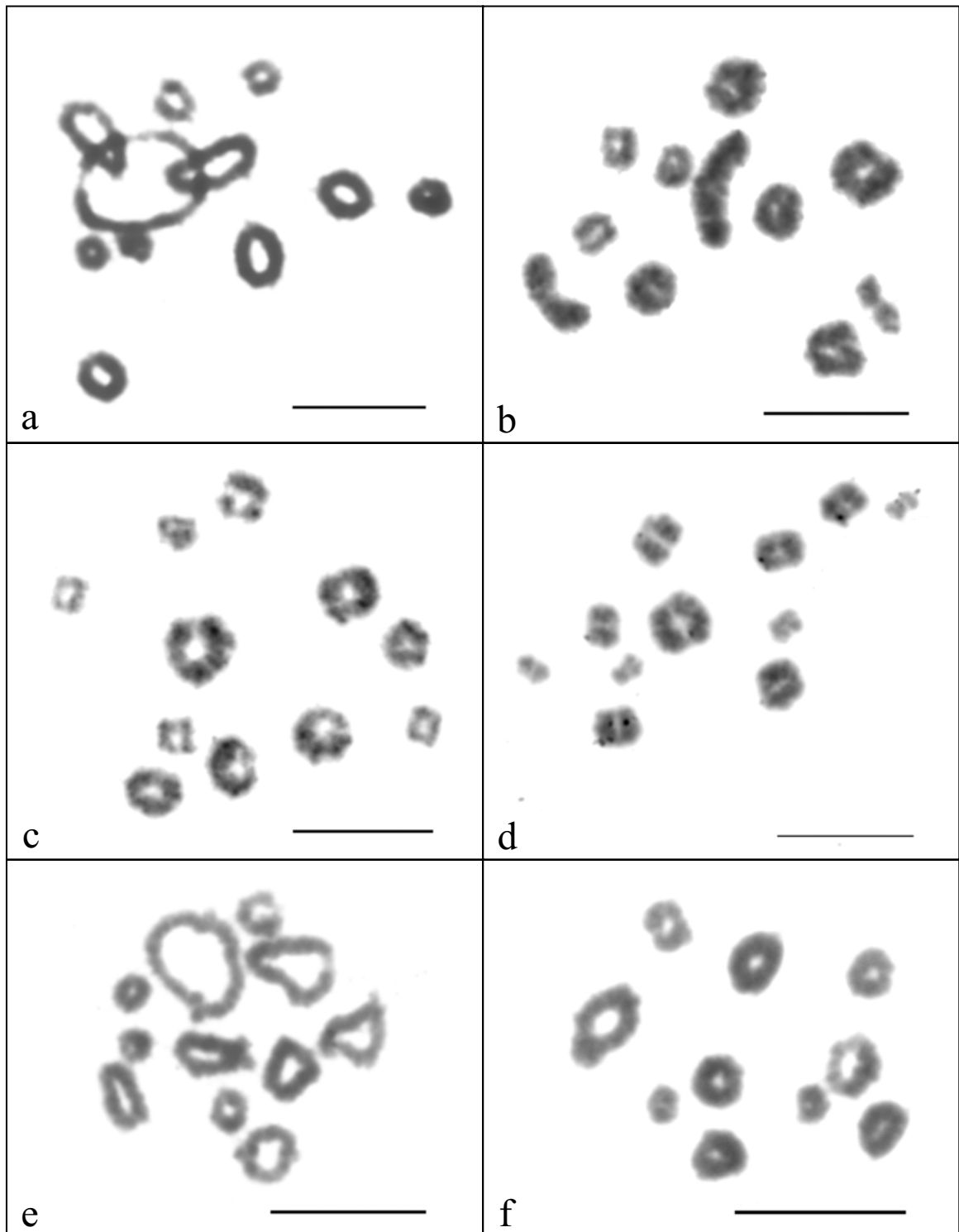


Figura 7. Células meióticas em diplóteno/diacinese ou metáfase I com coloração convencional com 11 bivalentes de *Leptodactylus labyrinthicus* (a), *L. chaquensis* (b, c), *Leptodactylus cf. petersii* (d) *L. podicipinus* (e) e *Leptodactylus aff. podicipinus* (f). Barra=10 μ m

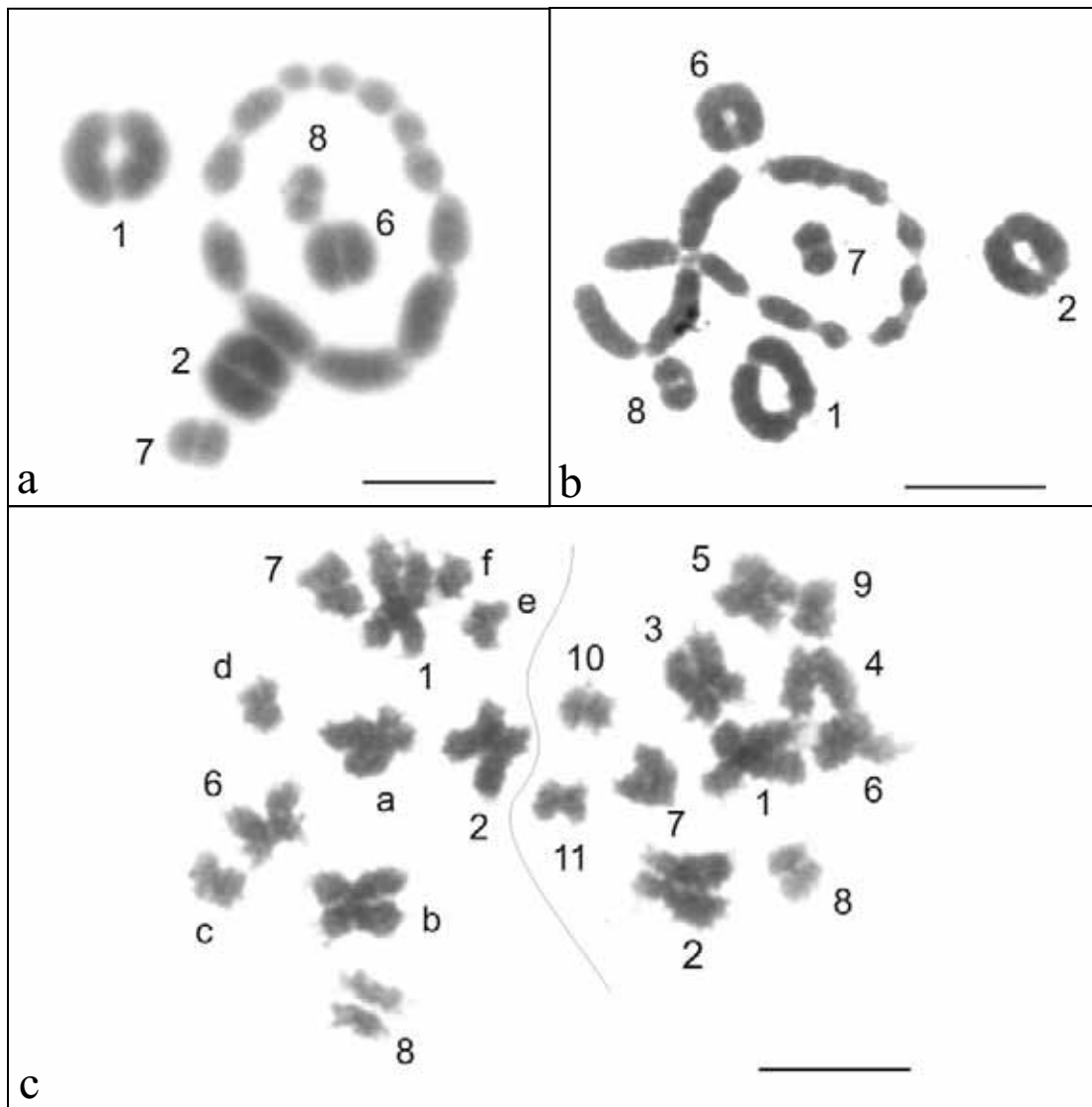


Figura 8. Células meióticas em metáfase I (a,b) e em metáfase II (c) de *Leptodactylus pentadactylus*. Notar cinco bivalentes (1, 2, 6, 7 e 8) e cadeia com 12 cromossomos (a, b) e 11 cromossomos nas duas células em (c), presumivelmente, resultantes da segregação de uma mesma célula em MI. Constrição secundária no bivalente 8 em (a). Barra=10 μ m

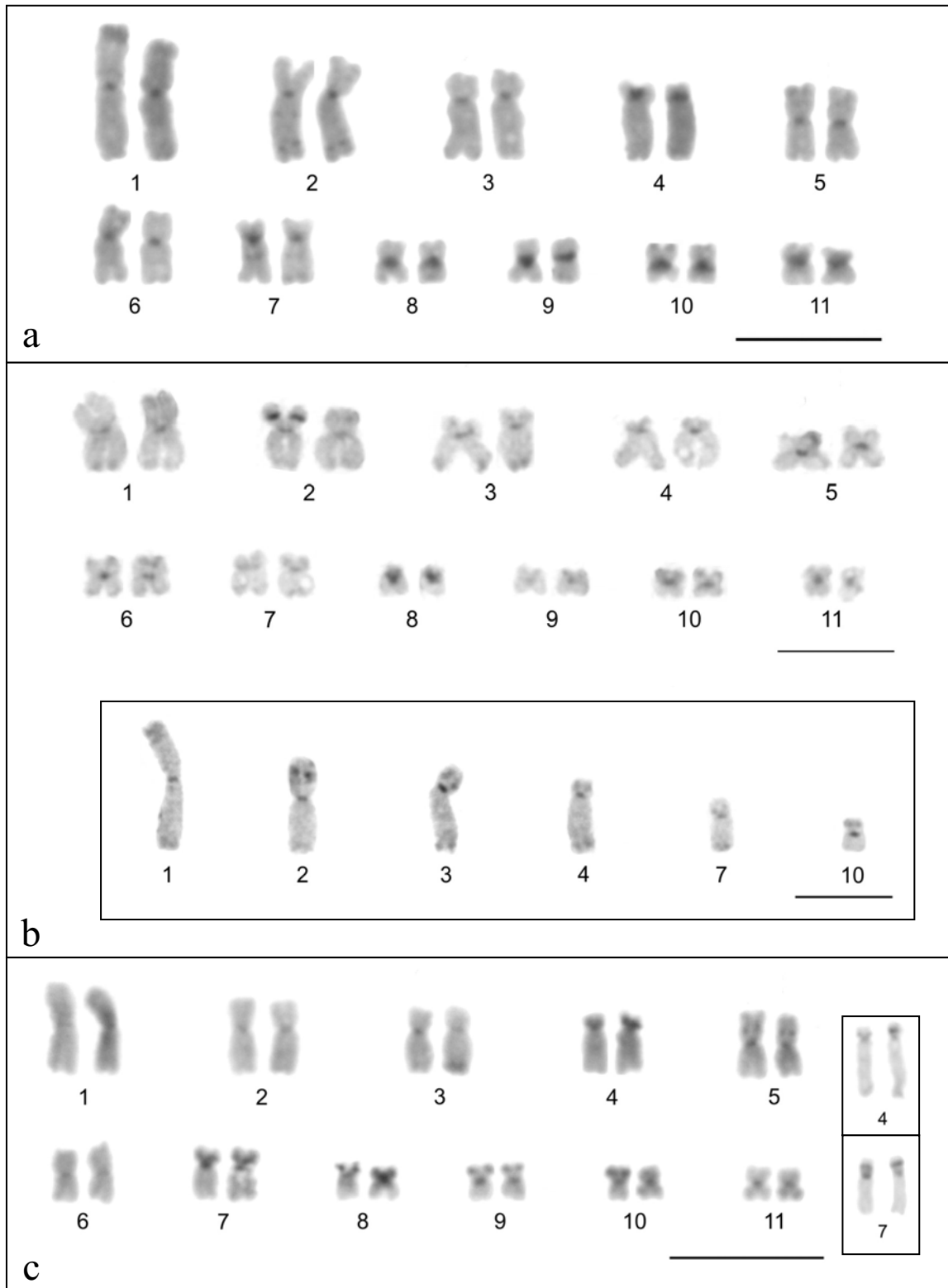


Figura 9. Cariogramas com bandas C de *Leptodactylus labyrinthicus* (a), *L. rhodomystax* (b) e *L. chaquensis* (c). Nos destaques em (b) e (c), cromossomos de outras metáfases de *L. rhodomystax* e *L. chaquensis*, respectivamente. No cariograma em (b), par 2 heteromórfico quanto a banda C intersticial nos braços curtos. Barra=10µm

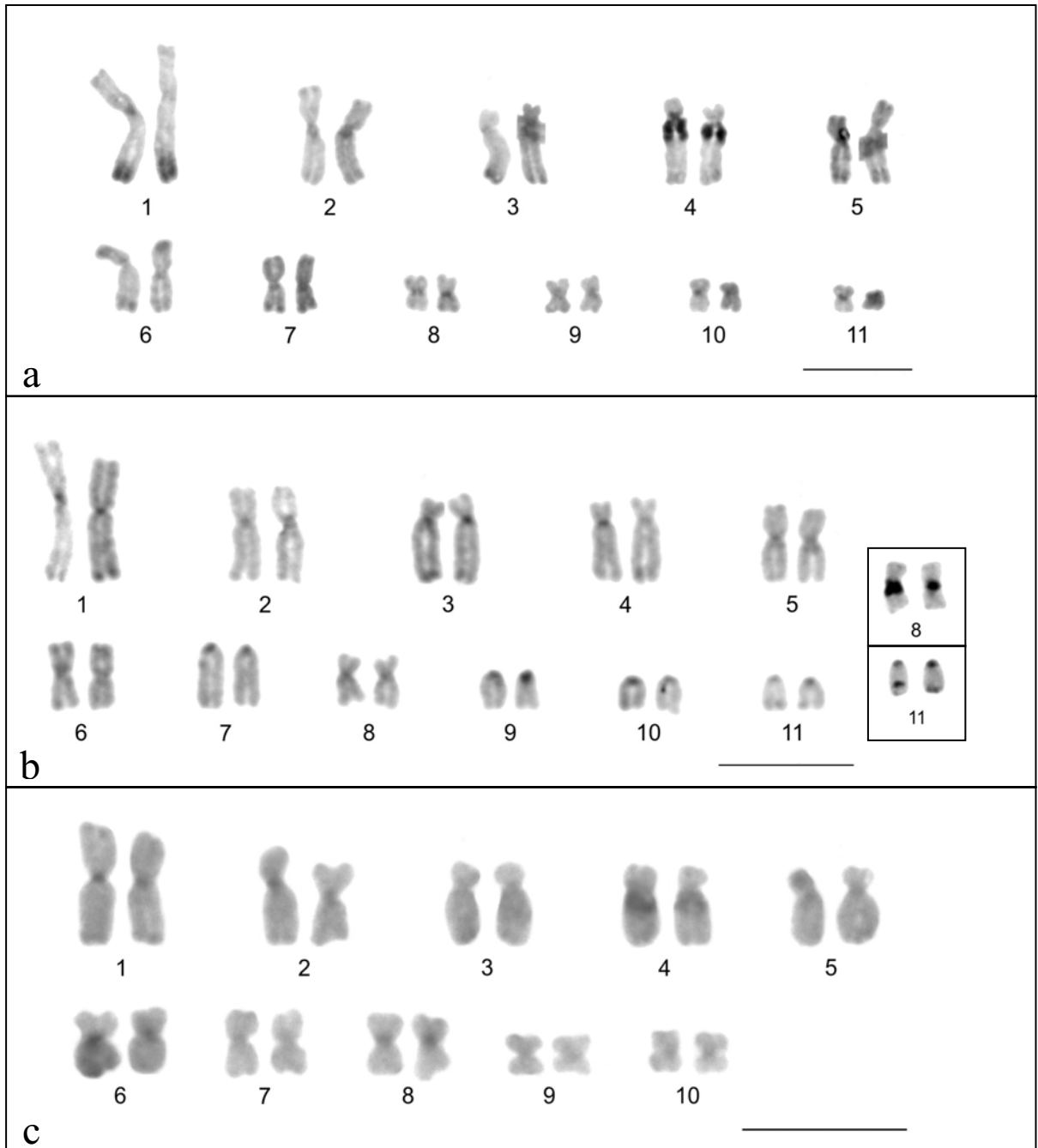


Figura 10. Cariogramas (a, b, c) e cromossomos no destaque (b) com bandas C de *Leptodactylus cf. petersii* (a), *L. podicipinus* (b) e *Leptodactylus aff. podicipinus* (c). No destaque em (b), cromossomos 8 e 11 de *L. podicipinus* de Nossa Senhora do Livramento, MT, mostrando heteromorfismo de banda C. Barra=10 μ m

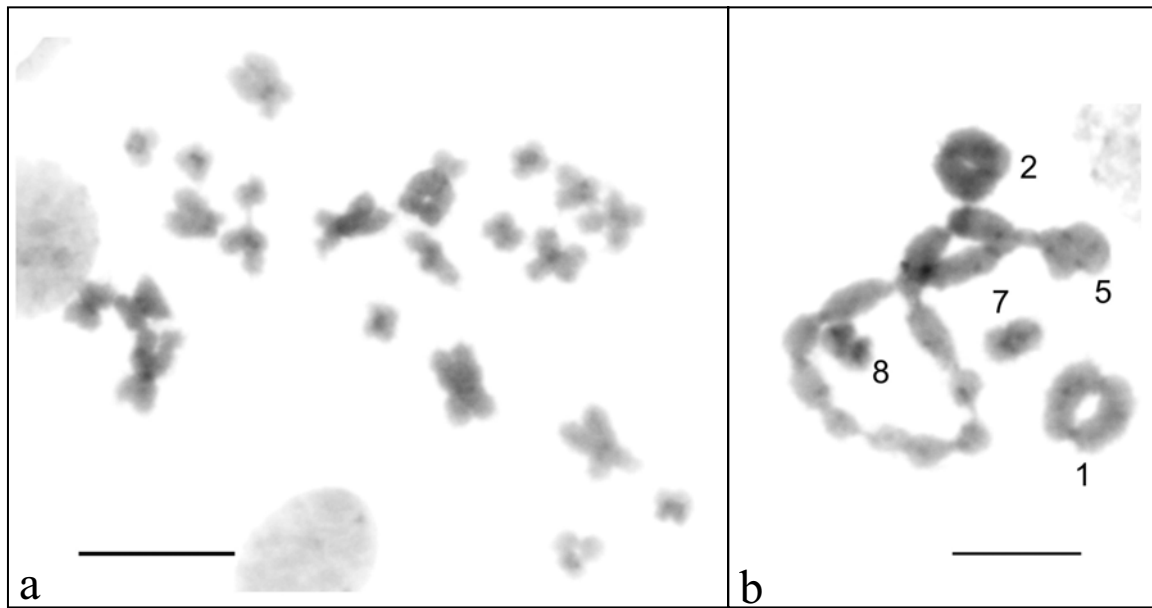


Figura 11. Células mitótica espermatogonial (a) e em metáfase I (b) com bandas C de *Leptodactylus pentadactylus*. Barra=10 μ m

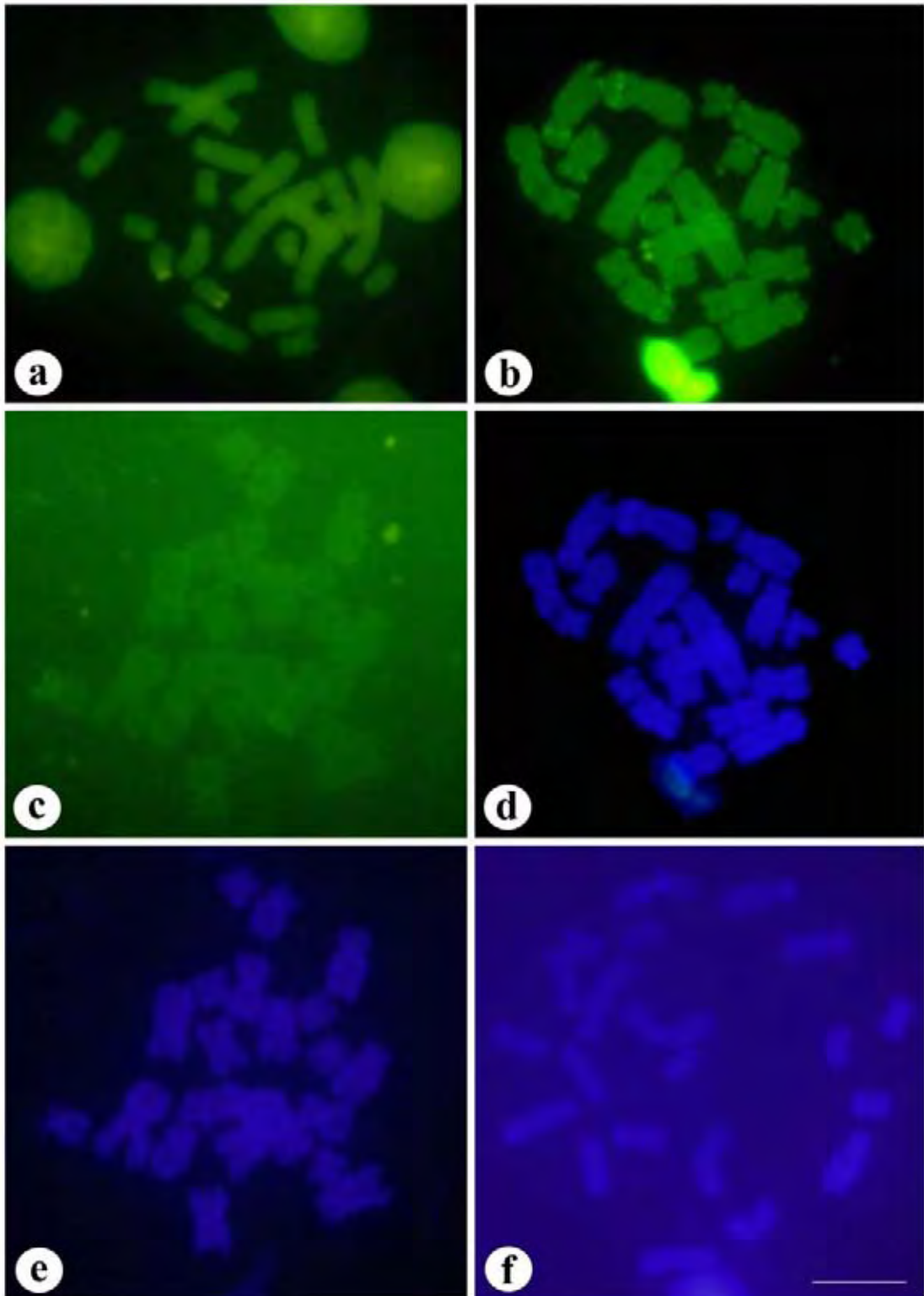


Figura 12. Células em metáfase com coloração pelo CMA₃ (a-c) e DAPI (d-f) de *Leptodactylus labyrinthicus* (a), *L. rhodomystax* (b, d) e *L. chaquensis* (c, e, f). O sítio da Ag-RON é CMA₃+ (a-c), assim como outras regiões cromossômicas em (b). Com DAPI, há marcações brilhantes em alguns cromossomos (d, f). Barra=10µm.

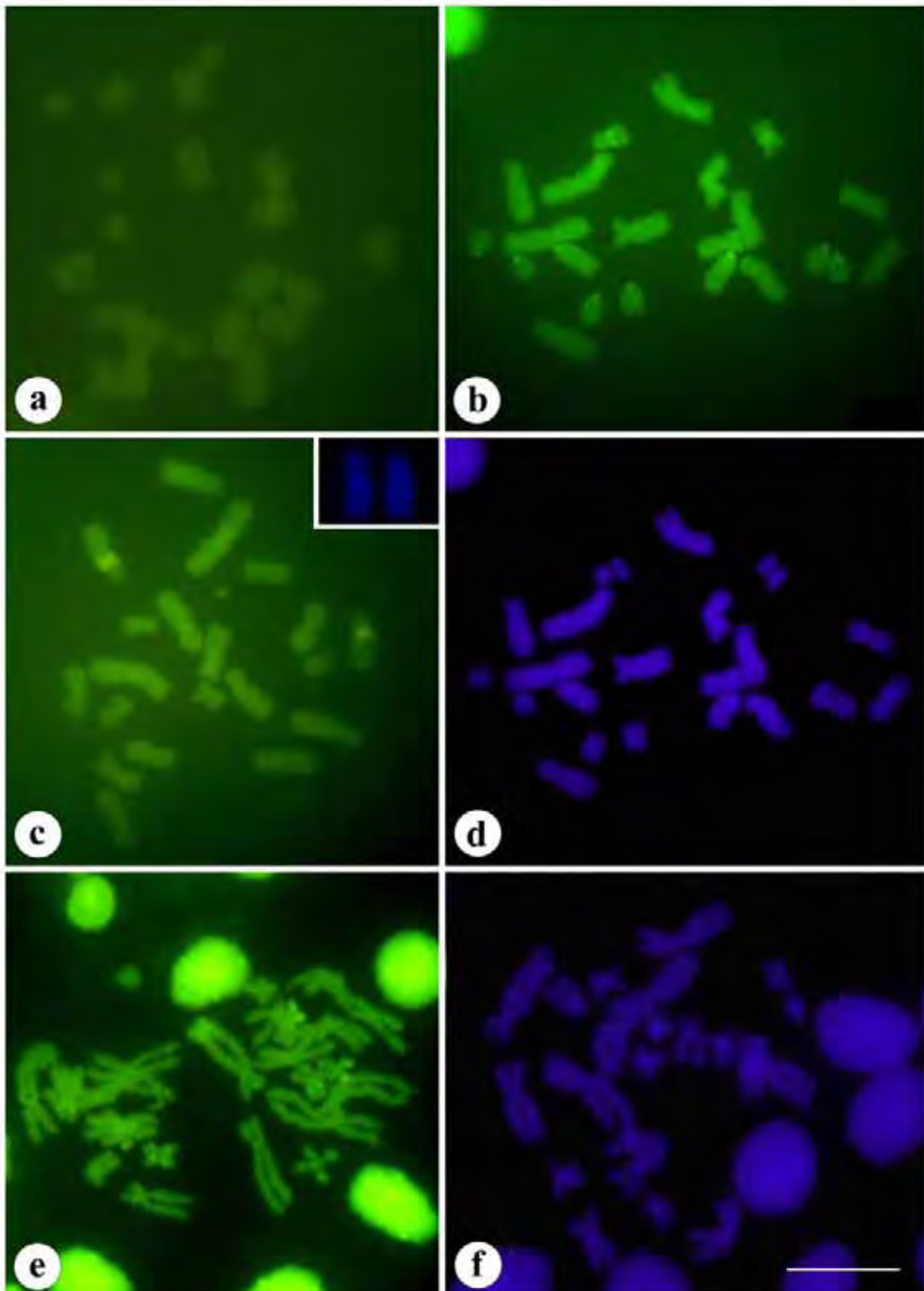


Figura 13. Células em metáfase com coloração pelo CMA₃ (a-c, e) e DAPI (d, f) de *Leptodactylus petersii* (a), *L. podicipinus* (b, d), *Leptodactylus* aff. *podicipinus* (c) e *L. pentadactylus* (e, f) f é DAPI da telomérica. O sítio da Ag-RON é CMA₃⁺ (a-c, e), assim como outras regiões cromossômicas em (a, b, e). Com DAPI, não se observou sítio brilhante em (d), porém, em outras metafases, há marcações brilhantes com o fluorocromo (no destaque em c, f). Barra=10µm

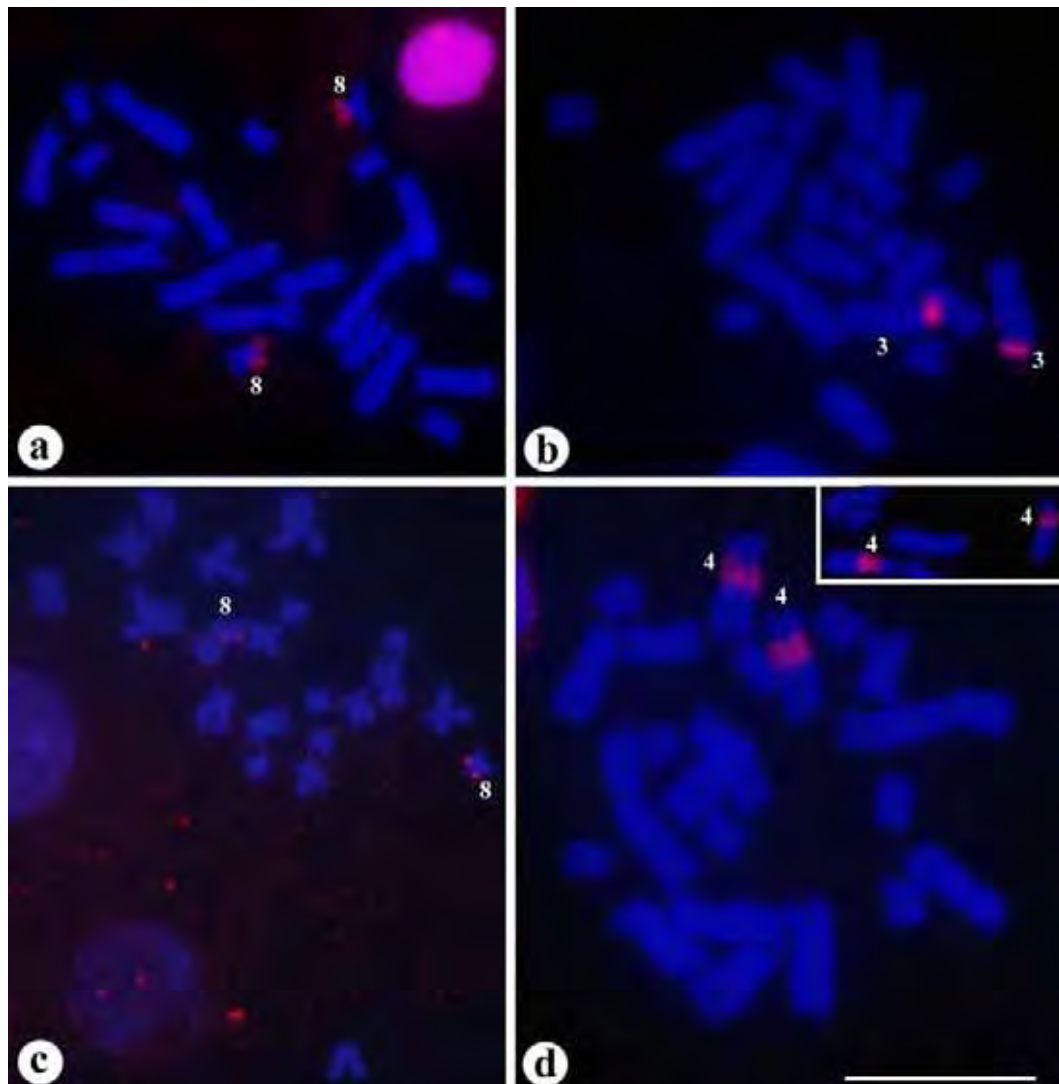


Figura 14. Células em metáfase (a-d) e metáfase parcial no destaque em (d) após FISH com sonda de DNAr HM123 de *Leptodactylus labyrinthicus* (a), *L. rhodomystax* (b), *L. chaquensis* (c), *Leptodactylus* cf. *petersii* e *L. petersii* no destaque em (d). Barra=10 μ m

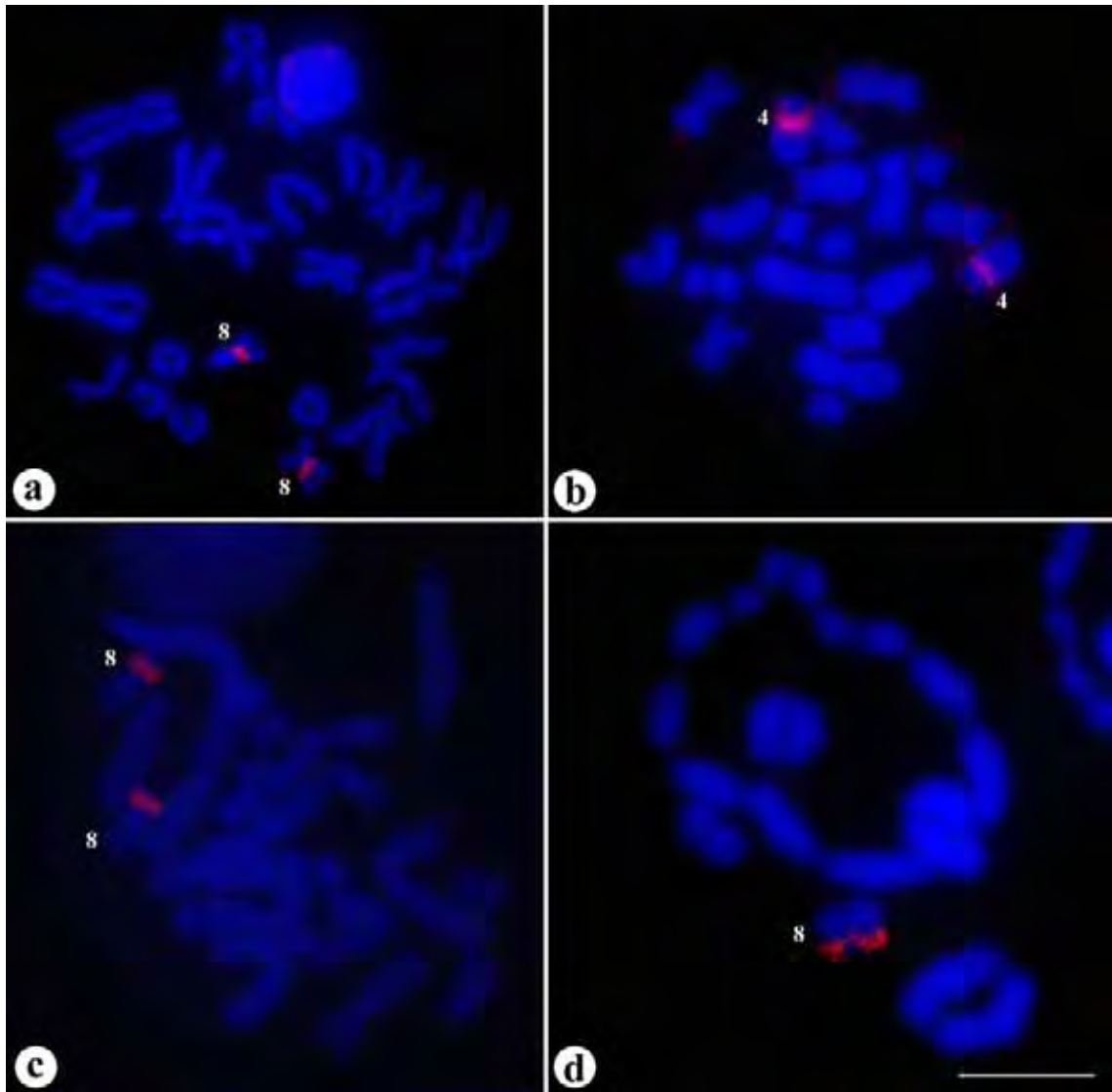


Figura 15. Células em metáfase (a-c) e em metáfase I (d) após FISH com sonda de DNAr HM123 de *Leptodactylus podicipinus* (a), *Leptodactylus* aff. *podicipinus* (b) e *L. pentadactylus* (c, d). Barra=10 μ m

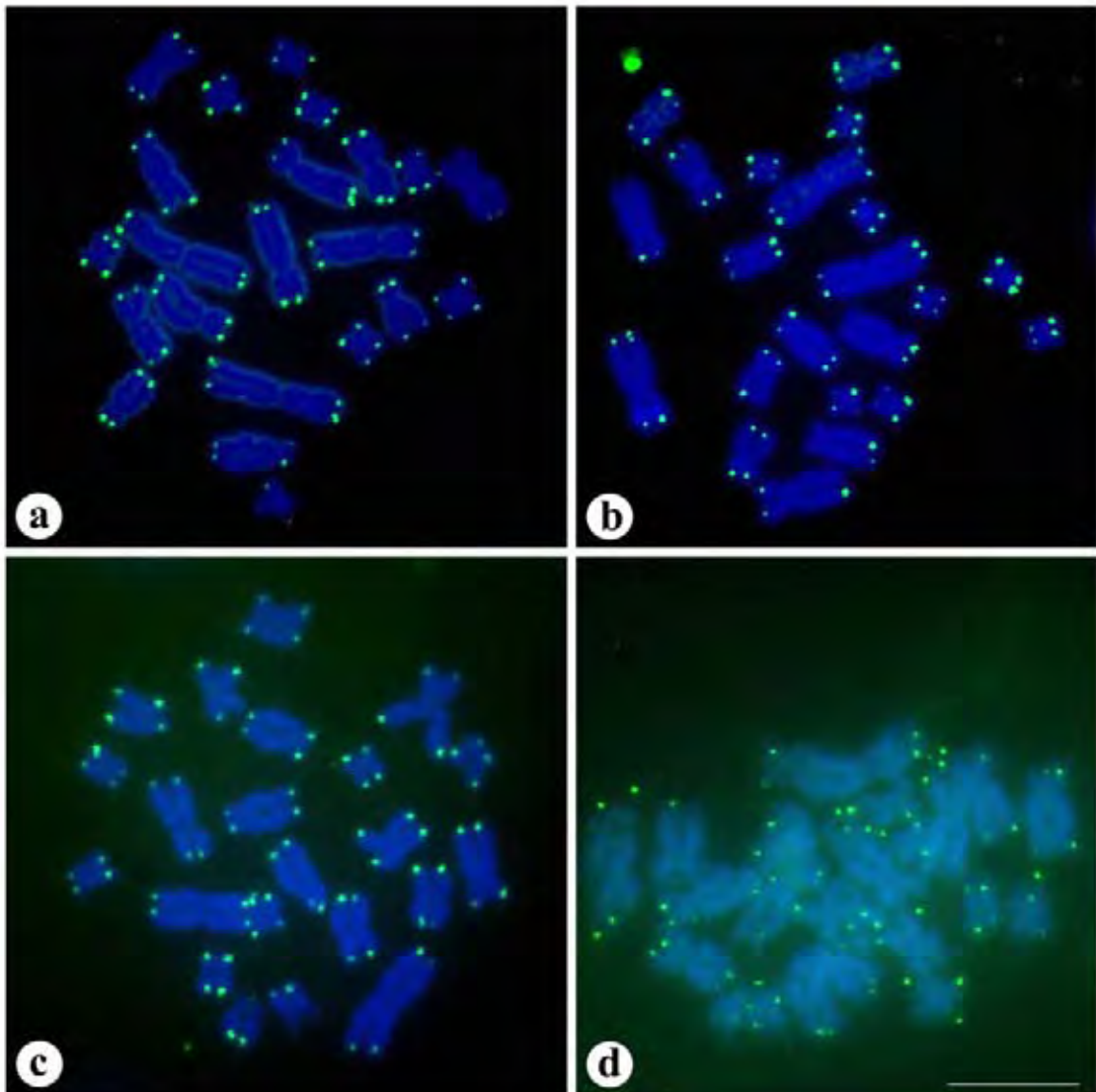


Figura 16. Células em metáfase após FISH com sonda telomérica de *Leptodactylus labyrinthicus* (a), *L. rhodomystax* (b), *L. chaquensis* (c) e *L. petersii* (d). Barra=10 μ m

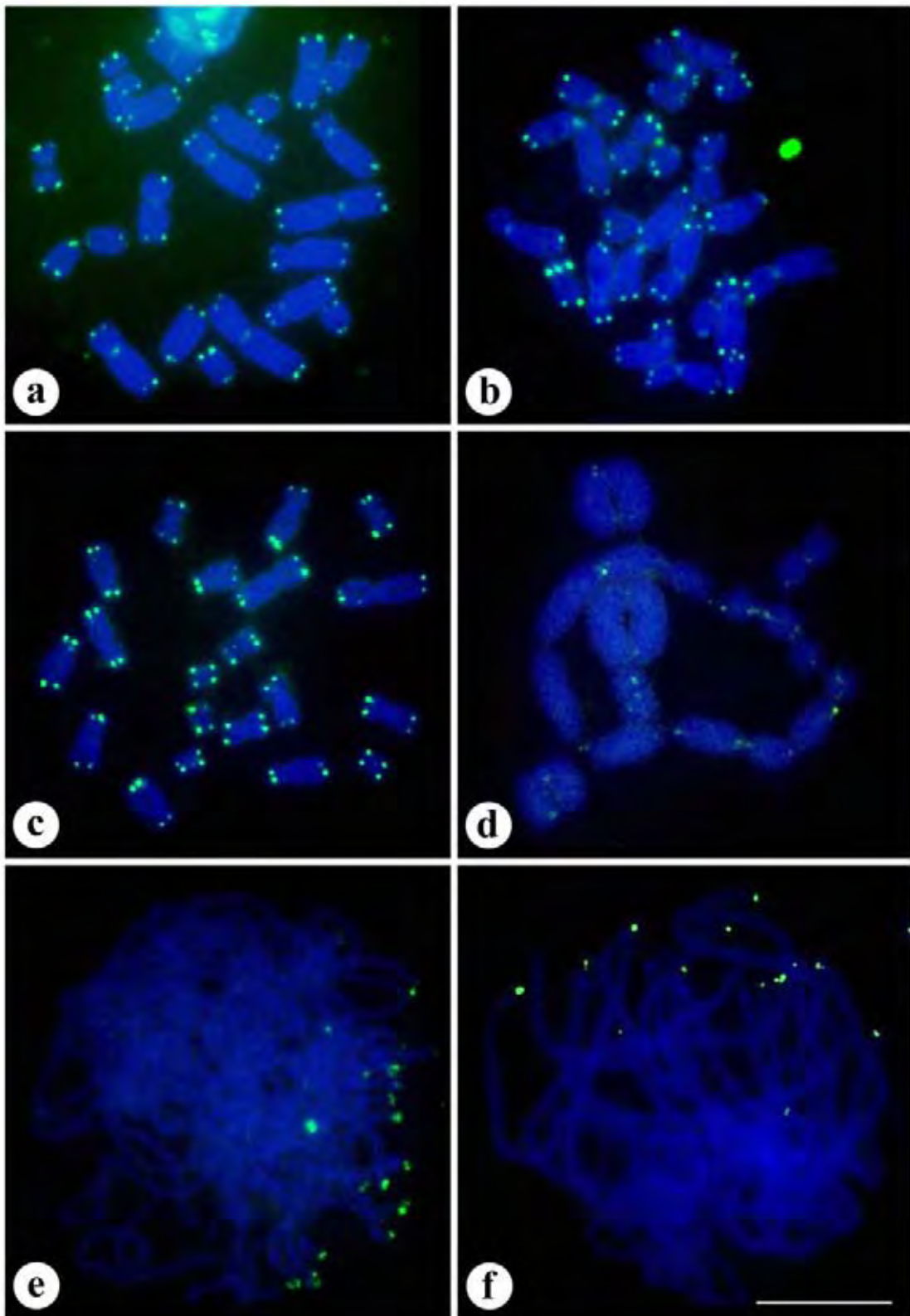


Figura 17. Células em metáfase (a-c), em metáfase I (d) e em paquíteno (e, f) após FISH com sonda telomérica de *Leptodactylus podicipinus* de Gurinhatã, MG (a) e de Nossa Senhora do Livramento, MT (b), *Leptodactylus* aff. *podicipinus* (c) e *L. pentadactylus* (d-f). Notar sinal de hibridação centromérica em alguns cromossomos (a, b) e configuração em buquê dos cromossomos paquítenicos, com polarização dos telômeros (e, f). Barra=10 μ m

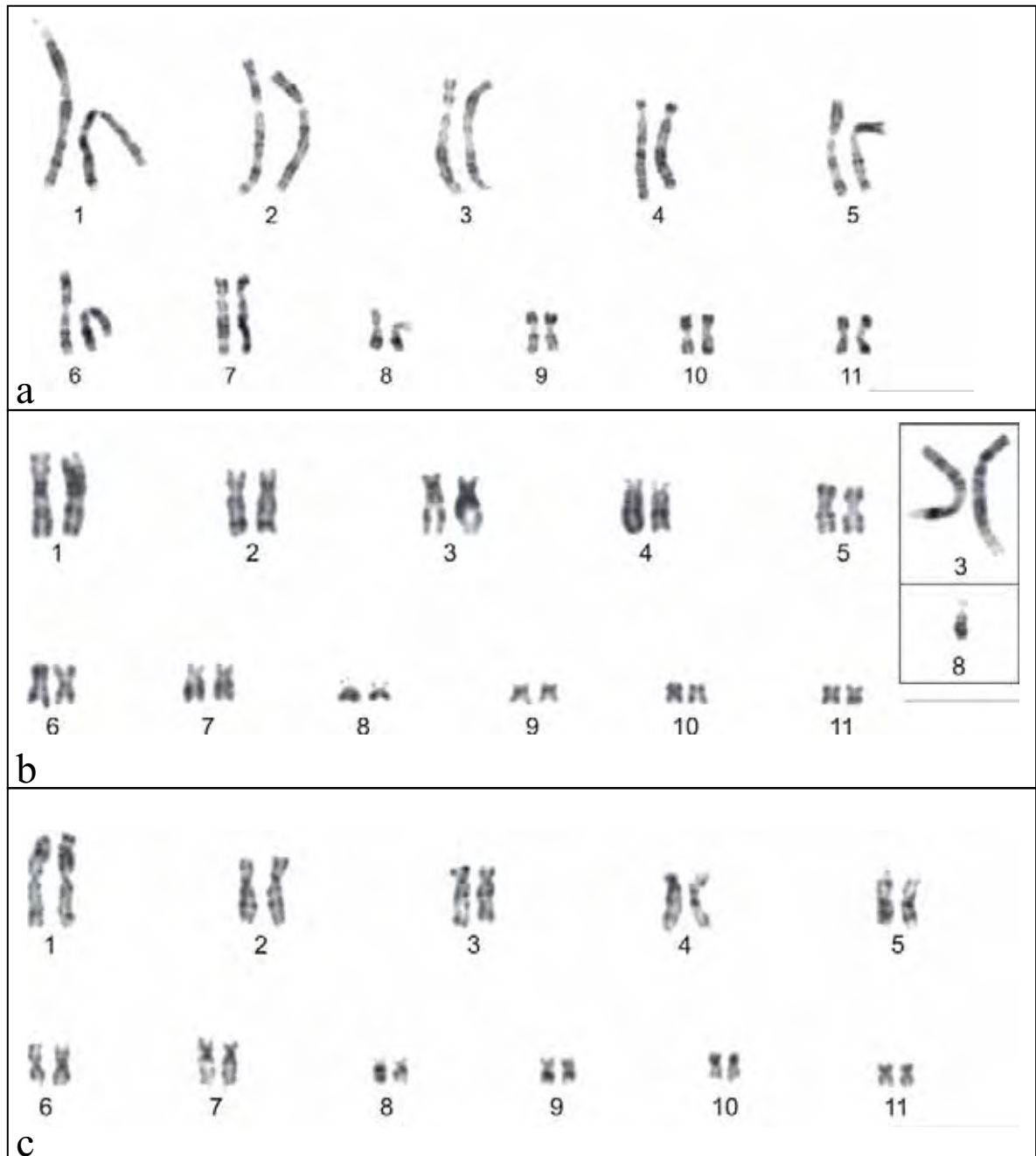


Figura 18. Cariogramas e cromossomos no destaque (b) com bandas de replicação após incorporação de BrdU de *Leptodactylus labyrinthicus* (a), *L. rhodomystax* (b) e *L. chaquensis* (c). Barra=10μm

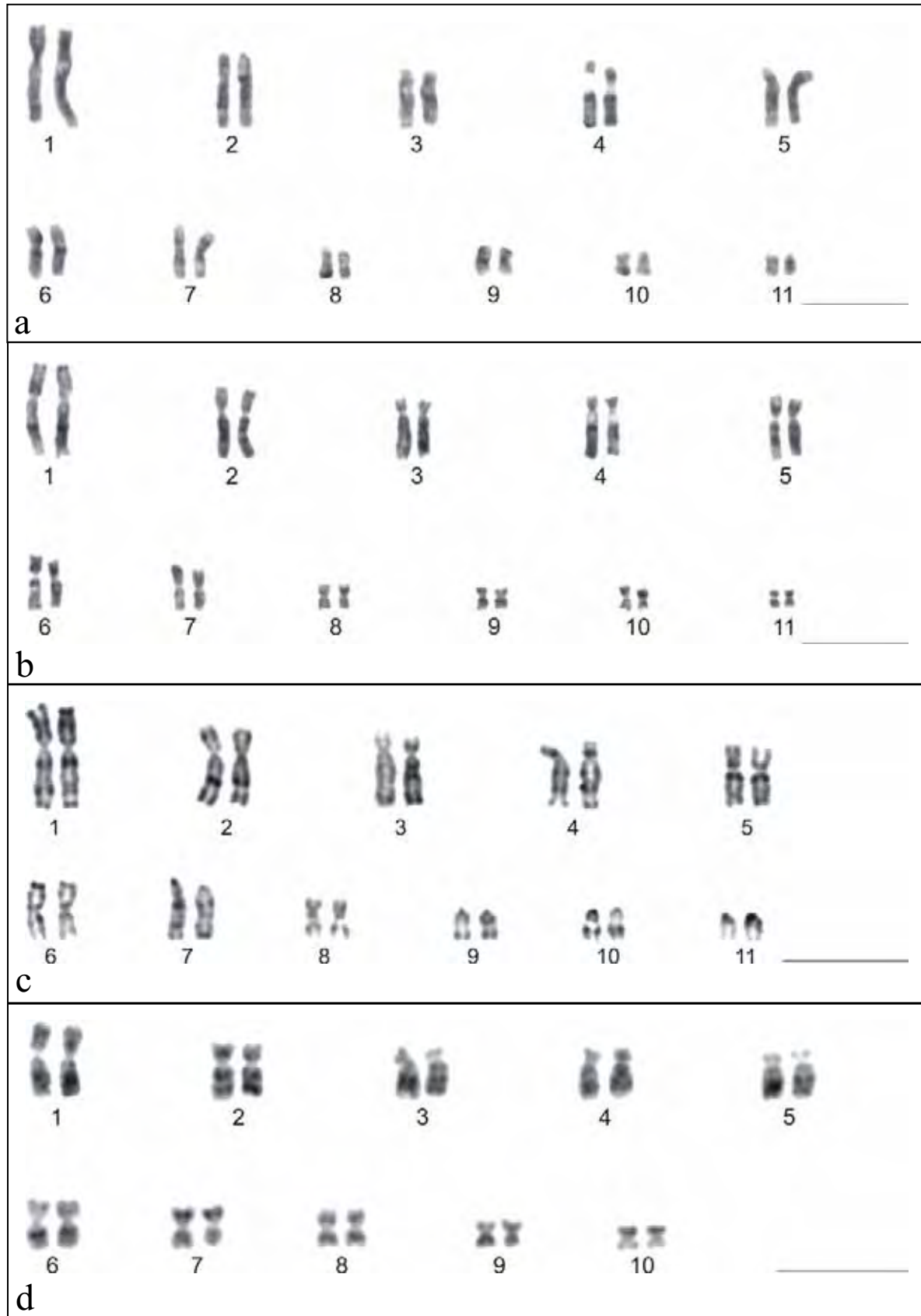


Figura 19. Cariogramas com bandas de replicação após incorporação de BrdU de *Leptodactylus petersii* (a), *Leptodactylus* cf. *petersii* (b), *L. podicipinus* (c) e *Leptodactylus* aff. *podicipinus* (d). Barra=10 μ m

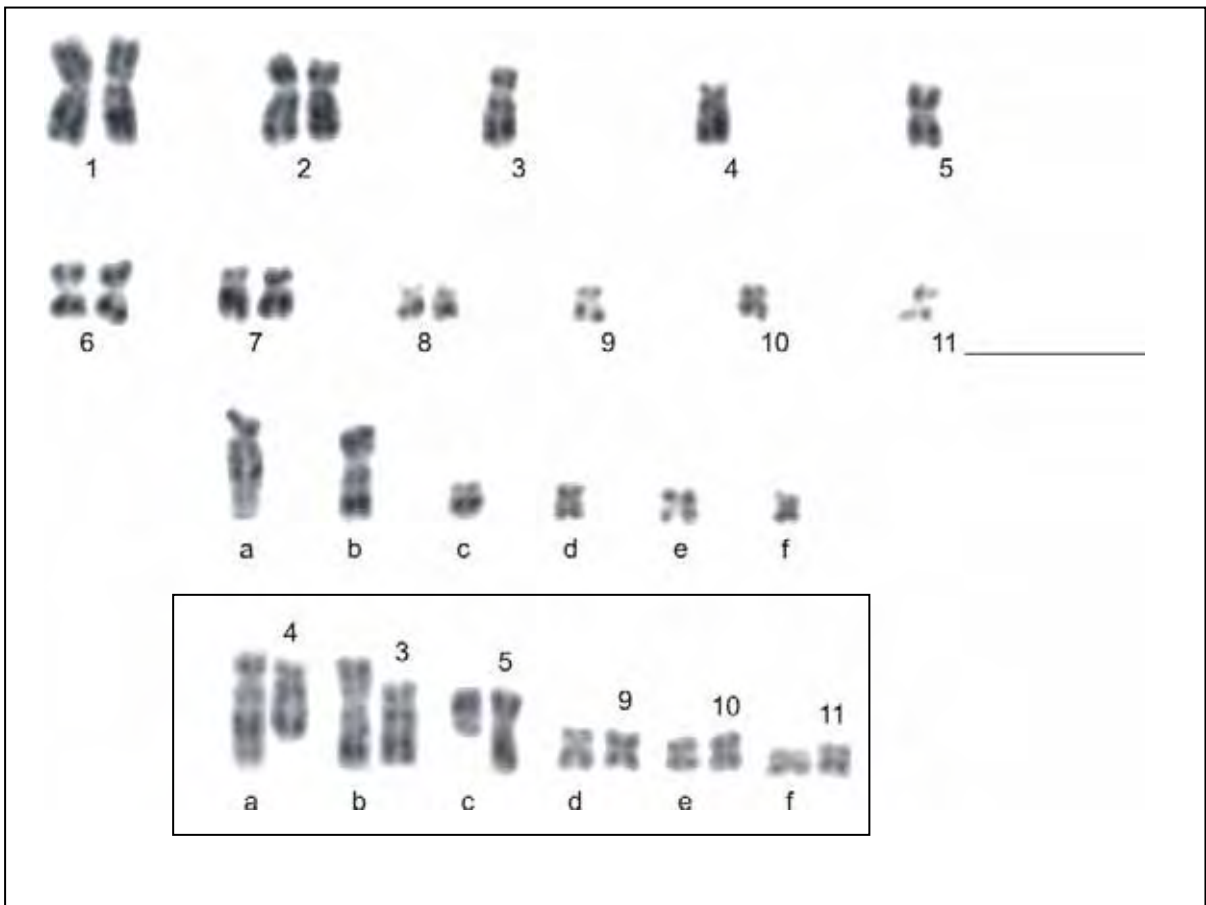


Figura 20. Cariogramas com bandas de replicação após incorporação de BrdU de *L. pentadactylus* (b). Barra=10 μm

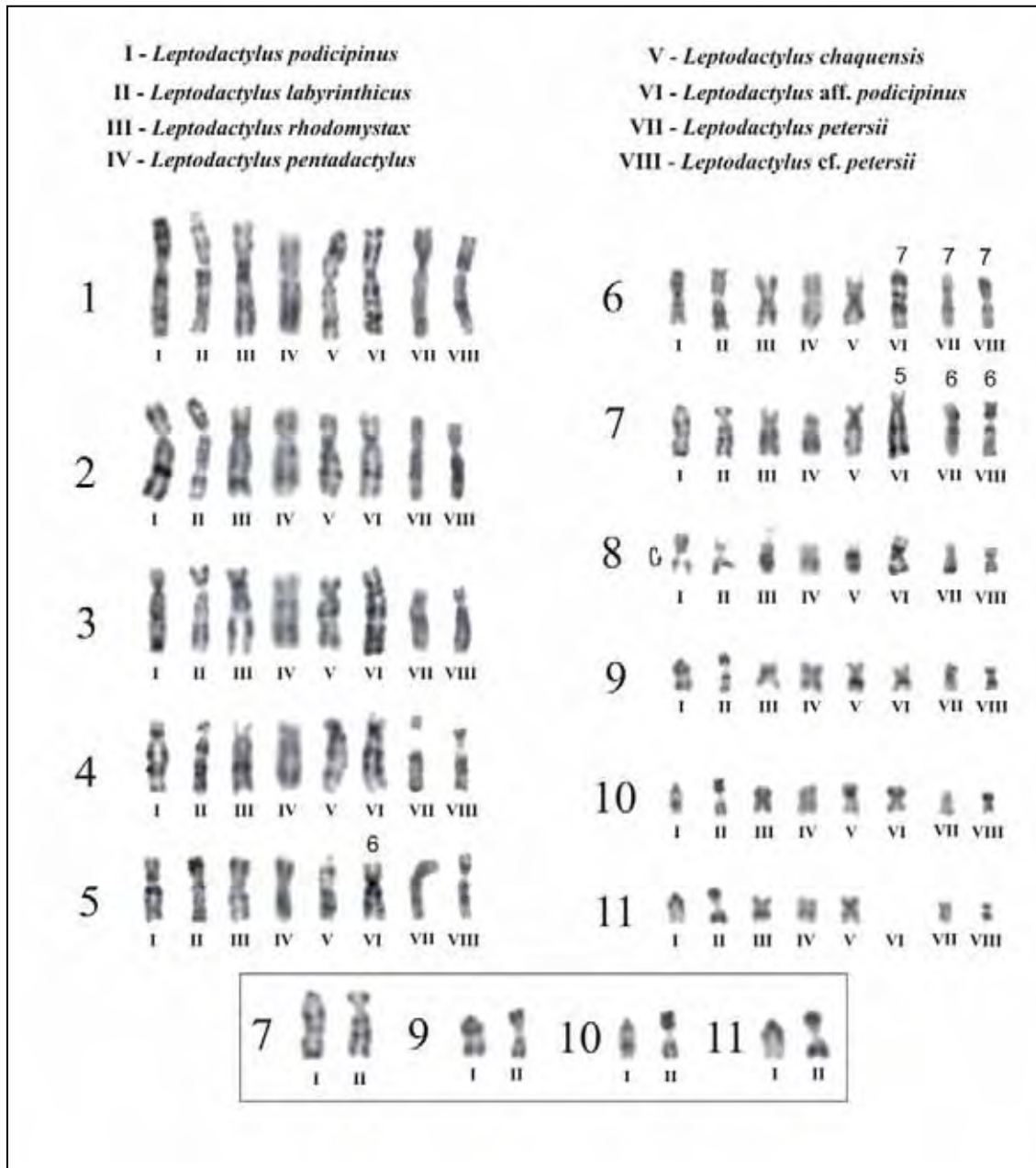


Figura 21. Comparação entre os padrões de bandas de replicação obtidos nos cromossomos de *Leptodactylus podicipinus*, *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax*, *L. chaquensis*, *L. pentadactylus*, *Leptodactylus* aff. *podicipinus*, *L. petersii* e *Leptodactylus* cf. *petersii*. Seta no cromossomo 8 de *L. podicipinus* indica correspondência dos padrões dos braços curtos e longos em posição invertida. No detalhe, cromossomos 7, 9, 10 e 11 de *L. podicipinus* e *L. labyrinthicus*, mostrando que a mudança na morfologia nos três primeiros cromossomos das duas espécies, pode ser decorrente de uma inversão pericêntrica.

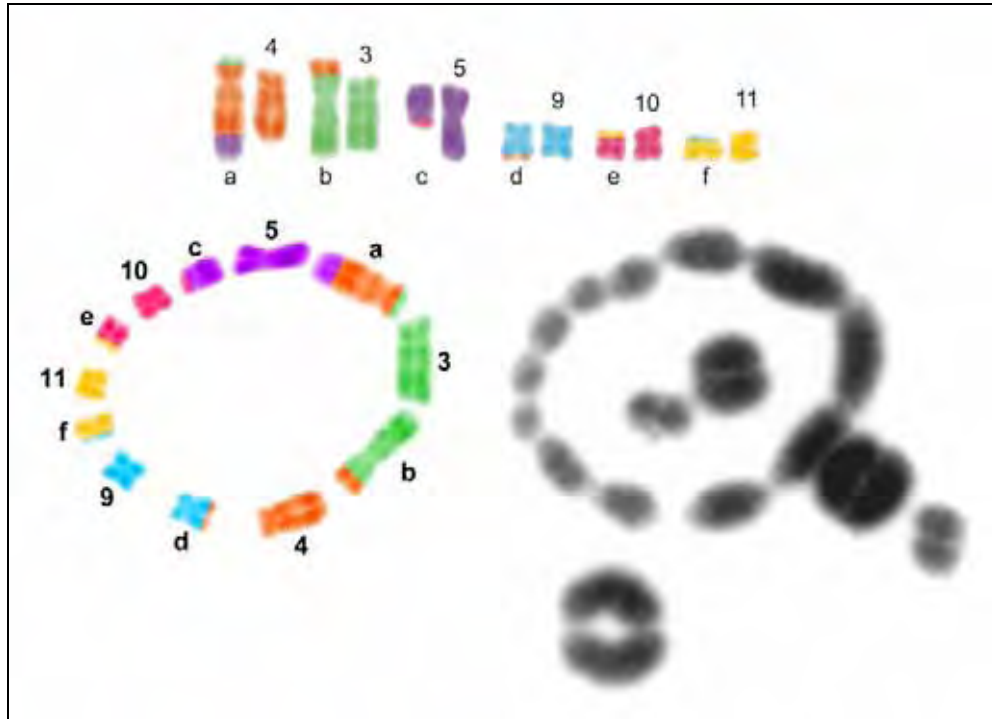


Figura 22. Identificação tentativa dos cromossomos 3, 4, 5, 9, 10 e 11, assim como dos elementos rearranjados **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** na cadeia meiótica de 12 cromossomos de *L. pentadactylus*.

V. Discussão

Leptodactylus labyrinthicus e *L. rhodomystax* (ambas do grupo de *L. pentadactylus*) e *L. chaquensis* (grupo de *L. latrans*) exibem grande similaridade em seus padrões cariotípicos, sendo equivalentes, no caso de *L. labyrinthicus* e *L. chaquensis*, aos previamente descritos para as mesmas espécies, procedentes de outras localidades do Brasil e de países vizinhos (DENARO, 1972; BOGART, 1974; HEYER E DIMENT, 1974; BARALE et al., 1990; SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2006; ARRUDA e MORIELLE-VERSUTE, 2008, e citações anteriores à década de 1970, conforme revisão em AMARO-GHILARDI, 2005). O cariótipo de *L. rhodomystax*, aqui descrito pela primeira vez, mostra constrição secundária nos cromossomos 8, como nas duas outras espécies, porém, um segundo par marcador, isto é, o de número 3, foi observado.

Leptodactylus petersii e *Leptodactylus* cf. *petersii* (ambas do grupo de *L. melanonotus*) apresentaram cariótipos semelhantes entre si e ao do exemplar identificado como *L. petersii* de Amaro-Ghilardi et al. (2006), e, diferentemente, das três espécies anteriores do presente trabalho, o par marcador com constrição secundária corresponde ao 4, além do que parece ocorrer ligeira diferença na morfologia dos pares 5 e 7, enquanto os demais são equivalentes em tamanho e morfologia. Exemplares de *L. podicipinus* (grupo de *L. melanonotus*) das três localidades amostradas apresentaram o mesmo padrão cariotípico, equivalente ao encontrado por Denaro (1972), Silva et al. (2000) e Arruda e Morielle-Versute (2008), sendo a característica mais notável a presença de quatro pares de cromossomos telocêntricos, o que explica a redução do NF de 44 para 36. Tal condição de mesmo $2n=22$, porém, NF distintos, pode ser atribuída a inversão pericêntrica, como, também, sugeriram Silva et al. (2000), embora sem comprovação citológica. Os demais cromossomos de *L. podicipinus* são equivalentes aos de *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax* e *L. chaquensis*, compartilhando com elas o par marcador 8.

As duas outras espécies da amostra, *Leptodactylus* aff. *podicipinus* (grupo de *L. melanonotus*) e *L. pentadactylus* (grupo de *L. pentadactylus*), apresentaram cariótipos discrepantes da grande maioria dos *Leptodactylus* já analisados até o presente. A primeira espécie por ter $2n=20$ e $NF=40$, constituição que, segundo levantamentos de King (1990), Kuramoto (1990), Amaro-Ghilardi (2005) e Green e Sessions (2007), não fora ainda relatada para nenhum dos representantes já

descritos no gênero. O único cariótipo de *Leptodactylus* com $2n$ menor que 22 já descrito é o de *L. lineatus* (*Lithodytes lineatus*), com $2n=18$ (BOGART, 1970a). A constituição cariotípica de *Leptodactylus* aff. *podicipinus* é, em certa extensão, semelhante à das espécies da presente amostra, compartilhando com elas pares aparentemente homeólogos, um dos quais, sem dúvida, é o 4 portador da constrição secundária, como em *L. petersii* e *Leptodactylus* cf. *petersii*. É provável que rearranjo do tipo fusão tenha sido responsável pela diminuição do número diploide e, ainda que não se saiba, exatamente, quais são os cromossomos envolvidos, é fato que estamos diante de um novo cariótipo.

A segunda espécie com cariótipo atípico corresponde ao de *L. pentadactylus* (grupo de *L. pentadactylus*), em que o exemplar da amostra exibiu cinco pares de cromossomos (1, 2, 6, 7 e 8) e, adicionalmente, 12 elementos ímpares, seis deles equivalentes aos cromossomos dos pares 3, 4, 5, 9, 10 e 11 de *L. labyrinthicus* e *L. rhodomystax* e outros seis, designados como **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f**, não reconhecidos naquelas duas espécies, embora os menores, **d** e **e**, não difiram morfológicamente do 9, 10 e 11. Os pares 1, 2, 6, 7 e 8 são equivalentes aos encontrados em *L. labyrinthicus* e *L. rhodomystax*, inclusive, pela presença do mesmo par marcador 8.

A nossa hipótese inicial para explicar a constituição atípica do cariótipo de *L. pentadactylus* foram as translocações múltiplas sequenciais, o que pôde ser, parcialmente, comprovado, assim que foram analisadas células em diplóteno/diacinese e metáfase I, pois essas mostraram sempre 5 bivalentes, os dos pares 1, 2, 6, 7 e 8, e uma cadeia com 12 cromossomos. Os bivalentes 1 e 2 foram reconhecidos pelo tamanho e o bivalente 8, pela presença de constrição secundária e, subsequentemente, pelo sinal de hibridação com a sonda ribossômica, bem como por um padrão de banda C característico desse par marcador.

Segundo revisão de Amaro-Ghilardi (2005), a espécie *L. pentadactylus* teve seu cariótipo analisado no final dos anos 1960 e início da década de 1970. Em época mais recente, Amaro-Ghilardi et al. (2004) descreveram $2n=22$ em um jovem de *L. pentadactylus* e constituição que consideraram similar àquela apresentada por Bogart (1974) para a mesma espécie, exceto pelo fato de ter sido encontrada uma translocação recíproca. Essa foi atribuída a rearranjo ocorrido *in vitro* durante a cultura de fibroblastos, sugerido pelos autores com base nos padrões de bandas de replicação, como sendo do tipo 4/5.

Nossos resultados não deixam dúvidas de que se trata de mais um caso, em que complexos de translocação sequencial são confirmados pela formação de multivalentes, seja em cadeia aberta, seja em anel, como nos exemplos clássicos em plantas dos gêneros *Oenothera* e *Rhoeo* (STRICKBERGER, 1976) e no monotremado *Ornithorhynchus anatinus*, analisado em 2004 por Grützner et al. (2004), com técnicas de pintura cromossômica. Em anuros, há, também, relatos de ocorrência de cadeias de cromossomos na meiose de algumas espécies (BEÇAK E BEÇAK, 1974; LOURENÇO et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2004; CAMPOS et al., 2008; CARVALHO et al., 2009), tendo sido atribuída a sua formação a rearranjos múltiplos heterozigotos, embora sem comprovação. Segundo Schmid et al. (2010), casos como esses podem ser explicados, alternativamente, por emparelhamento ectópico não quiasmático entre regiões heterocromáticas teloméricas. No entanto, é interessante notar que na amostra de *Haddadus binotatus* analisada por Campos et al. (2008), em que o aparecimento da cadeia meiótica nos machos era esporádica, um dos exemplares exibiu pares cromossômicos e elementos em condição ímpar, à semelhança do relatado no presente trabalho para *L. pentadactylus*, sugerindo que, de fato, rearranjos múltiplos sequenciais devem ocorrer.

Na preparação citológica de testículo de *L. pentadactylus* do presente trabalho, foram observadas células em metáfase II, porém, somente em duas delas, originadas, provavelmente, da segregação alternada da mesma célula em metáfase I, foi possível identificar as respectivas constituições, ainda que de forma tentativa. Esse modo de segregação assegura a produção de dois tipos de gametas, sendo que um deles carrega cromossomos não rearranjados, enquanto o outro, os elementos derivados, além daqueles não envolvidos nas translocações. Não se pode descartar a ocorrência de segregação dos tipos adjacentes dos elementos da cadeia, mas, os gametas ou os zigotos deles originados devem ser eliminados, por não terem constituição cromossômica equilibrada.

A análise meiótica dos machos das demais espécies de *Leptodactylus* da amostra permitiu descartar a presença de um possível par heteromórfico, sugestivo de cromossomos sexuais diferenciados, tal como descrito no anfíbio *Triturus helveticus*, que apresenta cromossomos indistinguíveis nos dois sexos, porém, um bivalente com emparelhamento sugestivo de par XY na espécie (SCHMID et al., 1991).

No presente trabalho, a obtenção de bandas de replicação permitiu o emparelhamento mais preciso dos cromossomos de cada espécie de *Leptodactylus*. Apesar de não se ter obtido padrões de qualidade equivalente, uma comparação tentativa dos seus cariótipos sugere homeologias para grande parte dos cromossomos. Contudo, não estão muito claras diferenças observadas na morfologia de alguns cromossomos de *L. petersii* e de *Leptodactylus* cf. *petersii* em relação à dos cromossomos de *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax* e *L. chaquensis*. Tampouco, é conclusivo o reordenamento responsável pela redução do número diploide para $2n=20$ em *Leptodactylus* aff. *podicipinus*, mas, é possível que o seu cromossomo 5 seja o derivado de uma fusão que envolveu o 7 e o 11 do cariótipo ancestral com $2n=22$. Não se pode, contudo, afastar rearranjos mais complexos que produziram, também, o cromossomo 8 de *Leptodactylus* aff. *podicipinus*, diferente dos 8 das demais espécies. Quanto aos cromossomos 7, 9, 10 e 11 de *L. podicipinus* e seus correspondentes em *L. labyrinthicus*, parece não haver dúvidas de que a alteração na morfologia se deve a evento de inversão pericêntrica, pelo menos para o caso dos três primeiros elementos, enquanto a diferença na morfologia dos cromossomos 11 das duas espécies pode ter envolvido rearranjos mais complexos.

Pelos padrões de bandas de replicação foram identificados, sem dúvida, no cariótipo de *L. pentadactylus*, os cromossomos 3, 4 e 5 e os respectivos produtos derivados. Já os demais elementos envolvidos nos rearranjos sequenciais, assim como a identificação dos segmentos cromossômicos que mudaram de posição, foram presumidos com base no padrão de bandamento e complementados pela configuração da cadeia meiótica.

A obtenção dos padrões de bandas de replicação por incorporação de BrdU tem sido um procedimento relevante para a caracterização cariotípica de espécies de anfíbios anuros da fauna brasileira, como mostram os trabalhos de Kasahara et al. (2003), Gruber et al. (2007), bem como os de Silva et al. (2000), Amaro-Ghilardi et al. (2004), Silva et al. (2004) e Silva et al. (2006), esses quatro últimos analisando espécies de *Leptodactylus*. Contudo, a comparação dos padrões de bandas não é uma tarefa fácil, visto que esses nem sempre exibem grau uniforme de diferenciação, podendo ser decorrente de dificuldades de ordem técnica, como o de padronizar a duração do tratamento com o análogo de base, principalmente, se for *in vivo*. De qualquer modo, é importante enfatizar que comparações inequívocas

poderão ser conseguidas com o uso de metodologias mais resolutivas, como as de pintura cromossômica cruzada pelo FISH. Isso foi observado com relação à hipótese de tetraploidia do anuro *Xenopus laevis*, inicialmente sugerida pela medida da quantidade de DNA, que ganhou um reforço com as análises comparativas das bandas de replicação (SCHMID e STEINLEIN, 1991) e, mais recentemente, comprovação pela pintura cromossômica (KRYLOV et al., 2010).

Para todas as espécies da amostra, foram observadas Ag-RON em apenas um par cromossômico, o que é usual em anfíbios anuros (SCHMID et al., 1990; GREEN e SESSIONS, 2007; SCHMID et al., 2010). A ocorrência de Ag-RON múltiplas, no entanto, é relativamente comum em espécies de anfíbios e, mesmo em *Leptodactylus*, Silva et al. (2006) encontraram marcações nos cromossomos dos pares 4 e 8 de *L. mystacinus*.

A Ag-RON pode ser um importante marcador espécie-específico, principalmente, para grupos em que há grande similaridade na constituição cariotípica, pelo menos pela coloração convencional. Em nossa amostra de *Leptodactylus*, à semelhança dos relatos no gênero (SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006), é frequente a Ag-RON no par 8, porém, a posição desse marcador nem sempre é coincidente, podendo aparecer seja nos braços curtos, seja nos braços longos, em posição terminal, intersticial ou proximal.

Descrições de Ag-RON localizada em cromossomos que não os do par 8, como em *L. rhodomystax* no par 3, e no par 4 em *L. petersii*, *Leptodactylus* cf. *petersii* e *Leptodactylus* aff. *podicipinus* de nossa amostra, são menos frequentes e, no momento, pode-se dizer que é espécie-específica para o caso da primeira espécie. Localização das Ag-RON em pares cromossômicos distintos foi descrita, também, para alguns outros representantes de *Leptodactylus* (CAMPOS et al., 2009), sendo possível, no entanto, que tal variação seja decorrente da diferenciação ocorrida nos cariótipos dessas espécies, incluídas anteriormente no gênero *Adenomera*.

É interessante notar que os cromossomos 8 de *Leptodactylus labyrinthicus*, *L. rhodomystax*, *L. chaquensis*, *L. petersii*, *Leptodactylus* cf. *petersii*, *L. podicipinus* e de *L. pentadactylus* apresentam padrão equivalente de bandas de replicação, independentemente, se são ou não os portadores de RON e, também, não

importando se o sítio de localização da mesma não é coincidente. Isso dá suporte à hipótese de que a mudança na posição da RON pode ser decorrente, não de rearranjos estruturais grosseiros e, sim, por eventos de transposição, não alterando a morfologia dos cromossomos.

A localização da região organizadora de nucléolo foi confirmada pelo FISH com sonda de DNAr em todas espécies da amostra e mostrou que o heteromorfismo no tamanho das Ag-RON em *Leptodactylus* aff. *podicipinus* é decorrente de duplicação do segmento de DNA ribossômico e não de uma atividade genética diferencial, como tem sido relatado, também, em anfíbios (AMARO-GHILARDI et al., 2008). O procedimento de FISH foi importante para descartar como RON, eventualmente inativa, as regiões de constrição secundária visualizadas nos cromossomos 5 de *L. chaquensis* e 8 de *L. rhodomystax*, não impregnadas pelo nitrato de prata. É provável que a heteropicnose negativa seja devida ao fato de que sequências repetitivas ocorrem nesses sítios, como, também, ficou evidenciado pelo bandamento C. De qualquer modo, o emprego conjunto da impregnação pelo nitrato de prata e do FISH com sonda de DNAr é relevante para descartar algumas marcações Ag⁺ como RON verdadeiras. De fato, tem sido frequente o relato de regiões repetitivas argirofílicas que se mostram coradas pelo bandamento C, não só em anfíbios (KASAHARA et al., 1996; SILVA et al., 2006; ANANIAS et al., 2007a), como, também, em outros vertebrados (SÁNCHEZ et al., 1995; DOBIGNY et al., 2002; GROMICHO et al., 2005).

Assim como observado nas espécies de *Leptodactylus*, os animais da presente amostra exibem bandas C, predominantemente, na região centromérica dos cromossomos, porém, é evidente que os padrões de distribuição de heterocromatina C-positiva não são os mesmos, no que se refere às bandas intersticiais e terminais. Essas bandas são de difícil caracterização, sendo sua identificação dependente, algumas vezes, do grau de distensão dos cromossomos, como no caso aqui relatado em *L. chaquensis*. A existência de bandas, mesmo secundárias, pode ser decorrente, também, dos tratamentos técnicos, de modo que são evidentes em algumas metáfases ou sutis em outras, como em *L. rhodomystax*. Não está descartada, além disso, a possibilidade de que certas bandas intersticiais sejam, de fato, regiões eucromáticas mais resistentes à ação do hidróxido de bário.

De modo geral, é comum heteromorfismo de banda C nos organismos, incluindo anfíbios (SCHMID et al., 1990a), já que a heterocromatina é,

geneticamente, inativa, podendo ser duplicada ou deletada. Desse modo, são frequentes os relatos de cromossomos com bandas C aumentadas, diminuídas ou mesmo ausentes, como observado nos cromossomos 8 de *Eupemphix nattereri* (ANANIAS et al., 2007a). A marcação intersticial de banda C nos braços curtos dos cromossomos 2 de *L. rhodomystax* só pôde ser averiguada em um único exemplar da espécie, sendo necessária a ampliação da amostra para se avaliar a extensão dessa variante. Por outro lado, *L. chaquensis* de nossa amostra não apresentou banda C heteromórfica nos braços curtos dos cromossomos 1, como relatado por Barale et al. (1990) para exemplares da Argentina, tendo sido a variante relacionada com possível sistema de determinação do sexo do tipo XY, ainda que em estágio inicial. Os heteromorfismos de bandas C observados nos cromossomos 8 e 11 de um único exemplar de *L. podicipinus* de Nossa Senhora do Livramento, MT, pode ser indicativo de possível variação interindividual ou interpopulacional, em que uma ampliação de amostragem poderia, eventualmente, esclarecer. Diferença interpopulacional nos padrões de bandas C pode ser presumida, pela observação do cariótipo de *L. podicipinus* apresentado por Silva et al. (2000), para exemplares coletados em Rio Claro, SP.

A análise do bandamento C para se avaliar a diversidade cariotípica pode ser melhorada, se complementada com informações acerca da composição molecular das sequências repetitivas, com uso dos fluorocromos AT ou GC específicos. Não é incomum que espécies filogeneticamente próximas, com padrões equivalentes de bandas C, mostrem diferenças marcantes quanto ao conteúdo de bases nitrogenadas na heterocromatina centromérica ou, mesmo, revelem regiões repetitivas não diferenciadas pelo tratamento com o hidróxido de bário, como é o caso de *Aparasphenodon brunoi* e *Corythomantis greeningi* (KASAHARA et al., 2003). Em certa extensão, isso foi observado no presente trabalho, em que os cromossomos das espécies de *Leptodactylus*, com padrões de bandas C que guardam grande uniformidade, mostram padrão de coloração distinto pelo CMA₃ e DAPI. Ao compararem os padrões de bandas C de *Leptodactylus labyrinthicus* com aquele descrito por Silva et al. (2000) para a mesma espécie, porém, de outra localidade, Arruda e Morielle-Versute (2008) não detectaram uma região repetitiva intersticial C-positiva nos cromossomos 2, a qual, no entanto, foi por eles visualizada com fluorescência brilhante pelo fluorocromo DAPI.

Apesar das dificuldades de se estabelecer padrões precisos de bandas C e de coloração por fluorocromos base-específicos, esses procedimentos são relevantes na busca de marcadores cromossômicos que sejam espécie-específicos e mesmo população-específico.

Como era de se esperar, o FISH com sonda de telômero revelou sinais de hibridação nas regiões teloméricas dos cromossomos, sem que fosse observada nenhuma marcação indicativa de possível ocorrência de rearranjo estrutural durante a evolução cromossômica das espécies de *Leptodactylus* aqui analisadas. Marcações em sítios intersticiais, conhecidas pela sigla ITS (*Interstitial Telomeric Sites*), têm sido relatadas em inúmeros casos, porém, enquanto alguns deles correspondem a vestígios de telômeros que permaneceram após rearranjo estrutural (VENTURA et al., 2006), outros são apenas indicativos de presença de DNA repetitivo que contem sequências (TTAGGG)_n semelhantes às presentes nas unidades de repetição dos telômeros. Esse parece ser o caso de *L. podicipinus* com marcação na região centromérica de alguns cromossomos e do descrito por Nanda et al. (2008) em *Xenopus clivii*, em que sinais intersticiais de hibridação pela sonda telomérica não sugerem ou comprovam rearranjo estrutural.

O gênero *Leptodactylus* tem sido objeto de estudos taxonômicos desde longa data, porém, persistem ainda muitos questionamentos. Um deles refere-se à distribuição das espécies nos grupos de *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. marmoratus*, *L. melanonotus* e *L. pentadactylus*, atualmente aceitos. Embora no catálogo *on line* publicado e atualizado por Frost (2011) não sejam feitas referências a qualquer espécie incluída no grupo de *L. marmoratus*, trabalhos recentes, como o de Ponssa et al. (2011), mencionam os cinco agrupamentos fenéticos propostos para o gênero, reconhecendo, portanto, o grupo supracitado. Autores como Kwet et al. (2009) e Zaracho e Hernando (2011) não reconheceram a sinonimização de *Adenomera* a *Leptodactylus*, proposta por Frost et al. (2006), os quais mantiveram o grupo de *L. marmoratus* para alocar espécies de *Adenomera*. Existem, também, questões não resolvidas de nomenclatura, já que não são incomuns casos de espécies crípticas ou de complexos de espécies.

As espécies incluídas no gênero *Leptodactylus* estão entre as mais diversificadas em número, distribuição geográfica e ocupação de nichos ecológicos, além de apresentar variação intraespecífica, gerando muitas dúvidas sobre quais caracteres devem ser utilizados para uma abordagem filogenética. O gênero tem

sido objeto de estudos do grupo liderado por R. Heyer (Smithsonian Institute, nos Estados Unidos da América) que, ao longo de décadas, produziu dezenas de trabalhos, tendo sido esses e outras pesquisas reunidas em publicação de 2009 (HEYER et al., 2009). Pode-se constatar que, nos últimos anos, uma grande ênfase tem sido dada para as informações obtidas pelo sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear, sendo que as filogenias produzidas têm pouca ou nenhuma contribuição de dados citogenéticos.

De acordo com a filogenia preliminar proposta por A.P.Z. Silva (comunicação pessoal), *L. pentadactylus* forma uma ramificação no mesmo clado constituído pelas espécies de *L. latrans*, ao invés de apresentar relação filogenética mais próxima às espécies incluídas no agrupamento de mesmo nome. As sequências da referida espécie foram obtidas a partir do exemplar procedente de Paranaíta, MT, cujo cariótipo, estudado no presente trabalho, apresentou várias translocações recíprocas sequenciais, tendo sido detectadas tanto em preparações diretas, como a partir de mais de uma cultura de linfócitos, realizadas em épocas diferentes. O exemplar de *L. pentadactylus* cariotipado por Amaro-Ghilardi et al. (2004) é procedente de Cláudia, localidade do mesmo estado de Mato Grosso, porém, os autores atribuem a translocação recíproca 4/5 por eles observada à modificação ocorrida *in vitro*, durante a cultura de fibroblastos. *Leptodactylus pentadactylus* é uma espécie de relativa dificuldade de coleta na natureza e, considerando a proximidade dos locais de onde o espécime do presente trabalho e o de Amaro-Ghilardi et al. (2004) são procedentes, e, levantando a possibilidade de que a translocação recíproca está presente, de fato, no animal procedente de Cláudia, MT, pode-se sugerir que reordenamento cromossômico por esse tipo de rearranjo é frequente nos animais da região. Faz-se, necessária, portanto, a ampliação da amostra de espécimes cariotipados e sequenciados, não só de Paranaíta, MT, como, eventualmente, da localidade de Cláudia, MT, para se testar a hipótese de rearranjo produzido *in vitro* e, possivelmente, identificar outros animais com translocações sequenciais múltiplas, também, pela análise meiótica.

Exemplares de *L. podicipinus* procedentes dos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Maranhão, São Paulo, Goiás e Amapá e de *L. petersii* procedentes de Paranaíta e Alcorizal, ambas localidades no estado do Mato Grosso, foram incluídas na análise de A.P.Z. Silva (comunicação pessoal). Foi feito sequenciamento gênico de alguns exemplares de *L. podicipinus* do presente

trabalho, assim como o de *L. petersii* de Paranaíta, MT, cujos cariótipos são distintos. As sequências de todos os exemplares amostrados por A.P.Z. Silva foram recuperadas, preliminarmente, em um único clado, indicando forte proximidade filogenética entre as duas espécies do grupo de *L. melanonotus*.

Por outro lado, a análise preliminar das sequências dos exemplares de *L. aff. podicipinus* do presente trabalho, que apresentaram cariótipo discrepante quanto ao número diploide com $2n=20$, mostrou-se altamente similar às sequências de *L. podicipinus* com cariótipo com $2n=22$. Os dados cariotípicos aliados às observações sobre a morfologia e comportamento dos animais identificados como *L. aff. podicipinus* e *L. podicipinus* (C. Strüssmann, comunicação pessoal) indicam que esses indivíduos pertencem a entidades taxonômicas distintas. Desse modo, as sequências de DNA obtidas serão incluídas em uma análise filogenética mais ampla e em um estudo de rede de haplótipos que, associados aos caracteres citogenéticos, morfológicos e comportamentais, poderão estimar o grau de divergência entre essas populações (A.P.Z. Silva, comunicação pessoal). É importante destacar que as populações do complexo *podicipinus*, principalmente, da região do Pantanal brasileiro, tem sido alvo de investigações sob as mais diversas abordagens, justamente, por apresentarem uma complexidade taxonômica, como apontado, por exemplo, por Ponssa et al. (2011), a partir de estudos de osteologia e de comportamento reprodutivo.

Uma análise dos dados obtidos a partir do desenvolvimento do presente trabalho, integrados a dados moleculares, de morfologia e de ecologia é fundamental para a construção de hipóteses filogenéticas, mesmo que, muitas vezes, conflitantes, mas que possibilitam a divulgação de inferências evolutivas que mais se aproximem do que de fato ocorreu ao longo da diversificação cariótica das populações dos anuros do gênero *Leptodactylus*.

VI. Conclusões

O presente trabalho sobre marcadores citológicos em oito espécies do gênero *Leptodactylus*, *L. labyrinthicus*, *L. rhodomystax*, *L. chaquensis*, *L. petersii*, *Leptodactylus* cf. *petersii*, *L. podicipinus*, *Leptodactylus* aff. *podicipinus* e *L. pentadactylus*, permite chegar a algumas conclusões e sugestões de novas abordagens nas análises citogenéticas das espécies do gênero:

-ainda que a amostra seja pequena, é válida a característica de que o gênero exibe constituição cromossômica relativamente conservada, mantendo o cariótipo modal de $2n=22$ e $NF=44$ para a maioria das espécies;

-não estão afastadas pequenas diferenças no tamanho e morfologia dos cromossomos, as quais devem ter sido originadas, ao longo da evolução, a partir de rearranjos estruturais mínimos, nem sempre de fácil detecção ou comprovação mesmo com o uso de técnicas mais resolutivas;

-diferenças marcantes no número diploide e na constituição cromossômica estão presentes no gênero, cuja origem pode ser atribuída a reordenamentos estruturais, por uma simples análise convencional rotineira;

-análises de células meióticas fornecem subsídios para a comprovação de constituição cariotípica, previamente, estabelecida a partir de cromossomos mitóticos;

-a maioria das constrições secundárias corresponde a regiões organizadoras de nucléolo, com comprovação pelo nitrato de prata (Ag-RON) e pelo FISH com sonda de DNAr. Outros sítios com heteropicnose negativa, que não são marcados por esses procedimentos, correspondem a regiões de heterocromatina C-positiva;

-o padrão de RON diferencia o cariótipo de algumas espécies, sendo que na maioria delas o marcador tem localização nos cromossomos 8, como o observado com frequência no gênero, ainda que ocupando, eventualmente, sítios distintos nos braços cromossômicos;

-a localização e a quantidade de heterocromatina visualizada pelo bandamento C podem indicar pequenas diferenças cromossômicas interespecíficas e mesmo interpopulacionais, principalmente, no que se refere às marcações terminais e intersticiais. Contudo, tais bandas são, às vezes, de difícil demonstração;

-a coloração com fluorocromos base-específicos forneceu informações sobre a natureza molecular de regiões repetitivas, indicando algumas diferenças nos cariótipos das espécies;

-o FISH com sonda telomérica não exibiu ITS como vestígio de possíveis rearranjos estruturais ocorridos na diferenciação dos cariótipos, mas detectou regiões repetitivas centroméricas que contêm sequências similares às dos telômeros;

-as bandas de replicação permitiram a identificação mais precisa dos homólogos no cariótipo de cada espécie e a comparação interespecífica dos cromossomos mostrou correspondência dos padrões em grande parte deles. Alguns dos rearranjos estruturais presumidos, inclusive aqueles responsáveis pela diferenciação do cariótipo de *L. pentadactylus*, puderam ser confirmados, enquanto outros, necessitam ainda de análises adicionais;

-os dados citogenéticos aqui obtidos contribuem para a resolução de questões relativas à taxonomia e sistemática de *Leptodactylus*, na medida em que evidenciou um cariótipo com $2n=20$, jamais descrito para o gênero, assim como uma constituição cromossômica atípica, resultante de translocações recíprocas sequenciais, provavelmente, fixada em *L. pentadactylus* de uma localidade, porém, não relatada em outras;

-estudos mais aprofundados são ainda necessários, com ampliação das amostras, coletas de novas espécies, uso de procedimentos de FISH com pintura cruzada de cromossomos, bem como relacionar os dados citogenéticos com informações produzidas em outras pesquisas, que permitam melhor entendimento da evolução cromossômica.

VII. Referências Bibliográficas

- ABRAMYAN, J.; EZAZ, T.; GRAVES, J.A.M.; KOOPMANN, P. Z and W sex chromosomes in the cane toad (*Bufo marinus*). **Chromosome Research** 17:1015-1024, 2009.
- AGUIAR-JR, O.; BACCI JR, M.; LIMA, A.P.; ROSSA-FERES, D.C.; HADDAD, C.F.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Phylogenetic Relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics** 23:455-463, 2007.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.; FORESTI, F.; TOLEDO FILHO, S.A. DUTRILLAUX, B. BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species of the genus *Eigenmannia*. **Cytogenetics and Cell Genetics** 48:117-120, 1988.
- AMARO-GHILARDI, R.C. **Estudos citogenéticos comparativos em 26 espécies da família Leptodactylidae (Amphibia, Anura)**. 2005. 162 f. Tese (Doutorado em Biologia/Genética - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005).
- AMARO-GHILARDI, R.C.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia** 57:53-65, 2004.
- AMARO-GHILARDI, R.C.; SKUK, G.; DE SÁ, R.O.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. **Phyllomedusa** 5:119-133, 2006.
- 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.
- ANANIAS, F.; BOMBEIRO, A.L.; SILVA C.D.B.; SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Anura: Leiuperidae) and karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implications. **Acta Zoologica Sinica** 53:285-293, 2007a.

ANANIAS, F.; MODESTO, A.D.S.; MENDES, S.C.; NAPOLI, M.F. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. **Hereditas** 144:206-212, 2007b.

ANDERSON, K. Chromosome Evolution in Holarctic *Hyla* Treefrogs. In: GREEN, D.M.; SESSIONS, S.K. (Ed.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego: Academic Press, 1991.

ANGULO, A.; REICHLE, S. Acoustic signals, species diagnosis, and species concepts: the case of a new cryptic species of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Chapare region, Bolivia. **Zoological Journal of the Linnean Society** 152:59-77, 2008.

ANGULO, A.; COCROFT, R.B.; REICHLE, S. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) in southeastern Peru. **Herpetologica** 59:490-504, 2003.

ARRUDA, M.P.; MORIELLE-VERSUTE, E. Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). **Genetics and Molecular Research** 7:161-176, 2008.

BALDISSERA JR, F.A.; OLIVEIRA, P.S.L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética** 16:335-345, 1993.

BARALE, G.D.; SENN, E.P.; LISANTI, J.A. Polimorfismo de bandas C ligado al sexo em *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). **Revista de la Universidad Nacional de Rio Cuarto** 10:51-53, 1990.

BEÇAK, M.L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia** 21:191-208, 1968.

BEÇAK M.L.; BEÇAK W. Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae - Amphibia). **Experientia** 30:624-625, 1974.

BERNECK, B. M.; COSTA, C.O.R.; GARCIA, P.C.A. A new species of *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic Forest of São Paulo state, Brazil. **Zootaxa** 1795:46-56, 2008.

BIANCHI, N.O.; MOLINA, J.O. DNA replication patterns in somatic chromosomes of *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Anura). **Chromosoma** 22:391-400, 1967.

BIANCHI, N.O.; BIANCHI, M.S.; VIDAL-RIOJA, L. Heterochromatin late replication and secondary constrictions in the chromosome complement of *Leptodactylus ocellatus*. **Caryologia** 26:397-403, 1973.

BOGART, J.P. Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. **Cytogenetics** 9:369-383, 1970a.

BOGART, J.P. Los cromosomas de anfibios anuros del genero *Eleutherodactylus*. **Acta IV Congreso Latinoamericano de Zoología** 1:65-78, 1970b.

BOGART, J.P. Evolution of anuran karyotypes. In: VIAL, J.L. (Ed.) **Evolutionary Biology of Anurans**. Columbia: University of Missouri Press, p. 337-349, 1973.

BOGART, J.P. A karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). **Copeia** 3:728-737, 1974.

CAMPOS J.R.C ; ANANIAS, F. ; HADDAD, C. F. B. ; KASAHARA, S. Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae). **Micron** 39:151-159, 2008.

CAMPOS, J.R.C.; ANANIAS, F.; BRASILEIRO, C.A.; YAMAMOTO, M.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae). with phylogenetic considerations. **Hereditas** 146:104-111, 2009.

CARAMASCHI, U. Taxonomic status of *Leptodactylus ochraceus*, a forgotten species (Anura, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Zoologia** 25:523-528, 2008.

CARAMASCHI, U.; FEIO, R.N.; SÃO-PEDRO, V.A. A new species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) from Serra do Brigadeiro, state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Zootaxa** 1861:44-54, 2008.

CARVALHO, K.A.; GARCIA, P.C.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic comparisons of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). **Genetics and Molecular Research** 8:1498-1508, 2009.

CHRISTIAN, A.; MCNIEL, E.; ROBINSON, J.; DRABEK, J.; LARUE, C.; WALDREN, C.; BEDFORD, J. A versatile image analyses approach for simultaneous chromosome identification and localisation of FISH probes. **Cytogenetics and Cell Genetics** 82:172-179, 1998.

DANIEL-SILVA, M.F.Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research** 109:497-501, 2005.

DARST, C.R.; CANATELLA, D.C. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31:462-475, 2004.

DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. **Journal of Herpetology** 6:71-74, 1972.

DE SÁ, R.O.; HEYER, W.R.; CAMARGO, A. A phylogenetic analysis of *Vanzolinius* Heyer, 1974 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): taxonomic and life history implications. **Arquivos do Museu Nacional**, 63:707-72, 2005.

DOBIGNY, G.; NOMAO, A.; GAUTUN, J.C. A cytotaxonomic survey of rodents from Niger: implications for systematics, biodiversity and biogeography. **Mammalia** 66:495-523, 2002.

DUELLEMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1994.

DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J. **La Pratique de L'Analyse Chromosomique**. Paris: Masson, 1981.

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.

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.

FORD, L.S.; CANATELLA, D.C. The major clades of frogs. **Herpetological Monographs** 7:94-117, 1993.

FORESTI, F. **Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura)**. 1972. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

FROST, D.R. **Amphibian Species of the World**: an Online Reference. Version 5.5. New York: American Museum of Natural History, 2011. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; DE SÁ R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 297:1-370, 2006.

GIARETTA, A.A.; COSTA, H.C.M. A redescription of *Leptodactylus jolyi* Sazima and Bokermann (Anura, Leptodactylidae) and the recognition of a new closely related species. **Zootaxa** 1608:1-10, 2007.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** 53:37-50, 1975.

GRANT, T.; FROST, D.R.; CALDWELL, J.P.; GAGLIARDO, R.; HADDAD, C.F.B.; KOK, P.J.R.; MEANS, D.B.; NOONAN, B.P.; SCHARGEL, W.E.; WHEELER, W.C. Phylogenetic systematic of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History** 269:1-262, 2006.

GREEN, D.M.; SESSIONS, S.K. Nomenclature for chromosomes. In: GREEN, D.M., SESSIONS, S.K. (Ed.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego: Academic Press, p. 431-432, 1991.

GREEN, D.M.; SESSIONS, S.K. Karyology and Cytogenetics. In: HEATWOLE, H., TYLER, M. (Ed.) **Amphibian Biology, vol. 7. Systematics**. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons, p. 2756-2841, 2007.

GROMICHO M.; OZOUF-COSTAZ, C.; COLLARES-PEREIRA, M.J. Lack of correspondence between CMA₃-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two

Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. **Cytogenetic and Genome Research** 109:507-511, 2005.

GRUBER, S.L.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n=24$ to $2n=22$ in the genus. **Genetica** 130:281-291, 2007.

GRÜTZNER, F.; RENS W.; TSEND-AYUSH E.; EL-MOGHHARBEL N.; O'BRIEN P.C.M.; JONES R.C.; FERGUSON-SMITH M.A.; GRAVES, J.A.M. In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. **Nature** 3021:1-5, 2004.

GUERRA, M. (Ed.) **Fish. Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

GUSTASHAW, K.M. Chromosome Stains. In: BARCH, M.J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J.L. **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**. 3. ed. Philadelphia: Lippinkott-Raven Publishers, p. 280-283, 1997.

HAAS, A. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia, Anura). **Cladistics** 19:23-89, 2003.

HASS, I.; SBALQUEIRO, I.J.; MÜLLER, S. Chromosomal phylogeny of four Akodontini species (Rodentia, Cricetidae) from Southern Brazil established by Zoo-FISH using *Mus musculus* (Muridae) painting probes. **Chromosome Research** 16:75-78, 2008.

HEDGES, S.B.; DUELLMAN, W.E.; HEINICKE, M.P. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. **Zootaxa** 1737:1-182, 2008.

HEYER, W.R. The adaptative ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution** 23:421-428, 1969.

HEYER, W.R. Systematic of the *marmoratus* group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Contributions in Science Natural History Museum** 251:1-50, 1973.

HEYER, W.R. Relationships of the *marmoratus* species group (Amphibia, Leptodactylidae) within the subfamily Leptodactylinae. **Contributions in Science** 254:1-45, 1974.

HEYER, W.R. *Adenomera lutzi* (Amphibia: Leptodactylidae), a new species of frog from Guyana. **Proceedings of the Biology Society of Washington** 88:315-318, 1975.

HEYER, W.R. A discriminant function analysis of the frogs of the genus *Adenomera* (Amphibia: Leptodactylidae). **Proceedings of the Biology Society of Washington** 89:581-592, 1977.

HEYER, W.R. The relationships of *Leptodactylus diedrus* (Anura, Leptodactylidae). **Alytes** 16:1-24, 1998.

HEYER, W.R.; DIMENT, M.J. The karyotype of *Vanzolinius discodactylus* and comments on usefulness of karyotypes in determining relationships in the *Leptodactylus* complex (Amphibia, Leptodactylidae). **Proceedings of the Biology Society of Washington** 87:327-336, 1974.

HEYER, W.R.; MAXSON, L.R. Distributions, relationships, and zoogeography of lowland frogs. The *Leptodactylus* complex in South America, with special reference to Amazonia. In: PRANCE, G.T. (Ed.) **Biological Diversification in the Tropics**. New York: Columbia University Press, p. 375-388, 1982.

HEYER, M.H.; HEYER, W.R.; DE SÁ, R.O. Bibliography of the frogs of the *Leptodactylus* clade – *Adenomera*, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Lithodytes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Smithsonian Herpetological Information Service** 1:1-677, 2009.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia** 36:1014-1015, 1980.

KASAHARA, S. **Introdução à Citogenética de Vertebrados**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009.

KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M.T. Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae). **Caryologia**, 40:43-57, 1987.

KASAHARA, S.; SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufoidea). **Brazilian Journal of Genetics**, 19:237-242, 1996.

KASAHARA, S.; SILVA, A.P.Z.; GRUBER, S.L. Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). **Genetics and Molecular Biology** 21:471-476, 1998.

KASAHARA, S.; SILVA, A.P.Z.; GRUBER, S.L.; HADDAD, C.F.B. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. **Cytogenetic and Genome Research** 103:155-162, 2003.

KING, M. Amphibia. In: JOHN, B. **Animal Cytogenetics. Amphibia, 4. Chordata 2.** Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1990.

KOHNO, S.; KURO-O, M.; IKEBE, C. Cytogenetics and Evolution of Hynobiid Salamanders. In: Green, D.M., Sessions, S.K. (Ed.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution.** San Diego: Academic Press, 456 p., 1991.

KOKUBUM, M.N.; GIARETTA, A.A. Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) with endotrophic tadpoles: systematic implications. **Journal of Natural History** 39:1745-1758, 2005.

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.

KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anurans amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education** 39:83-127, 1990.

KURO-O, M.; IKEBE, C.; KOHNO, S. Cytogenetics studies of Hynobiinae (Urodela) IV. DNA replication bands (R-banding) in the genus *Hynobius* and the banding karyotype of *Hynobius nigrescens* Stejneger. **Cytogenetics and Cell Genetics** 43:14-18, 1986.

KWET, A.; STEINER, J.; ZILLIKENS, A. A new species of *Adenomera* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Atlantic Rain Forest in Santa Catarina, southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 44:93-107, 2009

LAVILLA, E.O.; LANGONE, J.A.; CARAMASCHI, U.; HEYER, W.R.; DE SÁ, R.O. The identification of *Rana ocellata* Linnaeus, 1758. Nomenclatural impact on the species currently known as *Leptodactylus ocellatus* (Leptodactylidae) and *Osteopilus brunneus* (Gosse, 1851) (Hylidae). **Zootaxa** 2346:1-16, 2010.

LOURENÇO, L.B.; GARCIA, P.C.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae) with phylogenetic comments. **Hereditas** 113:201-209, 2000.

LOURENÇO, L.B.; BACCI-JÚNIOR, M.; MARTINS, V.G.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; HADDAD, C.F.B. Molecular Phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). **Genetica** 132:255-266, 2008.

LUCCA, E.J.; JIM, J.; FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia** 27:183-192, 1974.

LYNCH, J.D. Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. University of Kansas Museum of Natural History, **Miscellaneous Publications** 53:1-238, 1971.

MATSUI, M.; SETO, T.; KOHSAKA, Y.; BORKIN, L.J. Bearing of chromosome C-banding patterns on the classification of Eurasian toads of the *Bufo bufo* complex. **Amphibia-Reptilia** 6:23-33, 1985.

MATSUDA Y. CHAPMAN V.N. Application of fluorescence *in situ* hybridization in genome analysis of the mouse. **Electrophoresis** 16:261-272, 1995.

MAXSON, L.R.; HEYER, W.R. Molecular systematic of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Fieldiana Zoology** 1384:1-13, 1988.

MEUNIER-ROTIVAL, M.; CORTADAS, J.; MACAYA, G.; BERNARDI, G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucleic Acids Research** 6:2109-2123, 1979.

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.

MIURA, I. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog, *Rana japonica*. I-Sex-related heteromorphism of the distribution pattern of constitutive heterochromatin in chromosome n. 4 of the Wakuya population. **Zoological Science** 11:797-806, 1994.

MIURA, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia-Anura). **Chromosoma** 103:567-574, 1995.

MORESCALCHI, A. Amphibia. In: CHIARELLI, A.B.; CAPANNA, E. (Ed.), **Cytotaxonomy and vertebrate evolution**. London: Academic Press, p. 233-248, 1973.

MURAKAMI, T.; MAKI, N.; NISHIDA-UMEHARA, C.; MATSUDA, Y.; AGATA, K. Establishment of high-resolution FISH mapping system and its application for molecular cytogenetic characterization of chromosomes in newt, *Cynops pyrrhogaster* (Urodela, Amphibia). **Chromosome Research** 15:471-484, 2007.

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** 11:28-36, 2010.

NANDA, I.; FUGATE, M.; STEINLEIN, C.; SCHMID, M. Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. **Cytogenetic and Genome Research** 122:396-400, 2008.

NISHIOKA, M.; MIURA, I.; SAITOH, K. Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanisms. **Scientific Report of the Laboratory for Amphibian Biology** 12:55-81, 1993.

NISHIOKA, M.; HANADA, H.; MIURA, I.; RYUZAKI, M. Four kinds of sex chromosomes in *Rana rugosa*. **Scientific Report of the Laboratory for Amphibian Biology**, 13:1-34, 1994.

OHNO, S. **Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes**. Berlin: Springer, 1967.

OLIVEIRA, E.H.C.; HABERMANN, F.A.; LACERDA, O.; SBALQUEIRO, I.J.; WIENBERG J.; MÜLLER, S. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). **Chromosoma** 114:338-343, 2005.

PELLEGRINO K.C.M.; KASAHARA, S.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Pericentric inversion events in karyotypic distinction of lizards of genus *Phyllopezus* (Squamata, Gekkonidae) detected by chromosomal banding patterns. **Hereditas** 127:255-262, 1997.

PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y. Pintura cromossômica como instrumento para estudos filogenéticos em primatas. In: Guerra, M. (Ed.) **Fish. Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 115-132, 2004.

PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y.; O'BRIEM, P.C.M.; YANG, F.; RENS, W.; BARROS, R.M.S.; NORONHA, R.C.R.; RISSINO, J.D.; OLIVEIRA, E.H.C.; FERGUSON-SMITH, M.A. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). **Chromosome Research** 13:339-347, 2005.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 83:2934-2938, 1986.

PONSSA, M.L.; BRUSQUETTI, F.; SOUZA, F.L. Osteology and intraspecific variation of *Leptodactylus podicipinus* (Anura:Leptodactylidae), with comments on the relationship between osteology and reproductive modes. **Journal of Herpetology** 45:79-93, 2011.

PRADO, C.P.A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C.F.B. Description of a new reproductive mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a review of the reproductive specialization toward terrestriality in the genus. **Copeia** 4:1128-1133, 2002.

QUINDERÉ, Y.R.S.D.; LOURENÇO, L.B.; ANDRADE, G.V.; TOMATIS, C.; BALDO, D.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing regions. **Biological Research** 42:79-92, 2009.

RABELLO, M.N.; BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W. Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. **Arquivos do Museu Nacional** 54:285-286, 1971.

RUVINSKY, I.; MAXSON, L.R. Phylogenetic relationship among Bufonoid frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 3:533-547, 1996.

SÁNCHEZ, A.; JIMÉNEZ, R.; BURGOS, M.; STITOU, S.; ZURITA, F.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. **Heredity** 75:10-16, 1995.

SBH. **Brazilian amphibians – List of species**. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2010. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>> Acesso em: 4 mar. 2011.

SCHEMPP, W.; SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. VI. BrdU replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. **Chromosoma** 83:697-710, 1981.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** 66:361-388, 1978a.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Ranidae*, *Microhylidae* and *Rhacophoridae*. **Chromosoma** 68:131-148, 1978b.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** 77:83-103, 1980.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87:327-344, 1982.

SCHMID, M.; GUTTENBACH, M. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome band in vertebrates. **Chromosoma** 97:101-114, 1988.

SCHMID, M.; KLETT, R. Chromosome banding in Amphibia. XX. DNA replication patterns in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). **Cytogenetics and Cell Genetics** 65:122-126, 1994.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C. Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. **Chromosoma** 101:123-132, 1991.

SCHMID, M., HAAF, T., SCHEMPP, W. Chromosome banding in Amphibia. IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura – Leptodactylidae). **Chromosoma** 91:172-184, 1985.

SCHMID, M.; VITELLI, L.; BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizer, 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma** 95:271-284, 1987.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; FEICHTINGER, W. Chromosome banding in Amphibia. XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). **Chromosoma** 97:434-438, 1989.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; NANDA, I.; EPPLEN, J.T. Chromosome banding in Amphibia. In: OLMO, E. (Ed.) **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**. Basel: Birkhauser Verlag, p. 21-45, 1990a.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; FRIEDL, R.; ALMEIDA, C.G.; HAAF, T.; HILLIS, D.M. E DUELLMAN, W.E. Chromosome banding in Amphibia XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). **Chromosoma** 99:413-423, 1990b.

SCHMID, M.; NANDA, I.; STEINLEIN, C.; KAUSCH, K.; EPPLEN, J.T.; HAAF, T. Sex determining mechanisms and sex chromosomes in amphibia. In: GREEN, D.M., SESSIONS, S.K. (Ed.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego: Academic Press, p. 393-430, 1991.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; FEICHTINGER, W.; POOT, M. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenetics and Cell Genetics** 62:42-48, 1993a.

SCHMID, M.; OHTA S.; STEINLEIN C.; GUTTENBACH M. Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). **Cytogenetics and Cell Genetics** 62:238-246, 1993b.

SCHMID, M.; FEICHTINGER, W.; WEIMER, R.; MAIS, C.; BOLAÑOS, F.; LEÓN, P. Chromosome banding in Amphibia. XXI Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura-Hylidae). **Cytogenetics and Cell Genetics** 69:18-26, 1995.

SCHMID, M.; HAAF, T.; STEILEIN, C.; NANDA, I.; MAHONY, M. Chromosome banding in Amphibia. XXV. Karyotype evolution heterocromatin characterization in Australian *Mixophyes* (Anura, Myobatrachidae). **Cytogenetic and Genome Research** 97:239-253, 2002.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; HAAF, T. Chromosome banding in Amphibia. XXVII. DNA replication banding patterns in three anuran species with greatly differing genome sizes. **Cytogenetic and Genome Research** 101:54-61, 2003.

SCHMID, M.; BOGART, J.P.; HEDGES, S.B. (Ed.). The chromosomes of Terraranan frogs: Insights into vertebrate cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research** 130-131:1-568, 2010.

SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. **Hereditas** 131: 135-141, 1999.

SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. **Cytobios** 103:25-38, 2000.

SILVA, A.P.Z.; GARCIA, P.C.A.; MARTINS, V.G.; BACCI, M. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. **Amphibia-Reptilia** 25:185-196, 2004.

SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; GALASSI, G.G.; KASAHARA, S. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. **Genetica** 127:35-44, 2006.

SINGH, L.; PURDOM, I.F.; JONES, K.W. Satellite DNAs and evolution of sex chromosomes. **Chromosoma** 59:43-62, 1976.

SIQUEIRA, JR. S.; ANANIAS, F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. **Genetics and Molecular Biology** 27:363-372, 2004.

SIQUEIRA, S.; AGUIAR JR., O.; SOUZA, M.B.; LIMA, A.P.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Unusual intra-individual karyotypical variation and evidence of cryptic species in

Amazonian populations of *Pristimantis* (Anura, Terrarana). **Hereditas** 146:141-151, 2009.

STRICKBERGER, M.W. **Genetics**, 2 ed. New York: Macmillan Publishing, 1976.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75:304-306, 1972.

SUMNER, A.T. **Chromosomes. Organization and Function.**, Oxford: Blackwell Publishing, 2003.

TARGUETA, C.P.; RIVERA, M.; SOUZA, M.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; LOURENÇO, L.B. Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura; Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetic relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 54:709-725, 2010.

UNO, Y.; NISHIDA, C.; OSHIMA, Y.; YOKOYAMA, S.; MIURA, I.; MATSUDA, Y.; NAKAMURA, M. Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangements in the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, Ranidae) with ZW and XY sex chromosome systems. **Chromosome Research** 16:637-647, 2008a.

UNO, Y.; NISHIDA, C.; YOSHIMOTO, S.; ITO, M.; OSHIMA, Y.; YOKOYAMA, S.; NAKAMURA, M.; MATSUDA, Y. Diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three species of the Raninae and Xenopodinae. **Chromosome Research** 16:999-1011, 2008b.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human Chromosomes. Principles and Techniques**, 2 ed., New York: McGraw-Hill, 1995.

VENTURA, K.; SILVA, M.J.J.; FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). **Cytogenetic and Genome Research** 115:169-175, 2006.

VITELLI, L.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F.; NARDI, I.; BARSACCHI-PILONE, G. Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. **Chromosoma** 84:475-491, 1982.

WILEY, J.E.; MEYNE, J.; LITTLE, M.L.; STORET, 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.

YONENAGA-YASSUDA, Y.; KASAHARA, S.; CHU, T.H.; RODRIGUES, M.T. High resolution RBG-banding pattern in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae). **Cytogenetics and Cell Genetics** 48:68-71, 1988.

ZARACHO, V.H.; HERNANDO, A.B. The karyotype of *Adenomera diptyx* (Boettger 1885) (Anura, Leptodactylidae) from northeastern Argentina. **Genetics and Molecular Biology** 34:84-87, 2011.

ZUG, G.R. **Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles.** San Diego: Academic Press, 1993.