

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 19/02/2021.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**Estudo citogenético de dois grupos de anuros brasileiros (Anura –
Amphibia) envolvidos em problemáticas taxonômicas**

LUIZA RIEDER CHOLAK

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Fevereiro - 2020

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE DOIS GRUPOS DE ANUROS
BRASILEIROS (ANURA – AMPHIBIA) ENVOLVIDOS EM
PROBLEMÁTICAS TAXONÔMICAS**

Luiza Rieder Cholak

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Patricia Pasquali Parise-Maltempi

Rio Claro, São Paulo, Brasil
Fevereiro – 2020

C547e

Cholak, Luiza Rieder

Estudo citogenético de dois grupos de anuros brasileiros (Anura - Amphibia) envolvidos em problemáticas taxonômicas / Luiza Rieder Cholak. -- Rio Claro, 2020

100 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Patricia Pasquali Parise-Maltempi

1. Genética Animal. 2. Citogenética. 3. Anuros. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: **Utilização da citogenética como ferramenta de auxílio para elucidar problemas taxonômicos de três grupos de anuros brasileiros (Anura – Amphibia)**

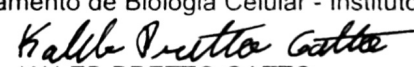
AUTORA: LUIZA RIEDER CHOLAK

ORIENTADORA: PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

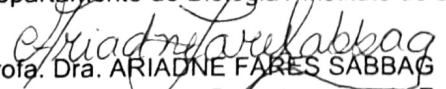
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro-SP


Profa. Dra. LUCIANA BOLSONI LOURENÇO
Departamento de Biologia Celular - Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas - SP


Prof. Dr. KALEB PRETTO GATTO
Pós-Doutorando do Departamento de Zoologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP


Prof. Dr. DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro-SP


Profa. Dra. ARIADNE FARES SABBAG
Pós-Doutoranda do Departamento de Zoologia - Laboratório de Herpetologia - CAUNESP / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Rio Claro, 19 de fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

O que esse trabalho mais deveria conter são agradecimentos. Ciência não se faz sem ajuda, não a boa ciência. Eu comecei esse doutorado sem saber (quase) nada de (cito) genética, a não ser o básico que se sabe quando se é formada em Biologia. O que sabia é que amava (e ainda amo) Biologia, achava genética algo fascinante. Sabia também do desafio que seria me comprometer com um Doutorado em uma área de pouca familiaridade e nenhum domínio, sendo essa área tão abstrata, como é a Biologia Molecular. A partir do momento em que ingressei no Programa, cada conhecimento que adquiri, cada pedaço do que esse trabalho se tornou e do que eu me tornei, como pessoa e profissional, eu devo a pessoas incríveis que carregarei sempre comigo e a quem serei sempre grata. Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Patrícia, que está comigo nessa trajetória desde o início e que sempre cuidou muito bem da sua equipe e do seu laboratório, sendo paciente, compreensiva e competente, obrigada por tudo Pati! Ao Thiago Gazoni, por me passar sua experiência milenar com a citogenética (rs desculpe a brincadeira), por me auxiliar em coletas e por me dar valiosos conselhos. Ao Rafael Borba, que além de colega de laboratório, é meu amigo da vida, uma das melhores pessoas que tive o prazer de conhecer e que tanto me ensinou (e ainda ensina) sobre rotina de laboratório e genética, sem ele minhas coletas não teriam acontecido. À Ariadne Sabbag, por tanta coisa...rs Ari, obrigada por me ajudar a coletar, por me ajudar a discutir meu trabalho, por ter aceitado contribuir na minha qualificação (já melhorei bastante, juro rs), por ter aceitado participar da minha banca de defesa e por ter dado a mim, e à ciência, trabalhos tão maravilhosos com *Thoropa*. E obrigada mais que tudo pela amizade e boa vontade.

Obrigada aos meus grandes amigos Marcelo Silva, Carolina Crepaldi e Murilo Durigon por toda imensa ajuda, fazendo experimentos para mim quando eu estava apertada com prazos, coletando, opinando nos meus trabalhos, tirando dúvidas e enchendo minha rotina de risadas e companheirismo. Sem vocês meus dias teriam sido mais tristes. Obrigada à Giselle Pessoa por me ajudar diretamente e tão eficientemente com parte do meu trabalho, foi uma ajuda inestimável e que gerou um TCC lindo. Obrigada à Raquel Destro, Évelin Mariani, Luciana Latsch e Matheus Tagliaferro, por toda ajuda e toda risada dada! Vocês são a melhor equipe de trabalho que eu poderia querer, pessoas competentes, inteligentes, inspiradoras e colaborativas. A ciência precisa de mais pesquisadores como vocês.

Agradeço também à toda equipe do prof. Diogo, que sempre dividiram o laboratório, a rotina e os reagentes comigo rs. Muito obrigada por contribuírem tanto com meu crescimento profissional e por terem paciência com as inexperiências. Devo um agradecimento especial à

Vanessa Bardela e à Ana Beatriz Ferretti, vocês estão entre as pessoas que mais me ajudaram com dicas de laboratório, conselhos acadêmicos, discussões acadêmicas e conversas triviais que aliviaram meus dias. Meu eterno agradecimento.

Sem dúvida merecem minha gratidão outros colegas de programa que foram fundamentais na minha vida e na minha formação: aos amigos Rafael Borba, Allison Anjos, Manuela Ramalho, Adna Dorigo, Letícia Ramos, Iago Bueno, Luís Adriano, Pamela Décio, Corina Barrera e Ana Cláudia Marcato (Matraquinha) por começarem e continuarem comigo uma das melhores partes do meu doutorado, nossa menina dos olhos, o Projeto Primeiros Passos na Ciência. Com esse projeto aprendi coisas valiosas que a academia *per se* não foi capaz de ensinar. Com vocês eu ralei, chorei e gargalhei, e nenhuma das experiências vividas com esse projeto tem preço. Além deste, vocês também estiveram comigo em outros projetos importantes (BioCelMol, Junção GAP), tentando sempre melhorar nosso programa de Pós e sempre abraçaram propostas que envolvessem divulgar nossos trabalhos para a comunidade. Por serem tão especiais, comprometidos, se importarem com questões que eu julgo tão fundamentais e compartilharem comigo tudo isso, eu sou imensamente grata. Vocês, além de pesquisadores que eu admiro e nos quais eu me espelho, são amigos para vida toda.

Marco Aurélio Oliveira, Marcela Aragão, Bruna Albuquerque, Laura Jiménez, José Renato Ribeiro e Arthur Lima, não tenho palavras para expressar quão importante a APG foi na minha vida e na minha formação e vocês fizeram parte diretamente disso, de todo meu crescimento. Obrigada de todo coração por me ensinarem a trabalhar em equipe, a lutar pelo que julgo importante, a lutar pela nossa Universidade e pela Educação, a enfrentar as infundáveis e maçantes burocracias (para tudo! hahaha). Juntos fundamos uma APG, com CNPJ e tudo (ulhuuuul!), fizemos eventos incríveis e demos um pouco de cada um de nós para tentar tornar a pós-graduação um lugar melhor e mais crítico. Sigo aprendendo e me espelhando em vocês.

Ao prof. Célio Haddad, um obrigada que vem desde a minha graduação. Você é quem vem acompanhando minha jornada como Bióloga e pesquisadora a mais tempo, sempre contribuiu imensamente com meus trabalhos e é inestimável o valor de trabalhar com um pesquisador tão respeitado como você. Obrigada também à toda sua equipe, formada sempre por pesquisadores excelentes. Agradeço especialmente à Mariana Lyra, Pedro Taucce e Délio Baêta por me auxiliarem na elaboração do meu projeto e com coletas.

Obrigada aos meus alunos de ênfase, vocês tiveram o desafio de serem minha primeira turma de alunos e passaram com louvor.

Um agradecimento mais que especial à prof. Maria Antônia Ramos de Azevedo e à Rosemary Donizeti (Rose), que me abraçaram e abraçaram a APG de uma forma tocante. Admiro muito vocês duas, como profissionais e como pessoas. Obrigada por tudo!

Agradeço imensamente a meus migues do coração que são pessoas tão lindas que eu nem acredito: Mão, Mari, Yuri, Lucas e Cori. Obrigada por existirem na minha vida e por me ajudarem a segurar essa barra que é gostar de pesquisa no Brasil (rs). Amo vocês!

Obrigada a todos vocês que enriqueceram minha mente e meu coração, foram quatro anos intensos e difíceis, mas que valeram muito a pena, em grande parte por vocês.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Bom, não é usual o agradecimento continuar depois que acaba (rs), mas tenho um especial a fazer. Meu maior agradecimento vai à minha família. Família gritona e intensa que sempre me apoiou, sempre me incentivou a fazer o que eu realmente queria, botou fé que todo esse tempo e esforço me levaria a conseguir um bom emprego (vamos continuar aí com os dedinhos cruzados né rs) e que sempre me deu muito amor e muita segurança. Vocês são a melhor família que eu poderia querer e se eu sou chata assim, devo a vocês (rs). Pai, mãe, Bruno, vocês estão entre as pessoas mais inteligentes que eu conheço e se eu me esforço tanto é para não ficar aquém de vocês. Vó, nem preciso dizer que você começou tudo isso né...rs a vênha mais porreta desse mundo, quero chegar à sua idade com sua disposição, saúde, lucidez e beleza. Você é uma das pessoas mais corretas que eu conheço e me espelho muito em você para ser sempre o melhor de mim. Amo muito todos vocês!!

Por fim, um agradecimento que se estende por tantas coisas...Artur, você representa tantas coisas boas nesses quatro anos. Obrigada por aliviar a barra desse doutorado tantas vezes, por me aguentar chorando e por aguentar minhas crises, só o fato de poder conversar com você nesses momentos difíceis já me tranquilizava. Obrigada por ser paciente com minha chatice e por dividir tantos anos comigo, como amigo e como namorado. Seu amor foi e é fundamental para mim. Amo você para sempre.

Calma, agora é o último agradecimento mesmo! Pode ser piegas, mas devo um agradecimento a criaturinhas que não vão ler isso aqui, mas acho necessário dividir a importância deles na minha vida. Joey, Téo e Massa, chegar em casa todos os dias e ter festinha desses três pentelhos era a melhor parte do meu dia. Vocês fazem meus dias mais felizes, mais leves. Amor puro, dizem...

Entre tantos agradecimentos, muitos outros talvez tenham faltado, mas todos vocês estão no meu coração (e nessa tese). A frase do momento é “ninguém solta a mão de ninguém”. É da mão de pessoas como vocês que não quero soltar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido através do processo 2017/00195-7.

O mundo

Eduardo Galeano

“Um homem da aldeia de Neguá, no litoral da Colômbia, conseguiu subir aos céus. Quando voltou, contou. Disse que tinha contemplado, lá do alto, a vida humana. E disse que somos um mar de fogueirinhas. - O mundo é isso - revelou -. Um montão de gente, um mar de fogueirinhas. Cada pessoa brilha com luz própria entre todas as outras. Não existem duas fogueiras iguais. Existem fogueiras grandes e fogueiras pequenas e fogueiras de todas as cores. Existe gente de fogo sereno, que nem percebe o vento, e gente de fogo louco, que enche o ar de chispas. Alguns fogos, fogos bobos, não alumiam nem queimam; mas outros incendeiam a vida com tamanha vontade que é impossível olhar para eles sem pestanejar, e quem chegar perto pega fogo”.

RESUMO

Os anfíbios anuros correspondem ao segundo grupo de vertebrados com maior número de espécies, perdendo apenas para os peixes. Só no Brasil são mais de 1000 espécies descritas, com novas descrições e revalidações acontecendo todo ano. Esse grupo está envolvido em diversas problemáticas taxonômicas, em parte por ser altamente polimórfico e ao mesmo tempo conter muitas espécies crípticas, em parte por ainda haver muitas lacunas no conhecimento acerca desse grupo, dado o tamanho da sua diversidade. Resolver problemáticas envolvendo esse grupo de vertebrados é fundamental para melhor estimar o tamanho real dessa diversidade, entender os caminhos evolutivos e as relações filogenéticas no grupo e poder auxiliar na conservação das espécies, traçando planos de manejo adequados, já que o declínio de anfíbios devido à perda e fragmentação de habitat, contaminação de ambientes naturais e disseminação de doenças tem aumentado vertiginosamente. Para isso, a taxonomia moderna conta com a soma de diferentes informações a respeito dos grupos, além dos dados morfológicos já tradicionalmente utilizados. Uma das áreas que tem se mostrado promissora como uma ferramenta de auxílio na taxonomia é a citogenética, especialmente depois do advento da citogenômica, além da sua importância para o entendimento da evolução cromossômica dos grupos. No entanto, trabalhos citogenéticos, especialmente aqueles aliados à biologia molecular, são escassos em anuros. Seguindo essa linha, esse trabalho buscou obter marcadores moleculares que pudessem auxiliar no esclarecimento de questões taxonômicas acerca de dois grupos de anuros endêmicos do Brasil, *Thoropa* Cope, 1865 e *Haddadus binotatus* (Spix, 1824). Para isso foram utilizados marcadores convencionais e moleculares, além de análises citogenômicas, com o auxílio de programas de bioinformática.

Palavras-chave: Citogenômica. DNA repetitivo. *Thoropa*. *Haddadus binotatus*.

ABSTRACT

Anuran amphibians corresponds to one of the most diverse vertebrate groups, second only to fishes. In Brazil alone there are more than 1000 described species, with new descriptions and revalidations happening every year. This group is involved in several taxonomic issues, partially because it is highly polymorphic and at the same time contains many cryptic species, partially because there are still many gaps in knowledge about this group, given the size of its diversity. To solve these problems is a fundamental step to better estimate its true size, to understand the evolutionary pathways and phylogenetic relationships in the group and also to be able to contribute to the conservation of the species by helping to draw appropriate management plans, as the decline of amphibians due to habitat loss and fragmentation, contamination of natural environments and the spread of disease has increased dramatically. For this, modern taxonomy relies on the sum of different data about the groups, besides the morphological data traditionally used. One of the areas that has shown promise as a taxonomy tool is cytogenetics, especially after the advent of cytogenomics, in addition to its importance for understanding the chromosomal evolution of groups. However, cytogenetic studies, especially those allied to molecular biology, are scarce in anurans. Following this line, this work sought, through the cytogenetic study, using conventional molecular markers, and cytogenomic, with the help of bioinformatics softwares in obtaining more specific markers, to add data that can clarify taxonomic questions about two groups of endemic anurans of Brazil, *Thoropa* Cope, 1865 and *Haddadus binotatus* (Spix, 1824).

Key-words: Cytogenomics. Repetitive DNA. *Thoropa*. *Haddadus binotatus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

Pb – Pares de bases

rDNA – DNA ribossomal (*ribosomal DNA*)

rRNA – RNA ribossomal (*ribosomal RNA*)

snDNA – DNA que codifica snRNA

snRNA – Pequeno RNA nuclear (*small nuclear RNA*)

SatDNA – DNA satélite (*satellite DNA*)

TE – Elementos transponíveis (*transposable elements*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

FISH – Hibridação *in situ* fluorescente (*fluorescent in situ hybridization*)

FITC - Fluoresceína isoticianato-avidina conjugada

SSC – Tampão de citrato sódio-cloreto (*saline-sodium citrate buffer*)

PBS – Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*)

PBD – Detergente fosfato-tamponado (*phosphate-buffered detergente*)

DAPI - 4', 6-diamidino-2'-phenylindole

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados (*deoxynucleotide triphosphate*)

T° - Temperatura

°C – Graus Célsius

RNase – Ribonuclease

Tris-HCl – Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

KCl – Cloreto de potássio

MgCl² – Cloreto de magnésio

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 <i>Thoropa</i> Cope, 1865	16
1.2 <i>Haddadus binotatus</i> (Spix, 1824).....	18
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Coleta de exemplares.....	21
3.2 Preparações cromossômicas	22
3.3 Técnicas de citogenética clássica	22
3.4 Sequenciamento de DNA genômico e análises de bioinformática para busca e caracterização de DNA satélites.....	24
3.5 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH), segundo Pinkel et al. (1986) com modificações de Cabral-de-Mello et al. (2010)	25
3.6 Análise dos cariótipos.....	26
4 RESULTADOS	27
4.1 CAPÍTULO I - Cytogenetic analysis of four species of <i>Thoropa</i> Cope, 1865 (Anura-Cycloramphidae), with evolutionary inferences based on repetitive sequences	28
4.2 CAPÍTULO 2 - Satellite DNA description and chromosome mapping in <i>Thoropa</i> Cope, 1865 (Anura-Cycloramphidae): evolutionary and taxonomic inferences	45
4.3 CAPÍTULO 3 - Investigação e comparação citogenética de diferentes populações de <i>Haddadus binotatus</i> (Spix, 1824) - um possível complexo de espécies com complexo cariótipo.....	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PRÓXIMOS PASSOS	88
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os anfíbios anuros constituem o grupo de vertebrados tetrápodes mais diverso, sendo 7.193 espécies descritas até hoje no mundo (FROST, Darrel R. 2020, acessado em abril de 2020). O Brasil, por sua vez, abriga boa parte dessa diversidade, com 1.137 espécies, sendo a maioria endêmica do país (SEGALLA et al., 2019). Por ser um grupo tão grande, estudos profundos de história natural, ecologia, citogenética, bioacústica, entre outros, não contemplam ainda toda essa diversidade (OLIVEIRA et al., 2017). O tamanho do grupo também leva a dúvidas com relação à classificação, e muitos grupos aparecem envolvidos em problemas taxonômicos. Uma das razões para essa dificuldade é o fato de os anuros constituírem um grupo altamente polimórfico e, ao mesmo tempo, com muitas espécies crípticas (SILVA et al., 2004).

A taxonomia tradicional é baseada em descrições morfológicas, descrevendo - e delimitando, conseqüentemente - espécies exclusivamente através da morfologia, que por si só se constitui em apenas uma das muitas facetas que o estudo da biodiversidade apresenta (DAYRAT, 2005). Apesar da importância que a descrição morfológica tenha para a validação de espécies (e aí quando falamos em espécies esbarramos em outro aspecto que caracteriza a discussão que a taxonomia enfrenta atualmente: o conceito de espécie - DAYRAT, 2005; PADIAL et al., 2010), as hipóteses levantadas pela morfologia devem ser testadas através de outras abordagens. Assim, para diferenciar espécies, a taxonomia moderna, também chamada de taxonomia integrativa, usa de informações alternativas e aditivas à morfologia, como análises citogenéticas, moleculares, características estruturais de gametas, ecologia, bioacústica, entre outros (GROSJEAN, 2005; PADIA & RIVA, 2009; BRUSCHI et al., 2013; KÖHLER et al., 2017; MAGALHÃES et al., 2018). Nesse contexto, análises citogenéticas têm sido utilizadas em abordagens taxonômicas e filogenéticas como uma forma de prover mais informações a fim de auxiliar em tais problemáticas (BRUSCHI et al., 2012), já que a comparação cariotípica entre espécies, populações da mesma espécie, e até mesmo gêneros, podem ser úteis não só ao entendimento de como ocorre a diversificação cromossômica nos grupos, como também auxiliar na compreensão sobre as relações filogenéticas dentro e entre gêneros (AGUIAR JR. et al., 2002).

Nas duas últimas décadas, importantes revisões taxonômicas foram realizadas em Anura, baseando-se principalmente em dados morfológicos e moleculares (FAIVOVICH et al., 2005; FROST et al., 2006; GRANT et al., 2006; HEDGES et al., 2008; DUELLMAN et al., 2016), mas muitas questões ainda permanecem em aberto. Ao mesmo tempo, muitas espécies de anuros foram cariotipadas até hoje e a comparação dos cariótipos entre grupos ou espécies pode

mostrar tanto variação quanto conservação cromossômica, sendo que a variação cariotípica está evidentemente associada à especiação em inúmeros casos como é o exemplo dos gêneros de anuros *Eleutherodactylus* Duméril and Bibron, 1841 e *Hyla* Laurenti, 1768 que abarcavam muitas espécies que hoje sabe-se pertencerem a gêneros e até famílias diferentes, e eram considerados gêneros com grande número de polimorfismos, devido à grande variação cariotípica existente entre essas espécies.

Há trabalhos que tentam entender os mecanismos que podem levar à evolução cromossômica, como se dão as taxas dessa evolução (BOGART, 1991; SIQUEIRA et al., 2009), e em casos onde a morfologia é conservada e os dados moleculares deixam dúvidas, a citogenética pode ajudar a esclarecer problemas taxonômicos (RABELLO, 1970; LOURENÇO et al., 1999; CARVALHO et al., 2009), inclusive corroborando a existência de novas espécies e diferenciando espécies crípticas em diferentes grupos de vertebrados (NAKAYAMA et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2009; LOURENÇO et al., 2006; COSTA et al., 2016; SUÁREZ-VILLOTA et al., 2017; LIMA et al., 2019). Dados cariotípicos aliados a dados moleculares têm resultado em relevantes trabalhos filogenéticos de alguns grupos (AGUIAR JR. et al., 2007; TARGUETA et al., 2010; GAZONI et al., 2012; AMARO et al., 2012) e como a maioria dos grandes trabalhos de revisão não levou em conta informações cromossômicas, essa abordagem pode ser útil para resolver as questões que permanecem abertas.

Assim, o estudo dos cromossomos baseado em suas morfologias e localização física de diferentes marcadores, como por exemplo, regiões organizadoras do nucléolo (RONs) e heterocromatina constitutiva, pode ser ainda uma importante ferramenta no auxílio do entendimento taxonômico e sistemático de alguns grupos (LOURENÇO et al., 1999; ROSA et al., 2003; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2009; MEDEIROS et al., 2013). De forma geral, anfíbios anuros apresentam cariótipo homogêneo quando analisados sob coloração convencional, sendo conservados com relação a número modal, ploidia (AGUIAR JR. et al., 2002) e morfologia (SILVA et al., 2006). Dessa forma, técnicas de bandamento e rastreamento de sondas são formas de buscar diferenças mais “profundas” nos cariótipos das espécies, a fim de conseguir diferenciá-las e/ou compreender melhor o processo evolutivo dos grupos.

O surgimento de novas tecnologias de sequenciamento genômico nos anos 2000 possibilitou o avanço da biologia molecular, e o refinamento na análise de cromossomos que vinha desde a década de 1980 com a implementação de novas técnicas de hibridização, como a FISH (PINKEL et al., 1986; VALENTE et al., 2017), propiciaram a integração entre citogenética e genômica, com o suporte de ferramentas bioinformáticas (SYMONOVA &

HOWELL, 2018), levando ao nascimento da citogenômica e reforçando o uso da citogenética como importantes ferramentas para estudos comparativos de caráter taxonômico e evolutivo.

O mapeamento cromossômico de sequências de DNA repetitivo tem sido abordado em trabalhos que envolvem citogenética de anuros nas últimas décadas (LOURENÇO et al., 2001; VITTORAZZI et al., 2011; GAZONI et al., 2012; BARTH et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2015; GATTO et al., 2018). Essa classe de sequências está presente no genoma de todos os eucariotos, geralmente concentradas nas regiões centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos, constituindo o principal componente da heterocromatina (BISCOTTI et al., 2015). Elas aparecem repetidas, dispersas ou em tandem, de centenas a milhares de vezes, com o tamanho de seus monômeros variando de alguns pares de bases a algumas centenas deles. Elas também podem ser divididas entre as famílias multigênicas, como rDNAs que codificam RNAs ribossomais, snDNA, que codificam os snRNAs envolvidos no *splicing*, famílias gênicas codificadoras de proteínas, como as histonas e globinas, e aquelas sequências repetidas não-codificantes, como DNAs satélites e TE, como transposons e retrotransposons (LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012). Apesar de abundantes nos genomas eucariotos, poucos grupos têm seus DNA satélites extensivamente estudados (GIOVANNOTTI et al., 2018), sendo que em anfíbios anuros trabalhos com mapeamento e comparação de diferentes DNAs satélites são raros.

Uma ferramenta que tem sido recentemente utilizada em estudos de organização genômica e comparação do genoma de diferentes grupos é a citogenômica. A citogenética molecular aliada à genômica, através da utilização de ferramentas de bioinformática, já é amplamente utilizada em análises clínicas e estudos de patologias humanas (IOUROV et al., 2008; BERNHEIM et al., 2010; PINTO et al., 2018). Após o desenvolvimento do software RepeatExplorer (<http://repeatexplorer.org/>), as análises de genomas de eucariotos se tornaram mais rápidas e precisas, em parte pelo fato da ferramenta não necessitar que haja um banco de dados de referência para a busca das sequências repetitivas; Além disso, o RepeatExplorer permite fazer a classificação das sequências análises filogenéticas de retroelementos e comparar sequências repetitivas de diferentes espécies (NOVÁK et al., 2013). Em estudos evolutivos e de genômica comparativa, a citogenômica tem sido aplicada em plantas (RIBEIRO et al., 2016; GUPTA & VASISTHA, 2018; FU et al., 2019; ZHOU et al., 2019), insetos (RUIZ-RUANO et al., 2017; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2018; FERRETTI et al., 2019; SILVA et al., 2019), mamíferos (CAZAUX et al., 2013; BREEN, 2015; THOMAS, 2015; CERUTTI et al., 2016; ESCUDEIRO et al., 2019), aves (DELANY et al., 2007; GRIFFIN et al., 2008; MCPHERSON et al., 2014; KINSELLA et al., 2019), répteis (ROJO et al., 2015; MATSUBARA et al., 2015;

KICHIGIN et al., 2019) e peixes (VICARI et al., 2010; RAMOS et al., 2017; UTSUNOMIA et al., 2017; SILVA et al., 2017; CREPALDI & PARISE-MALTEMPI, 2020), sendo que para a maioria desses grupos, ferramentas como o RepeatExplorer não são frequentemente utilizadas, com exceção de insetos e peixes. Para anfíbios, os trabalhos com caracterização e mapeamento de DNA satélite, especialmente com uso de ferramentas de bioinformática, são ainda incipientes (DA SILVA et al., 2020).

1.1 *Thoropa* Cope, 1865

Além dos problemas taxonômicos, outra questão a ser levada em consideração nos estudos desse grupo de vertebrados é o crescente declínio das populações de anfíbios, ocasionado principalmente pela ação antrópica. A contaminação, perda e fragmentação de habitat (ETEROVICK et al., 2005; DE LUCCA et al., 2018; FERRANTE et al., 2019), mudanças climáticas e doenças como a quitridiomiose (BLAUSTEIN et al., 1994; COLLINS & STORFER, 2003; PREUSS et al., 2015; CARVALHO et al., 2017) são alguns dos fatores que têm levado a esse declínio. As espécies do gênero *Thoropa*, por exemplo, são especialistas com relação ao habitat, sendo duas das seis espécies que compõe o gênero, *T. petropolitana* e *T. lutzi*, de registro raro (FEIO 2002) e *T. saxatilis* está listada como “preocupante” na IUCN Red List (<https://www.iucnredlist.org/species/57372/11628473>). Sendo assim, a falta de dados nas diferentes áreas da biologia dificulta o estudo e criação de planos de manejo para conservação das espécies, e o entendimento de como se dá o declínio desse grupo (GUEDES et al. 2019).

Atualmente o gênero *Thoropa* Cope, 1865 pertence à família Cycloramphidae e é composto por seis espécies válidas, divididas em dois grupos: o grupo *T. petropolitana*, com *T. petropolitana* (Wandolleck 1907) e *T. lutzi* Cochran 1938, e o grupo *T. miliaris*, com *T. miliaris* (Spix 1824), *T. taophora* (Miranda-Ribeiro 1923), *T. saxatilis* Cocroft & Heyer 1988 e *T. megatympanum* Caramaschi & Sazima 1984. O gênero ocorre na Mata Atlântica, onde se dá em maior abundância, ecótonos Cerrado-Mata Atlântica e Mata Atlântica-Caatinga (BOKERMANN, 1965; CARAMASCHI & SAZIMA, 1984; COCROFT & HEYER, 1988). As espécies de *T. grupo miliaris* são facilmente encontradas na natureza, sendo a que dá nome ao grupo a de distribuição mais ampla, ocorrendo desde o centro-sul da Bahia até sul do Rio de Janeiro (FEIO, 2002). As demais espécies do grupo têm ocorrência mais restrita, sendo que *T. taophora* ocorre na Serra do Mar do Estado de São Paulo (FEIO, 2002), *T. saxatilis* ocorre nas encostas da Serra Geral, de Santa Catarina ao Rio Grande do Sul (COCROFT & HEYER 1988; FEIO, 2002), e *T. megatympanum* ocorre na Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e sul da Bahia (CARAMASCHI & SAZIMA 1984; FEIO, 2002). Além disso, *T. miliaris*

e *T. taophora* ocorrem em sintopia no sul do Rio de Janeiro, mais especificamente no município de Paraty (SABBAG et al., 2018).

As espécies do gênero *Thoropa* são especialistas, habitando formações rochosas úmidas, cachoeiras e quedas d'água (CARAMASCHI & SAZIMA 1984; COCROFT & HEYER 1988; FEIO, 2002; FEIO et al. 2006). As fêmeas desovam em fios de água doce que escorrem nas rochas e os girinos exotróficos, quando eclodem, se alimentam de matéria orgânica (algas e musgo) (GONÇALVES, 2018, dissertação de mestrado; ROCHA et al. 2002; FEIO, 2002). Por se encontrarem muitas vezes associadas a ambientes de alta salinidade, como costões rochosos em ambientes costeiros, *T. taophora* e *T. miliaris* apresentam maior resistência à salinidade que espécies de mata (ABE & BICUDO 1991).

Do ponto de vista filogenético, a história do gênero sempre foi marcada por incertezas, sendo os trabalhos sempre baseados em descrições morfológicas, até que Fitzpatrick e colaboradores (2009) publicaram o primeiro trabalho filogeográfico com o grupo, utilizando genes mitocondriais e nucleares de *T. miliaris* e *T. taophora*, com *T. megatympanum* como grupo externo, e já sugeriram que *T. miliaris* pudesse ser um complexo de espécie. Posteriormente, Sabbag e colaboradores (2018), na proposta de ampliar o trabalho realizado por Fitzpatrick, estenderam as análises filogenéticas para todas as espécies do grupo de *T. miliaris*, também utilizando genes mitocondriais e nucleares, abrangendo quase toda a distribuição do grupo.

O trabalho de Sabbag et al. (2018) encontrou oito clados distintos em suas análises, sendo cinco linhagens bem definidas para *T. miliaris*, todas parafiléticas em relação à *T. taophora*, levando a crer que há mais espécies sob o nome de *T. miliaris* e *T. taophora*, resultado similar ao encontrado por Fitzpatrick et al. (2009). Os clados de *T. megatympanum*, *T. saxatilis* apareceram como monofiléticos e bem estruturados, provavelmente tendo sido os primeiros a divergir. Os clados de *T. taophora* também formaram um agrupamento monofilético e a espécie teria sido a última a divergir. Diferentes metodologias foram utilizadas e em todas o número de clados formados foi o mesmo, no entanto a relação entre eles e entre os grupos externos diferiu. Além disso, Sabbag e colaboradores propuseram um padrão de diversificação para o grupo, sendo *T. saxatilis* a espécie mais ancestral e de onde parte a dispersão das demais espécies, seguida de *T. megatympanum* e, por fim, a migração para a costa do complexo *T. miliaris* + *T. taophora* (SABBAG et al. 2018). No entanto, não foi possível concluir, com a amostragem do estudo, as relações filogenéticas entre os oito clados encontrados para *Thoropa*, grupo *miliaris*. Assim, SABBAG et al., (2019 - dados não publicados), utilizando centenas de genes nucleares e uma combinação de métodos de construção de filogenias, tentaram resolver a parafilia entre

T. miliaris e *T. taophora* e determinar os níveis de fluxo gênico entre as espécies. Eles recuperaram *T. miliaris* como monofilética e com cinco clados bem definidos, que podem se constituir em linhagens, evoluindo independentemente. Apesar desses recentes esforços e dos avanços alcançados no conhecimento filogenético do grupo, ainda não há clareza sobre essas relações, com as análises esbarrando na dificuldade de delimitar espécies, havendo a possibilidade de espécies ainda não descritas no grupo, e na falta de informações a respeito das mesmas, incluindo dados citogenéticos.

Em 1970, Bogart publicou um trabalho de quinze páginas contendo a descrição cariotípica de nove espécies da família Leptodactylidae, incluindo o primeiro cariótipo de *Thoropa miliaris*, com intuito de entender um pouco melhor as relações evolutivas entre elas. Na tentativa de fornecer dados que possam ajudar a esclarecer o status taxonômico de *T. grupo miliaris* e traçar um caminho de evolução cromossômica para as espécies de *Thoropa*, esse trabalho teve como objetivo investigar as quatro espécies de *T. grupo miliaris* (*T. miliaris*, *T. taophora*, *T. megatympanum* e *T. saxatilis*) com enfoque citogenético e citogenômico.

1.2 *Haddadus binotatus* (Spix, 1824)

O gênero *Haddadus* Hedges, Duellman, and Heinicke, 2008 pertence à família Craugastoridae (HEDGES et al., 2008), é endêmico da Mata Atlântica e compreende três espécies: *H. binotatus* (Spix, 1824), *H. plicifer* (Boulenger, 1888) e *H. aramunha* (Cassimiro, Verdade, and Rodrigues, 2008). *H. binotatus* e *H. plicifer* antes pertenciam ao gênero *Eleutherodactylus* Duméril and Bibron, 1841 (família Leptodactylidae) e foram alocadas em *Haddadus* com a criação do gênero em 2008 (HEDGES et al., 2008) e *H. aramunha*, que antes pertencia ao gênero *Strabomantis* Peters, 1863, foi incluída em 2013 por Amaro e colaboradores. Hedges et al. (2008) propuseram a criação do clado Terrarana, que reúne as espécies que apresentam desenvolvimento direto, com ovos depositados em terra firme (modo reprodutivo 23, segundo HADDAD & PRADO, 2005), sendo Craugastoridae incluída nesse clado. *H. binotatus* é, das três espécies que compõem o gênero, a que apresenta distribuição mais ampla, ocorrendo do Sul da Bahia ao Rio Grande do Sul (Figura 3), e vive em áreas de mata primária e secundária (FORLANI et al., 2010). Autores acreditam que mais de uma espécie pode estar sob o nome de *Haddadus binotatus*, devido à grande variação morfológica observada ao longo de sua distribuição (HADDAD & SAZIMA, 1992; RIBEIRO et al., 2005; FORLANI et al., 2010).

Do ponto de vista citogenético, alguns trabalhos já analisaram diferentes populações da espécie, a maioria deles aplicando técnicas convencionais de bandamento (BEÇAK & BEÇAK,

1974; SIQUEIRA-JR. et al., 2004; CAMPOS et al., 2008) e resultados interessantes são mostrados em todos eles. A primeira característica que chama atenção sobre os cromossomos de *H. binotatus* é o tamanho: o número diplóide da espécie é o mesmo de espécies consideradas próximas, como *Ischnocnema guentheri* e *I. parva* ($2n = 22$), mas seus cromossomos são de três a quatro vezes maiores que o dessas espécies (BEÇAK & BEÇAK, 1974). Além disso, ocorre a formação de multivalentes em anel na meiose, em diferentes configurações, e algumas populações foram descritas como apresentando diversos cromossomos heteromórficos em metáfases mitóticas, havendo variação com relação a isso entre as populações (BEÇAK & BEÇAK, 1974; SIQUEIRA-JR. et al., 2004; CAMPOS et al., 2008). A presença de cromossomos heteromórficos com formação de cadeia na meiose é retratada em outros grupos, como nos ciclídeos *Symphysodon aequifasciatus* e *S. haraldi* (GROSS et al., 2009), em ornitorrinco (GRÜTZNER et al., 2004) e no anuro *Leptodactylus pentadactylus* (GAZONI et al., 2018) sendo associada nestes dois últimos casos, à presença de múltiplos cromossomos sexuais.

O uso de técnicas de bandamento cromossômico e, mais atualmente citogenômica, são essenciais para a detecção de pequenos rearranjos cromossômicos e diferenças entre cariótipos de espécies próximas e até mesmo de populações diferentes de uma mesma espécie, já que muitas vezes esses rearranjos não são detectados sob coloração convencional, e as técnicas citadas poderiam ajudar a detectá-los.

REFERÊNCIAS

- AMARO, R. C., NUNES, I. V. A. N., CANEDO, C., NAPOLI, M. F., & JUNCÁ, F. A. A molecular phylogeny recovers *Strabomantis aramunha* Cassimiro, Verdade and Rodrigues, 2008 and *Haddadus binotatus* (Spix, 1824) (Anura: Terrarana) as sister taxa. **Zootaxa**, v. 3741, n. 4, p. 569-582. 2013.
- DE ARAÚJO, R. E. F., NAGAMACHI, C. Y., DA COSTA, M. J. R., NORONHA, R. C. R., RODRIGUES, L. R. R., & PIECZARKA, J. C. First description of multivalent ring structures in eutherian mammalian meiosis: new chromosomal characterization of *Cormura brevisrostris* (Emballonuridae, Chiroptera). **Genetica**, v. 144, n. 4, p. 407-415. 2016.
- BALDISSERA, F. A., DEOLIVEIRA, P. L., & KASAHARA, S. Cytogenetics of 4 Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, p. 335-345. 1993.
- BEÇAK, M. L., DENARO, L., & BEÇAK, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 9, n. 4, p. 225-238. 1970.
- BEÇAK, M. L., & BEÇAK, W. Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae-amphibia). **Experientia**, v. 30, n. 6, p. 624-625. 1974.
- BICK, Y. A., MURTAGH, C., & SHARMAN, G. B. The chromosomes of an egg-laying mammal *Tachyglossus aculeatus* (the echidna). **Cytobios**, v. 7, n. 28, p. 233-243. 1973.
- BICK, Y. & SHARMAN, G. The chromosomes of the platypus (*Ornithorhynchus*): Monotremata. **Cytobios**, v. 14, p. 17-28. 1975.
- BOGART, J. P. Evolution of Anuran Karyotypes. **Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems**, p. 337-349. 1973.
- BOKERMANN, W. C. Lista anotada das localidades tipo de anfíbios brasileiros. In **Lista anotada das localidades tipo de anfíbios brasileiros**. 1966.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C., MOURA, R. C., & MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 393. 2010.
- CAMPOS, J. R. C., & KASAHARA, S. Os cromossomos dos anfíbios anuros do gênero *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae: Brachycephalidae). **Publicatio UEPG, Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, p. 27-38. 2006.
- 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**, v. 39, n. 2, p. 151-159. 2008.
- CAMPOS, J. R. C., ANANIAS, F., AGUIRRE BRASILEIRO, C., YAMAMOTO, M., FERNANDO BAPTISTA HADDAD, C., & KASAHARA, S. Chromosome evolution in three

- Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. **Hereditas**, v. 146, n. 2, p. 104- 111. 2009.
- CARVALHO, K. A., GARCIA, P. C. A., & RECCO-PIMENTEL, S. M. NOR dispersion, telomeric sequence detection in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the *Aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 126, n. 4, p. 359-367. 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**, v. 82, p. 172-179. 1998.
- DE LUCCA, E. J., JIM, J., & FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia**, v. 27, n. 2, p. 183-192. 1974.
- FORLANI, M. D. C., BERNARDO, P. H., HADDAD, C. F. B., & ZAHER, H. Herpetofauna do Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 265-308. 2010.
- FROST, DARREL R. **Amphibian Species of the World: An Online Reference**. Version 6.0. Museum of Natural History, New York. 2019. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Acesso em 17 abr. 2020.
- GAZONI, T., GRUBER, S. L., SILVA, A. P., ARAÚJO, O. G., NARIMATSU, H., STRÜSSMANN, C., ... & KASAHARA, S. Cytogenetic analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. **BMC genetics**, v. 13, n. 1, p. 109. 2012.
- GAZONI, T., HADDAD, C. F. B., NARIMATSU, H., CABRAL-DE-MELLO, D. C., LYRA, M. L., & PARISE- MALTEMPI, P. P. More sex chromosomes than autosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus*. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 269-278. 2018.
- GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 741-743. 1986.
- GROSS, M. C., FELDBERG, E., CELLA, D. M., SCHNEIDER, M. C., SCHNEIDER, C. H., PORTO, J. I. R., & MARTINS, C. Intriguing evidence of translocations in *Discus* fish (Symphysodon, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. **Heredity**, v. 102, n. 5, 435. 2009.
- GRUETZNER, F., ASHLEY, T., ROWELL, D. M., & GRAVES, J. A. M. How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. **Chromosoma**, v. 115, n. 2, p. 75-88. 2006.
- GRÜTZNER, F., RENS, W., TSEND-AYUSH, E., EL-MOGHARBEL, N., O'BRIEN, P. C., JONES, R. C., ... & 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**, v. 432, n. 7019, p. 913. 2004.

HADDAD, C.F.B., & SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. *In*: Morellato, L.P.C. (Ed.), *História Natural da Serra do Japi. Ecologia e Preservação de uma Área Florestal no Sudeste do Brasil*. São Paulo: Editora da UNICAMP, 1992. pp. 188–211.

HADDAD, C. F., & PRADO, C. P. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207-217. 2005.

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

HEINICKE, M. P., DUELLMAN, W. E., & HEDGES, S. B. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 24, p. 10092-10097. 2007.

HEINICKE, M. P., DUELLMAN, W. E., TRUEB, L., MEANS, D. B., MACCULLOCH, R. D., & HEDGES, S. B. A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct- developing clade revealed by molecular phylogeny. **Zootaxa**, v. 2211, p. 1-35. 2009.

HEYER, W.R. Variation, systematics, and zoogeography of *Eleutherodactylus guentheri* and closely related species (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 402, p. 1–42. 1984.

HOLSINGER, K. E., & ELLSTRAND, N. C. The evolution and ecology of permanent translocation heterozygotes. **The American Naturalist**, v. 124, n. 1, p. 48-71. 1984.

HOWELL, W. T. & BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015. 1980.

IUCN 2020. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2020.1 - <https://www.iucnredlist.org/> - acessado em 26 nov. 2019.

LOURENÇO, L. B., RECCO-PIMENTEL, S. M., & CARDOSO, A. J. A second case of multivalent meiotic configurations in diploid species of Anura. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 131-133. 2000.

LYNCH, J.D. The species groups of the South American frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). **Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas**, v. 61, p. 1–24. 1976.

MESHARAM, L.D., NARKHEDE, M.N., & DESHMUKH, N.Y. Spontaneous multiple translocations in *Capsicum annuum* L. **Cytologia**, v. 46, n. 1-2, p. 75-79. 1981.

MATTOS, V. F., CARVALHO, L. S., CARVALHO, M. A., & SCHNEIDER, M. C. Insights into the origin of the high variability of multivalent-meiotic associations in holocentric chromosomes of *Tityus* (Archaeotityus) scorpions. **PloS one**, v. 13, n. 2, e0192070. 2018.

MURTAGH, C. E. A unique cytogenetic system in monotremes. **Chromosoma**, v. 65, n. 1, p. 37- 57. 1977.

- NOLETO, R. B., AMARO, R. C., VERDADE, V. K., CAMPOS, J. R. C., GALLEGU, L. F. K., DE LIMA, A. M. X., ... & TOLEDO, L. F. Comparative cytogenetics of eight species of *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 250, n. 3, p. 205-214. 2011.
- PADIAL, J. M., GRANT, T., & FROST, D. R. Molecular systematics of terraranas (Anura: Brachycephaloidea) with an assessment of the effects of alignment and optimality criteria. **Zootaxa**, v. 3825, n. 1, p. 1-132. 2014.
- PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938. 1986.
- PYRON, R. A., & WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, n. 2, p. 543-583. 2011.
- RIBEIRO, R. D. S., EGITO, G. T. B. T. D., & HADDAD, C. F. B. Chave de identificação: anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, Estado de São Paulo. *Biota Neotropica*, v. 5, n. 2, p. 235-247. 2005.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, v. 66, n. 4, p. 361-388. 1978.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., BOGART, J. P., FEICHTINGER, W., LEÓN, P., LA MARCA, E., ... & HEDGES, S. B. The chromosomes of terraranan frogs. Insights into vertebrate cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 130, n. 1-8, p. 1-14. 2010.
- SCHMID, M., EVANS, B. J., & BOGART, J. P. Polyploidy in amphibia. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 145, n. 3-4, p. 315-330. 2015.
- SHARP, H. E., & ROWELL, D. M. Unprecedented chromosomal diversity and behaviour modify linkage patterns and speciation potential: structural heterozygosity in an Australian spider. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 20, n. 6, p. 2427-2439. 2007.
- 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**, v. 27, n. 3, p. 363-372. 2004.
- ŠÍCHOVÁ, J., OHNO, M., DINCĂ, V., WATANABE, M., SAHARA, K., & MAREC, F. Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 118, n. 3, p. 457-471. 2016.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, n. 1, p. 304-306. 1972.
- SYREN, R. M., & LUYKX, P. Permanent segmental interchange complex in the termite *Incisitermes schwarzi*. **Nature**, v. 266, n. 5598, p. 167. 1977.

TARGINO, M., COSTA, P. N., & SILVA, S. P. D. C. E. Two new species of the *Ischnocnema lactea* species series from Itatiaia highlands, southeastern Brazil (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). **South American Journal of Herpetology**, v. 4, n. 2, p. 139-151. 2009.

TAUCCE, P. P. G. The advertisement call, color patterns and distribution extension of *Ischnocnema izecksohni* (Caramaschi and Kisteumacher, 1989) (Anura, Brachycephalidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 52, n. 9. 2012.

WIENS, D., & BARLOW, B. A. Unusual translocation heterozygosity in an East African mistletoe (*Viscum fischeri*). **Nature: New biology**, v. 243, n. 124, p. 93. 1973

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PRÓXIMOS PASSOS

Os resultados aqui apresentados mostram que a citogenética pode, sim, auxiliar na taxonomia e no entendimento das relações filogenéticas em anfíbios anuros, especialmente quando aliada à genômica. Foi possível, através da análise de sequências repetitivas, detectar diferenças consideráveis na organização e distribuição de diferentes DNA satélites nas espécies de *Thoropa* grupo *miliaris*, sendo mais notáveis as diferenças encontradas entre duas populações de *T. miliaris*, que caem em clados diferentes e com pouco fluxo gênico em extensa análise filogenética realizada por Sabbag et al., (2018; 2019), havendo maior semelhança de uma das populações de *T. miliaris* (população de Santa Teresa/ES) com *T. saxatilis*, do que com a outra população de *T. miliaris* (Paraty/RJ). Também detectamos um DNA satélite centromérico, TmiSat05-143, mostrando que, de fato, sequências repetitivas estão associadas aos centrômeros, podendo ter importante papel estrutural nessas regiões. Um dos resultados mais interessantes foi a co-localização de um dos satélites, TmiSat02-189, com o rDNA 5S e com outro DNA satélite, centromérico, isolado de *Proceratophrys boiei* (PboSat03-189) que é altamente semelhante ao DNA satélite Pcp190, isolado de *Physalaemus cuvieri* por Vittorazzi e colaboradores, o qual os autores acreditam ser derivado do rDNA 5S e que está presente em outros grupos de anuros, nos levando a pensar que provavelmente essas sequências possam ter uma origem comum. Para ampliar o entendimento dessa relação em *Thoropa*, é necessário sequenciar o rDNA 5S na população de Santa Teresa/ES e comparar com os dois DNA satélites (TmiSat02-189 e PboSat03-189), além de aumentar a amostragem de *T. miliaris*, de forma que todos os cinco clados encontrados por Sabbag et al. (2018) sejam comparados citogeneticamente, e coletar mais indivíduos de *T. megalotympanum*, para que tenhamos esses DNA satélites mapeados em todas as espécies de *T.* grupo *miliaris*. Também pensamos ser interessante mapear o DNA satélite Pcp190 nas espécies de *Thoropa*, a fim de saber se esse satélite está presente também em Cycloramphidae e, se sim, como se encontra organizado nesses genomas.

Para o segundo grupo estudado, *Haddadus binotatus*, não foi possível tirar conclusões a respeito do status taxonômico da espécie, devido à falta de material para confirmar os resultados obtidos. Cinco populações foram analisadas e quatro delas apresentam cromossomos heteromórficos, com polimorfismos entre elas. Não foi possível analisar a população de Paraty/RJ, sendo desconhecido se essa população apresenta cromossomos heteromórficos. Além disso, nossa interpretação dos cariótipos difere do encontrado por outros autores, havendo

também divergência entre esses diferentes trabalhos. Não acreditamos que esses cromossomos heteromórficos estejam relacionados a cromossomos sexuais, por estarem presentes em machos e fêmeas. Além disso, encontramos nas metáfases meióticas diferentes configurações em anel dentro de uma mesma população. Nossos resultados abrem mais questionamentos a respeito da origem desses cromossomos heteromórficos: (1) os polimorfismos encontrados são apenas diferenças interpopulacionais ou representam a existência de mais de uma espécie sob o mesmo nome? (2) como esses cromossomos heteromórficos se organizam no anel multivalente e como se dá a segregação deles na meiose? Dessa forma, é necessária a coleta de mais material, na tentativa de obter boas metáfases, tanto mitóticas quanto meióticas, a fim de confirmarmos as interpretações aqui apresentadas. Além disso, a busca por sequências específicas, como DNAs satélites, pode ajudar a detectar diferenças entre essas populações. Por fim, pretende-se fazer uma diferenciação genética entre essas populações utilizando marcadores moleculares como citocromo c para auxiliar no entendimento da relação entre elas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A. S., & BICUDO, J. E. P. W. Adaptations to salinity and osmoregulation in the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia, Leptodactylidae). **Zoologischer Anzeiger**, p. 313-318. 1991.
- AGUIAR JR, O., LIMA, A. P., GIARETTA, A. A., & RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of four poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura: Dendrobatidae). **Herpetologica**, v. 58, n. 3, p. 293-303. 2002.
- AGUIAR JR., O., BACCI, M., LIMA, A. P., ROSSA-FERES, D., 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**, v. 23, n. 5, p. 455-463. 2007.
- AMARO-GHILARDI, R. C., RODRIGUES, M. T., & YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence in situ hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia**, v. 57, n. 1, p. 53-65. 2004.
- AMARO, R. C., RODRIGUES, M. T., YONENAGA-YASSUDA, Y., & CARNAVAL, A. C. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.62 n. 3, p. 880-888. 2012.
- AMARO, R. C., NUNES, I., CANEDO, C., NAPOLI, M. F., & JUNCÁ, F. A. A molecular phylogeny recovers *Strabomantis aramunha* Cassimiro, Verdade and Rodrigues, 2008 and *Haddadus binotatus* (Spix, 1824) (Anura: Terrarana) as sister taxa. **Zootaxa**, v. 3741, n. 4, p. 569-582. 2013.
- BALDISSERA, F. A., DEOLIVEIRA, P. L., & KASAHARA, S. Cytogenetics of 4 Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, p. 335-345. 1993.
- BARTH, A., SOUZA, V. A., SOLÉ, M., & COSTA, M. A. Molecular cytogenetics of nucleolar organizer regions in *Phyllomedusa* and *Phasmahyla* species (Hylidae, Phyllomedusinae): a cytotaxonomic contribution. **Gen Mol Res**, v. 12, n. 3, p. 2400-2408. 2013.
- BEÇAK, M. L., & BEÇAK, W. Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae-amphibia). **Experientia**, v. 30 n. 6, p. 624-625. 1974.
- BERNHEIM, A. Cytogenomics of cancers: From chromosome to sequence. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 4, p. 309-322. 2010.
- BISCOTTI, M. A., OLMO, E., & HESLOP-HARRISON, J. P. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, p. 415-420. 2015.
- BLAUSTEIN, A. R., WAKE, D. B., & SOUSA, W. P. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. **Conservation Biology**, v. 8, n. 1, p. 60-71. 1994.

- BOGART, J. P. Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 9, n. 5, p. 369-383. 1970.
- BOGART, J. P. **The influence of life history on karyotypic evolution in frogs**. In: Green, D. M., & Sessions, S. K. (Eds.). Amphibian cytogenetics and evolution. Academic Press. 1991. 233-258.
- BOKERMANN, W. C. A. Notas sobre as espécies de *Thoropa* Fitzinger (Amphibia, Leptodactylidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 37, n. 3/4, p. 525-537. 1965.
- BREEN, M. **Comparative Cytogenetics**. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2015.
- BRUSCHI, D. P., BUSIN, C. S., SIQUEIRA, S., & RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, v. 149, n. 1, p. 34-40. 2012.
- BRUSCHI, D. P., BUSIN, C. S., TOLEDO, L. F., VASCONCELLOS, G. A., STRUSSMANN, C., WEBER, L. N., & RECCO-PIMENTEL, S. M. Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. **BMC Genetics**, v. 14, n. 1, p. 70. 2013.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C., MOURA, R. C., & MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 393. 2010.
- 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**, v. 39, n. 2, p. 151-159. 2008.
- CAMPOS, J. R. C., ANANIAS, F., AGUIRRE BRASILEIRO, C., YAMAMOTO, M., FERNANDO BAPTISTA HADDAD, C., & KASAHARA, S. Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. **Hereditas**, v. 146, n. 2, p. 104-111. 2009.
- CAMPOS, J.R.C. **Constituição cariotípica em leptodactilídeos do gênero *Leptodactylus* e em espécies de famílias relacionadas à Leptodactylidae (Amphibia: Anura)**. 2010. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.
- CARAMASCHI, U., & SAZIMA, I. Uma nova espécie de *Thoropa* da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, n. 3, p. 139-146. 1984.
- CARVALHO, K. A., GARCIA, P. C. A., & RECCO-PIMENTEL, S. M. NOR dispersion, telomeric sequence detection in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the *Aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 126, n. 4, p. 359-367. 2009.

CARVALHO, T., BECKER, C. G., & TOLEDO, L. F. Historical amphibian declines and extinctions in Brazil linked to chytridiomycosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1848, p. 20162254. 2017.

CAZAUX, B., CATALAN, J., JUSTY, F., ESCUDÉ, C., DESMARAIS, E., & BRITTON-DAVIDIAN, J. Evolution of the structure and composition of house mouse satellite DNA sequences in the subgenus *Mus* (Rodentia: Muridea): a cytogenomic approach. **Chromosoma**, v. 122, n. 3, p. 209-220. 2013.

CERUTTI, F., GAMBA, R., MAZZAGATTI, A., PIRAS, F. M., CAPPELLETTI, E., BELLONI, E., ... & GIULOTTO, E. The major horse satellite DNA family is associated with centromere competence. **Molecular cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. 35. 2016.

CHARLESWORTH, B., SNIEGOWSKI, P., & STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215. 1994.

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**, v. 82 p. 172-179. 1998.

COCROFT, R. B., & HEYER, W. R. Notes on the frog genus *Thoropa* (Amphibia: Leptodactylidae) with a description of a new species (*Thoropa saxatilis*). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 101, n. 1, p. 209-220. 1988.

COLLINS, J. P., & STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions**, v. 9, n. 2, p. 89-98. 2003.

DA COSTA, M. J. R., DO AMARAL, P. J. S., PIECZARKA, J. C., SAMPAIO, M. I., ROSSI, R. V., MENDES- OLIVEIRA, A. C., ... & NAGAMACHI, C. Y. Cryptic species in *Proechimys goeldii* (Rodentia, Echimyidae)? A case of molecular and chromosomal differentiation in allopatric populations. **Cytogenetic and genome research**, v. 148, n. 2-3, p. 199-210. 2016.

CRAWFORD, A. J., & SMITH, E. N. Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae: *Eleutherodactylus*) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, n. 3, p. 536-555. 2005.

CREPALDI, C., & PARISE-MALTEMPI, P. P. Heteromorphic Sex Chromosomes and Their DNA Content in Fish: An Insight through Satellite DNA Accumulation in *Megaleporinus elongatus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 1, p. 38-46. 2020.

CUSHMAN, S. A. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. **Biological conservation**, v. 128, n. 2, p. 231-240. 2006.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407-417. 2005.

DELANY, M. E., GESSARO, T. M., RODRIGUE, K. L., & DANIELS, L. M. Chromosomal mapping of chicken mega-telomere arrays to GGA9, 16, 28 and W using a cytogenomic approach. **Cytogenetic and genome research**, v. 117, n. 1-4, p. 54-63. 2007.

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

DE LUCCA, G. S., BARROS, F. A., OLIVEIRA, J. V., DAL MAGRO, J., & LUCAS, E. M. The role of environmental factors in the composition of anuran species in several ponds under the influence of coal mining in southern Brazil. **Wetlands Ecology And Management**, v. 26, n. 3, p. 285-297. 2018.

DUELLMAN, W. E., MARION, A. B., & HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**, v. 4104, n. 1, p. 1-109. 2016.

ESCUDEIRO, A., ADEGA, F., ROBINSON, T. J., HESLOP-HARRISON, J. S., & CHAVES, R. Conservation, Divergence, and Functions of Centromeric Satellite DNA Families in the Bovidae. **Genome Biology And Evolution**, v. 11, n. 4, p. 1152-1165. 2019.

ETEROVICK, P. C., DE QUEIROZ CARNAVAL, A. C. O., BORGES-NOJOSA, D. M., SILVANO, D. L., SEGALLA, M. V., & SAZIMA, I. Amphibian Declines in Brazil: An Overview 1. **Biotropica: The Journal of Biology and Conservation**, v. 37, n. 2, p. 166-179. 2005.

FAIVOVICH, J., HADDAD, C. F., GARCIA, P. C., 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**, v. 2005, n. 294, p. 1-240. 2005.

FEIO, R. N. **Revisão taxonômica O, gênero *Thoropa* Cope, 1865 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)**. 2002. Tese de Doutorado - Museu Nacional, Rio de Janeiro, 2002.

FEIO, R. N., NAPOLI, M. F., & CARAMASCHI, U. Considerações taxonômicas sobre *Thoropa miliaris* (Spix, 1824), com revalidação e redescrição de *Thoropa taophora* (Miranda-Ribeiro, 1923) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, v. 64, n. 1, p. 41- 60. 2006.

FERRANTE, L., LEONEL, A. C. M., GAIGA, R., KAEFER, I. L., & FEARNSIDE, P. M. Local extinction of *Scinax caldarum*, a treefrog in Brazil's Atlantic forest. **Herpetological Journal**, v. 29, n. 4, 2019.

FERRETTI, A. B., RUIZ-RUANO, F. J., MILANI, D., LORETO, V., MARTÍ, D. A., RAMOS, E., ... & CABRAL- DE-MELLO, D. C. How dynamic could be the 45S rDNA cistron? An intriguing variability in a grasshopper species revealed by integration of chromosomal and genomic data. **Chromosoma**, v. 128, n. 2, p. 165-175. 2019.

FITZPATRICK, S. W., BRASILEIRO, C. A., HADDAD, C. F., & ZAMUDIO, K. R. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 13, p. 2877-2896. 2009.

FORLANI, DA CRUZ M., BERNARDO, P. H., HADDAD, C. F. B., & ZAHER, H. Herpetofauna do Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 265-309. 2010.

FROST, D. R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R. H., HAAS, A., HADDAD, C. F., ... & WHEELER, W. C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of natural History**, v. 2006, n. 297, p. 1- 291. 2006.

FROST, DARREL R. **Amphibian Species of the World: An Online Reference**. Version 6.0. Museum of Natural History, New York. 2019. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Acesso em 17 abr. 2020.

FU, J., ZHANG, H., GUO, F., MA, L., WU, J., YUE, M., ... & LI, L. Identification and characterization of abundant repetitive sequences in *Allium cepa*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-7. 2019.

GATTO, K. P. G., MATTOS, J. V., SEGER, K. R., & LOURENÇO, L. B. Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 301. 2018.

GAZONI, T., GRUBER, S. L., SILVA, A. P., ARAÚJO, O. G., NARIMATSU, H., STRÜSSMANN, C., ... & KASAHARA, S. Cytogenetic analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. **BMC Genetics**, v. 13, n. 1, p. 109. 2012.

GAZONI, T., HADDAD, C. F. B., NARIMATSU, H., CABRAL-DE-MELLO, D. C., LYRA, M. L., & PARISE- MALTEMPI, P. P. More sex chromosomes than autosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus*. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 269-278. 2018.

GIOVANNOTTI, M., NISI CERIONI, P., ROJO, V., OLMO, E., SLIMANI, T., SPLENDIANI, A., & CAPUTO BARUCCHI, V. Characterization of a satellite DNA in the genera *Lacerta* and *Timon* (Reptilia, Lacertidae) and its role in the differentiation of the W chromosome. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 330, n. 2, p. 83-95. 2018.

GONÇALVES, G. C. **Morfologia Larval Externa, Alterações Heterocrônicas e Tabela de Desenvolvimento para *Thoropa miliaris* (Anura: Cycloramphidae)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

GRANT, T., FROST, D. R., CALDWELL, J. P., GAGLIARDO, R. O. N., HADDAD, C. F., KOK, P. J., & WHEELER, W. C. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of natural History**, v. 2006, n. 299, p. 1-262. 2006.

GROSS, M. C., FELDBERG, E., CELLA, D. M., SCHNEIDER, M. C., SCHNEIDER, C. H., PORTO, J. I. R., & MARTINS, C. Intriguing evidence of translocations in *Discus* fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. **Heredity**, v. 102, n. 5, p. 435. 2009.

GRIFFIN, D. K., ROBERTSON, L. B., TEMPEST, H. G., VIGNAL, A., FILLON, V., CROOIJMANS, R. P., ... & WADDINGTON, D. Whole genome comparative studies between chicken and turkey and their implications for avian genome evolution. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 168. 2008.

GROSJEAN, S. The choice of external morphological characters and developmental stages for tadpole-based anuran taxonomy: a case study in *Rana (Sylvirana) nigrovittata* (Blyth, 1855) (Amphibia, Anura, Ranidae). **Contributions to Zoology**, v. 74, n. 1-2, p. 61-76. 2005.

GRÜTZNER, F., RENS, W., TSEND-AYUSH, E., EL-MOGHARBEL, N., O'BRIEN, P. C., JONES, R. C., ... & 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**, v. 432, n. 7019, p. 913. 2004.

GUEDES, J. J. M., DE ASSIS, C. L., NOVAES, C. M., DERGAM, J. A., & FEIO, R. N. Filling knowledge gaps about the 'Data Deficient' species *Zachaenus carvalhoi* Izecksohn, 1983 (Anura, Cycloramphidae): an endemic frog from the Atlantic Forest of southeastern Brazil. **Herpetology Notes**, v. 12, p. 113-204. 2019.

GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 741-743. 1986.

GUPTA, P. K., & VASISTHA, N. K. Wheat cytogenetics and cytogenomics: the present status. **The Nucleus**, v. 61, n. 3, p. 195-212. 2018.

HADDAD, C.F.B., & SAZIMA, I. Anfíbios anuros da Serra do Japi. In: Morellato, L.P.C. (Ed.), História Natural da Serra do Japi. Ecologia e Preservação de uma Área Florestal no Sudeste do Brasil. São Paulo: Editora da UNICAMP, 1992. pp. 188–211.

HADDAD, C. F., & PRADO, C. P. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207-217. 2005.

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

HEINICKE, M. P., DUELLMAN, W. E., & HEDGES, S. B. Major Caribbean and Central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 24, p. 10092-10097. 2007.

HOWELL, W. T. & BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015. 1980.

IOUROV, I. Y., VORSANOVA, S. G., & YUROV, Y. B. Molecular cytogenetics and cytogenomics of brain diseases. **Current Genomics**, v. 9, n. 7, p. 452-465. 2008.

KICHIGIN, I. G., LISACHOV, A. P., GIOVANNOTTI, M., MAKUNIN, A. I., KABILOV, M. R., O'BRIEN, P. C., ... & TRIFONOV, V. A. First report on B chromosome content in a reptilian species: The case of *Anolis carolinensis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 294, p. 1, P. 13-21. 2019.

KINSELLA, C. M., RUIZ-RUANO, F. J., DION-CÔTÉ, A. M., CHARLES, A. J., GOSSMANN, T. I., CABRERO, J., ... & FORSTMEIER, W. Programmed DNA elimination of germline development genes in songbirds. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-10. 2019.

- KÖHLER, J., JANSEN, M., RODRÍGUEZ, A., KOK, P., TOLEDO, L., EMMRICH, M., GLAW, F., HADDAD, C., RÖDEL, M., & VENCES, M. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. **Zootaxa**, v. 4251, n. 1, p. 1–124. 2017.
- LIMA, A. M., GAREY, M. V., NOLETO, R. B., & VERDADE, V. K. Natural History of the Lutz's Frog *Cycloramphus lutzorum* Heyer, 1983 (Anura: Cycloramphidae) in the Brazilian Atlantic Forest: Description of the advertisement call, tadpole, and karyotype. **Journal of Herpetology**, v. 44, n. 3, p. 360-372. 2010.
- LIMA, L. R., DUBEUX, M. J. M., DO NASCIMENTO, F. A. C., BRUSCHI, D. P., & MOTT, T. Uncovering Neotropical treefrog diversity: integrative taxonomy reveal paraphyly in *Boana atlantica* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 40, n. 4, p. 511-521. 2019.
- LÓPEZ-FLORES, I., & GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In: GARRIDO-RAMOS, M.A (ed.). **Repetitive DNA**. Karger, 2012. Vol. 7, p. 1-28.
- LOURENÇO, L. B., RECCO-PIMENTEL, S. M., & CARDOSO, A. J. Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). **Canadian Journal Of Zoology**, v. 77, n. 4, p. 624-631. 1999.
- LOURENÇO, L. B., GARCIA, P. C., & RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. **Hereditas**, v. 133, n. 3, p. 201-209. 2001.
- LOURENÇO, L., NASCIMENTO, J., RECCO-PIMENTEL, S., ANDRADE, G., & ROSSA-FERES, D. Chromosomal analysis of the leptodactylids *Pleurodema diplolistris* and *Physalaemus nattereri* (Amphibia, Anura). **Amphibia-Reptilia**, v. 27, n. 4, p. 481-489. 2006.
- DE MAGALHÃES, R. F., ROCHA, P. C., SANTOS, F. R., STRÜSSMANN, C., & GIARETTA, A. A. Integrative taxonomy helps to assess the extinction risk of anuran species. **Journal for Nature Conservation**, v. 45, p. 1-10. 2018.
- MATSUBARA, K., UNO, Y., SRIKULNATH, K., SEKI, R., NISHIDA, C., & MATSUDA, Y. Molecular cloning and characterization of satellite DNA sequences from constitutive heterochromatin of the habu snake (*Protobothrops flavoviridis*, Viperidae) and the Burmese python (*Python bivittatus*, Pythonidae). **Chromosoma**, v. 124, n. 4, p. 529-539. 2015.
- MCPHERSON, M. C., ROBINSON, C. M., GEHLEN, L. P., & DELANY, M. E. Comparative cytogenomics of poultry: mapping of single gene and repeat loci in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Chromosome Research**, v. 22, 1, p. 71-83. 2014.
- MEDEIROS, L. R., LOURENÇO, L. B., ROSSA-FERES, D. C., LIMA, A. P., ANDRADE, G. V., GIARETTA, A. A., & RECCO-PIMENTEL, S. M. Comparative cytogenetic analysis of some species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) in the light of phylogenetic inferences. **BMC Genetics**, v. 14, n. 1, p. 59. 2013.
- MEŠTROVIĆ, N., PAVLEK, M., CAR, A., CASTAGNONE-SERENO, P., ABAD, P., & PLOHL, M. Conserved DNA motifs, including the CENP-B box-like, are possible promoters of satellite DNA array rearrangements in nematodes. **PLoS One**, v. 8 n. 6, e67328. 2013.

- NAKAYAMA, C., JÉGU, M., PORTO, J. I. R., & FELDBERG, E. Karyological evidence for a cryptic species of piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. **Copeia**, v. 2001, n. 3, p. 866-869. 2001.
- NOGUEIRA, L., ZANONI, J. B., SOLÉ, M., AFFONSO, P. R. A. D. M., SIQUEIRA, S., & SAMPAIO, I. Cytogenetic studies in six species of *Scinax* (Anura, Hylidae) clade *Scinax ruber* from northern and northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 156-161. 2015.
- NOLETO, R. B., AMARO, R. C., VERDADE, V. K., CAMPOS, J. R. C., GALLEGOS, L. F. K., DE LIMA, A. M. X., ... & TOLEDO, L. F. Comparative cytogenetics of eight species of *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 250, n. 3, p. 205-214. 2011.
- NOVÁK, P., NEUMANN, P., PECH, J., STEINHAIŠ, J., & MACAS, J. RepeatExplorer: a Galaxy- based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, n. 6, p. 792-793. 2013.
- OLIVEIRA, B. F., SÃO-PEDRO, V. A., SANTOS-BARRERA, G., PENONE, C., & COSTA, G. C. AmphiBIO, a global database for amphibian ecological traits. **Scientific Data**, v. 4, p. 170123. 2017.
- ORRICO, V. G., NUNES, I., MATTEDI, C., FOUQUET, A., LEMOS, A. W., RIVERA-CORREA, M., ... & RODRIGUES, M. T. Integrative taxonomy supports the existence of two distinct species within *Hypsiboas crepitans* (Anura: Hylidae). **Salamandra**, v. 53, n. 1, p. 99-113. 2017.
- PADIAL, J. M., & DE LA RIVA, I. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 155, n. 1, p. 97-122. 2009.
- PADIAL, J. M., MIRALLES, A., DE LA RIVA, I., & VENCES, M. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, v. 7, n. 1, p. 16. 2010.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M., MILANI, D., LEMOS, B., CASTILLO, E. R., MARTÍ, D. A., RAMOS, E., ... & CABRAL-DE-MELLO, D. C. Uncovering the evolutionary history of neo-XY sex chromosomes in the grasshopper *Ronderosia bergii* (Orthoptera, Melanoplinae) through satellite DNA analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 18, n. 1, p. 2. 2018.
- PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938. 1986.
- PINTO, I. P., DA CRUZ, A., COSTA, E., PEREIRA, S., MINASI, L., & DA CRUZ, A. Cytogenomic Microarray Testing. *In: LARRAMENDY M., & SOLONESKI S. Cytogenetics-Past, Present and Further Perspectives*. IntechOpen, 2012.
- PREUSS, J. F., LAMBERTINI, C., DA SILVA LEITE, D., TOLEDO, L. F., & LUCAS, E. M. *Batrachochytrium dendrobatidis* in near threatened and endangered amphibians in the southern Brazilian Atlantic Forest. **North. West. J. Zool**, v. 11, p. 360-362. 2015.

- PYRON, R. A., & WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, n. 2, p. 543-583. 2011.
- RABELLO, M. N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, v. 23, n. 1, p. 45-59. 1970.
- RAMOS, É., CARDOSO, A. L., BROWN, J., MARQUES, D. F., FANTINATTI, B. E., CABRAL-DE-MELLO, D. C., ... & MARTINS, C. The repetitive DNA element BncDNA, enriched in the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, transcribes a potentially noncoding RNA. **Chromosoma**, v. 126, n. 2, p. 313-323. 2017.
- RIBEIRO, R. D. S., EGITO, G. T. B. T. D., & HADDAD, C. F. B. Chave de identificação: anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, 235-247. 2005.
- RIBEIRO, T., BARRELA, R. M., BERGÈS, H., MARQUES, C., LOUREIRO, J., MORAIS-CECÍLIO, L., & PAIVA, J. A. Advancing *Eucalyptus* genomics: cytogenomics reveals conservation of *Eucalyptus* genomes. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 510. 2016.
- ROCHA, C. F. D., VAN SLUYS, M., BERGALLO, H. G., & ALVES, M. A. S. Microhabitat use and orientation to water flow direction by tadpoles of the leptodactylid frog *Thoropa miliaris* in southeastern Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 36, n. 1, p. 98-100. 2002.
- ROJO, V., MARTÍNEZ-LAGE, A., GIOVANNOTTI, M., GONZÁLEZ-TIZÓN, A. M., CERIONI, P. N., BARUCCHI, V. C., ... & NAVEIRA, H. Evolutionary dynamics of two satellite DNA families in rock lizards of the genus *Iberolacerta* (Squamata, Lacertidae): different histories but common traits. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 441-461. 2015.
- ROSA, C., AGUIAR- JR, O., GIARETTA, A. A., & RECCO-PIMENTEL, S. M. Karyotypic variation in the genus *Megaelasia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in a leptodactylid frog. **Copeia**, v. 2003, n. 1, p. 166-174. 2003.
- RUIZ-RUANO, F. J., CABRERO, J., LÓPEZ-LEÓN, M. D., & CAMACHO, J. P. M. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. **Chromosoma**, v. 126, n. 4, p. 487-500. 2017.
- SABBAG, A. F., LYRA, M. L., ZAMUDIO, K. R., HADDAD, C. F., FEIO, R. N., LEITE, F. S., ... & BRASILEIRO, C. A. Molecular phylogeny of Neotropical rock frogs reveals a long history of vicariant diversification in the Atlantic forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 122, p. 142-156. 2018.
- SABBAG, A. F. **Variação genética e morfológica das espécies de *Thoropa* Cope, 1865 (Anura: Cycloramphidae)**. 2019. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2019.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, v. 66, n. 4, p. 361-388. 1978.
- SEGALLA, M. V., CARAMASCHI, U., CRUZ, C. A. G., GARCIA, P. C. A., GRANT, T., HADDAD, C. F. B., SANTANA, D. J., TOLEDO, L. F., & LANGONE, J. A. Brazilian Amphibians: List of Species. **Revista Herpetologia Brasileira**. v. 8, n. 1, p. 65-97. 2019.

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**, v. 27, n. 3, p. 363-372. 2004.

SIQUEIRA, S., AGUIAR JR, O., PANSONATO, A., GIARETTA, A. A., STRÜSSMANN, C., MARTINS, I., & RECCO- PIMENTEL, S. M. The karyotype of three Brazilian Terrarana frogs (Amphibia, Anura) with evidence of a new *Barycholos* species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 470-476. 2009.

SILVA, A. P. Z., GARCIA, P. C., MARTINS, V. G., BACCI, M., & KASAHARA, S. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. **Amphibia-Reptilia**, v. 25, n. 2, p. 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**, v. 127, n. 1-3, p. 35-44. 2006.

SILVA, D. M. D. A., UTSUNOMIA, R., RUIZ-RUANO, F. J., DANIEL, S. N., PORTO-FORESTI, F., HASHIMOTO, D. T., ... & FORESTI, F. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12726. 2017.

SILVA, B. S. M. L., HERINGER, P., DIAS, G. B., SVARTMAN, M., & KUHN, G. C. S. De novo identification of satellite DNAs in the sequenced genomes of *Drosophila virilis* and *D. americana* using the RepeatExplorer and TAREAN pipelines. **PloS One**, v. 14, n. 12, e0223466. 2019.

DA SILVA, M. J., DESTRO, R. F., GAZONI, T., NARIMATSU, H., DOS SANTOS, P. S. P., HADDAD, C. F., & PARISE-MALTEMPI, P. P. Great Abundance of Satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) Revealed by Genome Sequencing. **Cytogenetic and Genome Research**. 2020.

SUÁREZ-VILLOTA, E. Y., CARMIGNOTTO, A. P., BRANDÃO, M. V., PERCEQUILLO, A. R., & SILVA, M. J. D. J. Systematics of the genus *Oecomys* (Sigmodontinae: Oryzomyini): molecular phylogenetic, cytogenetic and morphological approaches reveal cryptic species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 184, n. 1, p. 182-210. 2017.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, n. 1, p. 304-306. 1972.

SYMONOVÁ, R., & HOWELL, W. M. Vertebrate genome evolution in the light of fish cytogenomics and rDNAomics. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 96. 2018.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., & KUMAR, S. MEGA: molecular evolutionary genetics using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

- 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**, v. 54, n. 3, p. 709-725. 2010.
- TARVIN, R. D., PEÑA, P., & RON, S. R. Changes in population size and survival in *Atelopus spumarius* (Anura: Bufonidae) are not correlated with chytrid prevalence. **Journal of Herpetology**, v. 48, n. 3, p. 291-297. 2014.
- TAUCCE, P. P., CANEDO, C., PARREIRAS, J. S., DRUMMOND, L. O., NOGUEIRA-COSTA, P., & HADDAD, C. F. Molecular phylogeny of *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae) with the redefinition of its series and the description of two new species. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v. 128, p. 123-146. 2018.
- THOMAS, R. Cytogenomics of feline cancers: Advances and opportunities. **Veterinary Sciences**, v. 2, n. 3, p. 246-258. 2015.
- UTSUNOMIA, R., RUIZ-RUANO, F. J., SILVA, D. M., SERRANO, É. A., ROSA, I. F., SCUDELER, P. E., HASHIMOTO, D. T., OLIVEIRA, C., CAMACHO, J. P. M. & FORESTI, F. A glimpse into the satellite DNA library in characidae fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers In Genetics**, v. 8, p. 103. 2017.
- VALENTE, G. T., NAKAJIMA, R. T., FANTINATTI, B. E., MARQUES, D. F., ALMEIDA, R. O., SIMÕES, R. P., & MARTINS, C. B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. **Chromosoma**, v. 126, n. 1, p. 73-81. 2017.
- VICARI, M. R., NOGAROTO, V., NOLETO, R. B., CESTARI, M. M., CIOFFI, M. B., ALMEIDA, M. C., ... & ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094-1116. 2010.
- VITTORAZZI, S. E., LOURENÇO, L. B., DEL-GRANDE, M. L., & RECCO-PIMENTEL, S. M. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 101-107. 2011.
- ZHOU, H. C., WAMINAL, N. E., & KIM, H. H. In silico mining and FISH mapping of a chromosome-specific satellite DNA in *Capsicum annuum L.* **Genes & Genomics**, v. 41, n. 9, p. 1001-1006. 2019.