
**Programa de Pós-Graduação Em Ciências Biológicas
Biologia Celular e Molecular**

**Mecanismos de evolução cromossômica e diferenciação cariotípica em espécies das
subfamílias Hyalinae (tribos Cophomantini e Lophiohylini) e Phyllomedusinae
(Hylidae, Anura, Amphibia)**

Simone Lilian Gruber

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

Fevereiro - 2013

Simone Lilian Gruber

**MECANISMOS DE EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA E DIFERENCIAÇÃO
CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DAS SUBFAMÍLIAS HYLINAE (TRIBOS
COPHOMANTINI E LOPHIOHYLINI) E PHYLLOMEDUSINAE
(HYLIDAE, ANURA, AMPHIBIA)**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: Dra. Sanae Kasahara

Rio Claro
Estado de São Paulo - Brasil
2013

597.8 Gruber, Simone Lilian
G885m Mecanismos de evolução cromossômica e diferenciação cariotípica em espécies das subfamílias Hyalinae (tribos Cophomantini e Lophiohylini) e Phyllomedusinae (Hylidae, Anura, Amphibia) / Simone Lilian Gruber. - Rio Claro : [s.n.], 2013
179 f. : il., figs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Sanae Kasahara

1. Anuro. 2. Citogenética animal. 3. Bandas de replicação. 4. Hibridação in situ. 5. Cromossomo B. 6. Anfíbio. 7. Fluorocromos. I. Título.

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

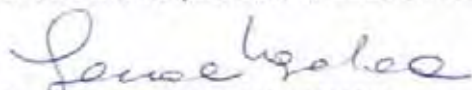
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Mecanismos de evolução cromossômica e diferenciação cariotípica em espécies das subfamílias Hylinae (tribos Cophomantini e Lophiohylini) e Phyllomedusinae (Hylidae, Anura, Amphibia)

AUTOR: SIMONE LILIAN GRUBER

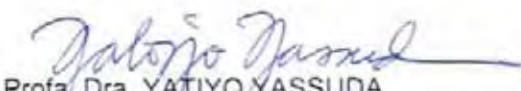
ORIENTADORA: Profa. Dra. SANAÉ KASAHARA

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



Profa. Dra. SANAÉ KASAHARA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro



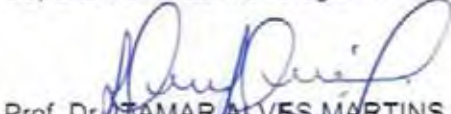
Profa. Dra. YATIYO YASSUDA

Instituto de Biociências - USP - São Paulo



Prof. Dr. CÉSAR MARTINS

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu / UNESP



Prof. Dr. TAMAR ALVES MARTINS

Departamento de Biologia / Universidade de Taubaté



Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

Depto. de Zootecnia / UNESP - Jaboticabal

Data da realização: 14 de fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho à minha filha Camila Gruber Chiaregato. Foi ela que aguentou o meu stress, impaciência e mau humor, assim como ela aceitou a minha ausência, quando eu estava no laboratório, em coleta, em estágio, em aula ou em um congresso, e não em casa. Ela também foi capaz de entender a minha ausência “virtual” quando eu estava estudando, lendo, corrigindo, ou preocupada com problemas do trabalho. Filha, eu te amo.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Sanae Kasahara agradeço por tantos ensinamentos, que se estenderam além dos conhecimentos científicos específicos da nossa área de pesquisa e que contribuíram para minha formação profissional e pessoal;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido, Processo No. 2008/56575-3;

À Universidade Estadual Paulista e o Instituto de Biociências do Campus de - Rio Claro pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Departamento de Biologia por acolher e facilitar o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Citogenética Animal;

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio) pelas licenças de coleta concedidas;

Ao Prof. Dr. Célio F. B. Haddad pelo apoio durante a realização desse trabalho, provendo suprimentos e animais vivos, bem como pelas conversas sobre a biologia dos anuros, que enriqueceram minha formação e me ajudaram a entender melhor o meu material de estudo;

A todos os pesquisadores que contribuíram coletando, identificando e disponibilizando exemplares para a obtenção de cromossomos;

Ao Departamento de Morfologia (UNESP-Botucatu) em especial ao Prof. Dr. Fausto Foresti por oferecer as instalações do laboratório e às Dra. Débora Diniz e Dra. Patrícia Elda Sobrinho-Scudeler pelo auxílio durante os experimentos de microdissecção;

Aos Professores do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências (UNESP-RC), pelo apoio e amizade;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Gerson de Souza Melo, Lucila Segala, Mônica Iamonte, Maria da Graça Coelho, Neusa Perinotto e Sandra Veloso, pelo carinho e pelo papo na hora do café e, principalmente, pela presteza com que sempre me ajudaram;

À aluna de Graduação Gabriela Isabela Gomes de Oliveira que em 2012 trabalhou comigo em citogenética de anfíbios, porque ao orientá-la tive oportunidade de transmitir meus conhecimentos e experiência e com isso aprender mais e me preparar para a carreira acadêmica;

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal, pelo companheirismo e pela animação que tornaram mais agradáveis as jornadas de trabalho;

Aos meus familiares, Camila, minha mãe Iracema, minhas irmãs Karin Dorotheia e Caroline, meus cunhados, Riccieri, André e Teodoro, e à minha família adotiva, Elsie, Eder, Kevin, Shelsie, Marina, Murillo, Claudino e Emily, pelo estímulo constante;

Aos amigos da Igreja Luterana e da Academia Pró Vida que me apoiaram e me animaram nesta jornada.

Resumo

A classe Amphibia, especialmente a família Hylidae, passou por extensas modificações na taxonomia e sistemática, realizadas com base, principalmente, em dados moleculares, mas quase nenhuma contribuição das informações citogenéticas. Os hílideos são os anuros mais abundantes em número de espécies, porém, a maioria delas foi sequer cariotipada e grande parte das informações disponíveis na literatura está restrita apenas ao número e morfologia dos cromossomos. No presente trabalho, foram cariotipadas 28 espécies da subfamília Hyalinae, sendo da tribo Cophomantini *Aplastodiscus arildae*, *A. callipygius*, *A. eugenioi*, *A. leucopygius*, *A. perviridis*, *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, *H. albomarginatus*, *H. albopunctatus*, *H. bakeri*, *H. caingua*, *H. caipora*, *H. crepitans*, *H. faber*, *H. latistriatus*, *H. lundii*, *H. pardalis*, *H. polytaenius*, *H. prasinus*, *H. raniceps* e *H. semilineatus*; da tribo Lophiohylini, as espécies *Aparasphenodon bokermanni*, *Itapotihyla langsdorffii*, *Phyllodytes edelmoi*, *P. luteolus*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus* e *T. typhonius*; e da subfamília Phyllomedusinae, duas espécies, *Phyllomedusa distincta* e *P. tetraploidea*, bem como seus híbridos triploides. A maioria das espécies da subfamília Hyalinae compartilha cariótipo $2n=24$, $FN=48$, bandas C majoritariamente centroméricas e RON em cromossomos pequenos do par 11 em Cophomantini e do par 10 em Lophiohylini. As exceções são as do gênero *Phyllodytes*, da tribo Lophiohylini, cujas espécies têm $2n=22$, $FN=44$ e RON no par 2, e as do gênero *Aplastodiscus*, da tribo Cophomantini, cujas espécies têm diferentes números cromossômicos de $2n=24$, $2n=22$, $2n=20$ e $2n=18$, mas compartilham o mesmo padrão de bandamento C e o mesmo par marcador de RON. As bandas de replicação por incorporação de BrdU mostraram que a redução a partir de um ancestral com $2n=24$ aconteceu em duas linhagens distintas, originando cariótipos com $2n=22$ nas espécies do

grupo de *A. albofrenatus* e cariótipos com $2n=20$ e, subsequentemente, $2n=18$ nas espécies do grupo de *A. albosignatus*. As espécies *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus* e *H. albopunctatus* são muito semelhantes do ponto de vista da morfologia externa e apresentam números diploides reduzidos para $2n=22$, $FN=44$ e RON no par 8. A redução por fusão cromossômica deve ter acontecido no ancestral de ambas as espécies, as quais têm constituições cromossômicas idênticas e podem ser diferenciadas apenas pela coloração com CMA_3 . Adicionalmente, alguns indivíduos de uma população de *H. albopunctatus* têm cromossomo B que é altamente saturado de sequências repetitivas não compartilhadas com os cromossomos A da espécie, mas estão dispersas pelo genoma da espécie-irmã *H. raniceps*. *Phyllomedusa distincta* ($2n=2x=26$), *P. tetraploidea* ($2n=4x=52$) e seus híbridos triploides ($2n=3x=39$) apresentam o mesmo conjunto básico **n**, têm RONs múltiplas, mas o número de sítios de DNAr em cada forma não é proporcional ao nível de ploidia, indicando que deve existir um mecanismo de regulação gênica ou mesmo um início de diploidização. Em *P. tetraploidea* as RONs estão nos cromossomos 1 e 8 e, eventualmente, nos cromossomos 9. Isso pode indicar que ainda subsiste na espécie uma característica remanescente do ancestral diploide, cujas RONs estão nos cromossomos 1 e 9, mas a possibilidade de introgressão de caracteres via híbridos não pode ser descartada. Os dados obtidos com as técnicas de coloração diferencial nas três formas não foram conclusivos acerca da origem autopoliplóide ou alopoliplóide de *P. tetraploidea*. A coloração com fluorocromos, bem como o FISH com sondas teloméricas, revelou variabilidade, quanto à composição molecular das regiões repetitivas nas espécies estudadas e, em alguns casos, mostrou que existem mais regiões repetitivas nos cariótipos do que evidenciado pelo bandamento C. Isso indica que é altamente promissor o mapeamento de diversas classes de DNA repetitivo nas espécies de hílídeos em análises comparativas. Os dados citogenéticos aqui apresentados representam uma grande contribuição para a citogenética de Hylidae e corroboram as relações filogenéticas dentro da família.

Abstract

The Amphibia class, especially the family Hylidae, went through extensive changes in taxonomy and systematics, based mainly on molecular data, but with almost no contribution of cytogenetic information. This family is the most speciose among the anurans, however, the great majority of the species was never karyotyped, and most of the cytogenetic information on hylids available in the literature is restricted to the number and morphology of the chromosomes. In the present work we karyotyped 28 representatives of the subfamily Hyalinae, belonging to the tribe Cophomantini the species *Aplastodiscus arildae*, *A. callipygius*, *A. eugenioi*, *A. leucopygius*, *A. perviridis*, *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, *H. albomarginatus*, *H. albopunctatus*, *H. bakeri*, *H. caingua*, *H. caipora*, *H. crepitans*, *H. faber*, *H. latistriatus*, *H. lundii*, *H. pardalis*, *H. polytaenius*, *H. prasinus*, *H. raniceps* e *H. semilineatus*; to the tribe Lophiohylini the species *Aparasphenodon bokermanni*, *Itapotihyla langsdorffii*, *Phyllodytes edelmoi*, *P. luteolus*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus* e *T. typhoni*; and two species of the subfamily Phyllomedusinae, *Phyllomedusa distincta* and *P. tetraploidea*, as well as their triploid hybrids. Most species of the subfamily Hyalinae share the same karyotype with $2n=24$, $FN=48$, C bands with predominantly centromeric distribution, and NOR located on small chromosomes belonging to the pair 11 in Cophomantini and to the pair 10 in Lophiohylini. The exceptions are the genus *Phyllodytes*, from the tribe Lophiohylini, whose species have $2n=22$, $FN=44$ and NOR in the pair 2, and the genus *Aplastodiscus*, from the tribe Cophomantini, whose species have different chromosome numbers of $2n=24$, $2n=22$, $2n=20$,

and $2n=18$, but sharing the same C-banding pattern and the same pair of NOR marker. The replication bands obtained by BrdU incorporation showed that the reduction from an ancestral with $2n=24$ occurred in two distinct lineages, producing karyotypes with $2n=22$ in species of the group of *A. albofrenatus* and karyotypes with $2n=20$ and subsequently with $2n=18$ in the species of the group of *A. albosignatus*. *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus* and *H. albopunctatus* are very similar in external morphology and both species have reduced diploid numbers to $2n=22$, $FN=44$, and NOR in par 8. The reduction by chromosome fusion rearrangement must have occurred in the ancestor of both species, which have identical chromosome constitutions differentiated only by CMA₃ staining. Additionally, some individuals in a population of *H. albopunctatus* have B chromosome that is highly saturated with repetitive sequences not shared with the chromosomes of the A complement, but are dispersed throughout the genome of the sister-species *H. raniceps*. *Phyllomedusa distincta* ($2n=2x=26$), *P. tetraploidea* ($2n=4x=52$), and their triploid hybrids ($2n=3x=39$) have the same basic n set and multiple NOR system, but the number of rDNA sites in each form is not proportional to the ploidy level, indicating a mechanism of gene regulation or even an early diploidization. In *P. tetraploidea* the NORs are on chromosomes 1 and 8 and possibly on chromosomes 9. This may indicate that a trait of the diploid ancestor, whose NORs are on chromosomes 1 and 9, still remains in the tetraploid species, but the possibility of introgression of the character via hybrids can not be ruled out. The data obtained with differential staining techniques in the three forms were not conclusive about the origin of *P. tetraploidea* by autopolyploidy or allopolyploidy. The fluorochrome staining and the FISH with telomeric probes revealed variability regarding the molecular composition of repetitive regions in the studied species of the present work, and in some cases showed that there are more repetitive regions in the karyotypes than evidenced by C banding. This indicates that mapping of several types of repetitive DNA is highly promising in the comparative analyzes of hyliid species. Cytogenetic data here obtained represents a major contribution to the Hyliidae cytogenetics and it corroborates the phylogenetic relationships within this family.

Sumário

1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	16
3. Material e Métodos.....	18
4. Referências bibliográficas	28
5. Resultados.....	32
Capítulo 1: Citogenética de <i>Phyllomedusa distincta</i> ($2n=2x=26$), <i>Phyllomedusa tetraploidea</i> ($2n=4x=52$) e de seus híbridos triploides ($2n=3x=39$) (Hylidae, Phyllomedusinae)	33
Capítulo 2: Natureza das sequências repetitivas reveladas pelos fluorocromos DAPI e CMA ₃ , e FISH com sondas de telômero e de DNAr em 15 espécies de <i>Hypsiboas</i> (Cophomantini, Hyalinae, Hylidae)	66
Capítulo 3: Analysis of the B chromosome of <i>Hypsiboas albopunctatus</i> (Anura, Hylidae) by microdissection and chromosome painting	91
Capítulo 4: Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus <i>Aplastodiscus</i> (Cophomantini, Hyalinae, Hylidae).....	125
Capítulo 5: Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hyalinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques	152
6. Considerações Finais	177

1. Introdução

Dentre as três ordens que compõem a Classe Amphibia, Anura, Caudata e Gymnophiona, a primeira, que inclui os sapos, rãs e pererecas, compreende sozinha 88% dos anfíbios conhecidos, com aproximadamente 5966 espécies distribuídas em 49 famílias (Frost 2011). Os anuros são os anfíbios mais representativos no hemisfério Sul, sendo que no Brasil há uma grande variedade de formas, com aproximadamente 949 espécies já registradas (SBH, 2012). Certamente, esse número deve ser bem maior visto que, a cada ano, muitas espécies novas têm sido descritas.

Em um grupo tão diversificado como os anuros, os questionamentos relativos à taxonomia e sistemática são recorrentes, apesar das inúmeras revisões já realizadas. Além dos critérios baseados, entre outros, em morfometria, osteologia, comportamento reprodutivo, distribuição geográfica e padrão de vocalizações, o sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares e, eventualmente, a análise de outros marcadores moleculares são imprescindíveis, pois caracteres morfológicos podem ter evoluído paralelamente em diversas famílias e não representam uma conexão filogenética entre elas. Os dados de sequenciamento revolucionaram a sistemática dos organismos vivos de um modo geral e de anfíbios em particular (Faivovich, 2002; Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006; Aguiar Jr *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008, Wiens *et al.* 2010, Pyron e Wiens 2011) porque esse procedimento fornece muitos caracteres para construção das filogenias, aumentando a sua confiabilidade.

A interpretação dos resultados obtidos em análises citogenéticas de anfíbios muito tem se beneficiado do conhecimento fornecido nas árvores filogenética, porém, as informações

sobre o cariótipo e suas variações têm sido pouco exploradas nas análises filogenéticas. Esse panorama, no entanto, tende a mudar, na medida que se possa obter cada vez mais dados citogenéticos de inquestionável qualidade. Um trabalho bastante completo na área de citogenética de anfíbios é a revisão de Schmit *et al.* (2010) no grupo dos Terrarana, que, além da análise comparativa dados citogenéticos, inclui informações de filogenia e evolução do grupo.

Os anuros da família Hylidae: características, distribuição geográfica e taxonomia

Os hilídeos, conhecidos popularmente com pererecas, são animais que possuem corpo alongado, discos adesivos nas extremidades dos dedos e que, na sua maioria, têm hábito arborícola. Contando com mais de 900 espécies distribuídas em 46 gêneros, a família Hylidae é a mais abundante em número de representantes e tem ampla distribuição nas Américas, Austrália/Papua-Nova Guiné e Eurásia, incluindo o extremo norte da África e os arquipélagos japoneses (Frost 2011). No Brasil, os hilídeos têm alta representatividade, perfazendo cerca da metade das espécies de anfíbios aqui descritos (SBH 2012). É surpreendente que em um intervalo de quatro anos a porcentagem dos hilídeos passou de 40% (SBH 2008) para os atuais 48%.

Embora alguns grupos de Hylidae tenham sido estudados isoladamente (Chek *et al.*, 2001; Faivovich, 2002; Donnellan e Mahony, 2004; Faivovich *et al.*, 2004; Garda e Cannatella, 2007; Aguiar Jr *et al.*, 2007), uma hipótese filogenética ampla para toda a família só foi proposta no trabalho de Faivovich *et al.* (2005), complementada por trabalhos subsequentes (Frost *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006; Aguiar Jr *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2008; Wiens *et al.* 2010, Pyron e Wiens 2011). Como consequência, houve uma grande reorganização da taxonomia da família que passou a incluir as subfamílias Hyalinae, Pelodryadinae e Phyllomedusinae.

Hyalinae é a subfamília mais abundante com 646 espécies, subdividida nas tribos Cophomantini, Dendropsophini, Hylini e Lophiohylini (Faivovich *et al.*, 2005). Pertencem à tribo Cophomantini os gêneros *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus*, *Hypsiboas* e *Myersiohyla*. A tribo Dendropsophini abriga *Dendropsophus*, *Pseudis*, *Scarthyla*, *Scinax*, *Sphaenorhynchus* e *Xenohyla*, enquanto em Hylini estão incluídos os gêneros *Acris*, *Anotheca*, *Bromeliahyla*, *Charadrahyla*, *Duellmanohyla*, *Ecnomiohyla*, *Exerodonta*, *Hyla*, *Isthmohyla*, *Megastomatohyla*, *Plectrohyla*, *Pseudacris*, *Ptychohyla*, *Smilisca*, *Tlalocohyla* e *Triprion*. Por fim, na tribo Lophiohylini estão alocados os gêneros *Aparasphenodon*,

Argenteohyla, *Corythomantis*, *Itapotihyla*, *Nyctimantis*, *Osteocephalus*, *Osteopilus*, *Phyllodytes*, *Phytotryades*, *Tepuihyla* e *Trachycephalus*. O exemplo mais ilustrativo das transformações na taxonomia da família é o gênero *Hyla*, anteriormente o mais numeroso com 353 espécies, que conta atualmente apenas 56, correspondentes aos representantes dos antigos grupos de *Hyla arborea*, *Hyla cinerea*, *Hyla eximia*, *Hyla femoralis* e *Hyla versicolor*, enquanto as demais 297 espécies restantes foram alocadas em 17 gêneros, dos quais quatro, *Aplastodiscus*, *Plectrohyla*, *Ptychohyla* e *Scinax*, já eram reconhecidos; quatro, *Dendropsophus*, *Exerodonta*, *Hyloscirtus* e *Hypsiboas*, são gêneros revalidados; e nove são novos nomes genéricos como *Bokermannohyla*, *Bromeliahyla*, *Charadrahyla*, *Ecnomihyla*, *Isthmohyla*, *Itapotihyla*, *Megastomahyla*, *Myersiophyla* e *Tlalocohyla*.

Em trabalho subsequente ao de Faivovich *et al.* (2005), uma revisão sistemática em toda a Classe Amphibia foi realizada por Frost *et al.* (2006), com base em dados de sequenciamento de DNA combinados com caracteres anatômicos. Partindo dos resultados obtidos por Faivovich *et al.* (2005), os autores corroboraram a nova taxonomia proposta para a família Hylidae, mas para sustentar uma taxonomia monofilética na subfamília Pelodryadinae, sugeriram um rearranjo genérico pelo qual as espécies pertencentes aos gêneros *Cyclorana* e *Nyctimystes* fossem realocadas em *Litoria*. A subfamília Pelodryadinae abriga, a partir de então, apenas o gênero *Litoria*, que é o mais abundante da família Hylidae. A terceira subfamília, a Phyllomedusinae, considerado o grupo-irmão de Pelodryadinae, compreende 57 espécies pertencentes aos gêneros *Agalychnis*, *Cruziohyla*, *Hylomantis*, *Pachymedusa*, *Phasmahyla*, *Phrynomedusa* e *Phyllomedusa*, esse último o mais numeroso da subfamília.

Citogenética da família Hylidae

Das espécies descritas na família Hylidae apenas um pequeno número, cerca de 35%, teve algum estudo citogenético realizado. As revisões mais completas que sumarizam as informações citogenéticas dos anfíbios anuros foram realizadas por King (1990) e Kuramoto (1990), antecedidas por Morescalchi (1973 e 1979). Gruber (2002) realizou um levantamento apenas para espécies do antigo gênero *Hyla* e, recentemente, Catroli e Kasahara (2009) atualizaram os dados citogenéticos dos hílideos. Nesse levantamento baseado na nova taxonomia da família, foram incluídos o número diploide, indicados os casos analisados com coloração diferencial e com técnicas de citogenética molecular e mencionados os casos de

cromossomos sexuais e de cromossomos B.

A maioria das espécies alocadas na família Hylidae ainda não tem cariótipo conhecido. Uma das principais características da família é o cariótipo com 24 cromossomos, porém, números menores, isto é, $2n=18$, 20 e 22, ou maiores, como $2n=26$, 28, 30, 34, 40, 48 e 52, os dois últimos resultantes de poliploidização, também ocorrem na família. Acredita-se que a maioria dos cariótipos com menos de 24 cromossomos, senão todos, seja derivada de um ancestral com $2n=24$ (Bogart, 1973), o que foi, em certa extensão, corroborado pelas relações interespecíficas na subfamília Hylineae, mostradas na árvore filogenética do trabalho de Faivovich *et al.* (2005).

A subfamília Hylineae apresenta, em sua maioria, cariótipo com 24 cromossomos, entretanto, um segundo grupo que atualmente compõe o gênero *Dendropsophus* tem $2n=30$. Bogart (1973) tinha sugerido que ambos derivaram, independentemente, de um cariótipo ancestral comum com $2n=26$, sendo que a fissões cêntricas seguidas de inversões pericêntricas seriam as responsáveis pelo aumento do número de cromossomos no grupamento com $2n=30$, e que a redução de $2n=26$ para $2n=24$ poderia ter ocorrido por fusões, seja do tipo cêntrica ou do tipo em *tandem*. Faivovich *et al.* (2005) mencionam a possibilidade de que $2n=24$ seja uma característica sinapomórfica em Hylineae e isso significa que esse número cariotípico deva estar presente nos gêneros mais basais das tribos Cophomantini e Lophyiohylini, informação que é ainda desconhecida.

A tribo Cophomantini é a mais basal da subfamília Hylineae (Faivovich *et al.*, 2005) e, atualmente, o conhecimento cariológico na tribo está restrito aos gêneros *Hypsiboas*, *Aplastodiscus* e *Bokermannohyla*, sendo que a maioria das análises têm sido baseadas na coloração convencional e técnicas usuais de bandamento. Enquanto as espécies de *Hypsiboas* e *Bokermannohyla* (Gruber *et al.* 2007, Catroli e Kasahara 2009, Catroli *et al.* 2011) apresentam majoritariamente $2n=24$, dentro de *Aplastodiscus* há uma variação devido a fusões que ocorreram independentemente em espécies de dois clados distintos reduzindo o número de cromossomos de $2n=24$ para $2n=22$ em um deles e de $2n=24$ para $2n=20$ e subsequentemente $2n=18$ no outro, enquanto as espécies do terceiro clado permanecem com 24 cromossomos (presente trabalho e Gruber *et al.* 2012a).

Dentro da tribo Dendropsophini, a maior parte das informações citogenéticas existentes abrange principalmente representantes dos gêneros *Dendropsophus* e *Scinax*, enquanto *Pseudis* e *Sphaenorhynchus* tiveram poucos espécimes cariotipados e dos gêneros *Scarthyia*, *Lysapsus* e *Xenohyla* não se conhece o cariótipo de nenhum representante. *Scinax* é

o maior gênero em número de espécies, mas as informações sobre citogenética são escassas e a maioria delas foi obtida apenas com o uso de coloração convencional (revisão em Catroli e Kasahara 2009). Um amplo trabalho colaborativo entre brasileiros e argentinos, sobre 28 espécies de *Scinax* é o de Cardozo *et al.* (2011). Foram cariotipadas espécies do clado *Scinax catharinae*, cujas espécies estão divididas nos grupos, *S. catharinae* e *S. perpusillus*, e do clado *S. ruber*, com apenas dois grupos, *S. rostratus* e *S. uruguayus*, sendo que nesse último clado a maior parte das espécies está ainda sem grupo definido (Faivovich, 2002; Faivovich *et al.*, 2005). Com base nos dados citogenéticos obtidos até então observa-se uma grande uniformidade cariotípica em relação às espécies alocadas no grupo de *S. catharinae* que diferem daquelas incluídas no grupo de *S. perpusillus*; as espécies do clado de *S. ruber*, por sua vez, têm cariótipos similares, que diferem dos apresentados pelos representantes do clado de *S. catharinae*.

As espécies do gênero *Dendropsophus* são caracterizadas pelo número cromossômico de $2n=30$. Apenas 29 espécies, alocadas em sete grupos diferentes, *D. columbianus*, *D. labialis*, *D. leucophyllatus*, *D. marmoratus*, *D. microcephalus*, *D. minutus* e *D. parviceps*, têm dados cariológicos conhecidos (Catroli e Kasahara 2009). Embora os representantes do gênero compartilhem o $2n$, existe uma variação quanto ao NF e aos pares telocêntricos, e, ainda que em alguns casos cromossomos com tal morfologia apareçam em mesmo número, nem sempre correspondem ao mesmo par no cariótipo de diferentes espécies (Gruber *et al.*, 2005). O grupo de *D. marmoratus* é considerado o mais basal de todo o gênero (Faivovich *et al.*, 2005) com apenas três espécies analisadas citogeneticamente (Bogart e Bogart 1971, Bogart, 1973, Gruber *et al.* 2005, Nunes *et al.* 2006).

Entre as tribos de Hylinae, Lophiohylini é a que apresenta o conhecimento citogenético mais completo, abrangendo representantes de praticamente todos os gêneros (Catroli e Kasahara 2009, Gruber *et al.* 2012b). Enquanto foi observado $2n=24$ em *Aparasphenodon*, *Itapotihyla*, *Osteocephalus* e *Trachycephalus*, e $2n=22$ em *Phyllodytes*, dentro de *Osteopilus* foram observados cariótipos com números diploides diferentes, resultantes tanto de redução quanto de aumento no número de cromossomos (Catroli e Kasahara 2009, presente trabalho e Gruber *et al.* 2012b).

São conhecidas informações sobre os cariótipos em representantes de 13 dos gêneros que compõe a tribo Hylini, sendo que em 12 deles, todas as espécies apresentam $2n=24$, com exceção de um caso de poliploidia com $2n=4x=48$ em *Hyla versicolor*. Nas espécies do gênero *Acris* foram descritos cariótipos com $2n=22$ e, adicionalmente em *A. crepitans*, foram observados de 1 a 5 cromossomos B. Os gêneros *Bromeliahyla*, *Ecnomihyla* e

Megastomatohyla nunca tiveram representantes estudados do ponto de vista citogenético (revisão em Catroli e Kasahara 2009).

Nas outras duas subfamílias, isto é, Pelodriadinae e Phyllomedusine, o número cromossômico predominante nas poucas espécies analisadas é de 26 cromossomos (revisão em King 1990, Kuramoto 1990, Catroli e Kasahara 2009). De fato, similaridades cariotípicas encontradas entre esses dois grupos irmãos, parecem indicar uma relação filogenética próxima e sugerem que o conjunto cromossômico de ambas seja primitivo e conservado.

Dos sete gêneros da subfamília Phyllomedusinae, apenas *Phrynomedusa* não teve nenhuma espécie analisada do ponto de vista citogenético. Dos demais gêneros, as análises estão restritas a poucos representantes, excluindo *Phyllomedusa* que dispõe de informações citogenéticas de várias espécies, mas baseadas majoritariamente em análises com coloração convencional dos cromossomos. As hipóteses filogenéticas atuais indicam que para inferir a evolução cariotípica na subfamília é fundamental a análise conjunta do cariótipo de representantes de todos os gêneros.

Na subfamília Pelodryadinae está incluído um único gênero, *Litoria*, cujos representantes são de ocorrência exclusiva na Austrália e Nova Zelândia. Das quase 80 espécies das quais foram estudados os cromossomos, apenas uma, *L. angiana*, tem $2n=30$, enquanto todas as demais apresentam 26 cromossomos.

2. Objetivos

A realização do presente estudo citogenético de anuros da família Hylidae teve como justificativa a diversidade de hílideos da anurofauna brasileira ser relativamente pouco conhecida do ponto de vista cariológico e a pouca ênfase dada às constituições cromossômicas das espécies nas extensas modificações introduzidas na taxonomia e sistemática por que passou a família Hylidae. Tivemos, pois, como objetivo geral obter informações mais detalhadas sobre o modo como os cromossomos se alteraram dentro de diferentes grupos, levando a uma diversificação dos cariótipos nas espécies e, com isso, avançar no conhecimento da evolução cromossômica, bem como da estrutura e organização molecular dos cromossomos de anuros em geral.

Para isso, foram analisados os cromossomos de espécies pertencentes a duas das quatro tribos da subfamília Hyliinae, a saber, Cophomantini e Lophiohylini, assim como, de espécies da subfamília Phyllomedusinae. Da tribo Cophomantini foram cariotipadas as espécies *Aplastodiscus arildae*, *A. callipygius*, *A. eugenioi*, *A. leucopygius*, *A. perviridis*, *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, *H. albomarginatus*, *H. albomarginatus*, *H. albopunctatus*, *H. bakeri*, *H. caingua*, *H. caipora*, *H. crepitans*, *H. faber*, *H. latistriatus*, *H. lundii*, *H. pardalis*, *H. polytaenius*, *H. prasinus*, *H. raniceps* e *H. semilineatus*; da tribo Lophiohylini, as espécies *Aparasphenodon bokermanni*, *Itapotihyla langsdorffii*, *Phyllodytes edelmoi*, *P. luteolus*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus* e *T. typhonius*; e da subfamília Phyllomedusinae, as espécies *Phyllomedusa distincta*, *P. tetraploidea* e seus híbridos triploides.

Foram empregadas coloração convencional e técnicas usuais de bandamento, bem como técnicas de citogenética molecular, com sondas de DNAr e teloméricas, e, pela primeira vez, com sonda construída a partir da microdissecção de cromossomo B, seguida de amplificação por DOP-PCR e pintura cromossômica.

3. Material e Métodos

Animais

Foram realizadas análises citogenéticas em 30 espécies de hilídeos totalizando 171 exemplares procedentes de diversas localidades do Brasil. Da tribo Cophomantini foram cariotipados 5 exemplares (♂) de *Aplastodiscus arildae*, 7 (♂) de *A. callipygius*, 2 (1♂, 1♀) de *A. eugenioi*, 10 (9 ♂, 1 ♀) de *A. leucopygius*, 4 (♂) de *A. perviridis*, 4 (♂) de *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, 6 (5♂, 1♀) de *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, 11 (♂) de *H. albomarginatus*, 25 (23♂, 1♀, 1J) de *H. albopunctatus*, 1 (♂) de *H. bekeri*, 2 (♂) de *H. caingua*, 1 (♂) de *H. caipora*, 2 (♂) de *H. crepitans*, 3 (1♂, 2♀) de *H. faber*, 8 (♂) de *H. latistriatus*, 6 (♂) de *H. lundii*, 1 (♂) de *H. pardalis*, 6 (1♂, 1J) de *H. polytaenius*, 7 (4♂, 1♀, 2J) de *H. prasinus*, 12 (1♂, 10♀, 1J) de *H. raniceps* e 3 (2♂, 1J) *H. semilineatus*; da tribo Lophiohylini, 1 (♂) de *Aparasphenodon bokermanni*, 3 (2♂, 1♀) de *Itapotihyla langsdorffii*, 3 (1♂, 2♀) de *Phyllodytes edelmoi*, 2 (♂) de *P. luteolus*, 1 (♂) de *Trachycephalus* sp., 7 (4♂, 2♀, 1J) de *T. mesophaeus* e 2 (1♂, 1♀) de *T. typhoni*; e da subfamília Phyllomedusinae, 7 (6♂, 1♀) de *Phyllomedusa distincta*, 8 (6♂, 2♀) de *P. tetraploidea* e 10 (♂) de híbridos triploides. A maioria dos animais foi coletada e identificada pela equipe do Dr. Célio F. B. Haddad do Departamento de Zoologia, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. Os exemplares analisados estão depositados na coleção de anfíbios CFBH do referido Departamento.

Obtenção das preparações cromossômicas

Preparações citológicas diretas de medula óssea, fígado, baço e testículos, no caso dos exemplares machos, foram obtidas seguindo-se os procedimentos descritos em Baldissera Jr *et al.* (1993) e Silva *et al.* (2000). De alguns animais, foram feitas preparações citológicas do epitélio intestinal, segundo a técnica de Schmid (1978), com modificações. De alguns exemplares, foi feita cultura de linfócitos segundo Kasahara *et al.* (1998), quando o tamanho do animal permitiu a retirada de sangue em quantidade suficiente, isto é, pelo menos 0,5mL.

Para a preparação direta os animais receberam injeção prévia de fitohemaglutinina na proporção de 0,05mL para cada 5g de peso do animal, ou de 0,05mL como dose mínima para animais que pesam menos de 5g, entre 48 e 72h antes do sacrifício, como estimulante de divisão celular.

O tratamento com colchicina pode ser procedido de duas formas combinando a concentração com o tempo de ação da droga. A escolha é feita de acordo com o tecido a ser utilizado e as condições fisiológicas do animal. Em algumas situações, especialmente quando a identificação da espécie precisa ser confirmada, ou ainda não está descrita, o animal deve ser preservado e, portanto, fica difícil a utilização da medula óssea, pois a retirada dos fêmures e tíbias pode estragar a pele. Nesse caso a utilização de preparações do epitélio intestinal foi priorizada. Os tipos de tratamento e as aplicações de cada um deles podem ser encontrados na Tabela.

Com frequência realizamos também tratamento *in vivo* com análogos de base do DNA, para obtenção de bandas de replicação. Nesse caso, a solução contendo BrdU+FudR (10 mg de BrdU e 0,5 mg de FudR em 2 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9 %) deve ser injetada no animal na proporção de 0,05mL para cada 5g de peso do animal, ou de 0,05mL como dose mínima para animais que pesam menos de 5g, entre 16 e 18h antes do sacrifício. A droga deve ser incorporada nas novas fitas de DNA sintetizadas durante a última divisão celular anterior ao sacrifício e são, posteriormente, detectadas nos procedimentos de diferenciação de bandas.

Tipos de tratamentos com colchicina

Concentração da Colchicina	Tempo de Tratamento	Observações
1% a 2%	4h	quando se utiliza o epitélio intestinal ou se estado fisiológico do animal não recomenda tratamentos mais longos. Como é

		um tratamento rápido, tem a vantagem de ser facilmente aplicado.
0,01%	overnight	é ideal e com ótimos resultados para utilização de medula óssea e fígado. É a melhor opção quando é feito também tratamento in vivo com BrdU. Não é recomendado para utilização do epitélio intestinal. Como o tempo de tratamento é longo, é desaconselhável para animais em estado fisiológico debilitado.

Preparação direta

a. após o sacrifício do animal com lidocaína 5%, são retirados os ossos dos membros posteriores, fígado, baço, porção proximal do intestino delgado e testículos, quando do sexo masculino. Cada material é colocado em placa de Petri contendo solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075M e, em seguida, processado de diferentes maneiras:

- i. após a retirada da musculatura existente em torno dos ossos, as epífises são cortadas e a medula óssea liberada por meio de lavagens sucessivas com solução hipotônica, feitas com auxílio de uma seringa;
- ii. a liberação das células do fígado e do baço é feita de modo semelhante, com injeções repetidas de solução hipotônica e com fragmentação mecânica com o auxílio da agulha e de uma pinça, até que todo o tecido tenha sido dissociado;
- iii. os túbulos seminíferos são dissociados na solução hipotônica e as células são liberadas no decorrer da manipulação desse material;
- iv. o fragmento de intestino é cortado longitudinalmente e hipotonizado inteiro à temperatura ambiente e, somente após a pré-fixação, a mucosa intestinal é raspada para a liberação das células;

b. a suspensão celular é, então, transferida para um tubo de centrífuga e incubada a 37°C por 45 minutos. A duração do tratamento hipotônico do fragmento do intestino é de 30 minutos.

c. decorrido o tempo da hipotonização, é feita a pré-fixação, com a adição de 6 gotas de fixador (para aproximadamente 3mL de solução hipotônica), contendo 3 partes de álcool metílico e 1 parte de ácido acético (preparado na hora do uso). Após 5 minutos, mais 0,5mL de fixador é adicionado à suspensão. A duração da segunda etapa de pré-fixação é, também, de 5 minutos.

d. a suspensão é, em seguida, centrifugada a 1000 rpm, durante 9 minutos. Descartado o sobrenadante, o sedimento é desmanchado com pipeta Pasteur e novo fixador é adicionado, vagarosamente. A suspensão deve ser pipetada várias vezes para lavar bem as células.

e. o procedimento do item anterior é repetido, realizando-se, pelo menos, mais duas lavagens de fixador.

f. após a última centrifugação, o sobrenadante é descartado e adicionado o fixador na quantidade suficiente para o preparo das lâminas. Se for necessário guardar a suspensão por mais tempo, nessa etapa o material é transferido para um tubo plástico que é completado com fixador e então guardado no freezer. Nesse caso, o fixador deve ser trocado antes do preparo das lâminas.

g. sobre uma lâmina limpa e seca, mantida, horizontalmente, sobre um suporte de arame em banho-maria a 60°C, pinga-se de uma a duas gotas da suspensão. A lâmina é, logo em seguida, retirada do banho-maria e posta a secar ao ar.

Antes da preparação das lâminas, em algumas suspensões celulares passamos a utilizar o *Cytoclear* (ProCell Reagents) que é uma mistura de detergentes que age removendo o citoplasma que ainda persistir após a fixação. Desse modo, adicionar aproximadamente 1mL de fixador contendo *Cytoclear* na proporção de 5 L por mL, após a última centrifugação (item e), pipetar e deixar agir por 5 minutos. Centrifugar novamente e somente após o descarte sobrenadante com *Cytoclear*, adicionar novo fixador na quantidade necessária para o preparo das lâminas.

Cultura de linfócitos

a. o animal é anestesiado com lidocaína 5% e a superfície do tórax e abdômen é limpa com álcool 70%.

b. é feita uma incisão para expor o coração e com uma seringa heparinizada (Heparina Liquefina Roche, 5000 UI/mL) efetua-se uma punção no ventrículo, retirando-se o volume máximo de sangue. Em animais de tamanho médio e grande, é possível realizar a punção cardíaca direta sem expor o coração, evitando o sacrifício do animal.

c. o sangue é inoculado no frasco de cultura na proporção de, aproximadamente, 5 gotas para 5ml do meio *Amphibian Culture Medium* da GIBCO*, suplementado com fitohemaglutinina. Outra opção é a utilização do meio MEM, da Cultilab, diluído na proporção 2:1, suplementado com soro bovino fetal e fitohemaglutinina. Se a amostra de sangue obtida for grande, a seringa é mantida em posição vertical com a finalidade de separar o plasma com leucócitos das hemácias. Essa mistura é inoculada no frasco de cultura na proporção aproximada de 5 gotas para 5 ml de meio.

d. a cultura é incubada em estufa entre 28°C e 29°C, durante no mínimo de 3 e no máximo 7 dias.

e. cerca de 1 hora e 30 minutos antes de terminar o tempo de cultura, pinga-se duas gotas de colchicina (16 µg/mL) em cada frasco. Se for feito tratamento *in vitro* com BrdU, adiciona-se a solução de BrdU/FudR (a mesma utilizada *in vivo*) de modo que a concentração final do BrdU seja de 100 µg/mL, de 8 a 15 horas antes do término da cultura. Nesse caso, a duração do tratamento pela colchicina é de apenas uma hora.

f. ao término do tempo da cultura, o material é centrifugado por 9 minutos e descartado o sobrenadante.

g. os passos seguintes são feitos como descrito a partir do item b para preparações diretas.

* Meio de cultura que pode ser obtido diretamente do fabricante, mas é produzido apenas sob encomenda e em grandes quantidades.

Coloração e diferenciação dos cromossomos

As preparações mitóticas e meióticas serão coradas convencionalmente pelo Giemsa. As de cromossomos mitóticos foram, também, submetidas às técnicas de bandamento C (Sumner, 1972) e de marcação de RON pelo nitrato de prata (Howell e Black, 1980), bem como à coloração com fluorocromos GC-específico cromomicina A₃ (CMA₃) e AT-específico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) segundo Christian *et al.* (1998), respectivamente. A diferenciação das bandas de replicação nos cromossomos, após incorporação de BrdU, foi feita pela coloração FPG (*Fluorochrome Plus Giemsa*), ou com o fluorocromo Acridina Orange, ambos os procedimentos segundo Dutrillaux e Couturier (1981). A seguir são descritas as diferentes técnicas, com algumas modificações adotadas em nosso laboratório.

● Coloração convencional

a. a lâmina é incubada em solução 1N de HCl a 60°C, por 5 minutos, e lavada em água destilada.

b. em seguida, é corada com solução de Giemsa (1mL da solução comercial Merck diluído em 29mL de tampão fosfato pH 6,8), por 7 minutos, lavada em água destilada e seca à temperatura ambiente.

- Marcação regiões de organizadoras de nucléolos (Ag-RON), segundo Howell e Black (1980)

- a. a lâmina é incubada em solução 1N de HCl a 60°C, por 3 minutos, e seca ao ar.
- b. pinga-se na lâmina uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50mL de água destilada mais 0,5mL de ácido fórmico), duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% e cobre-se com lamínula.
- c. em seguida, a lâmina é incubada em câmara úmida a 60°C, durante 3 minutos.
- d. após a incubação, a lâmina é lavada em água destilada e corada em solução de Giemsa, a mesma utilizada para coloração convencional, por 30 segundos, lavada em água destilada e seca à temperatura ambiente.

Quando a técnica de marcação de Ag-RON é aplicada sequencialmente em lâmina já corada com Giemsa, algumas modificações são necessárias:

- i. retirar todo óleo de imersão com ajuda de lavagens com álcool etílico absoluto.
- ii. não é feita a hidrólise com HCl 1N ou a mesma tem o tempo e temperatura reduzidos para evitar que o material se estrague.
- iii. o tempo de incubação na câmara úmida é reduzido para aproximadamente 2 minutos.

- Obtenção de banda C, segundo Sumner (1972)

- a. incubar a lâmina em solução 0,2N de HCl à temperatura ambiente, por 45 minutos e, em seguida, lavá-la em água destilada.
- b. incubar em solução de 2xSSC, a 60°C, por 10 a 15 minutos e lavar em água destilada.
- c. em seguida, incubar a lâmina em solução de hidróxido de bário octahidratado a 5% à temperatura de 30°C, durante 30 a 40 segundos, e lavar em água destilada.
- d. passar a lâmina rapidamente em solução 1N de HCl a 60°C e lavar em água destilada.
- e. incubar em solução de 2xSSC a 60°C, por 30 minutos e, em seguida, lavá-la em água destilada.

f. corar a lâmina com solução de Giemsa (2 mL da solução comercial em 28 ml de tampão fosfato, pH 6,8), por 20 minutos, lavar em água destilada e secá-la à temperatura ambiente.

- Coloração com Fluorocromos CMA₃ e DAPI, segundo Christian *et al.* (1998)

a. incubar a lâmina em solução de formamida 70% diluída em 2xSSC a 70°C por 2 minutos.

b. em seguida, incubar a lâmina em 2xSSC por 2 minutos (repetir esta etapa).

c. incubar a lâmina em álcool 70%, 85% e 100% gelados por 2 minutos cada banho.

d. deixar a lâmina secar ao ar.

e. colocar 50µl da solução CMA₃ (20µg/ml em 32 mM de Cl₂Mg) cobrir com lamínula e deixar por 30 minutos em caixa escura na geladeira.

f. incubar a lâmina em solução de PBS 1x por 2 minutos (repetir esta etapa 2 vezes).

g. incubar a lâmina em solução de DAPI 1,25µL/ mL por 10 minutos no escuro.

h. sem que a lâmina esteja completamente seca fazer a montagem com *antifading* (Vectashield) e lamínula.

- Coloração FPG (*Fluorochrome Plus Giemsa*) após incorporação de 5-bromodeoxiuridina (BrdU), segundo Dutrillaux e Couturier (1981)

a. a lâmina é corada com solução de Hoechst 33258 na concentração de 10 g/mL, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e lavada com água destilada.

b. em seguida, é lavada rapidamente em solução de 2xSSC.

c. pinga-se duas a três gotas de 2xSSC e a lâmina é coberta com lamínula.

d. a lâmina é, então, incubada em câmara úmida preparada com uma placa de Petri, forrada com papel filtro umedecido com solução de 2xSSC e fechada com filme plástico. A lâmina assim preparada é exposta à luz negra por 2 horas.

e. após esse tempo, a lâmina é lavada com água destilada retirando-se a lamínula.

f. em seguida, é incubada em solução de 2xSSC a 60°C, por 20 minutos, e lavada em água destilada.

g. procede-se a coloração com solução de Giemsa, a mesma utilizada para coloração convencional, por 7 minutos, lavando-se, em seguida, em água destilada.

Uma variante da técnica de FPG, baseada em Matsuda e Chapman (1995), com redução considerável da duração do procedimento, tem sido empregada com sucesso em nosso laboratório. Nesse caso, após a coloração com solução de Hoechst 33258 (10 µg/mL) durante 20 minutos e montagem da lamínula com 2xSSC, a lâmina é colocada diretamente sobre uma placa metálica mantida em estufa a 65°C, por 3 minutos e, em seguida, é exposta à luz negra, durante 6 minutos. Os demais passos são os mesmos descritos acima.

- Coloração com Acridina Orange após incorporação de 5-bromodeoxiuridina (BrdU), segundo Dutrillaux e Couturier (1981)

- a. incubar a lâmina em solução de Acridina Orange 0,06% por 20 minutos à temperatura ambiente.

- b. lavar a lâmina com solução tampão fosfato pH 6,8, montar com lamínula e levar para análise ao microscópio de fluorescência.

- Hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica conforme as instruções do fabricante do Kit K5325 da marca DAKO

- a. incubar a lâmina na solução TBS 1 por 2 minutos.

- b. incubar a lâmina em solução de formaldeído 3,7% diluído em TBS por exatamente 2 minutos.

- c. incubar a lâmina em solução TBS* 1 e 2 por 5 minutos cada banho;

- d. incubar a lâmina em solução de pré tratamento* diluída em TBS por 10 minutos.

- e. incubar a lâmina em solução TBS 3 e 4 por 5 minutos cada banho.

- f. incubar a lâmina em álcool 70%, 85% e 95% gelado por 2 minutos cada banho e deixar a lâmina secar ao ar.

- g. colocar 10µl da solução da sonda*, cobrir com lamínula e incubar à 80°C por 5 minutos.

- h. colocar a lâmina em caixa escura por 30 minutos à temperatura ambiente.

- i. passar rapidamente a lâmina pela solução de enxágue*, para remover a lamínula.

- j. incubar a lâmina em solução de lavagem* pré aquecida a 65°C por 5 minutos.

- k. incubar a lâmina em álcool 70%, 85% e 95% gelado por 2 minutos cada banho.

- l. incubar a lâmina em solução de DAPI 1,25µL/ mL por 10 minutos no escuro;

- m. sem que a lâmina esteja completamente seca fazer a montagem com *antifading* (Vectashield) e lamínula, esperar por 15 minutos antes de iniciar a análise.

* soluções fornecidas pelo Kit.

- Hibridação *in situ* fluorescente (Pinkel *et al.* 1986)
 - a. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 min cada. (secar).
 - b. Incubar as lâminas em 100µl de RNase (0,4 % RNase/2xSSC) a 37° C por 1h em câmara úmida.
 - c. Lavar 3X por 5min cada em 2xSSC RT (*shaker*).
 - d. Lavar durante 5 min em Triton 1x (*shaker*).
 - e. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 min cada. (secar).
 - f. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70° por 2min (tempo variável de acordo com o material).
 - g. Desidratar cada lâmina em série alcoólica gelada 70, 90 e 100% a -20°C por 5 min cada. (secar).
 - h. Adicione 3µL da sonda marcada e 10µL do tampão de hibridação (*Hybuffer*) por lâmina em um microtubo.
 - i. Desnaturar a solução de hibridação em termociclador a 95°C por 10 minutos. A temperatura de manutenção deverá ser de 37°C.
 - j. Montar cada lâmina com 13µL de solução de hibridação, cobrir com lamínula, manter overnight a 37° C em câmara úmida.
 - k. Retirar as lamínulas com cuidado e enxaguar as lâminas em 0,4xSSC + 0,3% Triton a 70°C por **exatos** 2 minutos (*shaker*).
 - l. Enxaguar em 2xSSC + 0,1% Triton à temperatura ambiente por 2 minutos (*shaker*).
 - m. Sobre cada lâmina, colocar aproximadamente 30µL de tampão de bloqueio, cobrir com lamínula ou parafilm, incubar por 5 minutos à temperatura ambiente e enxaguar brevemente em 2xSSC a temperatura ambiente.
 - n. Incubar cada lâmina com 4µL de anti digoxigenina rodamina (solução mãe 100µg/mL) e 26µL de tampão de bloqueio durante 1h em câmara escura, a temperatura ambiente.
 - o. Lavar 1x 2 min. com 2xSSC a 43°C (*shaker*).
 - p. Lavar 2x 2 min. com 2xSSC + 0,1% Triton a 43°C (*shaker*).
 - q. Desidratar em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 min cada. (secar).
 - r. Colocar sobre cada lâmina aproximadamente 15µL de solução de DAPI+*antifading* (Vectashield) cobrir com lamínula, guardar em geladeira no escuro.

Análise cromossômica

As preparações cromossômicas submetidas aos diferentes procedimentos de coloração e de marcação cromossômica foram analisadas ao microscópio de luz comum e luz UV. As melhores metáfases mitóticas e fases meióticas foram fotografadas com filme preto e branco Kodak Image Link ou T-Max e filme colorido ASA 400 da Kodak, quando se tratava de FISH com sonda de DNAr. Nesses casos as cópias do material foram obtidas no ampliador fotográfico em papel fotográfico Kodak, ou mesmo a partir do negativo digitalizado. Quando utilizado o sistema digital de captura de imagem, as cópias do material foram obtidas no computador. A montagem dos kariogramas foi feita de acordo com a morfologia dos cromossomos e em ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos de dois braços foram chamados de metacêntricos, submetacêntricos ou subtelocêntricos (Green e Sessions 1991, 2007).

4. Referências Bibliográficas

Aguiar Jr O, Bacci Jr M, Lima AP, Rossa-Feres DC, Haddad CFB, Recco-Pimentel SM Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hyliinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Cladistics* 23:455-463, 2007.

Baldiessa Jr FA, Oliveira PSL, Kasahara S: Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Rev Bras Genet* 16:335-345, 1993.

Bogart JP Evolution of anuran karyotypes, in Vial JL (Ed) *Evolutionary Biology of Anurans* (pp 337-349) Missouri Press, Columbia, 1973.

Bogart JP, Bogart JE Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. *Herpetologica* 27:229-235, 1971.

Catrolí GF, Kasahara S Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. *Publ UEPG Biol Health Sci* 15:67-86, 2009.

Catrolí GF, Faivovich J, Haddad CFB, Kasahara S Conserved Karyotypes in Cophomantini: Cytogenetic Analysis of 12 Species from 3 Species Groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). *J Herpetol* 45:120-128, 2011.

Chek RF, Loughheed SC, Bogart JP, Boag PT Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30 - chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). *Mol Phylogenet Evol* 18:370-385, 2001.

Christian A, McNiel E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Wadren C, Bedford JA A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet Cell Genet* 82:172-179, 1998.

Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). Cytogenet Genome Res 122:163-168, 2008.

Donnellan SC, Mahony MJ Allozyme, chromosomal and morphological variability in the *Litoria lesueuri* species group (Anura: Hylidae), including a description of a new species. Aust J Zoology 52:1-28, 2004.

Dutrillaux B, Couturier J La Pratique de l'Analyse Chromosomique. Masson, Paris, 1981.

Faivovich J A cladistic analysis of *Scinax* Anura: (Hylidae). Cladistics 18:367-393, 2002.

Faivovich J, Garcia PCA, Ananias F, Lanari L, Basso NG, Wheeler WC A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). Mol Phylogenet Evol 32:938-950, 2004.

Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bull Am Mus Nat Hist 294:1-240, 2005.

Frost DR Amphibians of the world: an on-line reference. V5.5. (2011) Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.

Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, Sá RO, Channing A, Wilkinson M, Donnellan SC, Raxworthy CJ, Campbell JA, Blotto BL, Moler P, Drewes RC, Nussbaum RA, Lynch JD, Green DM, Wheeler WC The amphibian tree of life. Bull Am Mus Nat Hist 297:1-370, 2006.

Garda AA, Cannatella DC Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudoeurycea) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. Mol Phylogenet Evol 44:104-114, 2007.

Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE, Wheeler WC Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bull Am Mus Nat Hist 269:1-262, 2006.

Green DM, Sessions SK Nomenclature for chromosomes. in Green DM, Sessions SK (Eds) Amphibian Cytogenetics and Evolution (pp.431-432) Academic Press, San Diego, 1991.

Green DM, Sessions SK Karyology and cytogenetics. In Heatwole H, Tyler M (Eds) Amphibian Biology v7 (pp.2756-2841) Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, 2007.

Gruber SL Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (Anura, Hylidae) dos grupos com $2n=24$ e $2n=30$ cromossomos, com técnicas de coloração diferencial. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2002.

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S Evaluating the diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with $2n = 30$ chromosomes based on the analysis of ten species. *Folia Biologica* 51:68-75, 2005.

Gruber SL, Haddad CFB, 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.

Gruber SL, Zina J, Narimatsu, H, Haddad CFB, Kasahara S Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylinae, Hylidae). *BMC Genetics* 13:28, 2012a.

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. *Comp Cytogenet* 6:409-423, 2012b.

Hedges SB, Duellmann WE, Heinicke MP New world direct developing frogs (Anura, Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography and conservation. *Zootaxa* 1737:1-182, 2008.

Howell WM, Black DA Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015, 1980.

Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). *Genet. Mol. Biol.* 21:471-467, 1998.

King M Amphibia. In John B, Gwent C (Eds) *Animal Cytogenetics. Amphibia 4 Chordata 2* Berlin: Gebruder Borntraeger, p.1-241, 1990.

Kuramoto M A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. *Bull Fukuoka Univ Ed* 39:83-127, 1990.

Matsuda Y, Chapman VM Application of fluorescence in situ hybridization in genome analysis of the mouse. *Electrophoresis* 16:261-272, 1995.

Meunier-Rotival M, Cortadas J, Macaya G Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucl Acids Res* 6:2109-2123, 1979.

Morescalchi A Amphibia. In Chiarelli AB, Capanna G (Eds) *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution* (pp.233-348) London and New York, Academic Press, 1973.

Morescalchi, A. New developments in vertebrates cytotaxonomy. *Genetica* 50:179-193, 1979.

Nunes RRA Citogenética de anfíbios da família Hylidae do Espírito Santo. Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo: 71p, 2006.

Pinkel D, Straume T, Gray JW Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2934-2938, 1986.

Pyron RA, Wiens JJ A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol Phylogenet Evol*, 61:543-583, 2011.

SBH. 2012. Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>> Sociedade Brasileira de Herpetologia. (Acesso dezembro/ 2012).

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

Schweizer D Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatin regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27:190-193, 1980.

Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. *Cytobios* 103:25-38, 2000.

Smith SA, Oca ANM, Wiens JJ A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in middle American treefrogs: Why so few species in lowland tropical rainforests? *Evolution* 61:1188-1207, 2007.

Sumner AT A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306, 1972.

Wiens JJ, Kuczynski CA, Hua X, Moen D An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:871-882, 2010.

5. Resultados

Os resultados do presente trabalho são apresentados sob a forma de capítulos que correspondem a dois manuscritos que deverão ser oportunamente submetidos à publicação em revistas ainda não definidas e um submetido à BMC Genetics. Dois capítulos correspondem a artigos já publicados respectivamente nas revistas BMC Genetics e Comparative Cytogenetics.

Citogenética de *Phyllomedusa distincta* ($2n=2x=26$), *Phyllomedusa tetraploidea* ($2n=4x=52$) e de seus híbridos triploides ($2n=3x=39$) (Hylidae, Phyllomedusinae)

Resumo

Exemplares de *Phyllomedusa* coletados na região sudeste do Brasil foram cariotipadas com uso de coloração convencional e diferencial e com técnica de citogenética molecular. *Phyllomedusa distincta* ($2n=2x=26$) e *P. tetraploidea* ($2n=4x=52$) ocorrem em sintopia em duas localidades do estado de São Paulo, Ribeirão Branco e Ribeirão Grande, onde animais com $2n=3x=39$ foram também encontrados, indicando ocorrência de hibridação natural. Machos diploides apresentaram apenas bivalentes em diplóteno/diacinese e metáfase I, enquanto os tetraploides apresentaram nessas fases bivalentes e tetravalentes. Os triploides apresentaram fases iniciais da meiose, provavelmente em diplóteno/diacinese e metáfase I, com configurações cromossômicas nem sempre identificáveis, porém, reconhecidas às vezes como univalentes, bivalentes ou trivalentes. As células em metáfase II de *P. distincta* e *P. tetraploidea* tinham, respectivamente, 13 e 26 cromossomos, e os híbridos triploides apresentaram nessa fase números cromossômicos variáveis e uma certa quantidade de espermátides, sugerindo que não são completamente estéreis. Os triploides são reconhecidos por um padrão intermediário na coloração internas das coxas, mas as vocalizações de anúncio das três formas são indistinguíveis, não existindo uma barreira reprodutiva entre elas. De fato, os triploides cruzam com ambas as espécies parentais, porém, com produção de desovas menores e girinos com visíveis malformações. Esses animais assim como embriões cariotipados mostraram grande variação intraindividual na constituição cariotípica. As três formas exibiram bandas C centroméricas, pericentroméricas ou intersticiais, a maioria delas intensamente brilhantes com CMA₃ ou com DAPI. Em todos os exemplares a Ag-RON está nos cromossomos 1, mas os diploides têm, adicionalmente, o marcador nos cromossomos 9,

os tetraploides, nos cromossomos 8, enquanto os triploides, nos cromossomos 8 e 9. Entretanto, alguns indivíduos poliploides exibiram padrões inesperados de Ag-RONs, confirmados pelo FISH com sondas de DNAr, sugerindo que cromossomos 9 portadores de RONs ativas ou inativas ocorrem na população tetraploide. Embora os resultados obtidos no presente trabalho não tenham sido conclusivos acerca das hipóteses sobre a origem autopoliploide ou alopoliploide de *P. tetraploidea*, os dados trouxeram, sem dúvida, novas informações sobre os cariótipos de *Phyllomedusa*, especialmente no que se refere às evidências de diploidização do tetraploide, fornecidas pela análise das RONs. Adicionalmente, os dados sugerem que regiões repetitivas, como as sequências ribossômicas ou aquelas semelhantes a telômeros, podem ter um papel importante no processo de diferenciação do cariótipo da espécie poliploide.

Introdução

A poliploidia natural é um evento relativamente frequente em anfíbios, ocorrendo tanto entre organismos partenogenéticos, como também em espécies ou populações bissexuais de Anura e Caudata, tendo um importante papel na especiação desses vertebrados. Na revisão de Schmid *et al.* (2010) são relatados em anuros cerca de 50 casos de poliploidia, entre espécies ou populações poliploides, distribuídas por várias famílias e, também, como ocorrências esporádicas na natureza. Esse número, no entanto, deve estar subestimado levando-se em conta casos não mencionados, como os de *Aphantophryne (Cophyxalus) pansa* (Kuramoto e Allison 1989) e *Chiasmocleis leucosticta* (Kasahara e Haddad 1997), e os relatos recentes de triploidia eventual em *Holoaden luederwaldti* (Campos *et al.* 2012) e em *Engystomops coloradum* (Targueta *et al.* 2012). Embora a octoploidia em *Ceratophrys joazeirensis* já tivesse sido presumida com base em análises de citometria (Mercadal 1986), o cariótipo poliploide só foi confirmado muito tempo depois com as análises citogenéticas realizadas por Vieira *et al.* (2006).

Entre os anuros, a tetraploidia (4x) é o nível mais comumente encontrado, porém, casos de octoploidia (8x) e até de dodecaploidia (12x) são conhecidos, como bem ilustrado na série de espécies de *Xenopus* e do ressuscitado gênero *Silurana* (Tymowska 1991, Evans *et al.* 2008). Na família Hylidae, o relato de tetraploidia em *Hyla versicolor* com $2n=4x=48$ é um dos mais antigos e a espécie tem sido extensivamente estudada desde os anos 1970 (ver Catroli e Kasahara 2009 para referências). Em épocas mais recentes, *H. versicolor* e a espécie ancestral *H. chrysoscelis* com $2n=2x=24$ foram analisadas com inúmeras técnicas de citogenética clássica e molecular, incluindo bandamento de replicação por incorporação de 5-bromodeoxiuridina (Anderson 1991, Wiley e Little 2000). Um outro registro de poliploidia

na família Hylidae é o de exemplares de *Phyllomedusa tetraploidea*, com 52 cromossomos, erroneamente identificados no início como *P. burmeisteri* (Beçak *et al.* 1970). Mais tarde, número diploide de 26 cromossomos foi encontrado em exemplares também identificados como *P. burmeisteri* e foi sugerido, então, que essa espécie tinha populações diploides e tetraploides (Batistic *et al.* 1975). O amplo trabalho citogenético comparativo de 10 espécies de *Phyllomedusa* de Batistic (1989) incluiu a tetraploide do grupo de *P. burmeisteri*, referida como *Phyllomedusa* sp. e coletada em duas localidades. De uma delas em particular, Ribeirão Branco, a autora cariotipou também a diploide *P. distincta* e exemplares híbridos triploides.

É de autoria de Pombal Jr e Haddad (1992) o trabalho de descrição da espécie tetraploide de *Phyllomedusa*, a qual foi designada como *P. tetraploidea*. A área de ocorrência da espécie é o interior dos estados do Paraná e de São Paulo e na localidade de Ribeirão Branco, ao sul do estado de SP, ocorre uma área de sintopia com *P. distincta*, onde foi constatada hibridação entre as duas espécies. A produção de híbridos acontece porque os indivíduos de *P. tetraploidea* e *P. distincta* não reconhecem os parceiros reprodutivos uma vez que as vocalizações de anúncio de ambas as espécies são indistinguíveis. Conforme as observações de Haddad *et al.* (1994), os animais híbridos são numerosos, vigorosos e apresentam vocalização de anúncio indistinguível das espécies parentais, com as quais compartilham o mesmo sítio reprodutivo. A consequência é o cruzamento também de exemplares triploides com os seus parentais, com produção de desovas menores e girinos defeituosos, como foi constatado na natureza ou por cruzamentos experimentais (Haddad 1994)

Um aspecto ligado aos casos de poliploidia é a investigação sobre sua origem. No caso de *P. tetraploidea*, uma das teorias aventadas (Batistic 1989) é a da autopoliploidia de *P. boliviana* (antiga *P. pailona*), baseada na similaridade do padrão de distribuição de regiões organizadoras de nucléolos. Levando-se em conta a semelhança das vocalizações de anúncio e a ocorrência de hibridação interespecífica em Ribeirão Branco, porém, ganha força a hipótese de que *P. distincta* esteja na linha de ancestralidade de *P. tetraploidea* (Pombal Jr e Haddad 1992, Haddad *et al.* 1994), seja por autopoliploidia, seja por alopolidiploidia, nesse caso, por cruzamento com *P. iheringii*, uma outra espécie do grupo de *P. burmeisteri*, mas de ocorrência atual restrita ao Rio Grande do Sul no Brasil e ao Uruguai. Contudo, a autopoliploidia de *P. iheringii* na origem de *P. tetraploidea* não pôde ser afastada também pela similaridade nas respectivas vocalizações de anúncio. Mais recentemente, a filogenia molecular construída por Brunes *et al.* (2010) baseada, principalmente, em sequenciamento de

genes mitocondriais e nucleares, mostrou *P. distincta* e *P. tetraploidea* como grupos irmãos em um mesmo clado, enquanto *P. iheringii* aparecia em clado separado.

O presente trabalho traz dados obtidos com técnicas de citogenética clássica e molecular aplicados em cromossomos mitóticos de *P. distincta*, *P. tetraploidea* e de seus híbridos triploides coletados em Ribeirão Branco, SP, e em uma segunda área de sintopia, em Ribeirão Grande, SP. Alguns poucos exemplares das duas espécies são procedentes de localidades diferentes dessas mencionadas. Adicionalmente, são apresentadas informações sobre cromossomos meióticos das três formas cariotípicas e sobre os cromossomos de embriões e girinos obtidos de cruzamentos de exemplares triploides com parentais tanto diploides como tetraploides, analisados com coloração convencional. A melhor caracterização dos cariótipos das duas espécies e dos híbridos pode eventualmente ajudar na questão relativa à origem da poliploidia e detectar algum indício de diploidização no cariótipo de *P. tetraploidea* com as técnicas citogenéticas utilizadas.

Material

Foram realizadas análises citogenéticas em 25 exemplares adultos de *Phyllomedusa* procedentes de localidades dos estados de São Paulo e do Paraná (Tabela 1). Os animais foram coletados e identificados pela equipe do Dr. Célio F. B. Haddad do Departamento de Zoologia, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. Os exemplares analisados estão depositados na coleção de anfíbios CFBH do referido Departamento.

Foram analisados os cromossomos de oito girinos e de um único animal metamorfoseado (A113) no laboratório, provenientes de duas desovas coletadas na natureza, resultantes de cruzamentos naturais entre parentais desconhecidos, provavelmente dos tipos 3x x 4x. Três girinos e também quatro embriões, provenientes de duas desovas obtidas por cruzamentos realizados no laboratório, tiveram seus cromossomos analisados.

Métodos

Preparações cromossômicas diretas foram obtidas de exemplares adultos a partir da medula óssea, fígado, epitélio intestinal e também de testículos dos animais quando do sexo masculino (Baldiessa Jr *et al.* 1993, Schmid 1978). De alguns animais, suspensões celulares foram adicionalmente obtidas a partir da cultura de linfócitos (Kasahara *et al.* 1998). Em alguns animais foi realizado tratamento *in vivo* com 5- bromodeoxiuridina (BrdU) para obtenção de bandas de replicação conforme Silva *et al.* (2000). No caso das preparações obtidas por cultura de linfócitos, o tratamento *in vitro* com o análogo de base seguiu os procedimentos descritos por Kasahara *et al.* (1998).

A coloração convencional dos cromossomos foi feita com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8, a impregnação de regiões organizadoras de nucléolo pela prata para identificação de Ag-RON seguiu a técnica de Howel e Black (1980) e a de marcação de regiões heterocromáticas por banda C seguiu a técnica de Sumner (1972). Para a diferenciação de bandas de replicação foi seguida a técnica de *Fluorochrome Plus Giemsa* descrita por Dutrillaux e Couturier (1981) ou Matsuda e Chapman (1995). A coloração simultânea com os fluorocromos AT-específico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), e GC-específico cromomicina A₃ (CMA₃) seguiu o protocolo descrito por Christian *et al.* (1998). Adicionalmente, em alguns casos, o contra corante distamicina A (DA) foi empregado segundo Schweizer (1980). A técnica de hibridação *in situ* (FISH) com sonda ribossômica HM123 (Meunier-Rotival *et al.* 1979) foi feita de acordo com (Pinkel *et al.* 1986) e para hibridação com sondas teloméricas foi utilizado o Kit DAKO, seguindo as instruções do manual do fabricante.

Para obtenção de preparações citológicas de embriões, esses foram mantidos durante aproximadamente 4 horas em solução de Hanks diluída 1:1 em água, na qual foi adicionada colchicina para uma concentração final de 0,1%. Os embriões foram colocados em solução hipotônica, preparada com solução salina de anfíbio e água destilada (1:15), e nela mantidos durante 30 minutos a 37°C. A dissociação das células foi feita em fixador metanol e ácido acético (3:1) com auxílio de seringa. No caso de girinos, os mesmos foram colocados em aquários contendo solução de colchicina em concentração final de 0,1% durante 4 horas. Para a obtenção da preparação citológica, foram retirados o intestino e a ponta da cauda e colocados em solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075M durante 30 minutos a 37°C. Os tecidos foram dissociados em fixador metanol e ácido acético (3:1) com auxílio de seringa. Para a obtenção da preparação citológica do animal metamorfoseado em laboratório utilizou-se apenas o intestino conforme descrito para os girinos. Os cromossomos de embriões e girinos foram analisados apenas com coloração pelo Giemsa.

As preparações cromossômicas submetidas aos diferentes procedimentos de coloração e de marcação cromossômica foram analisadas ao microscópio de luz comum e luz UV. As melhores metáfases mitóticas e fases meióticas foram fotografadas com filme preto e branco Kodak Image Link ou T-Max e filme colorido ASA 400 da Kodak, quando se tratava de FISH com sonda de DNAr. Nesses casos as cópias do material foram obtidas no ampliador fotográfico em papel fotográfico Kodak, ou mesmo a partir do negativo digitalizado. Quando utilizado o sistema digital de captura de imagem, as cópias do material foram obtidas no computador. A montagem dos kariogramas foi feita de acordo com a morfologia dos cromossomos e em ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos de dois braços foram chamados de metacêntricos, submetacêntricos ou subtelocêntricos (Green e Sessions 1991, 2007).

Resultados

Os exemplares de *P. distincta* apresentam $2n=2x=26$, dos quais os pares 1, 4, 7, 11 e 13 são metacêntricos, os pares 2, 3, 5, 6, 10 e 12 são submetacêntricos e os pares 8 e 9 são subtelocêntricos (Fig. 1a). Os exemplares de *P. tetraploidea* apresentam $2n=4x=52$, incluindo o mesmo conjunto básico x de *P. distincta*, porém, com quatro cromossomos em cada grupo ou quarteto (Fig. 1b). Os exemplares híbridos dessas duas espécies apresentaram $2n=3x=39$, com três cromossomos em cada grupo ou terceto (Fig. 1c). Foram visualizadas constrições secundárias na região proximal dos braços curtos de cromossomo 1 e na região proximal dos braços longos de cromossomo 9 em *P. distincta*; em *P. tetraploidea*, na região proximal dos braços curtos de cromossomo 1 e na região proximal dos braços curtos de cromossomo 8; e em exemplar híbrido, na região proximal dos braços curtos de cromossomo 1 e em cromossomos 8 e 9, na mesma posição observada, respectivamente, nas espécies parentais. As constrições secundárias não foram visualizadas em todos os homólogos em cada célula analisada.

A análise da meiose mostrou que os machos de *P. distincta* apresentaram 13 bivalentes durante as fases de diplóteno/diacinese e metáfase I (Fig. 2a). Células em metáfase II apresentaram 13 cromossomos. As células em diplóteno/diacinese e metáfase I dos machos de *P. tetraploidea* mostraram número variável de tetravalentes e bivalentes (Fig. 2b, 2c) e as células em metáfase II apresentavam invariavelmente 26 cromossomos. Os machos com constituição triploide apresentaram fases iniciais da meiose, provavelmente em diplóteno/diacinese e metáfase I, com configurações cromossômicas reconhecidas às vezes como univalentes, bivalentes ou trivalentes (Fig. 2d, 2e). Foram identificadas células em

metáfase II que apresentavam número variável de cromossomos (Fig. 2f), assim como espermátides em processo de diferenciação ainda que em pequena quantidade (Fig. 2g).

A técnica de impregnação pela prata revelou em todos os exemplares de *P. distincta* marcação em ambos os homólogos do par 1 (região **p** proximal), assim como em ambos os homólogos do par 9 (região **q** proximal), segundo um padrão 1199 e totalizando sempre quatro Ag-RONs por metáfase (Fig. 3a). Na amostra de *P. tetraploidea* foi observado que seis dos exemplares tinham Ag-RONs somente em cromossomos 1 (região **p** proximal) e 8 (região **p** proximal), em número total de marcações variando de quatro a oito por metáfase, porém, relativamente constante para cada indivíduo e com apenas um caso que foi considerado de variação intraindividual. Nesse exemplar foram observadas metáfases com quatro (1188, 1888) ou cinco Ag-RONs (11888, 18888). Nas Fig. 3b, 3c e 3d são mostrados alguns dos padrões de Ag-RONs, como o 11888, 111888 e o 1118888, respectivamente; em dois outros exemplares de *P. tetraploidea* foi observado padrão no qual apareciam cromossomos 9 com Ag-RON, como 111899 (figura não mostrada) em um deles e 11188899 ou 11888999 no outro (Fig. 3e, 3f). Na amostra de exemplares híbridos foi observado que nove dos exemplares tinham Ag-RONs em cromossomos 1 (1**p** proximal), 8 (região **p** proximal) e 9 (região **q** proximal), em número total de marcações variando de três a seis por metáfase, porém, relativamente constante para cada indivíduo, não ultrapassando o padrão esperado máximo 111889 de um cruzamento de *P. distincta* (1199) e *P. tetraploidea* (11118888). Nas Fig. 3g, 3h, 3i, 3j e 3k são apresentados alguns padrões de Ag-RONs, como o 189, o 1189, o 11889, o 11189 e o 111889, respectivamente; um único exemplar híbrido apresentou um padrão 111899 de Ag-RONs (Fig. 3l), com dois cromossomos 9 impregnados pela prata.

A técnica de FISH com sondas ribossômicas foi aplicada em preparações citológicas de alguns exemplares de cada um dos três níveis de ploidia. Em três representantes de *P. distincta* com padrão 1199 de Ag-RONs foram observados quatro sinais de hibridação, correspondendo às marcações pela prata (Fig. 4a). Em *P. tetraploidea*, a técnica de FISH foi realizada em três exemplares: um com variação intraindividual, mostrando quatro padrões de Ag-RONs, apresentou seis sinais de hibridação do tipo 118888 (Fig. 4b); um com padrão 111888 de Ag-RONs apresentou sete sinais de hibridação do tipo 1111888 (Fig. 4c); e um com padrão 11188899 e 11888999 de Ag-RONs mostrou oito sinais de hibridação do tipo 11888999 (Fig. 4d). Nos híbridos triploides a técnica de FISH foi realizada em três exemplares: um com padrão 1189 de Ag-RONs apresentou cinco sinais de hibridação do tipo 11189 (Fig. 4e); um com padrão 11889 de Ag-RON apresentou cinco sinais de hibridação do tipo 11889 (Fig. 4f); e um que tinha padrão 11189 de Ag-RONs apresentou seis sinais de

hibridação do tipo 111899 (Fig. 5a). Nesse animal, a técnica de impregnação pela prata foi também realizada sequencialmente nas metáfases após serem submetidas ao FISH com sonda de DNAr (Fig. 5b), tendo sido confirmado o padrão 11189 de Ag-RON registrado quando essa técnica foi aplicada no material citológico, não anteriormente tratado com nenhum outro procedimento que não o de Ag-RON (Fig. 3j).

O bandamento C foi realizado em preparações citológicas de três exemplares de *P. distincta*, três de *P. tetraploidea* e três exemplares híbridos e a distribuição da heterocromatina é equivalente nos grupos de cromossomos das três formas, embora nem sempre similar nos respectivos homólogos. Nas Fig. 6a, 6b e 6c são apresentados os padrões de cada uma das formas cariotípicas. De um modo geral, todos os cromossomos apresentam banda C na região centromérica, sendo que algumas dessas bandas são relativamente pequenas ou quase ausentes, como as que aparecem nos cromossomos 2, 3, 4, 5, 8, 9, 12 e 13. Outras são maiores, estendendo-se pela região proximal, seja dos braços curtos, seja dos braços longos ou de ambos os braços, como aparecem nos cromossomos 1, 6, 7, 10 e 11. Dependendo da condensação cromossômica, as bandas C proximais aparecem como um bloco único em continuidade com a banda centromérica ou como uma banda separada. Os cromossomos 2 e 3 nos três cariótipos mostram banda C intersticial nos braços curtos, bem evidente em alguns casos.

A coloração com fluorocromos base-específicos foi aplicada em preparações citológicas de dois exemplares de *P. distincta*, dois de *P. tetraploidea* e quatro exemplares híbridos. O fluorocromo CMA₃ utilizado sozinho ou com o contra corante DA mostrou fluorescência na região centromérica de praticamente todos os cromossomos, com exceção de alguns deles, como os menores do complemento correspondentes aos homólogos do grupo 13, e adicionalmente as RONS também apareceram brilhantes com esse fluorocromo (Fig. 7a, 7b, 7c). Com frequência foi observada banda negativa na região intersticial dos cromossomos 2 e 3. Com DAPI sozinho sem o contra corante DA a fluorescência também está presente na região centromérica de alguns cromossomos, porém, aparece menos brilhante em relação à coloração com CMA₃. Em alguns cromossomos coloração brilhante foi observada nas regiões proximais dos braços longos de alguns cromossomos como os do grupo 1, ou nas regiões proximais de ambos os braços de alguns cromossomos como os dos grupos 7 e 11 (Fig. 7d, 7e, 7f). Quando o contra corante DA foi utilizado juntamente com DAPI, quase todos os centrômeros mostraram coloração brilhante, mas com menos intensidade do que a fluorescência do CMA₃.

A técnica de FISH com sondas de telômero, realizada nas preparações citológicas de cada representante das três formas cariotípicas, identificou as regiões terminais de todos os cromossomos nos três cariótipos (Fig. 8a, 8b, 8c). Nas metáfases de *P. distincta* os quatro cromossomos dos pares 7 e 11 exibiram adicionalmente forte sinal de hibridação na região centromérica, enquanto apenas um cromossomo 11 apresentou tal marcação intersticial nas metáfases de *P. tetraploidea*. O híbrido tinha um cromossomo 7 e um 11 com hibridação da sonda telomérica no centrômero.

Tratamento de BrdU foi realizada em dois exemplares de *P. distincta*, três de *P. tetraploidea* e em quatro exemplares híbridos. Bons resultados de bandas de replicação foram obtidos em representantes das três ploidias, permitindo o correto reconhecimento dos homólogos de cada grupo cromossômico (Fig. 9a, 9b, 9c). Foi possível constatar que os cromossomos nos três cariótipos apresentaram alto grau de homeologia.

As preparações citológicas de embriões e girinos forneceram número baixo de metáfases, nem sempre de boa qualidade. As análises citogenéticas mostraram que os indivíduos exibiram alta variação quanto o número de cromossomos nas células analisadas (Tabelas 2 e 3). Nas Fig. 10a e 10b são mostrados somente dois dos cariótipos de indivíduos originados de cruzamentos entre parentais 3x x 2x e 3x x 4x, respectivamente.

Discussão

A análise citogenética revelou que os exemplares de *Phyllomedusa* estudados, independente do grau de ploidia, apresentam grupos de cromossomos com variação gradual de tamanho do grupo 1 ao grupo 13. Em *P. distincta* ($2n=2x=26$) existem dois cromossomos homólogos em cada grupo, enquanto em *P. tetraploidea* ($2n=4x=52$) são quatro e nos híbridos ($2n=3x=39$) são três homólogos em cada grupo. Não foram notadas diferenças consistentes em tamanho e morfologia entre os homólogos dentro de um mesmo grupo cromossômico nos três cariótipos e eventuais pequenas discrepâncias nesses dois parâmetros foram atribuídas à condensação diferencial da cromatina, o que é bastante usual dentro de um mesmo cariótipo. Portanto, a constituição cromossômica haploide nos animais do presente trabalho parece ser invariável e é equivalente para a maioria das espécies de *Phyllomedusa* cariotipadas até o presente.

Existem na literatura informações citogenéticas sobre 17 espécies de *Phyllomedusa* (revisão em Catroli e Kasahara 2009 e relatos recentes em Bruschi *et al.* 2012a, Bruschi *et al.* 2012b) que mostram que, com exceção da poliploide *P. tetraploidea*, as espécies são todas diploides, com predominância de 26 cromossomos de dois braços, com exceção de *P. tarsi* e *P. camba*, cariotipadas, respectivamente, por Bogart (1973) e Paiva *et al.* (2009), cujos cariótipos incluem três pares de cromossomos telocêntricos. Um dado inusitado foi o achado de $2n=40$ e provável par sexual XY em um macho de *P. rohdei* de Linhares, ES (Nunes e Fagundes 2008), enquanto outra amostra dessa localidade e de outras regiões do sudeste e nordeste do Brasil (Batistic 1989, Paiva *et al.* 2009, Barth *et al.* 2009) apresentaram cariótipo com $2n=26$. Tal fato reforça a idéia de que todas as espécies de *Phyllomedusa* compartilham o mesmo conjunto básico $x=13$, embora constrição secundária tenha sido relatada em diferentes

sítios cromossômicos. Na presente amostra, por exemplo, esse marcador foi observado no cromossomo 1 nas três formas cariotípicas, bem como no 8 (se tetraploide ou triploide) ou no 9 (se diploide ou triploide).

Como é usual, as constrições secundárias nas espécies de *Phyllomedusa* são organizadoras nucleolares e, diferindo da maioria dos hilídeos (revisão em Cartoli e Kasahara 2009, Cardozo *et al.* 2011, Gruber *et al.* 2012a, Gruber *et al.* 2012b), as espécies de *Phyllomedusa*, geralmente, apresentam Ag-RONs múltiplas, com mais de um par de cromossomos marcadores. Nas 12 espécies analisadas (Batistic 1989, Morand e Hernando 1997, Nunes e Fagundes 1997, Barth *et al.* 2009, Paiva *et al.* 2010, Bruschi *et al.* 2012a, Bruschi *et al.* 2012b) existe uma diversidade quanto ao número e localização dos sítios de Ag-RONs, mas quando são levadas em conta as quatro espécies do grupo de *P. burmeisteri*, com exceção de *P. bahiana* ainda não cariotipada, foi observado que *P. burmeisteri*, *P. distincta* e *P. iheringii* apresentam conservadamente Ag-RONs nos cromossomos 1 e 9. *Phyllomedusa tetraploidea* compartilha com essas espécies somente a RON localizada no cromossomo 1 e aparentemente houve mudança do sítio do organizador nucleolar do cromossomo 9 para o 8, provavelmente, quando da diferenciação do cariótipo da espécie tetraploide.

Phyllomedusa distincta apresentou invariavelmente quatro RONs por metáfase identificadas não só pela impregnação da prata, como também pelo FISH com sonda de DNAr. Por outro lado, embora a localização das Ag-RONs em *P. tetraploidea* fosse nos cromossomos 1 e 8, os exemplares mostravam números diferentes de marcações, desde quatro até um total de sete marcações por metáfase, com apenas um caso de variação intra-individual. Esse exemplar, contudo, mostrou o único padrão 1118888 de FISH, compatível com a variação registrada de Ag-RON (1888 ou 1188 até 18888), admitindo inatividade genética de algumas regiões ou mesmo a existência de marcações não visualizadas por serem pequenas demais ou por estarem em área de superposição cromossômica na metáfase. Tal justificativa é também válida para um segundo exemplar que exibiu mais sítios de DNAr identificados com o FISH do que o observado com a impregnação pela prata. Um achado inesperado foram os casos de *P. tetraploidea* nos quais pelo menos dois cromossomos 9 apresentavam inquestionavelmente sítio impregnado pela prata, na mesma posição descrita para o par 9 de *P. distincta*. O dado de FISH com sonda de DNAr em um desses exemplares revelou que, de fato, esses sítios contêm genes ribossomais. Nossos resultados não permitem explicar como *P. tetraploidea* que, aparentemente tinha a RON fixada no cromossomo 8, voltou a carregar essa região no cromossomo 9 tal como as espécies diploides do grupo de *P. burmeisteri*. No entanto, algumas hipóteses podem ser sugeridas: uma é a permanência de

cromossomo 9 marcador na população de tetraploides, ainda que em tão poucos indivíduos que não foram amostrados anteriormente; ou segmentos com poucas cópias dos genes ribossômicos se mantiveram no sítio original e tais remanescentes poderiam ter amplificado em determinadas circunstâncias; e mesmo a introgressão de caracteres do ancestral diploide para a espécie tetraploide via híbridos interespecíficos não pode ser completamente descartada.

Uma observação interessante fornecida pelos dados de FISH é que na população dos tetraploides estão presentes cromossomos 1 e 8 que podem ter perdido as sequências de DNAr, fato esse não observado em *P. distincta*, cujos exemplares tinham sempre quatro sinais de hibridação por metáfase. A perda de RONS poderia decorrer de regulação gênica em que a quantidade necessária do produto final deve ter acontecido não por mera inativação dos genes ribossomais, mas por eliminação das cópias gênicas em excesso por ser isso bem tolerado. Esse fato pode ser um indício da reorganização do genoma em direção possivelmente ao processo de diploidização. No trabalho de Schmid *et al.* (1985) foi constatada no anuro *Ceratophrys ornata* ($2n=8x=104$) diploidização dentro de dois octetos, cujos cromossomos são portadores de Ag-RONS. O marcador RON nunca estava presente na totalidade dos homólogos e sim, em geral, na metade deles, achado esse confirmado pelas colorações GC-específicas mitramicina e cromomicina A₃, sugerindo deleção de DNAr e não inatividade genética.

Na amostra de híbridos os padrões de Ag-RON observados estão de acordo o esperado de cruzamentos de *P. distincta* com 1199 e *P. tetraploidea* com um máximo 11118888, padrão esse, no entanto, nunca observado nos tetraploides, pois foi comprovada entre eles a ocorrência de cromossomos 1 e 8 sem RON. Os dados de FISH com sonda de DNAr em dois indivíduos mostraram correspondência entre o número de sítios de DNAr com o número de Ag-RONS e um exemplar exibiu marcação de Ag-RON em dois cromossomos 9 e não em apenas um como seria o esperado se não fosse conhecida a presença desse marcador no cromossomo 9 também entre os tetraploides. Um resultado surpreendente é do triploide que mostrou padrão 11189 de Ag-RON, porém, o FISH revelou sinais de hibridação do tipo 111899 indicativo de presença de RON em mais de um cromossomo 9, porém, inativa do ponto de vista genético.

A técnica de banda C mostrou que as três formas cariotípicas exibem o mesmo padrão de distribuição da heterocromatina, não sendo possível fazer distinção conclusiva entre os cromossomos dos complementos diploide, tetraploide ou triploide. Tampouco Batistic (1989) relatou diferença nos padrões de bandas C de *P. distincta*, *P. tetraploidea* e dos híbridos

triploides, atribuindo eventuais diferenças entre os homólogos de um mesmo grupo à distensibilidade variável da cromatina ou aos diferentes graus de reação aos tratamentos do bandamento. Portanto, fica afastada, no momento, a diferenciação de banda C, entre os homólogos de um mesmo quarteto em *P. tetraploidea*, embora algumas variações tenham sido observadas, mas que necessitam ser esclarecidas se são, de fato, indício de diploidização, ou reflexo de variação interindividual ou mesmo intraindividual no padrão de banda C em exemplares tetraploides. Apesar de não conclusiva na presente amostra de *Phyllomedusa*, a análise dos padrões de bandas C é relevante para revelar indícios de diploidização, tal como foi revelado no anuro tetraploide *Odontophrynus americanus*, e no octoploide *Ceratophrys ornata* (Schmid *et al.* 1985). Em ambas as espécies havia heterogeneidade nos padrões de bandas C dentro de alguns quartetos ou octetos, porém, similares para cada dois cromossomos no caso do tetraploide e a cada quatro cromossomos no caso do octoploide.

O uso de fluorocromos base-específicos não apontou diferenças entre os três cariótipos de nossa amostra, mas, mostrou que as regiões repetitivas identificadas pela banda C não apresentam a mesma composição molecular, já que as bandas centroméricas são ricas em bases GC, enquanto as regiões pericentroméricas têm riqueza de bases AT. Quando os fluorocromos CMA₃ e DAPI foram utilizados juntamente com o DA, as regiões centroméricas foram identificadas por ambos os fluorocromos porque o contra corante interfere na coloração com produção de um resultado diferente (Schmid 1980).

A sonda (TTAGGG)_n hibridou nos telômeros e adicionalmente nos centrômeros de alguns cromossomos, podendo indicar a existência de remanescentes teloméricos nessas regiões em caso de rearranjos estruturais, como em roedores (Fagundes e Yonenaga Yassuda 1998, Ventura *et al.* 2009) ou, o que é mais provável, presença de sequências repetitivas semelhantes às teloméricas, como têm sido observado em outras espécies de hílideos (Gruber *et al.* 2012a, Gruber *et al.* 2012b). A presença dessas regiões repetitivas nos cromossomos dos pares 7 e 11 de *P. distincta*, em apenas um dos cromossomos 7 de *P. tetraploidea* e em dois cromossomos 7 e um 11 do híbrido pode indicar uma diferença dos cariótipos diploide e tetraploide.

As bandas de replicação obtidas em representantes das diferentes ploidias permitiram o correto reconhecimento dos homólogos de cada grupo cromossômico e evidenciaram um alto grau de homeologia nas três formas cariotípica. Os padrões de bandamento dos cromossomos dentro de cada par, quarteto ou terceto, porém, nem sempre são idênticos como resultado de diferenças de condensação cromossômica ou artefato técnico, não sendo completamente afastada a possibilidade de indício de diploidização. Foi verificado (Beçak e

Beçak 1998, Beçak e Kobashi 2004) que os cromossomos de *Odontophrynus americanus* exibiam condensação diferencial, quando metade do genoma estava defasado no ciclo celular (anfiplastia). Embora os autores tenham sugerido que uma alta taxa de metilação no DNA, relacionada com a regulação gênica, poderia causar tal fenômeno, esse não parece ser o caso dos cromossomos de *Phyllomedusa* estudadas no presente trabalho. Apesar da heterogeneidade usualmente observada nos padrões de bandas de replicação em elementos homólogos dentro de cada grupo cromossômico em casos de poliploides, a técnica representa uma ferramenta adicional para confirmar ou afastar indícios de diferenciação cromossômica em direção a uma diploidização do genoma. No tetraploide *Hyla versicolor*, Wiley e Little (2000) observaram que os cromossomos tinham correspondência nos padrões de replicação dentro de cada quarteto, não havendo, portanto, indícios de diploidização. Por outro lado, em *Odontophrynus americanus*, Schmid *et al.* (1985) corroboraram a diploidização que havia sido constatada pelo padrão de bandamento C. Um caso exemplar da importância da técnica de bandas de replicação na citogenética de poliploides é o da espécie *Xenopus laevis* ($2n=4x=36$), em que o status original da tetraploidia foi também confirmada pela análise minuciosa dos cromossomos (Schmid e Steinlein 1991). Foi mostrado pelas bandas de replicação que todos os pares de cromossomos podiam ser reagrupados em quartetos, embora alguns desses já tivessem um grau muito grande de diferenciação.

Tendo sido a coleta dos animais baseada em busca ativa guiada pela vocalização de anúncio, há um excesso de machos na presente amostra. Todos eles tiveram analisadas as preparações meióticas. Como esperado, bivalentes foram observados em diplóteno/diacinese e em metáfase I de *P. distincta*, porém, bivalentes e tetravalentes no caso de *P. tetraploidea*. A presença de tetravalentes poderia ser uma indicação de origem por autopoliploidia, mas considerando o alto grau de conservação nos cromossomos das espécies do gênero, não se pode afastar a alopoliploidia. Os híbridos triploides mostravam fases meióticas não identificadas, cujos cromossomos tinham indícios de degeneração, porém, algumas poucas células, provavelmente em diplóteno/diacinese e em metáfase I tinham aspecto relativamente normal com cromossomos emparelhados ou não. Células em metáfases II e, surpreendentemente, algumas espermátides, talvez aquelas carregando constituições cromossômicas aproximadamente equilibradas, foram observadas na preparação. É provável que tais espermátides passem por subsequente diferenciação em espermatozóides, o que explica uma certa fertilidade dos animais híbridos. Segundo observações de Haddad *et al.* (1994) feitas no campo, os híbridos triploides se reproduzem normalmente, mas originam desovas que contém poucos ovos ou com baixa taxa de fertilização. O desenvolvimento

desses ovos gerou, com frequência, girinos de tamanho pequeno, despigmentados e com severas deformidades físicas incapazes de completarem o desenvolvimento (Haddad 1994). A nossa análise citogenética de embriões, girinos e de um único exemplar jovem recém metamorfoseado mostrou número variável de cromossomos nas poucas metáfases disponíveis para análise, sem possibilidade de determinar uma constituição cariotípica modal. As células com número não equilibrado de cromossomos parecem ser resultantes de eliminação progressiva de cromossomos durante o desenvolvimento embrionário. Quaisquer que sejam os parentais, os triploides devem produzir majoritariamente progênie inviável. Seria interessante acompanhar futuramente o desenvolvimento de animais resultantes de tais cruzamentos para que se possa entender a existência de animais como o A113 do presente trabalho.

Os dados aqui obtidos com diferentes técnicas citogenéticas não forneceram elementos que pudessem contribuir para a elucidação da origem de *P. tetraploidea*, se por autopoliploidia ou alopolidiploidia. Uma grande similaridade cariotípica foi constatada com relação a *P. distincta*, o que juntamente com inúmeros outros parâmetros (Haddad *et al.* 1994) suportam a sua ancestralidade na origem da poliploidia. Embora não tivéssemos analisado cariótipo de *P. iheringii*, o trabalho de Batistic (1989) mostrou que essa espécie compartilha com *P. distincta* e outras espécies do grupo de *P. burmeisteri* equivalência quanto ao número e morfologia cromossômica, bem como quanto o número e localização de Ag-RONs e padrão de bandas C. Com base somente em tais dados citogenéticos e na similaridade de vocalização de anúncio de *P. iheringii* com relação a *P. tetraploidea* (Haddad *et al.* 1994), não se pode afastar a ancestralidade da primeira na origem da poliploidia da segunda. O trabalho de filogeografia das espécies de *Phyllomedusa* do grupo de *P. burmeisteri*, baseado em principalmente em dados moleculares, suportam fortemente a hipótese de que a poliploidia de *P. tetraploidea* se originou de uma duplicação do genoma de *P. distincta*, porém, Brunet *et al.* (2010) não excluem a hipótese de que *P. tetraploidea* teria se originado por alopolidiploidia por cruzamento das duas espécies diploides mais próximas.

A poliploidia tem grande importância evolutiva, pois representa possibilidade de especiação rápida, sem a ocorrência de formas transicionais, sendo o único processo inquestionável de especiação cromossômica. A duplicação do conteúdo genômico fornece uma vantagem adaptativa para a nova espécie que, no caso de *P. tetraploidea*, deve ter permitido a ocupação de novo ambiente na área de planalto onde os animais estão sujeitos a maior sazonalidade em comparação às demais espécies do gênero que ocorrem em regiões litorâneas (Haddad *et al.* 1992). Sendo um processo rápido, é esperado que o poliploide de

origem recente guarde ainda alta homeologia dos cromossomos em relação às espécies parentais. Como vimos, o cariótipo de *P. tetraploidea* conserva aparentemente pouca diferenciação em relação a *P. distincta*, pelo menos com as técnicas utilizadas. Uma abordagem citogenética que poderia ser utilizada no futuro é hibridação genômica (GISH), pela qual o conteúdo genômico de uma determinada espécie poliploide pode ser comparado com os de espécies diploides parentais presumidas, tal como relatado por (Bi e Bogart 2006) em anfíbios do gênero *Ambystoma* (ordem Caudata).

O caminho evolutivo da espécie poliploide é a diploidização que acontece no sentido de organizar o conteúdo genômico em uma estrutura de funcionamento diploide em termos de regulação gênica e características cromossômicas, tendo como pré requisito a formação preferencial de bivalentes durante a meiose (Schmid *et al.* 2010). Segundo Ohno (1970), a diploidização é imprescindível para estabilizar as vantagens seletivas produzidas pela poliploidização, contribuindo para a criação de novos locos gênicos. O anuro *Odontophrynus americanus*, com populações diploides e poliploides, foi investigado quanto à origem e evolução no diz respeito à diploidização e regulação gênica com o uso do marcador Ag-RON (Ruiz e Beçak 1976, Ruiz *et al.* 1981, Schmid *et al.* 1985). O estudo comparativo de animais 2x e 4x mostrou que o tetraploide tem, proporcionalmente, duas vezes mais cístrons ribossômicos que o diploide, mas que a quantidade total de algumas proteínas e de RNA é igual nas duas formas (Ruiz e Beçak 1976, Ruiz *et al.* 1981). Em estudos subsequentes (Ruiz e Brison 1989) demonstraram que a inativação dos genes ribossômicos em *O. americanus* acontece por metilação do DNA, dessa forma mantendo a atividade gênica em nível balanceado.

O diagnóstico do nível de ploidia em *Phyllomedusa* pode ser feito de forma preliminar com base no tamanho dos exemplares de *P. distincta*, de *P. tetraploidea* e de híbridos triploides e nos padrões de coloração da parte interna das coxas (Haddad 1994). De acordo com esse autor os exemplares triploides são, em geral, ligeiramente maiores do que os tetraploides que, por sua vez, são maiores do que os diploides; e que embora os híbridos exibam coloração intermediária alguns deles apresentam padrão igual a dos parentais. Portanto, a determinação da constituição cromossômica mitótica, mesmo que seja apenas com uso de coloração convencional, e a observação complementar de células meióticas em diplóteno/diacinese ou metáfase I são de importância fundamental para diagnosticar de forma inequívoca os níveis de ploidia dos animais.

Os resultados obtidos no presente trabalho trouxeram, sem dúvida, novas informações sobre os cariótipos de *Phyllomedusa*, especialmente no que se refere às evidências de

diploidização do tetraploide, fornecidas pela análise das RONS e, eventualmente, por outras técnicas, mas que necessitam ser ainda esclarecidas. Os nossos resultados sugerem que regiões repetitivas, como os cístrons ribossômicos ou aquelas semelhantes a telômeros, podem ter um papel importante no processo de diferenciação do cariótipo poliploide. Novas abordagens que permitam caracterizar melhor os diferentes tipos de sequências repetitivas, bem como técnicas como o GISH e microdissecção seguida de pintura cromossômica, podem fornecer evidência citológica de uma diferenciação molecular que serão de grande utilidade na investigação citogenética de *P. tetraploidea* e de outras espécies poliploides em geral.

Referências bibliográficas

Anderson K: Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs, in Green DM, Sessions SK (eds): Amphibian Cytogenetics and Evolution, pp 299-331 (Academic Press, San Diego 1991).

Baldissera Jr FA, Oliveira PSL, Kasahara S: Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. Rev Bras Genet 16:335-345 (1993).

Barth A, Solé M, Costa MA: Chromosome polymorphism in *Phyllomedusa rohdei* populations (Anura: Hylidae). J Herpetol 43:676-679 (2009).

Batistic RF, Soma M, Beçak ML, Beçak, W: Further studies on polyploidy amphibians. A diploid population of *Phyllomedusa burmeisteri*. J Hered 66:160-162 (1975).

Batistic RF Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura - Amphibia) [Doctoral Thesis]. Ribeirão Preto (Brazil): Instituto Butantan. pp 203. (1989)

Beçak ML, Beçak W: Evolution by polyploidy in Amphibia: new insights. Cytogenet Cell Genet 80:28-33 (1998).

Beçak ML, Kobashi LS: Evolution by polyploidy and gene regulation in Anura. Genet Mol Res 3:195-212 (2004).

Beçak ML, Denaro L, Beçak W: Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. Cytogenetics 9:225-238 (1970).

Bi K, Bogart JP: Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic *in situ* hybridization (GISH) Cytogenet Genome Res 112:307-312 (2006).

Bogart JP: Evolution of anuran karyotypes, in Vial JL (ed): *Evolutionary Biology of Anurans*, pp 337-349 (Missouri Press, Columbia 1973).

Bruschi DP, Busin CS, Siqueira S, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 149:34-40 (2012a).

Bruschi DP, Busin CS, Lima AP, Rivera M, Blasco-Zúñiga A, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic studies in *Phyllomedusa vaillantii* and *Phyllomedusa ayeaye* with descriptions of multiple NORs [abstract]. In 7th World Congress of Herpetology, s105 (Vancouver, Canada 2012b).

Brunes TO, Sequeira F, Haddad CFB, Alexandrino J: Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Mol Phylogenet Evol* 57:1120-1133 (2010).

Campos JRC, Martins IA, Haddad CFB, Kasahara S: The karyotype of *Holoaden luederwaldti* (Anura, Strabomantidae), with report of natural triploidy. *Folia Biologica* 58:144-150 (2012).

Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB *et al.*: Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation. *Copeia* 2011:251-263 (2011).

Catroli GF, Kasahara S: Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. *Publ UEPG Biol Health Sci* 15:67-86 (2009).

Christian A, McNeil E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Wadren C, Bedford JÁ: A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet Cell Genet* 82:172-179 (1998).

Dutrillaux B, Couturier J: *La Pratique de l'Analyse Chromosomique*. (Masson, Paris 1981).

Evans BJ, Carter TF, Tobias ML, Kelley DB, Hanner R, Tinsley RC: A new species of clawed frog (genus *Xenopus*) from the Itombwe Massif, Democratic Republic of the Congo: implications for DNA barcodes and biodiversity conservation. *Zootaxa* 1780:55-68 (2008).

Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y: Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Res* 6: 643-648 (1998).

Green DM, Sessions SK: Nomenclature for chromosomes, in Green DM, Sessions SK (eds): *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, pp 431-432 (Academic Press, San Diego 1991).

Green DM, Sessions SK: Karyology and cytogenetics, in Heatwole H, Tyler M (eds): *Amphibian Biology*. v7, pp 2756-2841 (Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton 2007).

Gruber SL, Zina J, Narimatsu, H, Haddad CFB, Kasahara S: Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylineae, Hylidae). *BMC Genetics* 13: 28 (2012a)

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S: Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. *Comp. Cytogenet.* 6: 409-423 (2012b)

Haddad CFB, Pombal Jr JP, Batistic RF: Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). *J Herpetol* 28:425-430 (1994).

Haddad CFB: Hibridação natural entre *Phyllomedusa distincta* e *P. tetraploidea* (Anura, Hylidae). [Tese Livre Docência]. pp.117 (Rio Claro, Instituto de Biociências, 1994).

Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015 (1980).

Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL: Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). *Genet Mol Biol* 21:471-467 (1998).

Kasahara S, Haddad CFB: Karyotypes of two Brazilian microhylid frogs of the genus *Chiasmocleis*, including a new case of polyploidy. *J Herpetol* 31: 139-142 (1997).

Kuramoto M, Allison A: Karyotypes of five hylid frogs from Papua New Guinea, with a discussion on their systematic implications. *Jpn J Herpetol* 14:6-11 (1991).

Matsuda Y, Chapman VM: Application of fluorescence in situ hybridization in genome analysis of the mouse. *Electrophoresis* 16:261-272 (1995).

Mercadal IT: *Ceratophrys joazeirensis* sp. n. (Ceratophryidae, Anura) del noreste de Brazil. *Amphib-Reptilia* 7:313-334 (1986).

Meunier-Rotival M, Cortadas J, Macaya G: Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucl Acids Res* 6:2109-2123 (1979).

Morand M, Hernando AB: Localización cromosómica de genes ribosomales activos en *Phyllomedusa hypochondrialis* y *P. sauvagii* (Anura: hylidae). *Cuadernos de Herpetología* 11: 31-36 (1997).

Nunes, RRA, Fagundes V: Cariótipo de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura: Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Bol Mus Biol Mello Leitão* 23:21-33 (2008).

Ohno S: *Evolution by Gene Duplication*. (Springer, Berlin 1970).

Paiva CR, Nascimento J, Silva APZ, Bernarde OS, Ananias F: Karyotypes and Ag-NORs in *Phyllomedusa camba* De La Riva, 1999 and *P. rhodei* Mertens, 1926 (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae): cytotaxonomic considerations. *Ital J Zool* 77:116-121 (2010).

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934-2938 (1986).

Pombal Jr JP, Haddad CFB: Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil Oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). *Rev Bras Biol* 52:217-229 (1992).

Ruiz IRG, Beçak W: Further studies on polyploid amphibians V. C-banding in diploid and tetraploid species of *Odontophrynus*. *Chromosoma* 54:69-74 (1976).

Ruiz IRG, Soma M, Beçak W: Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogenet Cell Genet* 29:84-98 (1981).

Ruiz IRG, Brison O: Methylation of ribosomal cistrons in diploid and tetraploid *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura). *Chromosoma* 98:86-92 (1989).

Schmid M: Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361-388 (1978).

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

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, Steinlein C, Bogart JP, Feichtinger W, León P, La Marca E, Diaz LM, Sans A, Chen S-H, Hedges SB: The chromosomes of Terraranan frogs: insights into vertebrate cytogenetics. *Cytogenet Genome Res* 130-131:1-568 (2010).

Schweizer D: Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatin regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27:190-193 (1980)

Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S: Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. *Cytobios* 103:25-38 (2000).

Sumner AT: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306 (1972).

Targueta CP, Rivera M, Lourenco LB: Karyotypic differentiation via 2n reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). *Genetica* 139:1339-1347 (2012).

Tymowska J: Polyploid and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*, in Green DM, Sessions SK (eds): *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, pp 259-297 (Academic Press, San Diego 1991).

Ventura K, Silva MJJ, Fagundes V, Christoff AU, 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). *Cytogenet Genome Res* 115:169-175 (2006).

Vieira KS, Silva APZ, Arzabe C: Cranial morphology and karyotypic analysis of *Ceratophrys joazeirensis* (Anura: Ceratophryidae, Ceratophryinae): taxonomic considerations. *Zootaxa* 1320:57-68 (2006).

Wiley JE, Little ML: Replication banding patterns of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. *Cytogenet Cell Genet* 88:11-14 (2000).

Tabela 1. Relação dos animais estudados, número e sexo dos exemplares, registro da coleção CFBH e local de coleta

Animais	Número de exemplares	Sexo	CFBH	Local de Coleta
<i>Phyllomedusa distincta</i> (2x)	1	macho	13558	Guaraqueçaba, PR
	4	macho	2460, 2471, 2577, 6912	Ribeirão Branco, SP
	1	fêmea	1810	
	1	macho	33315	Ribeirão Grande, SP
<i>Phyllomedusa tetraploidea</i> (4x)	5	macho	2110, 2112, 2639, 2718, 6925	Ribeirão Branco, SP
	1	fêmea	2464	Ribeirão Grande, SP
	1	macho	33314	
	1	fêmea	2599	Tatuí, SP
<i>Híbrido triploide</i> (3x)	9	macho	1730, 2050, 2111, 2463, 2638, 2718, 2722, 2723, 2728	Ribeirão Branco, SP
	1	macho	33316	Ribeirão Grande, SP

Tabela 2. Número de cromossomos de girinos e de um exemplar jovem, provenientes de desovas de cruzamentos naturais entre parentais desconhecidos, provavelmente 3x x 4x.

Desova	Girino	Número de cromossomos
1	A97	50; mais de 50
2	A102	30; 37; 40; 41; 41; 42; 42; 42 ou 43; 43; 44
2	A103	26; 34 ou 35; 38; 39; 39 ou 40; 40; 41; 42; 43; 43; 43; 44; 44; 44; 44; 44; 44; 44; 44; 44; 44; 44; 45
2	A105	45
2	A106	33; 34; 36; 38; 40 ou 41; 41; 42; 45; 49; 49; 49; 49; 49
2	A107	39
2	A110	42; 43; 44; 44; 44; 44; 44
2	A112	mais de 40
2	A113*	mais de 40

* animal metamorfoseado no laboratório

Tabela 3. Número de cromossomos de embriões e girinos, obtidos por cruzamentos experimentais

Cruzamento	Embrião ou girino	Número de cromossomos
1	A81	27; 30; 30 ou 31; 30 ou 31; 30 ou 31; 31
1	A83	26; 28; 28; 28; 28 ou 29; 29; 29; 29; 29 ou 30; 30; 30; 30; 30; 30; 31; 32 ou 33
1	A85	24; 28; 28 ou 29; 29; 29; 29; 29 ou 30; 29 ou 30; 29 ou 30; 30; 30; 30; 30; 30; 30; 30; 30; 31; 31; 31; 31
1	A86	29 ou 30
2	A75	49
2	A77	45
2	A78	44 ou 45

Cruzamento 1: macho 3n x fêmea 2n

Cruzamento 2: macho 3n x fêmea 4n

Legendas

Figura 1. Cariótipos corados com Giemsa. **a.** *Phyllomedusa distincta*, fêmea, com $2n=2x=26$; **b.** *P. tetraploidea*, macho, com $2n=4x=52$; **c.** híbrido triploide, macho, com $2n=3x=39$. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 2. Células meióticas de *Phyllomedusa distincta* (**a**), *P. tetraploidea* (**b**, **c**) e do híbrido triploide (**d**, **e**, **f**, **g**). **a**, **b**, **c**, **d**, **e**. Células em metáfase I; **f**. célula em metáfase II; **g**. aspecto geral da preparação meiótica mostrando espermatídes. Exceto para **g**, Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 3. Padrões de Ag-RONs em *Phyllomedusa distincta* (**a**), *P. tetraploidea* (**b**, **c**, **d**, **e**, **f**) e do híbrido triploide (**g**, **h**, **i**, **j**, **k**, **l**). **a.** 1199; **b.** 11888; **c.** 111888; **d.** 1118888; **e.** 11188899; **f.** 11888999; **g.** 189; **h.** 1189; **i.** 11889; **j.** 11189; **k.** 111889; **l.** 111899.

Figura 4. Metáfases de *Phyllomedusa distincta* (**a**), *P. tetraploidea* (**b**, **c**, **d**) e do híbrido triploide (**e**, **f**), todas com padrões de FISH com sonda de DNAr. **a.** 1199; **b.** 1118888; **c.** 1111888; **d.** 11888999; **e.** 11189; **f.** 111899. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 5. Metáfases do híbrido triploide. **a.** FISH com sonda de DNAr, com padrão 111899; **b.** a mesma metáfase impregnada com nitrato de prata, mostrando padrão 11189 de Ag-RON. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 6. Cariótipos com bandas C. **a.** *Phyllomedusa distincta*; **b.** *P. tetraploidea*; **c.** híbrido triploide. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 7. Coloração com os fluorocromos CMA₃ (**a**, **b**, **c**) e DAPI (**d**, **e**, **f**) em metáfases de *Phyllomedusa distincta* (**a**, **d**), *P. tetraploidea* (**b**, **e**) e do híbrido triploide (**c**, **f**). Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 8. Metáfases com FISH de sondas teloméricas. **a.** *Phyllomedusa distincta*; **b.** *P. tetraploidea*; **c.** híbrido triploide. Notar marcação adicional centromérica em **a** nos cromossomos dos pares 7 e 11, enquanto em **b** em um cromossomo 11 e um cromossomo 7 e um cromossomo 11. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 9. Cariótipos com bandas de replicação após incorporação de BrdU. **a.** *Phyllomedusa distincta*; **b.** *P. tetraploidea*; **c.** híbrido triploide. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 10. Cariótipos corados com Giemsa. **a.** embrião de desova obtida em laboratório, provavelmente, resultante de cruzamento triploide x diploide, com 31 cromossomos; **b.** girino coletado na natureza, provavelmente, resultante de cruzamento triploide x tetraploide, com 45 cromossomos. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 1

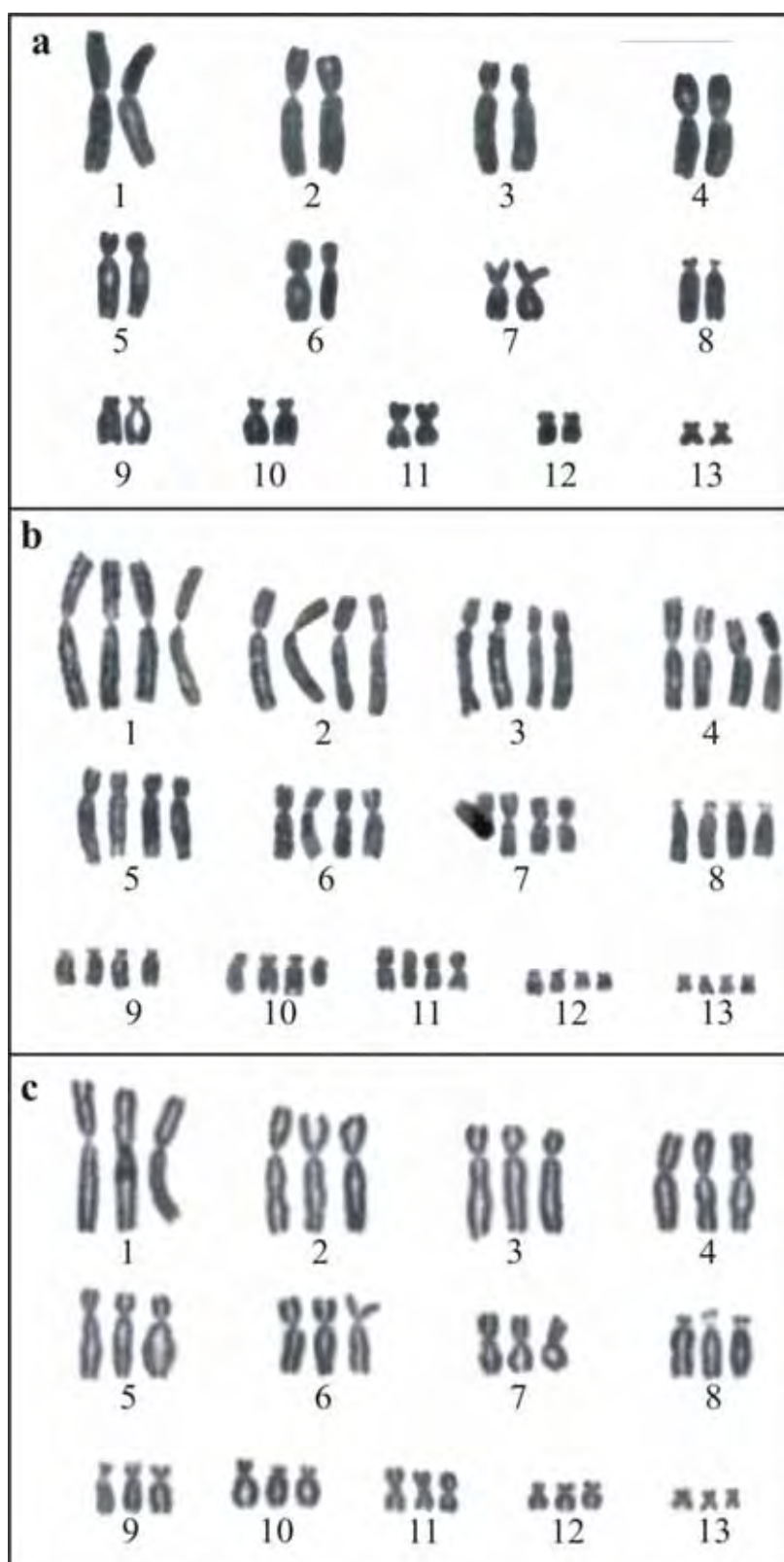


Figura 2

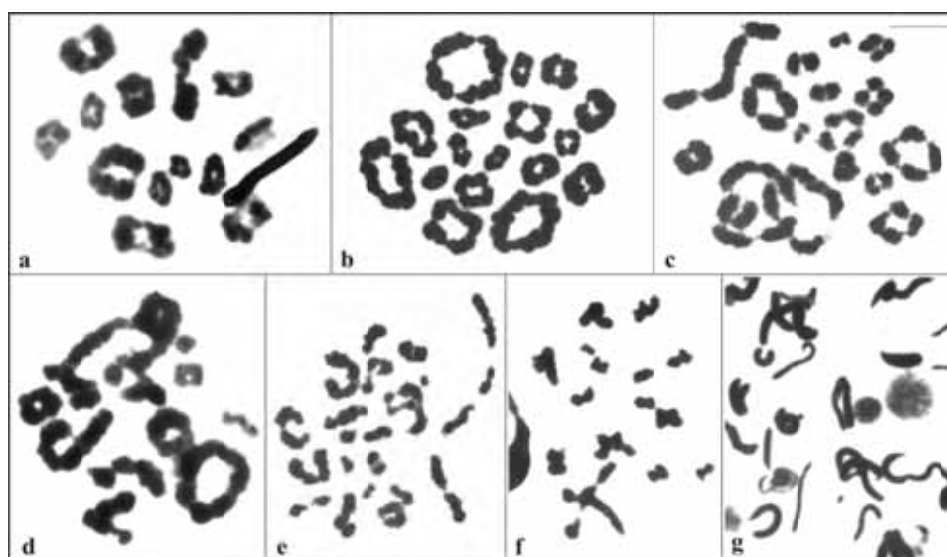


Figura 3

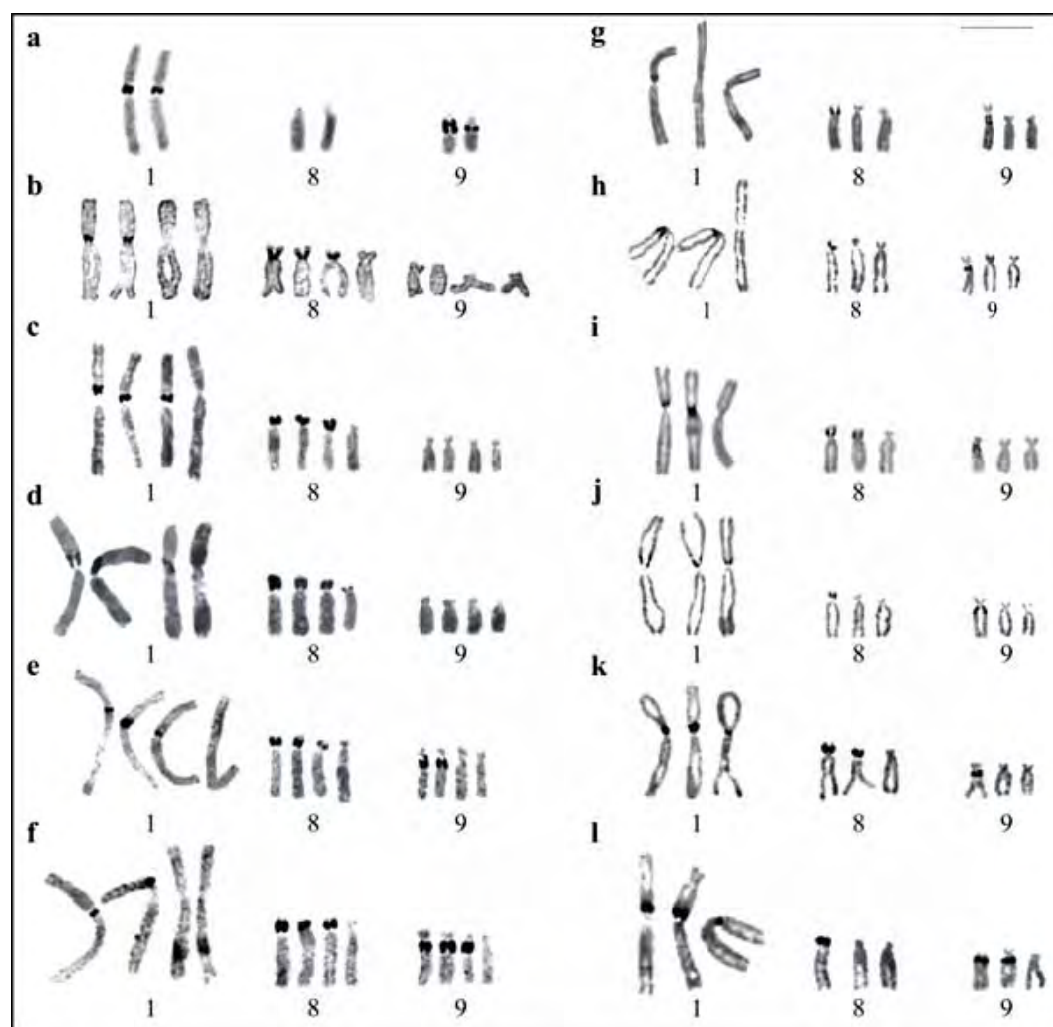


Figura 4

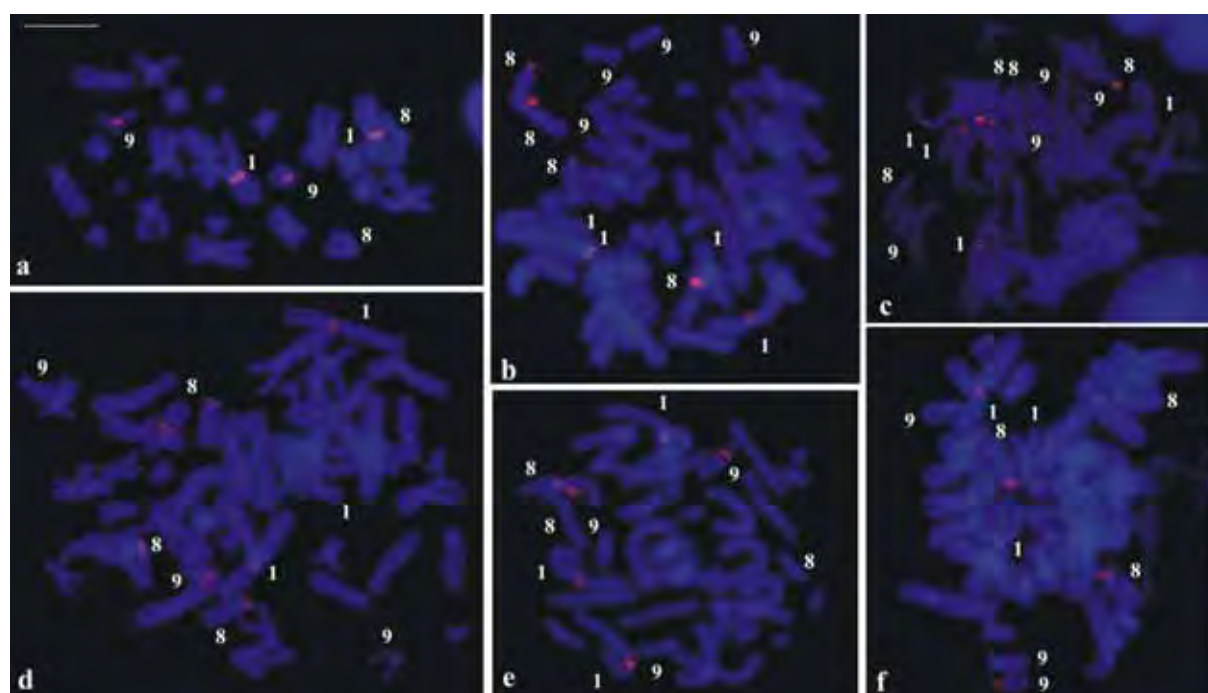


Figura 5

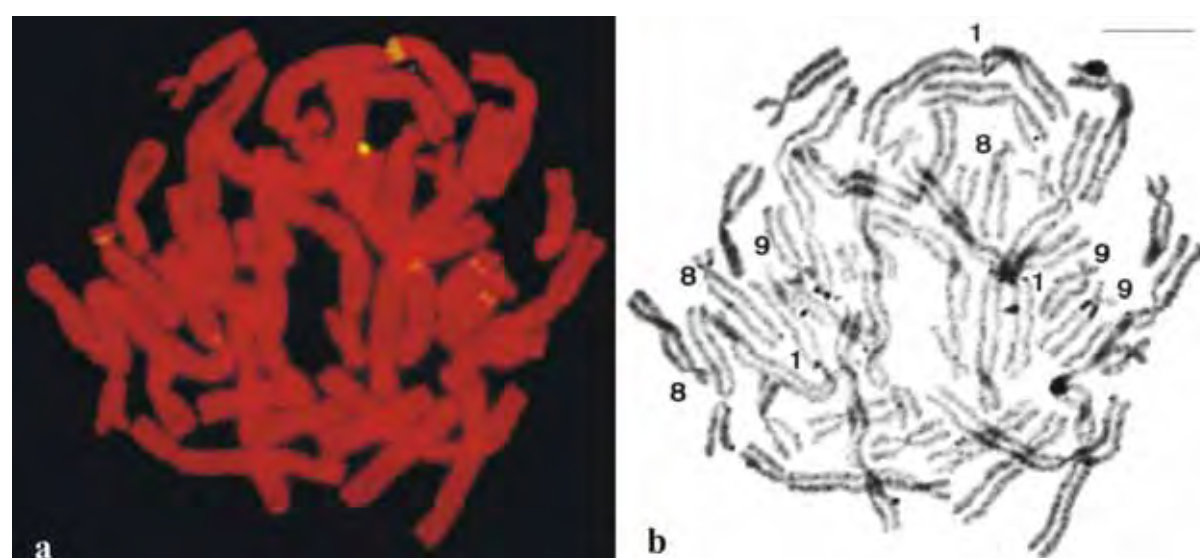


Figura 6

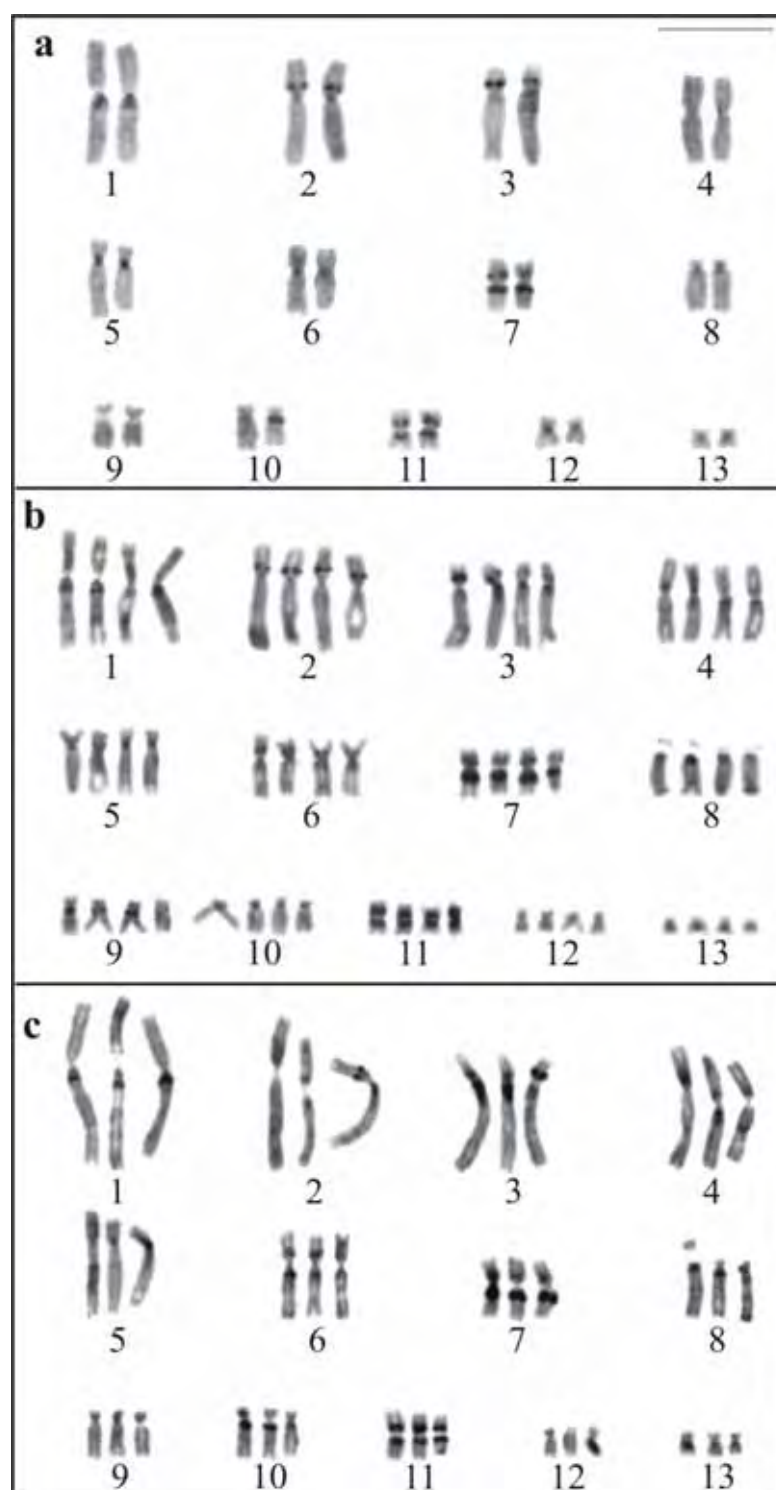


Figura 7

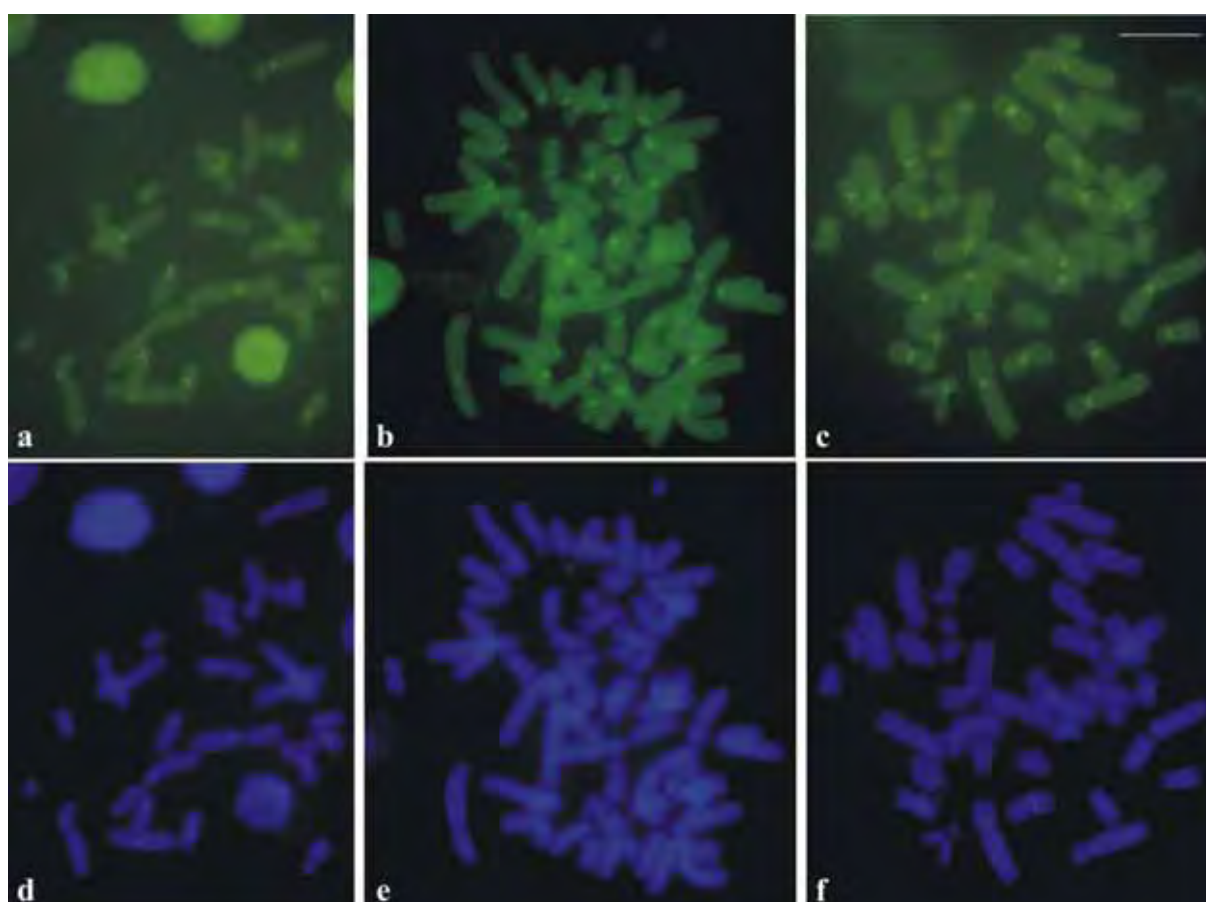


Figura 8

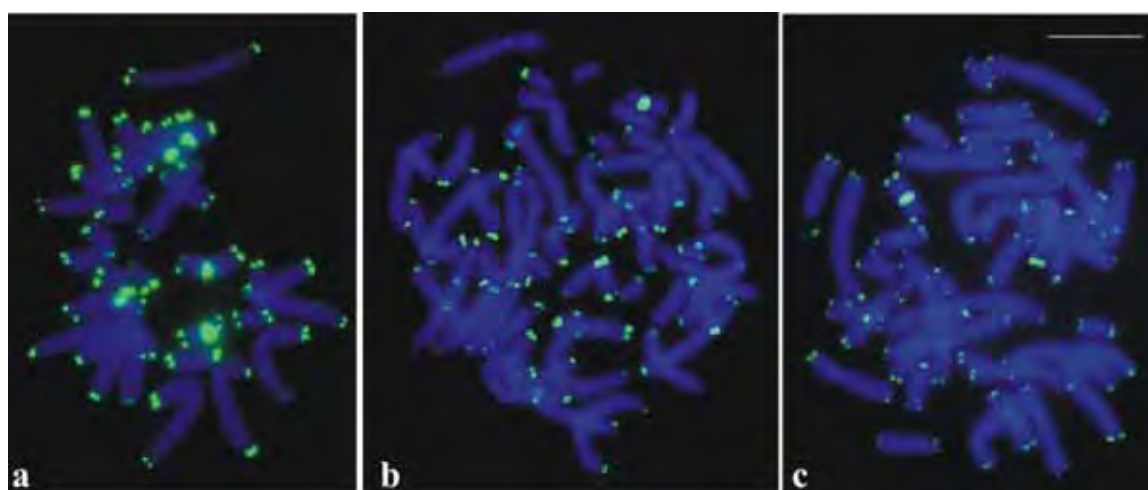


Figura 9

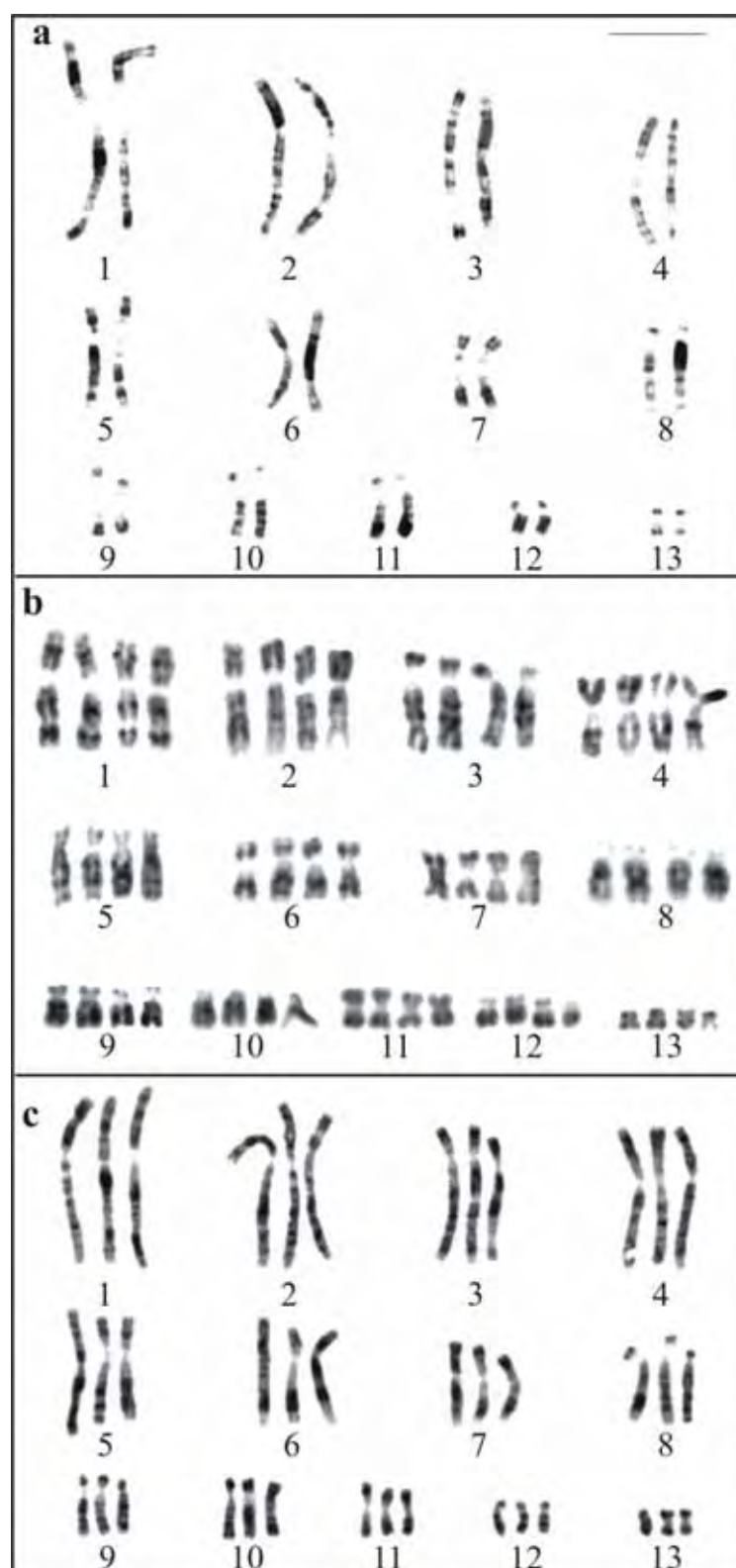
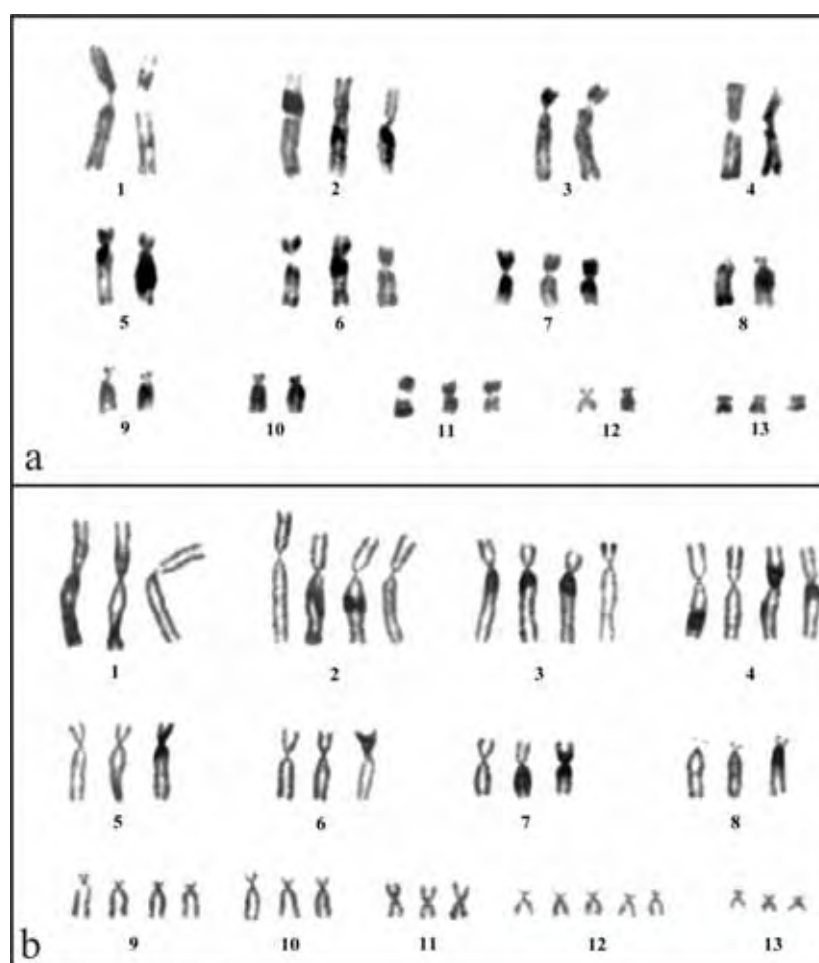


Figura 10



Natureza das sequências repetitivas reveladas pelos fluorocromos DAPI e CMA₃, e FISH com sondas de telômero e de DNAr em 15 espécies de *Hypsiboas* (Cophomantini, Hyalinae, Hylidae)

Resumo

As espécies do gênero *Hypsiboas* da família Hylidae ocorrem na América Central e na América do Sul, tendo sido descritos 84 representantes até a presente data. Análises citogenéticas restringem-se a 23 das espécies, as quais apresentam majoritariamente $2n=24$, $NF=48$, e somente um, *H. albopunctatus*, mostrou redução do número diploide para $2n=22$, $NF=44$, com um cromossomo B em alguns exemplares. O objetivo do trabalho foi o de caracterizar regiões repetitivas de *H. albomarginatus*, *H. caingua*, *H. crepitans*, *H. faber*, *H. pardalis*, *H. polytaenius*, *H. prasinus*, *H. raniceps* e *H. semilineatus*, assim como de *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, *H. beckeri*, *H. caipora*, *H. latistriatus* e *H. lundii*, nunca antes cariotipadas. Excetuando *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus* com $2n=22$, a maioria das espécies, tem $2n=24$. A RON, identificada pelo FISH com sonda de DNAr, está nos cromossomos 11 em nove delas, mas nem sempre na mesma posição, nos cromossomos 3, 4, 7 e 8 em *H. albomarginatus*, *H. polytaenius*, *H. semilineatus* e *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, respectivamente, enquanto em *H. caingua* em apenas um cromossomo 6 e um cromossomo 7. Com DAPI, a região centromérica dos cromossomos de *H. caipora*, *H. faber* e *H. semilineatus* são brilhantes, assim como uma banda intersticial nos cromossomos 11 em *H. raniceps*. Com CMA₃, todas as espécies têm RONs brilhantes e, adicionalmente, a região centromérica de *H. caingua*, *H. caipora*, *H. lundii* e *H. polytaenius*. A sonda telomérica hibridou nas regiões terminais dos cromossomos e também nas regiões centroméricas de *H. faber* e nas regiões pericentroméricas de *H. semilineatus*. Os cariótipos com $2n=24$ de *Hypsiboas* são muito similares, mas é inequívoca a variabilidade quanto à posição da RON e à natureza das regiões repetitivas que podem ser GC ou AT-ricas ou mesmo incluir sequências

semelhantes às teloméricas, diferenciando as espécies também sob o ponto de vista cariológico. Os dados obtidos reforçam a importância de se usar várias técnicas citogenéticas para a caracterização de regiões repetitivas, quando se faz análises comparativas de cariótipos altamente conservados, os quais via de regra não têm mostrado diferenciações mesmo quanto aos padrões de bandas de replicação.

Introdução

O gênero *Hypsiboas* abriga hilídeos, popularmente chamados de rãs gladiadoras, distribuídos na América Central e América do Sul (Frost 2011). A denominação genérica foi ressuscitada por Faivovich *et al.* (2005), para incluir os animais do hemisfério Sul que eram até então identificados como *Hyla* e pertencentes aos grupos de *H. albopunctatus*, *H. benitezi*, *H. faber*, *H. pellucens*, *H. pulchellus*, *H. punctatus* e *H. semilineatus*; além disso, foram alocadas em *Hypsiboas* outras espécies não incluídas em nenhum desses táxons as quais passaram a pertencer a esse gênero, bem como espécies novas, que juntas totalizam 84 representantes (Frost 2011). Faivovich *et al.* (2005) ressaltaram não ser conhecida, até aquele momento, nenhuma sinapomorfia morfológica para o gênero *Hypsiboas*. Essa informação, mais a existência de grupos subgenéricos e o grande número de espécies nele incluídas mostram que o gênero ainda tem questões taxonômicas a serem elucidadas.

Até o momento, 23 espécies de *Hypsiboas*, representando seis dos grupos atualmente descritos, já foram cariotipadas, enquanto nenhuma espécie do grupo de *H. benitezi* e tampouco aquelas não incluídas nos grupos estabelecidos tiveram cromossomos analisados (revisão em Catroli e Kasahara 2009). A maioria dos estudos tem sido baseada apenas com coloração convencional ou com bandamento clássico e os resultados mostram padrão cariotípico bastante conservado entre as espécies, caracterizado por número diploide de $2n=24$ cromossomos e número fundamental de braços cromossômicos $NF=48$. A exceção é *H. albopunctatus* que apresenta redução do número de cromossomos para $2n=22$, $NF=44$, apesar de grande semelhança morfológica da maioria dos cromossomos em relação ao cariótipo com

$2n=24$ e ocorrência eventual de um cromossomo B em alguns exemplares (Gruber *et al.* 2007, Gruber *et al.* submetido).

As informações sobre Ag-RONs, ou mesmo sobre localização de constrições secundárias, no caso das espécies que só tiveram seus cromossomos corados convencionalmente, mostram com frequência um único par de organizadores nucleolares nas espécies de *Hypsiboas*, em geral, localizados em cromossomos de pequeno tamanho. Embora escassos, tais dados observados sob o ponto de vista da filogenia de Faivovich *et al.* (2005) parecem mostrar uma certa concordância dentro dos diferentes grupos de espécies (Nunes e Fagundes 2008a).

A semelhança cariotípica entre as espécies é tão grande que mesmo a heterocromatina identificada pela banda C é similarmente distribuída entre elas, predominando localização na região centromérica dos cromossomos. Estudos comparativos do cariótipo de algumas espécies com 24 cromossomos, baseados nos padrões de bandas de replicação com 5-bromodeoxiuridina (BrdU), confirmaram grande homeologia entre os cromossomos, mesmo em relação à maior parte dos cromossomos da espécie com $2n=22$ (Gruber *et al.* 2007).

O caráter conservativo dos cariótipos com $2n=24$ não é exclusivo de *Hypsiboas*, mas foi também observado em *Bokermannohyla* e em algumas espécies de *Aplastodiscus*, ambos os gêneros pertencentes à tribo Cophomantini (Catroli *et al.* 2011), e em *Scinax* (Cardozo *et al.* 2011) da tribo Dendropsophini. Embora diversos gêneros dentro de Lophiohylini também apresentem cariótipos típicos de Hylidae com $2n=24$, Gruber *et al.* (2012b) mostraram que as análises de regiões repetitivas, avaliadas pelas bandas C, coloração com fluorocromos base-específicos e FISH com sondas ribossômicas e teloméricas, constituem uma abordagem relevante para diferenciar constituições cariotípicas similares pela distribuição e composição molecular de certas regiões cromossômicas.

No presente trabalho foram empregadas coloração com os fluorocromos AT-específico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e GC-específico cromomicina A₃ (CMA₃), bem como hibridação *in situ* com sondas de DNA ribossômico e de telômero na análise dos cromossomos de 15 espécies de *Hypsiboas*, com o objetivo de melhor caracterizar os cariótipos quanto à natureza e organização das sequências repetitivas. O conhecimento sobre o acúmulo ou falta de diferentes tipos de repetitivos é essencial para uma comparação mais efetiva dos cariótipos e, portanto, contribuindo para esclarecimento da evolução cromossômica.

Material

Foram realizadas análises citogenéticas em 72 exemplares de *Hypsiboas* procedentes de localidades dos estados de Alagoas, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Tabela 1). Os animais foram coletados e identificados pela equipe do Dr. Célio F. B. Haddad do Departamento de Zoologia, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. Os exemplares analisados estão depositados na coleção de anfíbios CFBH do referido Departamento.

Métodos

Preparações cromossômicas diretas foram obtidas de exemplares adultos a partir da medula óssea, fígado e do epitélio intestinal (Baldissera Jr *et al.* 1993, Schmid 1978). De alguns animais, suspensões celulares foram adicionalmente obtidas a partir da cultura de linfócitos (Kasahara *et al.* 1998). A coloração convencional dos cromossomos foi feita com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8, e a coloração simultânea com os fluorocromos AT-específico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e GC-específico cromomicina A₃ (CMA₃) seguiu o protocolo descrito por Christian *et al.* (1998). A técnica de hibridação *in situ* (FISH) com sonda ribossômica HM123 (Meunier-Rotival *et al.* 1979) foi feita de acordo com (Pinkel *et al.* 1986) e para hibridação com sondas teloméricas foi utilizado o Kit DAKO, seguindo as instruções do manual do fabricante.

As preparações cromossômicas submetidas aos diferentes procedimentos de coloração e de marcação cromossômica foram analisadas ao microscópio de luz comum e luz UV. As melhores metáfases foram registradas por captura digital de imagem e as cópias foram obtidas no computador. A montagem dos kariogramas foi feita de acordo com a morfologia dos cromossomos e em ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos de dois braços foram chamados de metacêntricos, submetacêntricos ou subtelocêntricos (Green e Sessions 1991, 2007).

Resultados

Os exemplares da grande maioria das espécies apresentam $2n=24$ cromossomos (Fig. 1), com exceção de *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus* com $2n=22$. As constituições cariotípicas com 24 cromossomos são semelhantes, sendo os pares 1 a 5 de tamanho grande, o par 6 médio e os restantes, de 7 a 12, pequenos. Os pares 1, 8, 10 e 11 são metacêntricos, 2, 3, 5, 7, 9 e 12 são submetacêntricos e os pares 4 e 6 são subtelocêntricos. O cariótipo com $2n=22$ é muito semelhante ao descrito para aqueles com $2n=24$, mas o grupo dos cromossomos pequenos inclui apenas os pares 7 a 11 (Fig. 1a).

A região organizadora de nucléolo (RON) foi detectada por FISH com sonda de DNAr (Fig. 2). Dez espécies tinham um par de RONS localizadas nos braços longos dos cromossomos 11, sendo que *H. lundii*, *H. pardalis* e *H. raniceps* tinham o marcador na região terminal (Fig. 2j, 2k, 2n), enquanto *H. crepitans*, *H. faber* e *H. prasinus* na região intersticial (Fig. 2g, 2h, 2m), e *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, *H. beckeri*, *H. caipora* e *H. latistriatus*, na região proximal (Fig. 2b, 2d, 2f, 2i). As espécies *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, *H. albomarginatus*, *H. polytaenius* e *H. semilineatus* tinham as RONS nos cromossomos dos pares 8, 3, 4 e 7, respectivamente (Fig. 2a, 2c, 2l, 2o), enquanto *H. caingua* mostrou duas marcações, porém, uma no cromossomo 6 e outra no cromossomo 7 (Fig. 2e).

O fluorocromo DAPI corou homogeneamente os cromossomos da grande maioria das espécies (Fig. 3), porém, em *H. caipora*, *H. faber* e *H. semilineatus* os centrômeros aparecem brilhantes (Fig. 3f, 3h, 3o), bem como uma banda intersticial nos cromossomos 11, adjacente à RON de *H. raniceps* (Fig. 3n). Com o CMA₃, as RONS se mostraram brilhantes em todas as espécies (Fig. 4) e, adicionalmente, os centrômeros no caso de *H. caingua*, *H. caipora*, *H.*

lundii e *H. polytaenius* (Fig. 4e, 4f, 4j, 4l). A sonda telomérica hibridou nos telômeros de todas as espécies (Fig. 5), mas também nas regiões centroméricas de *H. faber* (Fig. 5h) e nas regiões pericentroméricas de *H. semilineatus* (Fig. 5o).

Discussão

As espécies *H. albomarginatus*, *H. caingua*, *H. crepitans*, *H. faber*, *H. pardalis*, *H. prasinus*, *H. polytaenius*, *H. raniceps* e *H. semilineatus* apresentam $2n=24$ e a mesma constituição cariotípica, concordando com as informações já existentes para essas espécies (Beçak 1968, Rabello 1970, Bogart 1973, Ananias 1996, Gruber 2002, Nunes 2006, Gruber *et al.* 2007, Nunes e Fagundes 2008a e b, Carvalho *et al.* 2009). O mesmo número diploide de $2n=24$ com todos os cromossomos de dois braços é também característico para as espécies *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, *H. beckeri*, *H. caipora*, *H. lundii* e *H. latistriatus* que foram cariotipados pela primeira vez. Embora os kariogramas com $2n=24$ de *Hypsiboas* do presente trabalho e aqueles disponíveis na literatura apresentem, algumas vezes, pequenas discordâncias na nomenclatura da morfologia dos cromossomos e no ordenamento dos pares, pode-se dizer que não existem diferenças marcantes nos kariótipos de diferentes espécies, as quais apresentam notável grau de conservação quando analisados com coloração convencional.

Em trabalhos anteriormente realizados (Gruber *et al.* 2007, Gruber *et al.* submetido), a comparação dos padrões de bandas de replicação por incorporação de BrdU nos cromossomos de *H. crepitans*, *H. faber* e *H. raniceps*, todas com $2n=24$, confirmou a homeologia dos cromossomos nas três espécies, indicando que conservação cariotípica também se refere a esse marcador. Futuramente, será importante obter não só o bandamento com BrdU nas demais espécies de *Hypsiboas* e, na medida do possível, utilizar outras abordagens mais resolutivas, como a pintura cromossômica, para confirmar a extensão da conservação

cariotípica em espécies do gênero. A técnica de obtenção das bandas de replicação é relativamente fácil de ser aplicada e pode ser em alguns casos decisiva para se determinar primariamente as alterações ocorridas durante a evolução cromossômica. Um caso ilustrativo dessa situação é o das espécies de *Leptodactylus* (Gazoni *et al.* 2012), em que a comparação das bandas de replicação comprovou a homeologia dos cromossomos da maioria das espécies que têm o mesmo cariótipo básico com $2n=22$ e é praticamente indistinguível com coloração convencional. Entretanto, é importante enfatizar que, no caso de uma das espécies, ficou comprovado que a ligeira discrepância morfológica de um dos pares era decorrente de amplificação de região repetitiva caracterizada pela replicação tardia e coloração C-positiva. No referido trabalho, a análise das bandas de replicação foi decisiva para identificar o rearranjo complexo por translocações recíprocas sequenciais, a fusão de cromossomos com redução do número diploide para $2n=20$ e a presença de cromossomos resultantes de inversão pericêntrica.

As informações sobre distribuição das bandas C disponíveis na literatura para algumas espécies do gênero *Hypsiboas* mostram, de uma maneira geral, pouca heterocromatina C positiva majoritariamente localizada nas regiões centroméricas e, eventualmente, em sítios intersticiais ou terminais (Ananias *et al.* 2004, Raber *et al.* 2004, Nunes 2006, Gruber *et al.* 2007, Carvalho *et al.* 2009). As exceções são *H. albomarginatus* que tem grandes blocos centroméricos de banda C (Gruber 2002, Carvalho *et al.* 2009) e o caso intrigante de *H. raniceps* que apresentou uma única banda nos cromossomos do par 11 identificada com essa técnica (Gruber *et al.* 2007, Gruber *et al.* submetido). No presente trabalho, o bandamento C não produziu resultados adequados, em decorrência de algum fator desconhecido de ordem técnica. No entanto, as colorações por fluorocromos base-específicos forneceram dados interessantes em algumas espécies, acerca de regiões repetitivas centroméricas em algumas espécies, as quais se mostraram ricas em AT, ricas em GC, ricas em bases AT e GC ou que têm composição equilibrada de bases AT e GC, não mostrando fluorescência especialmente brilhante com nenhum dos fluorocromos. A hibridação da sonda telomérica fora das regiões terminais dos cromossomos foi também reveladora de um tipo particular de DNA repetitivo, com sequências similares a $(TTAGGG)_n$. Os resultados com fluorocromos e FISH com sondas teloméricas indicam que os cariótipos conservados das espécies do gênero *Hypsiboas* podem ser diferenciados pela composição molecular diversificada das sequências repetitivas.

Na busca por marcadores que auxiliem a caracterização dos cariótipos das diferentes espécies de *Hypsiboas*, as constrições secundárias e as RONS, detectadas em geral apenas pela impregnação da prata e, em alguns casos, também por FISH com sondas de DNAr,

constituem procedimentos relevantes na citogenética comparativa de *Hypsiboas* na medida em que revelaram variabilidade interespecífica. Os dados sobre o número e posição das RONS obtidos com FISH estão de acordo com os relatos existentes sobre Ag-RONS por nós obtidos (Gruber 2002, Gruber *et al.* 2007, Gruber *et al.* submetido), bem como aqueles da literatura (referências em Catroli e Kasahara 2009), em que a grande maioria das espécies tem um par marcador nucleolar localizado em cromossomos pequenos. Tal par corresponde ao 11 nas espécies do presente trabalho e de outros da literatura, porém, já foi considerado como o 10 ou o 12. Muito provavelmente, tais relatos devem referir-se a um mesmo cromossomo homeólogo, pois os pares pequenos são muito semelhantes em tamanho e morfologia, o que dificulta a sua correta identificação. A condição de RON em cromossomos pequenos tem sido considerada uma característica sinapomórfica, isto é, ancestral, de Hylidae e pode ser observada em representantes de vários gêneros, além de *Hypsiboas*, como, por exemplo, *Aparasphenodon*, *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, *Corythomantis*, *Hyla*, *Itapotihyla*, *Osteocephalus*, *Osteopilus*, *Scinax* e *Trachycephalus* (Anderson 1991, Cardozo *et al.* 2011, Catroli *et al.* 2011, Gruber *et al.* 2012a, Gruber *et al.* 2012b). As localizações de RON em cromossomos que não de tamanho pequeno, tal como observado presentemente em *H. albomarginatus*, *H. caingua*, *H. polytaeniatus* e *H. semilineatus* e, também, em *H. joaquinii* e *H. semiguttatus* (Ananias *et al.* 2004), representa uma derivação. Enquanto a maioria das espécies de *Hypsiboas* mostraram apenas um par organizador nucleolar, *H. caingua* poderia ser um caso de RONS múltiplas, já que um dos exemplares da amostra analisados pelo FISH com sonda de DNAr apresentou marcação em um cromossomo do par 7 e um do par 6. Já *Hypsiboas caingua* analisada por Ananias (1996) foi descrita com um par de Ag-RONS nos cromossomos 7.

Na análise tentativa combinando os dados de localização de Ag-RON com as informações filogenéticas do gênero, Nunes e Fagundes (2008a) concluíram que alguns grupos, como o de *H. pulchellus*, pareciam mostrar uma concordância já que várias espécies incluídas no grupo tinham Ag-RON no mesmo par. Mesmo que as informações sobre RONS do presente trabalho fossem adicionadas em tal análise, os dados citogenéticos são ainda escassos para que se possa concluir sobre a relação entre o padrão de localização de RONS e a distribuição das espécies nos grupos. Nunes e Fagundes (2008a) enfatizaram que as localizações dos sítios de Ag-RONS em diferentes posições no cromossomo 11 seriam resultado de inversões, porém, quando comparamos os cromossomos 11 carregando organizadores nucleolares em diferentes posições, não parecem existir diferenças na morfologia dos cromossomos, nem nos respectivos padrões de bandas de replicação (Gruber

et al. 2007, Gruber *et al.* submetido). Isso é sugestivo de que a mudança na posição da RON não é resultado de rearranjos grosseiros, porém, rearranjos minúsculos ou transposição dos genes via elementos móveis não podem ser afastados.

Na presente amostra, número diploide diferente de $2n=24$ foi observado em *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, em exemplares coletados da Chapada dos Guimarães, MT, e previamente identificados como *H. albopunctatus*. Um trabalho recente de ecologia molecular mostra que a população dessa localidade é geneticamente divergente, podendo ser considerada como outra espécie, mas que ainda não possui descrição formal (Prado *et al.* 2012). A nova espécie tem $2n=22$ e cariótipo idêntico ao já descrito na literatura para *H. albopunctatus* (Gruber *et al.* 2007) e que, por sua vez, é muito próximo ao complemento cromossômico com $2n=24$. No cariótipo de *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus* ocorrem cinco pares de tamanho pequeno, no lugar de seis como no cariótipo de $2n=24$. Uma das teorias acerca da redução no número de cromossomos em *H. albopunctatus* sugere que o cromossomo pequeno faltante, provavelmente o 12º do ancestral, poderia estar fusionado com o 11º portador de RON dando origem a um cromossomo, provavelmente o 8, pois as bandas de replicação mostraram homeologia entre o cromossomo 8 de *H. albopunctatus* e o cromossomo 11 das espécies com $2n=24$, embora o bandamento não tenha apresentado resolução suficiente para comprovar o envolvimento do par 12 no referido rearranjo (Gruber *et al.* 2007, Gruber *et al.* submetido). Essa teoria poderia explicar a redução do número de cromossomos também na espécie nova aqui cariotipada. As hipóteses alternativas sobre o reordenamento cromossômico em *H. albopunctatus* foram discutidas em ambos os trabalhos, sendo que uma delas relaciona a redução do número diploide com o aparecimento de cromossomo B, como sugerido de início por Bogart (1973). Como uma tentativa para se elucidar a evolução cariotípica em *H. albopunctatus*, os padrões de bandas de replicação por incorporação de BrdU nos cromossomos desta e de espécies com $2n=24$ foram comparativamente avaliados, porém, as análises não foram conclusivas (Gruber *et al.* 2007). Os exemplares de *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus* apresentam coloração DAPI homogênea em todos os cromossomos e RON corada pelo CMA₃, semelhante ao observado em *H. albopunctatus* (Gruber *et al.* submetido), e, adicionalmente, cada espécie tem uma marcação CMA₃ específica, isto é, nos cromossomos 9 na espécie nova e nos cromossomos 2 em *H. albopunctatus*. Esse marcador reforça os dados moleculares de que a população da Chapada dos Guimarães representa, de fato, uma entidade taxonômica distinta.

Os cariótipos com 24 cromossomos presentes em gêneros das tribos Cophomantini (*Aplastodiscus*, *Hypsiboas* e *Bokermannohyla*), Dendropsophini (*Pseudis*, *Scinax* clado *S.*

ruber e *Sphaenorhynchus*), Hylini (*Anotheca*, *Charadrahyla*, *Duellmanohyla*, *Exerodonta*, *Hyla*, *Isthmohyla*, *Plectrohyla*, *Pseudacris*, *Ptycohyla*, *Smilisca* e *Tlalocohyla*) e Lophiohylini (*Aparasphenodon*, *Itapotihyla*, *Osteocephalus*, *Osteopilus* e *Trachycephalus*) são muito semelhantes, fato esse que levou Faivovich *et al.* (2005) a sugerir que tal característica seria uma sinapomorfia da subfamília Hylinae. Corroboram essa teoria os casos de espécies de Hylidae com números diploides discrepantes, como por exemplo, *Aplastodiscus albofrenatus*, *A. arildae*, *A. ehrhardti* e *A. eugenioi* com $2n=22$, *A. callipygius* e *A. albosignatus* com $2n=20$, e *A. leucopygius* com $2n=18$, *Hypsiboas albopunctatus* com $2n=22$ e $2n=22+B$, *Hyla versicolor* com $2n=4x=48$, *Osteopilus brunneus* com $2n=34$ e *O. wilderi* com $2n=28$, mas cujos cariótipos muito provavelmente tiveram como ancestral uma constituição cromossômica com $2n=24$ (ver Gruber *et al.* 2012b).

Os resultados do presente trabalho trazem novas informações a respeito dos cromossomos de espécies de *Hypsiboas* e reforçam a importância dos estudos de regiões repetitivas na caracterização de espécies com cariótipos conservados, vindo a contribuir com a caracterização mais detalhada das espécies. Seria interessante que no futuro sejam acrescentadas novas abordagens como, por exemplo, o mapeamento por FISH de genes de DNAr 5S ou de genes H_1 , ou com a técnica de C_{ot} -1 que diferencia tipos de repetitivos pelas suas propriedades, representando ferramentas poderosas na caracterização do cariótipo de diferentes espécies e no esclarecimento da evolução cromossômica (Martins *et al.* 2011). Ainda, deve ser investigado se as sequências repetitivas isoladas de cromossomo B de *H. albopunctatus* e que estão presentes no genoma de *H. raniceps* (Gruber *et al.* submetido) são, de fato, um retrotransposon e se podem estar presentes em outras espécies do gênero *Hypsiboas*.

Referências bibliográficas

Ananias F: Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae). [Dissertação de Mestrado] Universidade Estadual de Campinas. PP 101 (1996).

Ananias F, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM: Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura Hylidae). *Hereditas* 140:42-48 (2004).

Anderson K: Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs, in Green DM, Sessions SK (eds): *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, pp 299-331 (Academic Press, San Diego 1991).

Baldissera Jr FA, Oliveira PSL, Kasahara S: Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Rev. Bras. Genet.* 16:335-345 (1993).

Beçak ML: Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia* 21:191-208 (1968).

Bogart JP: Evolution of anuran karyotypes, in Vial JL (ed): *Evolutionary Biology of Anurans*, pp 337-349 (Missouri Press, Columbia 1973).

Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB, Kasahara, S: Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation. *Copeia* 2011:251-263 (2011).

Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Gen Mol Res* 8:1498-1508 (2009).

Catroli GF, Kasahara S: Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. *Publ. UEPG Biol. Health Sci.* 15:67-86 (2009).

Catrolí GF, Faivovich J, Haddad CFB, Kasahara S: Conserved karyotypes in Cophomantini: cytogenetic analysis of 12 species from 3 species groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). *J Herpetol* 45:120-128 (2011).

Christian A, McNeil E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Wadren C, Bedford JA: A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenet Cell Genet* 82:172-179 (1998).

Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC: Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull Am Mus Nat Hist* 294:1-240 (2005).

Frost DR: Amphibians of the world: an on-line reference. V5.5. (2011) Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.

Gazoni T, Gruber SL, Silva APZ, Araújo OGS, Narimatsu H, Strüssmann C, Haddad CFB, 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* 13:109 (2012).

Green DM, Sessions SK: Nomenclature for chromosomes, in Green DM, Sessions SK (eds): *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, pp 431-432 (Academic Press, San Diego 1991).

Green DM, Sessions SK: Karyology and cytogenetics, in Heatwole H, Tyler M (eds): *Amphibian Biology*, v7, pp 2756-2841 (Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton 2007).

Gruber SL: Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (Anura, Hylidae) dos grupos com $2n=24$ e $2n=30$ cromossomos, com técnicas de coloração diferencial. [Dissertação de Mestrado] Universidade Estadual Paulista (2002).

Gruber SL, Haddad CFB, 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).

Gruber SL, Zina J, Narimatsu, H, Haddad CFB, Kasahara S: Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylinae, Hylidae). *BMC Genetics* 13: 28 (2012a).

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S: Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. *Comp Cytogenet* 6: 409-423 (2012b).

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S: Analysis of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, Hylidae) by microdissection and chromosome painting. [submetido BMC Genetics].

Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL: Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). *Genet Mol Biol* 21:471-467 (1998).

Martins C, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Mazzuchelli J, Oliveira SG: Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. in: Urbano KV (ed.): Advances in Genetics Research Volume 4, pp.1-82 (Nova Science Publisher, Hauppauge, 2011).

Meunier-Rotival M, Cortadas J, Macaya G: Isolation and organization of calf ribosomal DNA. Nucl Acids Res 6:2109-2123 (1979).

Nunes RRA Citogenética de anfíbios da família Hylidae do Espírito Santo. [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal do Espírito Santo (2006).

Nunes RRA, Fagundes V: Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species groups. Gen Mol Biol 31:982-987 (2008a).

Nunes RRA, Fagundes V: Cariótipo de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hyalinae e Phyllomedusinae (Anura: Hylidae) do Espírito Santo, Brasil Bol Mus Biol Mello Leitão 23:21-33 (2008b).

Prado CPA, Haddad CFB, Zamudio KR: Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. Mol Ecol 21:921-941 (2012).

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2934-2938 (1986).

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

Raber SC, Carvalho KA, Garcia PCA, Vinciprova G, Recco-Pimentel SM: Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *H. guenterii* (Anura, Hylidae). Phyllomedusa 3:43-49 (2004).

Schmid M: Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66:361-388 (1978).

Tabela 1. Relação das espécies, número e sexo dos exemplares e local de coleta.

Espécie	Número Sexo	Local de Coleta
<i>Hypsiboas</i> sp. aff. <i>albopunctatus</i>	5 machos 1 fêmea	Chapada dos Guimarães, MT
<i>Hypsiboas</i> aff. <i>polytaenius</i>	4 machos	São José do Barreiro, SP
<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	8 machos	Ubatuba, SP
	3 machos	Biritiba Mirim, SP
<i>Hypsiboas bekeri</i>	1 macho	Poços de Caldas, MG
<i>Hypsiboas caingua</i>	2 machos	Botucatu, SP
<i>Hypsiboas caipora</i>	1 macho	Sete Barras, SP
<i>Hypsiboas crepitans</i>	2 machos	Piranhas, AL
<i>Hypsiboas faber</i>	1 macho	Ubatuba, SP
	2 fêmeas	Rio Claro, SP
<i>Hypsiboas latistriatus</i>	8 machos	Camanducaia, MG
<i>Hypsiboas lundii</i>	2 machos	Rio Claro, SP
	1 macho	Descalvado, SP
	1 macho	Botucatu, SP
	2 machos	Furnas, MG
<i>Hypsiboas pardalis</i>	1 macho	Petrópolis, RJ
<i>Hypsiboas polytaenius</i>	1 jovem	Santa Virgínia, SP
	2 machos	Petrópolis, RJ
	3 machos	Maringá, RJ
<i>Hypsiboas prasinus</i>	1 macho	São José dos Campos, SP
	2 machos	Camanducaia, MG
	1 macho 1 fêmea 2 jovens	Salesópolis, SP
	1 fêmea	Mogi das Cruzes, SP
<i>Hypsiboas raniceps</i>	1 macho 8 fêmeas 1 jovem	Ilha do Bananal, TO
<i>Hypsiboas semilineatus</i>	1 macho	Santa Branca, SP
	1 macho	Mongaguá, SP
	1 jovem	Salesópolis, SP
Total de exemplares:	75	

Legendas

Figura 1. Cariótipos corados com Giemsa. **a.** *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, $2n=22$; **b.** *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, $2n=24$; **c.** *H. albomarginatus*, $2n=24$; **d.** *H. bekeri*, $2n=24$; **e.** *H. caingua*, $2n=24$; **f.** *H. caipora*, $2n=24$; **g.** *H. crepitans*, $2n=24$; **h.** *H. faber*, $2n=24$; **i.** *H. latistriatus*, $2n=24$; **j.** *H. lundii*, $2n=24$; **k.** *H. pardalis*, $2n=24$; **l.** *H. polytaenius*, $2n=24$; **m.** *H. prasinus*, $2n=24$; **n.** *H. raniceps*, $2n=24$; **o.** *H. semilineatus*, $2n=24$. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 2. Metáfases de *Hypsiboas* mostrando hibridação *in situ* (FISH) com sonda ribossômica HM123. **a.** *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, $2n=22$; **b.** *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, $2n=24$; **c.** *H. albomarginatus*, $2n=24$; **d.** *H. bekeri*, $2n=24$; **e.** *H. caingua*, $2n=24$; **f.** *H. caipora*, $2n=24$; **g.** *H. crepitans*, $2n=24$; **h.** *H. faber*, $2n=24$; **i.** *H. latistriatus*, $2n=24$; **j.** *H. lundii*, $2n=24$; **k.** *H. pardalis*, $2n=24$; **l.** *H. polytaenius*, $2n=24$; **m.** *H. prasinus*, $2n=24$; **n.** *H. raniceps*, $2n=24$; **o.** *H. semilineatus*, $2n=24$.

Figura 3. Metáfases de *Hypsiboas* coradas com o fluorocromo AT-específico DAPI. **a.** *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, $2n=22$; **b.** *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, $2n=24$; **c.** *H. albomarginatus*, $2n=24$; **d.** *H. bekeri*, $2n=24$; **e.** *H. caingua*, $2n=24$; **f.** *H. caipora*, $2n=24$; **g.** *H. crepitans*, $2n=24$; **h.** *H. faber*, $2n=24$; **i.** *H. latistriatus*, $2n=24$; **j.** *H. lundii*, $2n=24$; **k.** *H. pardalis*, $2n=24$; **l.** *H. polytaenius*, $2n=24$; **m.** *H. prasinus*, $2n=24$; **n.** *H. raniceps*, $2n=24$; **o.** *H. semilineatus*, $2n=24$. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 4. Metáfases de *Hypsiboas* coradas com o fluorocromo GC-específico CMA₃. **a.** *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, $2n=22$; **b.** *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, $2n=24$; **c.** *H. albomarginatus*, $2n=24$; **d.** *H. bekeri*, $2n=24$; **e.** *H. caingua*, $2n=24$; **f.** *H. caipora*, $2n=24$; **g.** *H. crepitans*, $2n=24$; **h.** *H. faber*, $2n=24$; **i.** *H. latistriatus*, $2n=24$; **j.** *H. lundii*, $2n=24$; **k.** *H. pardalis*, $2n=24$; **l.** *H. polytaenius*, $2n=24$; **m.** *H. prasinus*, $2n=24$; **n.** *H. raniceps*, $2n=24$; **o.** *H. semilineatus*, $2n=24$. Setas = RONS. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 5. Metáfases de *Hypsiboas* mostrando hibridação *in situ* (FISH) com sonda telomérica. **a.** *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, $2n=22$; **b.** *Hypsiboas* aff. *polytaenius*, $2n=24$; **c.** *H. albomarginatus*, $2n=24$; **d.** *H. bekeri*, $2n=24$; **e.** *H. caingua*, $2n=24$; **f.** *H. caipora*, $2n=24$; **g.** *H. crepitans*, $2n=24$; **h.** *H. faber*, $2n=24$; **i.** *H. latistriatus*, $2n=24$; **j.** *H. lundii*, $2n=24$; **k.** *H. pardalis*, $2n=24$; **l.** *H. polytaenius*, $2n=24$; **m.** *H. prasinus*, $2n=24$; **n.** *H. raniceps*, $2n=24$; **o.** *H. semilineatus*, $2n=24$. Barra= $10\mu\text{m}$.

Figura 1

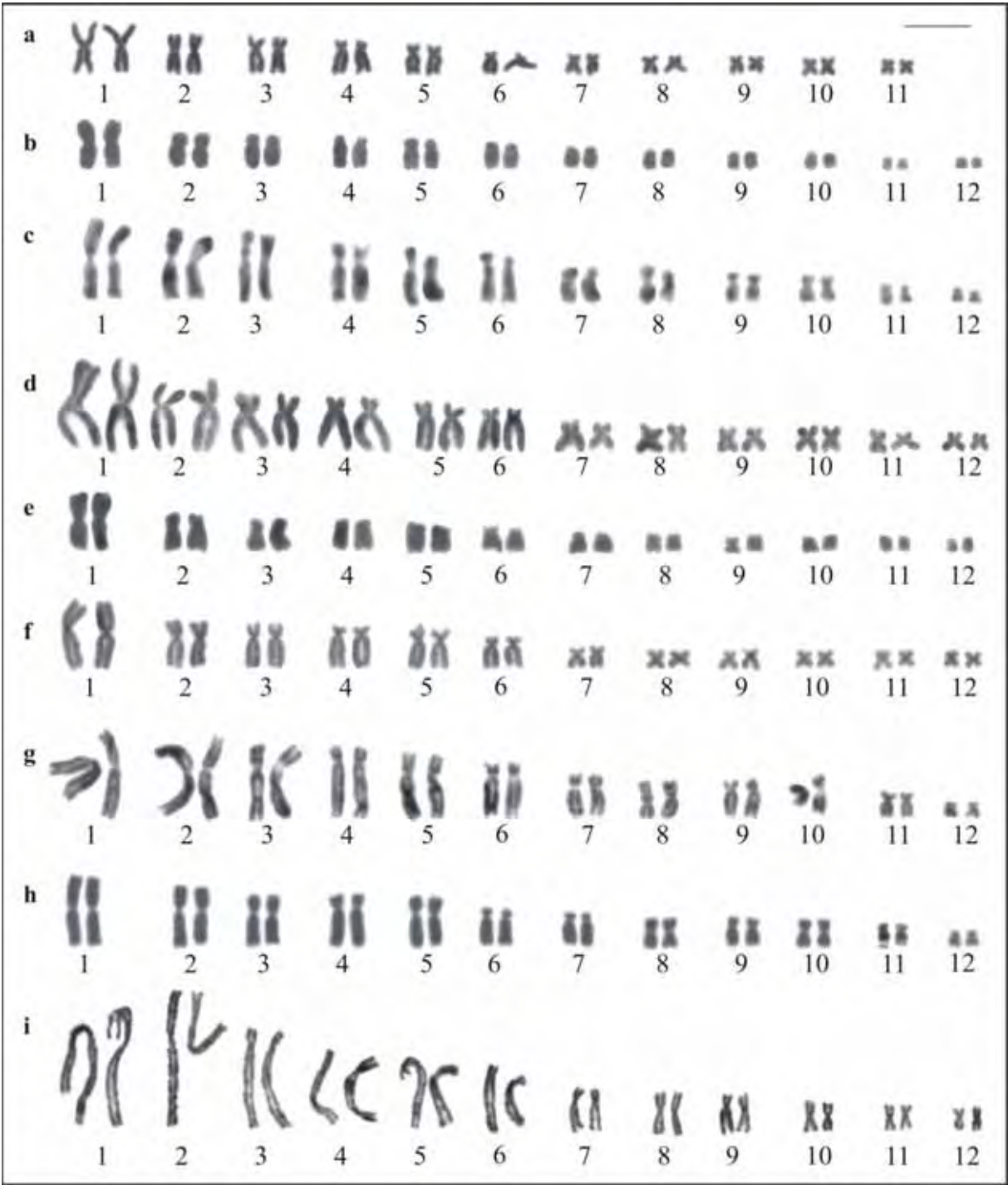


Figura 1 continuação

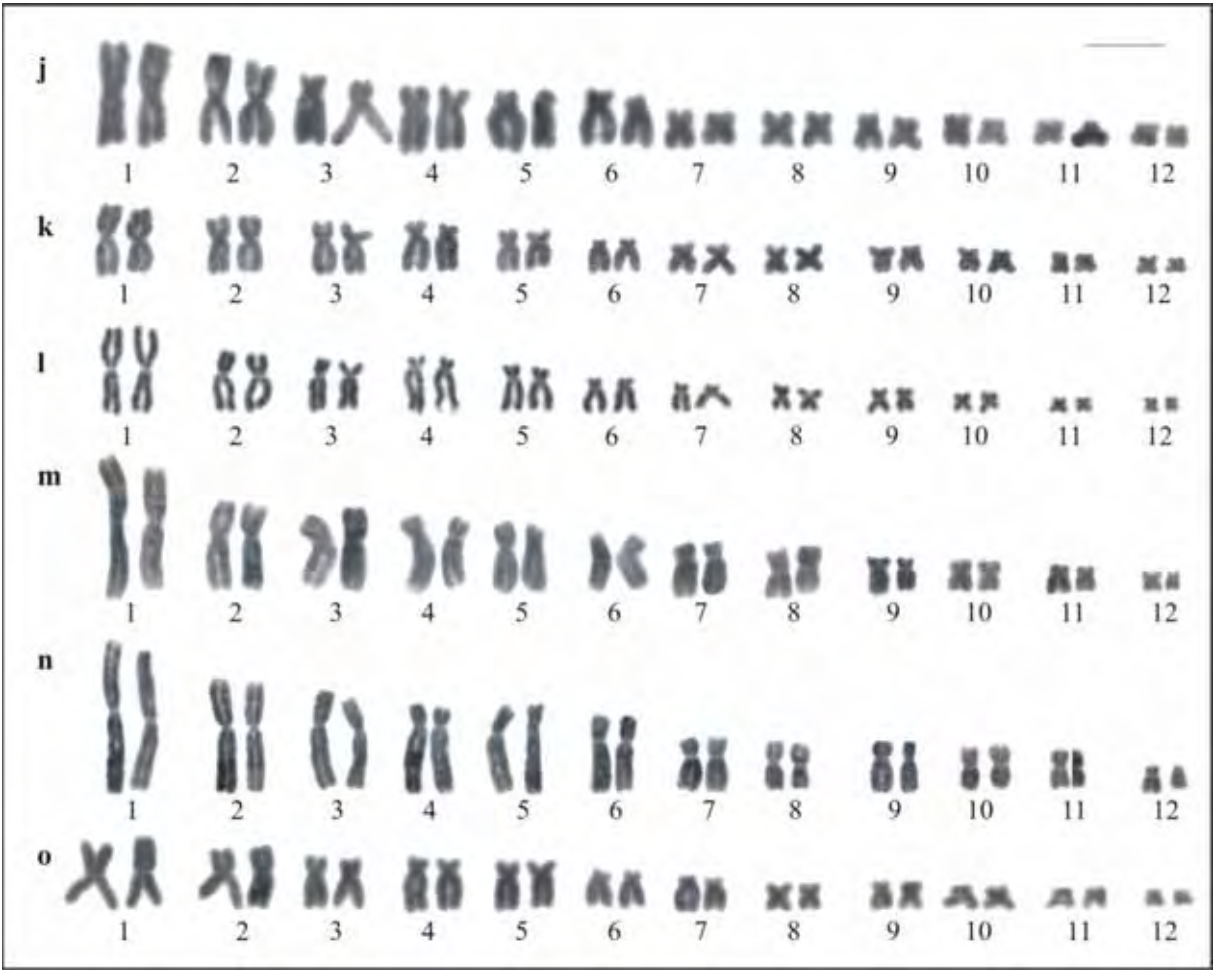


Figura 3

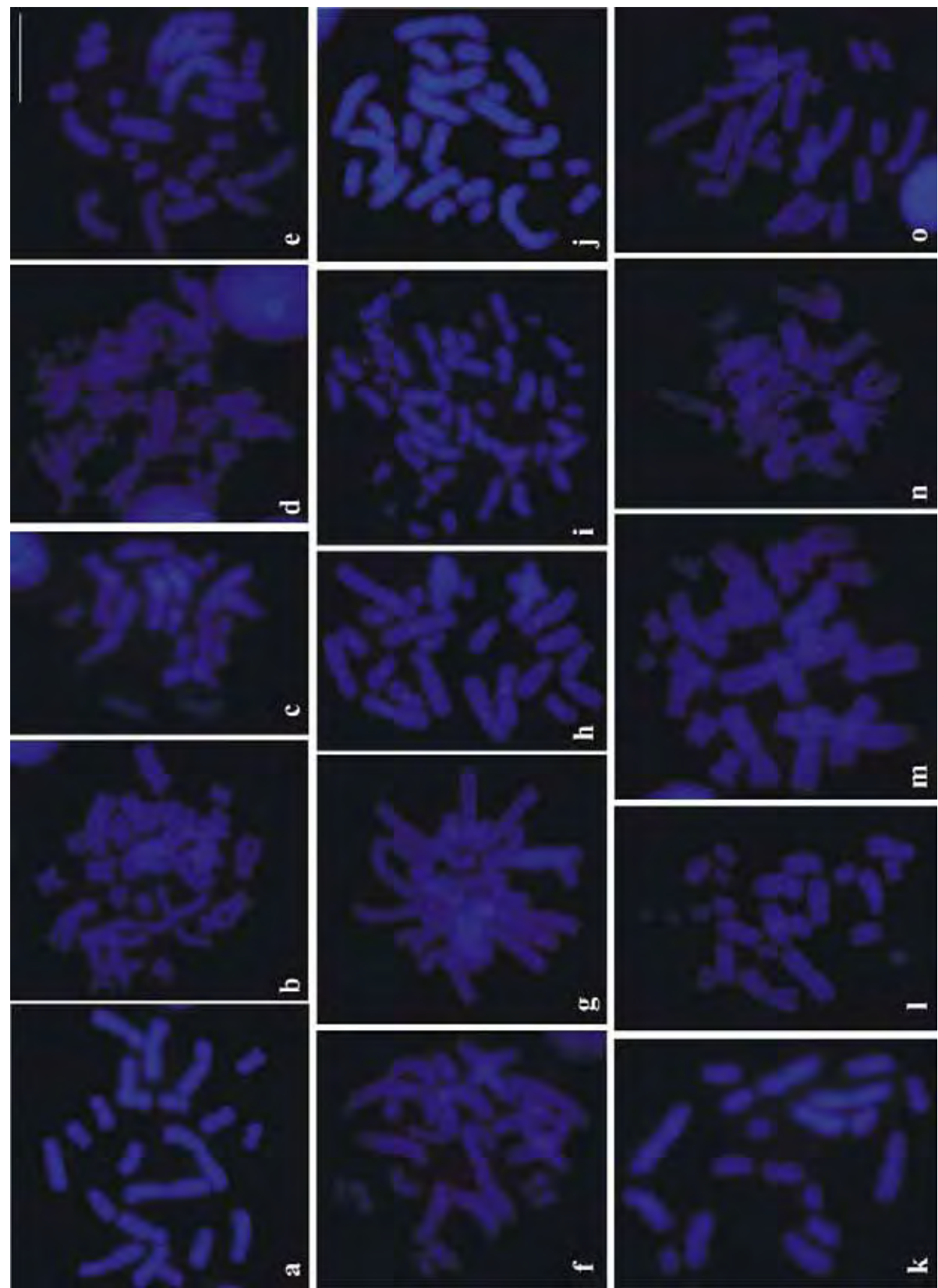


Figura 4

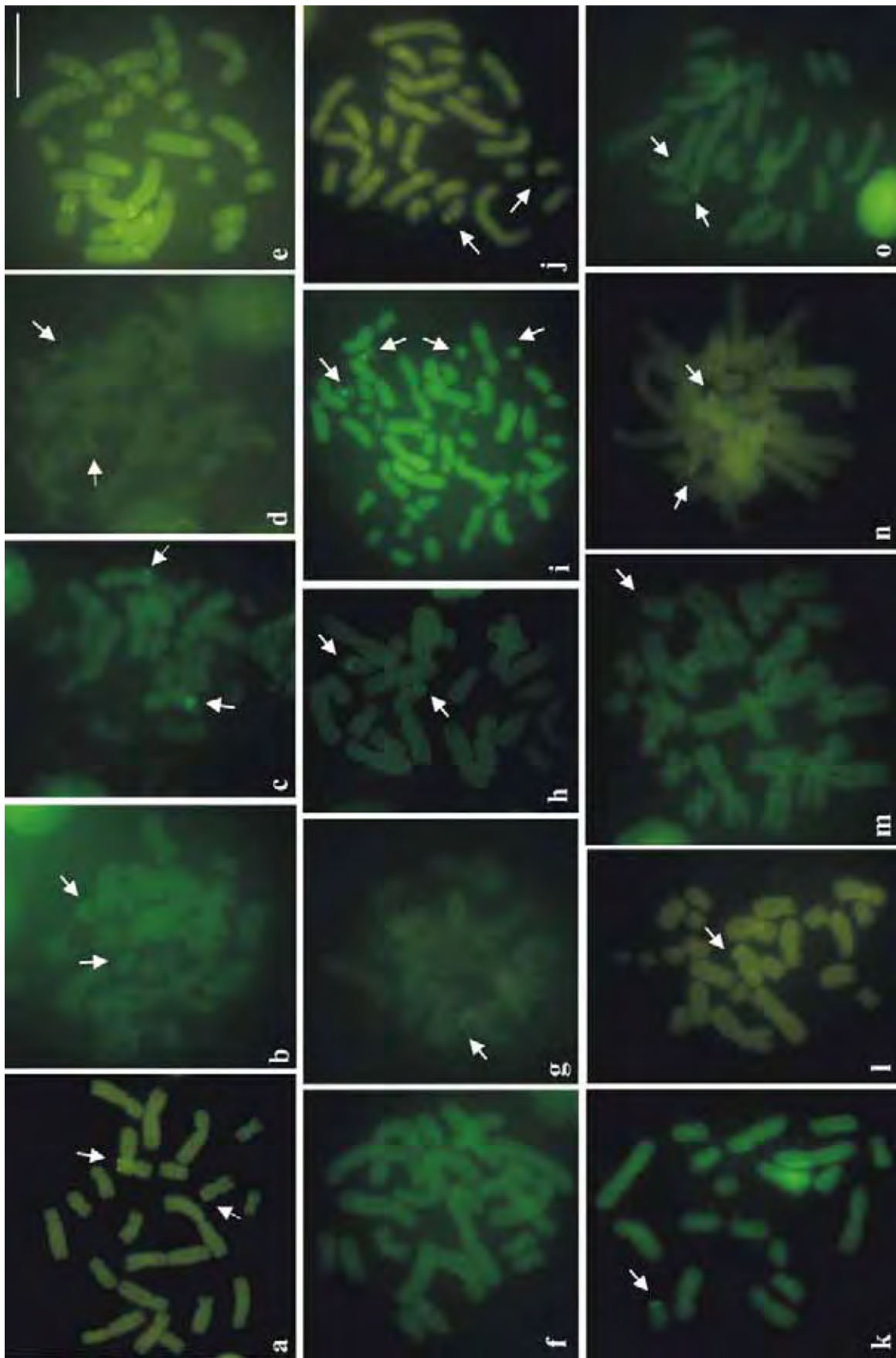
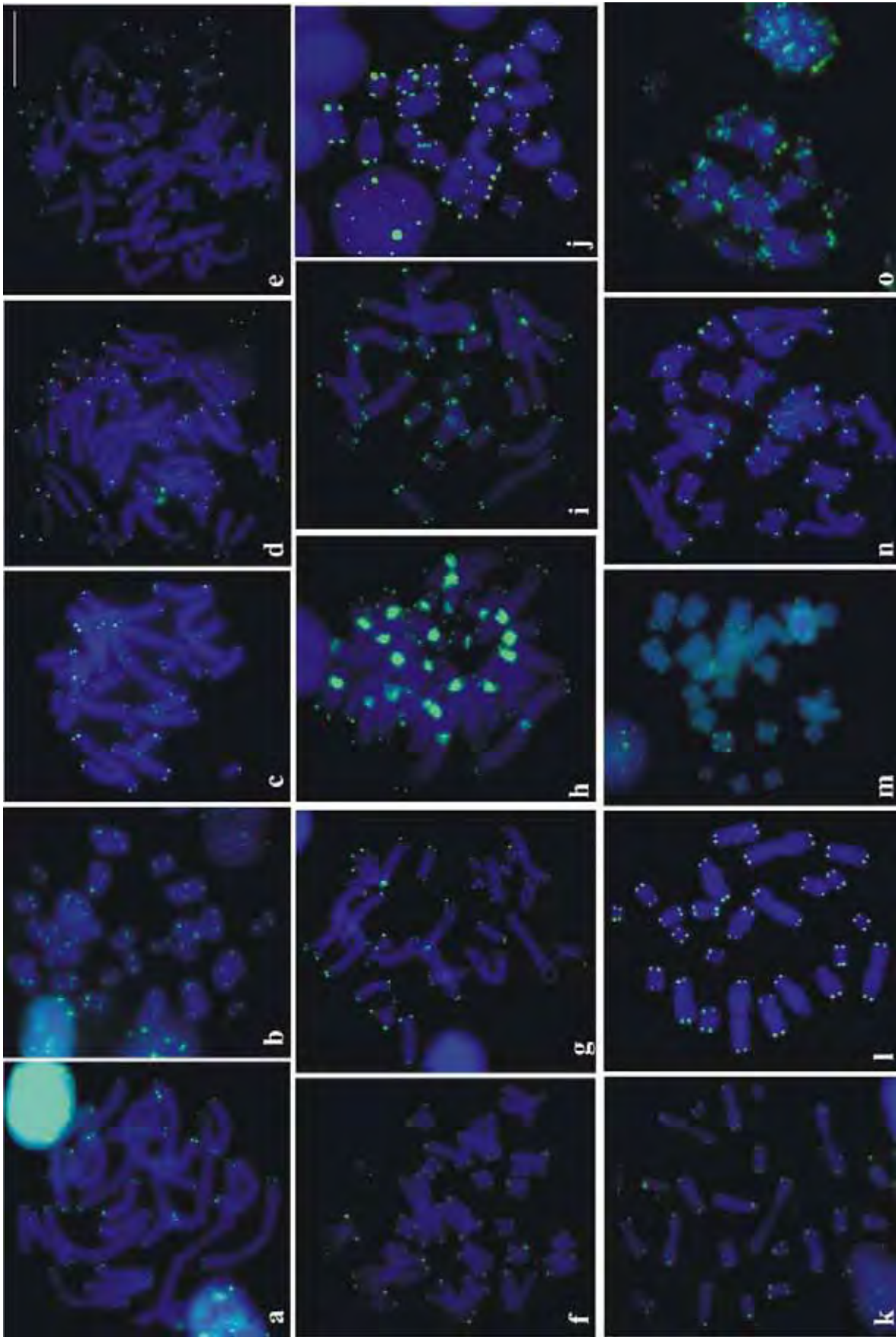


Figura 5



Analysis of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, Hylidae) by microdissection and chromosome painting

Resumo

Cromossomos B têm sido registrados em uma grande variedade de organismos, incluindo os anfíbios, estando presentes em cerca de 2% das espécies desse grupo taxonômico cariotipadas até o momento. Uma das espécies é o hilídeo *Hypsiboas albopunctatus*, que apresenta $2n=22+B$ em alguns indivíduos. Conforme relato anterior, o cromossomo B é pequeno, quase inteiramente marcado pela banda-C e não se emparelha com nenhum cromossomo permanecendo como univalente durante a meiose. Para melhor caracterizar esse supernumerário e obter informações sobre sua origem, exemplares de *H. albopunctatus*, *H. faber*, e *H. raniceps* foram cariotipadas. Técnicas de citogenética molecular e de rotina foram utilizadas, sendo este o primeiro relato em anuros que inclui análises de hibridação fluorescente *in situ*, utilizando sonda de cromossomo B de *H. albopunctatus* obtida por microdissecção e DOP-PCR, para investigar se existe homologia entre as sequências do B com qualquer cromossomo regular da mesma espécie ou de outras espécies do gênero. A análise citogenética caracterizou algumas sequências repetitivas de DNA nas três espécies de *Hypsiboas* e a pintura cromossômica revelou que a sonda cromossomo B de *H. albopunctatus* hibrida exclusivamente com o B e não marca quaisquer outros cromossomos em *H. albopunctatus* ou *H. faber*, mas em *H. raniceps* pequenos sinais de hibridação apareceram dispersos em todos os cromossomos. As sequências de DNA repetitivo identificadas nas três espécies *Hypsiboas* foram estudadas para determinar se podem fornecer alguma pista quanto à origem do cromossomo B em *H. albopunctatus*, mas a heterocromatina do B não apresenta qualquer semelhança com aquela presente nos cromossomas regulares das três espécies. A microdissecção e pintura cromossômica revelaram que o cromossomo B de *H. albopunctatus*

não compartilha nenhuma sequência com cromossomos do complemento A de *H. albopunctatus* e *H. faber*, mas a eucromatina dos cromossomos regulares de *H. raniceps* e a heterocromatina do B de *H. albopunctatus* são enriquecidas com o mesmo tipo de elemento de transposição. É ainda uma questão intrigante se o cromossomo B de *H. albopunctatus* pode ter originado a partir de trissomia de cromossomo regular ou a partir de um fragmento de cromossomo gerado pelo rearranjo responsável pela redução do número diploide de $2n=24$ para $2n=22$ na espécie. Em quaisquer dos casos, o acúmulo de sequências repetitivas de tipo transposon, detectada em outra espécie, embora proximamente relacionada, deve ser esclarecido.

Abstract

Background

B chromosomes have been recorded in a great variety of organisms, including amphibians. Approximately 2% of amphibian species karyotyped so far present B chromosomes. One such species is the hyliid, *Hypsiboas albopunctatus*, where $2n = 22 + B$ in some individuals. We previously reported that this B chromosome was small, almost entirely composed of C-banded heterochromatin, and does not pair with any chromosome of the A complement during meiosis. To further characterise this chromosome and to obtain some information about its origin, *H. albopunctatus* ($2n=22$ and $2n=22+B$), *H. faber* ($2n=24$), and *H. raniceps* ($2n=24$) specimens were karyotyped. Routine and molecular cytogenetic techniques were used, including first reported example in frogs of the use of fluorescent *in situ* hybridisation analyses using a B chromosome probe obtained from *H. albopunctatus* by microdissection and DOP-PCR amplification, to investigate whether the B chromosome shares sequence homology with regular chromosomes of the same species or with those of other species of the genus.

Results

The cytogenetic analyses characterised some repetitive DNA sequences in the three *Hypsiboas* species and the chromosome painting revealed that B chromosome probe of *H. albopunctatus* hybridised exclusively with the B chromosome. The probe did not label any other chromosomes in *H. albopunctatus* or *H. faber*, but all *H. raniceps* chromosomes showed small painting signals.

Conclusions

The repetitive DNA sequences identified in the three *Hypsiboas* species were studied to determine whether they provided any clues as to the origin of the B chromosome in *H. albopunctatus* but since B heterochromatin present any similarity with the regular chromosomes of the three species. The microdissection and chromosome painting revealed that the B chromosome of *H. albopunctatus* does not share any sequences with chromosomes of the A complement from *H. albopunctatus* and *H. faber*, but the euchromatin of the regular chromosomes of *H. raniceps* and the heterochromatin of the B chromosome of *H. albopunctatus* are enriched with the same type of mobile transposable elements (TEs). It is still an intriguing question if the B chromosome of *H. albopunctatus* may have originated from trisomy of a regular chromosome or from a chromosome fragment generated by the rearrangement responsible for reducing the diploid number from $2n = 24$ to $2n = 22$. In any of the cases, the accumulation of repetitive sequences of mobile transposable type, detected in another species, even though closely related, remains to be enlightened.

Key words

supernumerary chromosome; C-banding; rDNA probe; telomeric probe; fluorochrome staining; retrotransposon

Background

B chromosomes have been identified in a variety of organisms, including plants, invertebrates, and vertebrates. Several publications and reviews have reported that the properties of B chromosomes differ from those of the A complement [1,2,3,4,5,6]. Nevertheless, excepting the dispensability, the remaining characteristics are not universal and not always shared by the B chromosomes, indicating that these extra elements might be most probably distinct complex systems.

Approximately 2% of karyotyped salamanders, frogs, and toads have B chromosomes, which were found in species belonging to distinct families [6,7]. Initially, the karyotypes of 15 anuran species were reported to contain B chromosomes, and recently members of another species of this order, *Physalaemus feioi* (previously identified as *P. olfersii*), were also found to have a B chromosome [8]. One of the most intriguing cases was reported in *Leiopelma hochstetteri* from New Zealand, carrying two types of B chromosomes [9,10]. The larger one is found only in females, and is related to the 0W/00 sex chromosomes. The smaller one is found in both sexes and presented variation in number up to 15 per individuals.

The majority of reports on amphibian B chromosomes have been based on a small number of banding techniques and molecular cytogenetic procedures. Analyses of the molecular content of amphibian B chromosomes are scarce, and the only reported cases are in the frog *Leiopelma hochstetteri* [11] and in the salamander *Dicamptodon tenebrosus* [12]. In both cases, microdissected B chromosomes were analysed by Southern blotting, which revealed that the B chromosomes share repetitive sequences with chromosomes of the A complement. The B chromosome of *Leiopelma hochstetteri* was also reported to contain specific sequences that were not present in any chromosomes of the A complement. Recently,

B chromosomes of two species of Brazilian frogs, *Hypsiboas albopunctatus* and *Physalaemus feioi*, were microdissected to generate a B chromosome probe that was used for chromosome painting [13,14].

Our previous analysis in the tree frog *H. albopunctatus* showed a reduction in the diploid number from $2n = 24$ to $2n = 22$ and the presence of a B chromosome in some individuals, which was very similar in size and morphology to the nucleolar organiser region (NOR)-bearing chromosome 8 [15]. The B chromosome has a large amount of C-banded heterochromatin, and a small region is stained with DAPI. This chromosome is univalent and does not pair with another chromosome during metaphase I. Chromosome replication banding with 5-bromodeoxyuridine (BrdU) treatment was performed in *H. albopunctatus* and the karyotype was compared with the karyotypes of *H. crepitans* and *H. raniceps*, both with $2n = 24$ [15]. However, the mechanism responsible for the reduction in the diploid number and the origin of the B chromosome in *H. albopunctatus* remains unclear.

We performed the present work to further characterise the B chromosome of *H. albopunctatus*, in terms of its structure and molecular organisation, and to obtain information about the origin of this chromosome. New samples of *H. albopunctatus* and samples from two other species of the genus with $2n = 24$ were karyotyped. Routine and molecular cytogenetic techniques were used, including fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) analysis using a B chromosome probe obtained by microdissection and DOP-PCR amplification. This is the first reported example of the use of chromosome painting in amphibians to investigate whether a B chromosome shares sequence homology with chromosomes of the A complement of the same species or with those of other species of the genus. B chromosome probes obtained from two individuals were tested on mitotic and meiotic cells of the *H. albopunctatus* specimens, some of which contained a B chromosome, and on mitotic cells of *H. faber* and *H. raniceps* specimens, which did not contain B chromosomes. The aim was to search for location of same B repetitive sequences in regular chromosomes of representatives of the genus *Hypsiboas*.

Results

Karyotype constitution

Twenty-two specimens of *H. albopunctatus* from the five localities had $2n = 22$, and three males from Rio Claro, SP, had $2n = 23$ with one B chromosome (Figure 1a). The chromosome A complement was constituted of six large and medium sized pairs and five small pairs. Pairs 1, 8, and 10 were metacentric, pairs 2, 3, 5, 7, 9, and 11 were submetacentric, and pairs 4 and 6 were subtelocentric. The B chromosome was metacentric and was similar in morphology and size to chromosome 8. The specimens of *H. faber* and *H. raniceps* had $2n = 24$ and the karyotypes constituted of six large and medium sized pairs and six small pairs (Figures 1b and 1c). In *H. faber*, pairs 1, 8, and 10 were metacentric, pairs 2, 3, 5, 9, 11, and 12 were submetacentric, and pairs 4, 6, and 7 were subtelocentric. In *H. raniceps*, pairs 1, 8, and 10 were metacentric, pairs 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, and 12 were submetacentric, and pair 4 was subtelocentric. Male specimens of *H. albopunctatus* with $2n = 22$ displayed 11 bivalents in metaphase I cells and 11 chromosomes in metaphase II cells. In male specimens of *H. albopunctatus* with $2n = 22 + B$, the B chromosome was always univalent in metaphase I cells. This chromosome was either present or absent in metaphase II cells, which had 12 or 11 chromosomes, respectively.

A single NOR was identified in *H. albopunctatus* at the terminal region of the short arm of chromosome 8 by Ag impregnation (Figure 1a) and FISH with an rDNA probe (Figure 2a). An NOR was located at an interstitial region of the long arm of chromosome 11 in *H. faber* (Figure 1b, 2b). NORs were located at a terminal region in the long arm of chromosome 11 and at the terminal region of the long arm of one chromosome 1 in the *H. raniceps*

specimen from the state of Goiás (Figure 1b, 2b). In the *H. raniceps* specimen from the state of Mato Grosso, in which only the technique of Ag-impregnation was carried out, Ag-NOR was observed at terminal region of long arm on chromosome 11.

C-banding was performed in specimens of each of the three species. Even though no suitable C-banded metaphases had been obtained for *H. albopunctatus* with $2n = 22$, it was possible to confirm the data obtained in our previous study [15]. C-banded heterochromatin was predominantly located at the centromere, and was also detected at the interstitial region of the long arm of chromosome 7, at the para-centromeric regions of the short and long arms of chromosome 8, and at the terminal region of the short arm of chromosome 8 coincident with the NOR site. C-banded heterochromatin was detected at centromeric region of all chromosomes in *H. faber* (Figure 3a), and was detected only at the proximal region of the long arm of chromosome 11 in *H. raniceps* (Figure 3b).

BrdU treatment of *H. albopunctatus* specimens with a B chromosome produced metaphases with differentiation of very late replication regions in some chromosomes (Figure 4a). This was particularly evident for almost the entire B chromosome, for the interstitial regions of the long arm of chromosome 7, and for the peri-centromeric region of the short arms of chromosomes 3 and 4. All these regions were previously observed to contain C-banded heterochromatin. The majority of the remaining chromosomes were largely homogeneously stained. In some rare metaphases, however, replication banding was observed throughout chromosomes, which allowed homologous chromosomes to be paired more precisely (Figure 4b). The BrdU treatment carried out in the present work should result in incorporation of the base analogue into chromosome regions, including the heterochromatin, that are replicated during the second half and mainly at the end of the S-phase. These regions should appear as non stained bands, but, as shown in Figure 4b, a reverse pattern was observed. This pattern was most evident in the B chromosome in which the para-centromeric region was stained in both the short and long arms, whereas the distal regions of both these arms were stained less. The unexpected pattern showed in the Figure 4a was also well evident by observing the replication banding patterns in the chromosomes of *H. faber* and *H. raniceps* (Figures 4c and 4d) and may indicate that *in vivo* BrdU treatment sometimes generates intermediary replication banding patterns [16].

Staining with CMA₃ produced intense fluorescence at the NOR site in specimens of all three species (Figure 5a-c). In a *H. albopunctatus* specimen with a B chromosome from Rio Claro, intense fluorescence was also detected at the peri-centromeric region of the short arm of chromosome 2 (Figure 5a). The metaphase of *H. albopunctatus* stained with DAPI, showed

no particular fluorescence in any chromosome, including the B (Figure 5d). When the metaphase of a *H. faber* specimen was stained with DAPI the centromeres of all chromosomes exhibited intense fluorescence (Figure 5e), whereas DAPI fluorescence was observed at the proximal long arm of chromosome 11 of a *H. raniceps* specimen (Figure 5f).

The telomeric probe labelled the ends of chromosomes in specimens of all three species (Figure 6a-c). However, intense fluorescence was also observed at the centromeric and peri-centromeric regions in a *H. faber* specimen (Figure 6b). In metaphase I cells of a *H. albopunctatus* specimen with $2n = 22 + B$, labelling was observed at the ends of the A chromosome bivalents and four signals were detected in the univalent B chromosome (Figure 6d). In initial meiotic phases and in some of the interphase nuclei, the telomeric hybridisation signals were polarised towards to the same region (Figure 6e-f).

Microdissection and chromosome painting

The B54 and B57 probes completely hybridised with the B chromosome in mitotic metaphase or meiotic metaphase I cells of the specimens they were generated from, *i.e.*, the B54 probe labelled the B chromosome in CFBH 28554 and the B57 probe labelled the B chromosome in CFBH 28557. Hybridisation of the B54 probe with the B chromosome in meiotic metaphase I cells from the CFBH 28554 specimen is shown in Figure 7a. Chromosomes of the A complement were not labelled by these probes. Next, the B54 probe was cross-tested on mitotic metaphase cells from the CFBH 28557 specimen, and hybridisation was observed exclusively on the B chromosome (Figure 7b). We performed a total of eight FISH experiments in which the B probes were tested on cells of individuals carrying the B chromosome, and identical results were obtained. When the B54 probe was tested on mitotic metaphase cells from a *H. albopunctatus* specimen without a B chromosome (CFBH 28556), or from a *H. faber* specimen (CFBH 33187), no labelling was observed (Figure 7c-d). When the same experiment was performed using mitotic metaphase cells from two *H. raniceps* specimens (CFBH 7431 and CFBH 22456), which were collected from different locations, numerous small hybridisation signals were detected throughout all chromosomes (Figure 7e). When the B54 probe tested on the meiotic cells of the *H. albopunctatus* specimen CFBH 28554 with $2n = 22 + B$, a micronucleus with the B probe hybridisation signal was occasionally observed in interphasic cells (Figure 7f). In the same cytological preparation the B probe labelling was either present or absent in spermatids (Figure 7g).

Table 1 summarises the regions of repetitive sequences in the chromosomes of *H. albopunctatus*, *H. faber*, and *H. raniceps* specimens and the results of chromosome painting with the B chromosome probes.

Discussion and Conclusions

Hypsiboas albopunctatus is widely distributed throughout eastern Bolivia and Paraguay; central, south eastern, and southern Brazil; northern Uruguay; and north eastern Argentina [17]. However, only specimens from Argentina and some localities in Brazil have been karyotyped so far [15]. In contrast to other species in the genus where $2n = 24$ [18], *H. albopunctatus* has $2n = 22$. The $2n = 22$ karyotype lacks the smallest chromosome pair, which corresponds to chromosome 12 in the $2n = 24$ karyotype.

Some *H. albopunctatus* specimens have a B chromosome. This supernumerary chromosome was firstly recorded in *H. albopunctatus* specimens from south eastern Brazil collected from Poços de Caldas and Campinas [19], two municipalities in the states of Minas Gerais and São Paulo, respectively. B chromosome was also later detected in *H. albopunctatus* in six out of 14 specimens from Rio Claro, another locality in the state of São Paulo [15]. In the present paper, *H. albopunctatus* specimens were collected from the same site in the municipality of Rio Claro, approximately 10 years after B chromosome was first recorded and three of the 12 new specimens had a B chromosome. In the remaining two samples from the state of São Paulo and in the two samples from the states of Goiás and Mato Grosso in central Brazil only individuals without supernumerary were found. The occurrence of B chromosomes in specimens from these four localities cannot be dismissed because of the relatively small sample size. The three localities where B chromosomes have been recorded to date, Poços de Caldas, Campinas, and Rio Claro, are relatively close. It is possible that B chromosomes are only present in specimens from a particular geographical area, and this should be investigated further. Although *H. albopunctatus* has a wide geographical area with generalised ecology, regional population structures were detected according to recent

phylogeography data based on the sequencing of mitochondrial and nuclear genes [20]. The three recognised phylogenetic lineages correspond to the south eastern, Central Cerrado, and Chapada dos Guimarães clades, which may include the *H. albopunctatus* specimens used in the present study.

B chromosomes were only detected in male specimens of *H. albopunctatus* in this study, in agreement with previous reports [15,19]. This is most likely due to the collecting procedures used and the relatively small number of individuals analysed. However, B chromosomes have been reported to be exclusively found in males or females in other amphibian species [6], and the presence of a B chromosome has been related to the mechanism of sex chromosome determination, for example in the frog *Leiopelma hochstetteri* [9,10]. More male and female specimens of *H. albopunctatus* need to be analysed to determine whether B chromosomes are exclusively found in males of this species. B chromosomes have been found in a relatively high number of female *Gastrotheca espeletia* specimens, although the reason remains unclear. It was proposed that this may be due to B chromosomes conferring a selective disadvantage to males or to the elimination of B chromosomes during male embryogenesis [21].

In the *H. albopunctatus* specimens with B chromosome presented here and those reported previously, each individual had only one B chromosome per cell. Furthermore, the morphology and size of the B chromosome was similar in all specimens. This might indicate that the B chromosome of *H. albopunctatus* specimens had a common origin, and in this case the number and the morphology of B would have remained constant and unchanged along the time. However, it cannot be discounted that these B chromosomes had independent origins, and they share a similar morphology in response to a common but unknown factor working over time since the origin. These theories are based solely on the gross morphology of the B chromosome because the molecular content of this chromosome in *H. albopunctatus* has not been determined. Striking variation in the B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* has been observed, with approximately 30 different types of B chromosomes identified according to standard staining and C-banding patterns [22]. Nevertheless, FISH analyses demonstrated that these different B chromosome types are composed of rDNA and another repetitive sequence [23]. Even though the amount and organisation of these repetitive sequences differed between the chromosome types, the authors suggested that these B chromosomes have a common origin.

Some aspects of B chromosome in *H. albopunctatus* during meiosis could be observed in metaphase I cells, where the B chromosome invariably formed a round univalent and did

not pair with any chromosome of the A complement. The morphology of the B chromosome and the arrangement of its four telomeric signals suggested self-pairing of chromosome arms. This is in agreement with the hypothesis of the B chromosome being an isochromosome, even though the metacentric morphology with symmetrical arms of B observed in mitotic metaphases was already an indication of this configuration. In accordance with previous data [15], and contrary to what is frequently observed during cell division [3,24], there was no evidence of non-disjunction during meiosis. The B chromosome was either present or absent from metaphases II cells, which had 12 or 11 chromosomes, respectively. Chromosome painting of spermatids with the B chromosome probe detected one hybridisation signal when the B chromosome was present, whereas there was no labelling when the B chromosome was probably absent. It is important to note that micronuclei were occasionally labelled in cytological testis preparations, which might indicate that B chromosome can be eliminated from germline cells via some unknown factor operating during the inheritance of the B chromosome. The data on B chromosome during meiosis are scanty, and so we were unable to draw firm conclusions about the behaviour of the B chromosome in *H. albopunctatus* during meiosis and further analyses are necessary.

To obtain a probe for the B chromosome of *H. albopunctatus*, we performed microdissection of male metaphase I cells, which allowed easy identification of the meiotic B chromosome univalent. Furthermore, chromosome spreading in metaphase I cells ensured the B chromosome was better separated from the other chromosomes, avoiding contamination during the microdissection procedure. The clear results of the FISH experiments indicate that a B chromosome probe was successfully generated, and the 77% of stringency adopted prevented the probe hybridising non-specifically.

FISH experiments were performed in which the B54 and B57 probes were tested in mitotic or meiotic cells of the specimen they were generated from. In all seven of these experiments, uniform and intense fluorescence was observed exclusively on the B chromosome. When the B54 probe, which was generated from the CFBH 28554 specimen, was tested on mitotic metaphase cells from the CFBH 28557 specimen, intense fluorescence was again only detected on the B chromosome. This indicates that there is a significant degree of sequence conservation between the B chromosomes of different animals in the population. The B54 probe did not label any chromosomes of the A complement in these experiments, or when tested on metaphase cells from *H. albopunctatus* specimens lacking a B chromosome. This suggests that the repetitive DNA sequences of the B chromosome share no homology

with any A chromosome sequences of this species, unless the copy number was too low to be detected by FISH.

These results suggest that the B chromosome of *H. albopunctatus* contains abundant and conserved repetitive DNA sequences that are not found in any chromosomes of the A complement. Although this result is not frequent, similar findings where B chromosomes contain sequences that are not shared with the A complement have been reported in other species including the mammal *Nyctereutes procyonoides* [25] and the fish *Alburnus alburnus* [26]. In the vast majority of reported cases sequences found in B chromosomes are also shown in A chromosomes, as in the rodent *Apodemus peninsulae* [27] and in the locust *Locusta migratoria* [28]. In the plant *Brachycome dichromosomatica* two types of B chromosomes were observed [29,30,31] and among the several repetitive sequences identified some were found only in the B chromosomes, some were present in both B and A chromosomes, and others were present in the B or A chromosomes of other plants of the *Brachycome* genus.

The homology of B chromosome sequences was investigated in two other *Hypsiboas* species. The metaphase chromosomes of *H. faber* showed no labelling with the B chromosome probes generated from *H. albopunctatus*. However, the metaphase chromosomes of two *H. raniceps* specimens from different localities exhibited numerous small signals that are unlikely to be the result of a technical artefact. The hybridisation pattern is similar to that observed in FISH experiments with retrotransposon probes in rodents [32] and fish [33]. This indicates that the B chromosome of *H. albopunctatus* may contain repetitive sequences that are absent or undetectable in any of its A chromosomes, but that are similar to transposable elements (TEs) present in the regular chromosomes of a closely related species. In *H. albopunctatus*, these TEs accumulate in the heterochromatin of the B chromosome, whereas in *H. raniceps*, these TEs are dispersed throughout the euchromatic chromosome arms.

Several studies and the review of Camacho *et al.* [5] report that B chromosomes mostly contain distinct types of repetitive sequences, including satellite DNA, rDNA, transposable and retrotransposable elements. We have analysed the chromosomes of *H. albopunctatus*, *H. faber*, and *H. raniceps* with a wide range of cytogenetic techniques, including Ag-NOR impregnation, C-banding, replication banding with BrdU, base-specific fluorochrome staining, FISH with probes of rDNA and telomeric sequences, and B chromosome painting. This enabled us to characterise the repetitive sequences of the chromosomes of these three species at the gross cytological level, leading to the identification of several types of repetitive DNA.

As is frequently observed among Hyllinae [34,35], NOR was located on chromosome 11 of *H. faber* and *H. raniceps*, although at distinct sites. Labelling was also observed in one of the homologues of chromosome 1 in the *H. raniceps* specimen from the state of Goiás. In the specimens from the state of Mato Grosso of the present study and in *H. raniceps* from another locality [15], Ag-NOR was observed only at terminal region of long arm on chromosome 11, but since the FISH with an rDNA probe was not carried out the presence of inactive rDNA sequences on chromosome 1 can not be discarded. Surprisingly, NOR was located on chromosome 8 of *H. albopunctatus* indicating that the change in NOR position could be related to the mechanism responsible for reducing the chromosome number from $2n = 24$ to $2n = 22$, as previously discussed [15]. Since the B chromosome and chromosome 8 of *H. albopunctatus* are morphologically similar, one of the hypothesis for B origin was trisomy of chromosome 8 [15], although Ag-NOR was never detected on the B chromosome. In the present paper, we showed that, actually, this supernumerary chromosome contains no rDNA since no hybridisation was observed in FISH analyses using the ribosomal probe. This indicates that the B chromosome does not contains inactive NOR, and argues against the hypothesis that it originated from chromosome 8, although it is possible that rDNA sequences were lost after the B chromosome origin. A B chromosome containing a silent NOR was identified in the grasshopper *E. plorans* [36,37] by FISH with an rDNA probe and when rDNA sequences were activated after translocation involving the B chromosome with a chromosome of the A complement. Chromosome B carrying NOR is not too rare and this corresponds to one of the few confirmed cases of active gene on B chromosome of distinct organisms [2], including the rodent *Akodon montensis* [38,39], and the frogs *Gastrotheca espeletia*, *Scaphiopus hammondi*, and *Eleutherodactylus gundlachi* [6].

The other repetitive DNA sequences identified in the three *Hypsiboas* species were studied to determine whether they provided any clues as to the origin of the B chromosome in *H. albopunctatus*. Each species had a specific C-banding pattern; *H. albopunctatus* had a predominantly centromeric pattern but some chromosomes exhibited interstitial or pericentromeric bands; *H. faber* had an exclusively centromeric pattern; and *H. raniceps* displayed a single C-banding signal in accordance with previous observations [15]. The C-banded heterochromatin of the B chromosome of *H. albopunctatus* shows no evidence of heterogeneity, even though the tips of the short and long arms of this chromosome were not stained [15]. This peculiar C-banding pattern of the B chromosome was in agreement with its previously observed replication banding pattern, in which very late negative banded staining was restricted to the para-centromeric regions of the short and long arms. In that report and in

the present study, reverse replication banding was observed in some metaphases. The B chromosome had the para-centromeric regions at short and long arms darkly stained, whereas the terminal regions of the short and long arms were lightly stained. The C-banding and replication banding staining indicate that the B chromosome of *H. albopunctatus* has a small euchromatic region, and is predominantly composed of heterochromatin and other repetitive DNAs, including TEs.

We used base-specific fluorochrome staining to investigate the molecular nature of the repetitive sequences. Some of these sequences may be population-specific markers, such as the intense CMA₃-positive bands at the peri-centromeric region of the short arm of chromosome 2 and at the proximal region of the short arm of chromosome 9 of *H. albopunctatus*. Uniform non-fluorescent staining was observed throughout B chromosome of *H. albopunctatus* when this chromosome was stained with DAPI. This contrasts with the small band at the proximal region of the short arm that was intensely stained with DAPI counterstained with the AT-specific distamycin A in our former analysis [15]. This strongly suggests that the repetitive sequences of the B chromosome are not homogeneous and that their molecular content differs. Remarkably, intense centromeric staining with DAPI was observed in the *H. faber* specimen and the centromere of all chromosomes was labelled with the telomeric probe. This suggests that the amount of centromeric repetitive DNA is much larger than the C-banding staining suggests and that telomere-like repetitive sequences are present in centromeric heterochromatin. In *H. raniceps* specimens, NOR was intensely stained with CMA₃ and the single C-banded heterochromatin was intensely stained with DAPI. Interestingly, the chromosomes of *H. raniceps* specimens showing apparently a single region of C-banded heterochromatin exhibited a high level of interspersed repetitive DNA, as shown by chromosome painting with B chromosome probe generated from *H. albopunctatus*.

The origin of B chromosomes remains an intriguing question, which is generally studied by investigating the presence or absence of homologous repetitive sequences that are shared by the B chromosome and chromosomes of the A complement. In the present study, microdissection and chromosome painting revealed that the B chromosome of *H. albopunctatus* does not share any sequences with chromosomes of the A complement. However, the possibility that B chromosomes originated from chromosomes of the A complement cannot be dismissed. As discussed previously [15] the B chromosome of *H. albopunctatus* may have originated from trisomy of a regular chromosome or from a chromosome fragment generated by the rearrangement responsible for reducing the diploid number from $2n = 24$ to $2n = 22$. It also remains uncertain whether the B chromosome of *H.*

albopunctatus is an isochromosome. In any of the cases, the accumulation of repetitive sequences of mobile transposable type, detected in another species, even though closely related, remains to be enlightened. When studying the origin and differentiation of the B chromosome of *H. albopunctatus* it is crucial to map other repetitive DNA sequences, such as micro and mini satellites, histone genes, and 5S rDNA. Furthermore, the isolation and sequencing of the repetitive DNA of B chromosomes is still required.

Material and Methods

Animal samples

Chromosome preparations were obtained for 23 males, one female, and one juvenile of *Hypsiboas albopunctatus*, which were collected from five localities in the Brazilian states of Goiás, Mato Grosso, and São Paulo. Chromosome preparations were also obtained from two females of *H. faber* from the state of São Paulo, and from two females of *H. raniceps* from the states of Goiás and Mato Grosso (Appendix). Voucher specimens were deposited in the amphibian collection Célio F.B. Haddad (CFBH) housed in the Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Chromosome preparations, conventional and molecular cytogenetic techniques

Direct cytological suspensions of bone marrow, liver, and testes [40] and from the intestinal epithelium [41]. For some animals, cell suspensions were produced from lymphocyte cultures [42]. Slides were subjected to standard Giemsa staining and Ag-NOR impregnation [43], C-banding [44], and to double staining with AT-specific DAPI and GC-specific CMA₃ [45]. Differential staining of replication banding using fluorochrome plus Giemsa technique was performed following *in vivo* BrdU treatment [46,47]. FISH [48] was performed using the ribosomal probe HM123 [49] and a telomeric probe (TTAGGG)_n, according to the DAKO kit instructions (Denmark). The Ag-NOR technique was frequently performed on the same slide after Giemsa staining or FISH with the HM123 probe. Chromosomal images were captured with an Olympus digital camera D71 using the DP Controller program. Bi-armed chromosomes were classified as metacentric, submetacentric, or subtelocentric [50,51].

Microdissection and DOP-PCR

Microdissections of B chromosome were carried out according to Diniz *et al.* [52] from metaphase I cells of two male specimens of *H. albopunctatus* collected in Rio Claro with $2n = 22 + B$. The specimens CFBH 28554 and CFBH 28557 were used to generate the B54 and B57 probes, respectively. A meiotic cell suspension was dropped onto a 24 mm × 60 mm coverslip and was immediately stained with 5% Giemsa in phosphate buffer, pH 6.8. Using a glass needle micromanipulator acopped in a Nikon inverted microscope, four B chromosomes were microdissected and transferred to a microtube containing 10 µL DOP-PCR mix (1x Thermo Sequenase buffer reaction, 0.2 mM dNTP, 2 µM DOP primer - 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3' - [53], and ultra-pure water up to 10 µL). This procedure was repeated four times for each individual.

PCR reactions were performed using a Veritti Thermocycler (Applied Biosystems). Samples were heated at 90°C for 10 minutes and 4 U/µL Thermo Sequenase enzyme (USB) was added. The initial amplification of microdissected products was performed using RAMP-PCR with the following conditions: 94°C for 3 min; followed by 12 cycles of 94°C for 1 min 30 s; 37°C for 2 min increasing 0.2°C/s up to 72°C; 72°C for 2 min; followed by another 30 cycles of 94°C for 1 min 30 s; 62°C for 1 min; 72°C for 1 min 30 s.

After RAMP-PCR, a standard PCR was carried out to generate a probe stock. This reaction was comprised of: 1x PCR buffer; 2 mM MgCl₂; 0.02 mM dNTP; 0.7 µM DOP primer; 2.5 U Taq polymerase; 2 µL RAMP-PCR products; and ultra-pure water up to 25 µL. The following PCR conditions were used: 90°C for 3 min; followed by 30 cycles at 90°C for 1 min 30 s; 56°C for 1 min 30 s; 72°C for 1 min 30 s. Finally, a third PCR was performed to label the microdissection products. The PCR reaction was comprised of: 1x PCR buffer; 2 mM MgCl₂; 0.05 mM dATP; 0.05 mM dCTP; 0.05 mM dGTP; 0.035 mM dTTP; 0.015 mM labelled dUTP (Digoxigenin-11-dUTP, Roche); 2 µM DOP primer; 2.5 U Taq polymerase; 3 µL of the products from the second PCR; and ultra-pure water up to 25 µL. The amplification steps were the same as described for the previous reaction. After each PCR, electrophoresis of the amplified samples was performed using a 1% agarose gel to verify the sizes of the fragments. The fragments were 400–800 bp. Each labelled PCR product was precipitated in ethanol and re-suspended in 10 µL.

Chromosome painting

The B54 and B57 probes were used to perform FISH with mitotic and meiotic chromosome preparations. The probes were tested on samples from the individuals they were generated from, *i.e.*, B54 was tested on preparations from CFBH 28554 and probe B57 was tested on preparations from CFBH 28557. Furthermore, cross-specimen chromosome painting was performed in which the B54 probe was used on preparations from CFBH 28557. The B54 probe was also used on mitotic chromosome preparations of *H. albopunctatus* specimens with no B chromosome where $2n = 22$ (CFBH 28556), and on mitotic chromosome preparations of a *H. faber* specimen (CFBH 33187) and *H. raniceps* specimens from two distinct localities (CFBH 7431 and CFBH 22456).

FISH [48] was carried out as follows. Chromosome preparations that had been aged for at least 24 h were treated with RNase (0.05 mg/mL) and pepsin (0.005%), fixed in a formaldehyde solution (1%), dehydrated in 70%, 90%, and 100% ethanol (5 min each), and air-dried. Chromosomes were denatured by immersion of the slides in 70% formamide, 2x SSC at 70°C for 5 min, dehydrated in 70%, 90%, and 100% ethanol (5 min each), and air-dried. The hybridisation solution was composed of 160 µL dextran sulphate, 400 µL formamide, 80 µL 20x SSC, and 160 µL water. For each slide, 24 µL of hybridisation mix and 6 µL of the appropriate probe were heated at 85°C for 10 min, which was then immediately transferred to ice, dropped on the chromosome preparation, and the slide was kept overnight at 37°C to allow the hybridisation reaction to occur. Slides were then washed as follows: twice in 15% formamide, 0.2x SSC at 43°C for 10 min each, three times in 0.1x SSC at 60°C for 5 min each, and once in 4x SSC, 0.5% Tween 20 at room temperature for 5 min. All hybridisation procedures were performed with 77% stringency to prevent non-specific labelling.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. They also thank to Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for providing the collection permits. We also thank Amilton Ferreira, Cinthia Prado, Guilherme Galassi, Hideki Narimatsu, João Reinaldo da Cruz de Campos, and Juliana Zina for providing some of the karyotyped specimens.

List of Abbreviations

2n: diploid number; Ag-NOR: nucleolar organiser region marked by silver impregnation; BrdU: 5-bromodeoxyuridine; CMA₃: chromomycin A₃; DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenylindole; DOP-PCR: degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction; FISH: fluorescent *in situ* hybridisation; NOR: nucleolar organiser region; PCR: polymerase chain reaction; rDNA: ribosomal DNA.

Competing Interests

The authors declare non-financial competing interests.

Authors Contributions

SLG performed the routine and molecular cytogenetic studies and drafted the manuscript. DD and PESS helped with microdissection and chromosome painting experiments and revised the manuscript. FF supervised the microdissection and chromosome painting experiments and revised the manuscript. CFBH provided support on zoological information, carried out the species identification, and revised the manuscript. SK supervised the cytogenetic studies, participated in the draft, and in the revision of the final text. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] Jones RN, Rees H: *B Chromosomes*. London: Academic Press; 1982.
- [2] Green DM: **Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes**. *Genome* 1990, **33**:818-824.
- [3] Jones N, Houben A: **B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?** *Trends Plant Sci* 2003, **8**:417-423.
- [4] Camacho JPM: *B chromosomes in the eukaryote genome*. Basel: Karger; 2004.
- [5] Camacho JPM: **B chromosomes**. In *The evolution of the genome*. Edited by Gregory TR. San Diego: Elsevier; 2005:223-286.
- [6] Schmid M, Steinlein C, Bogart JP, Feichtinger W, León P, La Marca E, Diaz LM, Sans A, Chen S-H, Hedges SB: **The chromosomes of Terraranan frogs: insights into vertebrate cytogenetics**. *Cytogenet Genome Res* 2010, **130-131**:1-568.
- [7] Green DM: **Structure and evolution of B chromosome**. *Cytogenet Genome Res* 2004, **106**:235-242.
- [8] Milani M, Cassini CS, Recco-Pimentel SM, Lourenço LB: **Karyotypic data detect interpopulational variation in *Physalaemus olfersii* and the first case of a supernumerary chromosome in the genus**. *Animal Biol J* 2010, **2**:21-28.
- [9] Green DM: **Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system**. *Chromosoma* 1988, **97**:55-70.
- [10] Green DM: **Supernumerary chromosomes in Amphibians**. In *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Edited by Green DM, Sessions SK. San Diego: Academic Press; 1991:333-357.

- [11] Sharbel TF, Green DM, Houben A: **B-chromosome origin in the endemic New Zeland frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution.** *Genome* 1998, **41**:14-22.
- [12] Brinkman JN, Sessions SK, Houben A, Green DM: **Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific Giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*.** *Chromosome Res* 2000, **8**:477-485.
- [13] Gruber SL, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Haddad CFB, Kasahara S: **Microdissection and whole chromosome painting of the B chromosomes of *Hypsiboas albopunctatus* (Amphibia, Anura) [abstract].** In 18th International Chromosome Conference, Manchester, United Kingdom; 2011,s75.
- [14] Campos JRC, Benevides SSN, Lourenço LB: **Chromosome painting on B chromosome of *Physalaemus feioi* and cytogenetic study of its related species [abstract].** In 7th World Congress of Herpetology, Vancouver, Canada; 2012,s105.
- [15] Gruber SL, Haddad CFB, 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* 2007, **130**:281-291.
- [16] Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT: **Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae) from Brazil.** *Caryologia* 1987, **40**:43-57.
- [17] Frost DR: **Amphibians of the world: an on-line reference. V5.5.** [<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>]
- [18] Catroli GF, Kasahara S: **Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives.** *Publicatio: Ciências Biológicas e da Saúde* 2009, **15**:67-86.
- [19] Cardoso AJ: **Utilização de recursos para reprodução em comunidade de anuros no sudeste do Brasil.** *PhD Thesis*, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 1986.
- [20] Prado CPA, Haddad CFB, Zamudio KR: **Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog.** *Mol Ecol* 2012, **21**:921-941.
- [21] Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I, Haaf T: **Chromosome banding in amphibia XXIV. The B chromosomes of *Gastrotheca espeletia* (Anura, Hylidae).** *Cytogenet Genome Res* 2002, **97**:205-218.
- [22] López-León MD, Cabrero J, Parro MC, Viseras E, Camacho JPM, Santos JL: **Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper).** *Heredity* 1993, **71**:352-362.

- [23] Cabrero J, López-Léon MD, Bakkali M, Camacho JPM: **Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans***. *Heredity* 1999, **83**:435-439.
- [24] Beukeboom LW: **Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome Conference**. *Heredity* 1994, **73**:328-336.
- [25] Trifonov VA, Perelman PL, Kawada S-I, Iwasa MA, Oda S-I, Graphodatsky AS: **Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procynoides* (Carnivora)**. *Chromosome Res* 2002, **10**:109-116.
- [26] Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharl M, Schmid M: **The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence**. *Chromosome Res* 2003, **11**:23-35.
- [27] Karamysheva TV, Andreenkova OV, Bochkaev MN, Borissov YM, Bogdanchikova N, Borodin PM, Rubtsova NB: **B chromosomes of Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) analysed by microdissection and FISH**. *Cytogenet Genome Res* 2002, **96**:154-160.
- [28] Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM: **Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria***. *Chromosome Res* 2009, **17**:11-18.
- [29] Leach CR, Tamzin MD, Franks TK, Spinello SS, Hanrahan CF, Timmis JN: **Organisation and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica***. *Chromosoma* 1995, **103**:708-714.
- [30] Houben A, Leach CR, Verlin D, Rofe R, Timmis JN: **A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome***. *Chromosoma* 1997, **106**:513-519.
- [31] Houben A, Verlin D, Leach CR, Timmis JN: **The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica***. *Chromosoma* 2001, **110**:451-459.
- [32] Meles S, Adegá F, Guedes-Pinto H, Chaves R: **The karyotype and sex chromosomes of *Praomys tullbergi* (Muridae, Rodentia): A detailed characterization**. *Micron* 2008, **39**:559-568.
- [33] Cioffi MB, Bertollo LAC: **Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish**. In *Repetitive DNA*. Genome Dyn. Edited by Garrido-Ramos MA. Basel: Karger; 2012:197-221.
- [34] Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB, Kasahara S: **Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation**. *Copeia* 2011, **2**:251-263.

- [35] Gruber SL, Zina J, Haddad CFB, Kasahara S: **Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylinae, Hylidae).** *BMC Genetics* 2012, **13**:28. doi:10.1186/1471-2156-13-28.
- [36] Cabrero J, Alché JD, Camacho JPM: **Effects of B chromosomes on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*: activation of a latent nucleolar organizer region on a B chromosome fused to an autosome.** *Genome* 1987, **29**:116-121.
- [37] López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison TS, Hewitt GM, Camacho JPM: **Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique.** *Chromosome Res* 1994, **2**:87-92.
- [38] Yonenaga-Yassuda Y, Assis MFL, Kasahara S: **Variability of the nucleolus organizer and the presence of the rDNA genes in the supernumerary chromosome of *Akodon aff. arviculoides* (Cricetidae, Rodentia).** *Caryologia* 1992, **45**:163-174.
- [39] Fagundes V: **Contribuição da citogenética molecular no entendimento da evolução cromossômica no gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae).** *PhD Thesis*, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, 1997.
- [40] Baldissera Jr FA, Oliveira PSL, Kasahara S: **Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome.** *Rev Bras Genet* 1993, **16**:335-345.
- [41] Schmid M: **Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*.** *Chromosoma* 1978, **66**:361-388.
- [42] Kasahara S, Silva APZ, Gruber, SL: **Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia).** *Genet Mol Biol* 1998, **21**:471-467.
- [43] Howell WM, Black DA: **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method.** *Experientia* 1980, **36**:1014-1015.
- [44] Sumner AT: **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** *Exp Cell Res* 1972, **75**:304-306.
- [45] Christian A, McNiel E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Wadren C, Bedford JA: **A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes.** *Cytogenet Cell Genet* 1998, **82**:172-179.
- [46] Dutrillaux B, Couturier J: *La Pratique de l'Analyse Chromosomique*. Paris: Masson; 1981.
- [47] Matsuda Y, Chapman VM: **Application of fluorescence in situ hybridization in genome analysis of the mouse.** *Electrophoresis* 1995, **16**:261-272.

- [48] Pinkel D, Straume T, Gray JW: **Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**:2934–2938.
- [49] Meunier-Rotival M, Cortadas J, Macaya G: **Isolation and organization of calf ribosomal DNA.** *Nucleic Acids Res* 1979, **6**:2109-2123.
- [50] Green DM, Sessions SK: **Nomenclature for chromosomes.** In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Edited by Green DM, Sessions SK. San Diego: Academic Press; 1991:431-432.
- [51] Green DM, Sessions SK: **Karyology and Cytogenetics.** In: *Amphibian Biology*. Volume 7. Edited by Heatwole H, Tyler M. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons; 2007:2756-2841.
- [52] Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC: **Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes).** *Cytogenet Genome Res* 2008, **122**:163-168.
- [53] Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe J: **Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer.** *Genomics* 1992, **8**:718-725.

Table 1. Summary of labelling properties of B and some chromosome regions of *Hypsiboas* species.

Species	Chromosome Region	Cytogenetic Techniques					
		C-banding	DAPI staining	CMA ₃ staining	(TTAGGG)n hybridisation	Ag-NOR/ rDNA probe hybridisation	B probe hybridisation
<i>H. albopunctatus</i>							
	NOR (pair 8)	+	-	+	-	+	-
	centromeric heterochromatin	+	-	-	-	-	-
	interstitial heterochromatin pairs 2p and 9p	+	-	+	-	-	-
	interstitial heterochromatin pair 7q	+	-	-	-	-	-
	B chromosome	(+)	-	-	-	-	+
<i>H. faber</i>							
	NOR (pair 11)	+	-	+	-	+	-
	centromeric heterochromatin	+	+	-	+	-	-
<i>H. raniceps</i>							
	NOR (pair 11, chromosome 1) specimen from Goiás	-	-	+	-	+	-
	pair 11 heterochromatin	+	+	-	-	-	-
	euchromatic regions	-	-	-	-	-	+*

+/- = presence or absence of labelling with the cytogenetic techniques; (+) = partially labelled; * = numerous small interspersed labelling; p = short arm; q = long arm.

Appendix

List of karyotyped specimens, number of individuals, sex, voucher number, and collecting locations in Brazil.

Hypsiboas albopunctatus. Brazil: São Paulo: Rio Claro, CFBH 1145-46, 28554-62 (males); CFBH 28563 (female). São Paulo: Biritiba Mirim, CFBH 28637, 28639-40 (males). São Paulo: Salesópolis, CFBH 22381 (juvenile). Goiás: Goiânia, CFBH 7456-58 (males).

Hypsiboas faber. Brazil: São Paulo: Rio Claro, CFBH 7253, 33187 (females).

Hypsiboas raniceps. Brazil: Tocantins: Ilha do Bananal, CFBH 7431 (female). Mato Grosso: Santa Rita do Trivelato, CFBH 22456 (female).

Figure Legends

Figure 1. Giemsa-stained karyotypes of *Hypsiboas*.

a. *H. albopunctatus*, male, $2n = 22 + B$; b. *H. faber*, female, $2n = 24$; c. *H. raniceps*, female, $2n = 24$. Insets: Ag-NOR pairs. Bar = 10 μm .

Figure 2. FISH using an rDNA probe in *Hypsiboas*.

a. metaphase of *H. albopunctatus*, $2n = 22 + B$; b. partial metaphase of *H. faber*; c. partial metaphase of *Hypsiboas raniceps*. Bar = 10 μm .

Figure 3. C- banded metaphases of *Hypsiboas*.

a. *H. faber* showing centromeric C-bands; b. *H. raniceps* showing C-band only at proximal long arm of chromosomes 11. Bar = 10 μm .

Figure 4. Karyotypes of *Hypsiboas* showing differentiation after BrdU treatment.

a-b. *H. albopunctatus* with $2n = 22 + B$; c. *H. faber*; d. *H. raniceps*. Note in a very late replicating regions in the chromosomes B, 3, 4, and 7 and in b, approximately reverse replication pattern in the chromosomes of *H. albopunctatus* regarding those of the species showed in c and d. Bar = 10 μm .

Figure 5. CMA₃ (a-d) and DAPI stained (e-h) chromosomes of *Hypsiboas*.

a, e. *H. albopunctatus*, $2n = 22 + B$; b, f. *H. albopunctatus*, $2n = 22$; c, g. *H. faber*; $2n = 24$; d, h. *H. raniceps*, $2n = 24$. Note in a-d bright CMA₃ fluorescence at the NOR site (arrow) and also in a labelling in chromosome 2 and in b in chromosome 9; in g-h bright DAPI fluorescence in C-banded heterochromatin. The B chromosome showed no particular brilliant fluorescent with any of the fluorochromes. Bar = 10 μm .

Figure 6. FISH using a telomeric probe in *Hypsiboas*.

a, d-f. *H. albopunctatus*, $2n = 22 + B$; b. *H. faber*; c. *H. raniceps*. a-c. mitotic metaphases; d. metaphase I; e. initial meiotic phase; f. interphasic nucleus. B chromosome (arrow) showed only telomeric hybridisation. Note in b additional centromeric labelling in all chromosomes and in e and f polarization of the telomeric labelling. Bar = 10 μm .

Figure 7. FISH using probe of B chromosome (B54) of *Hypsiboas albopunctatus*.

a, f-g. *H. albopunctatus* (CFBH 28554), $2n = 22 + B$; b. *H. albopunctatus* (CFBH 28557), $2n = 22 + B$; c. *H. albopunctatus* (CFBH 28556), $2n = 22$; d. *Hypsiboas faber*; e. *Hypsiboas raniceps*. a. metaphase I; b-e. mitotic metaphases; f. interphasic nucleus; g. spermatids. Note in a and b completely labelled B chromosome (arrow), in c and d no hybridisation labelling in any chromosome, in e interspersed labelling in all chromosomes, in f labelling of B probe in micronucleus, and in g labelling of B probe in one of the spermatids. Bar = 10 μm .

Figure 1

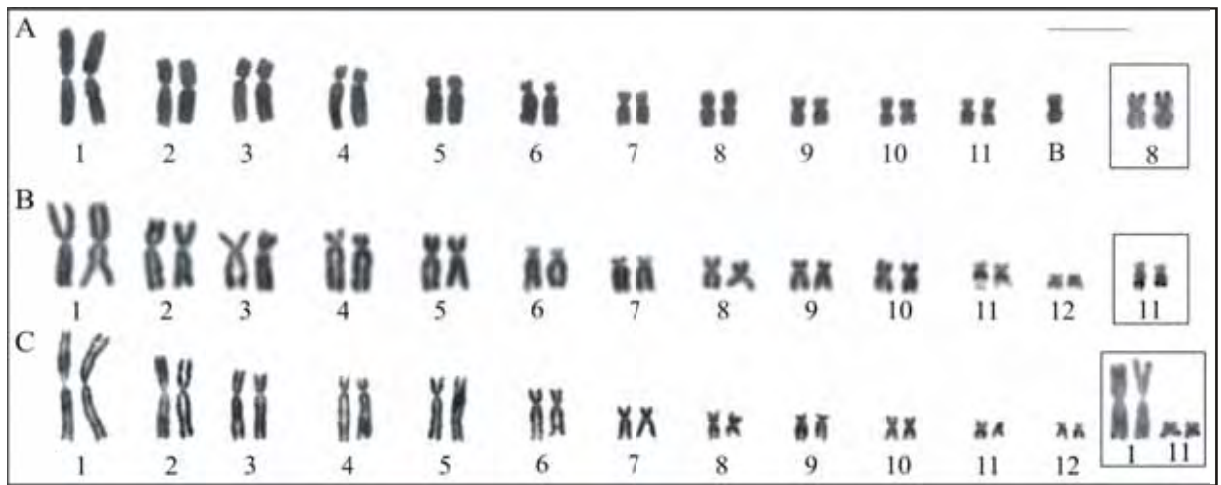


Figure 2

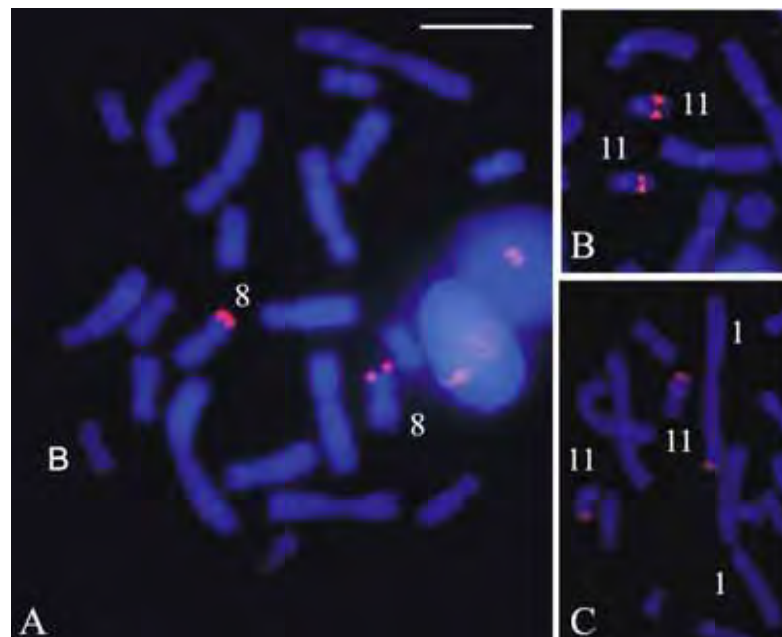


Figure 3

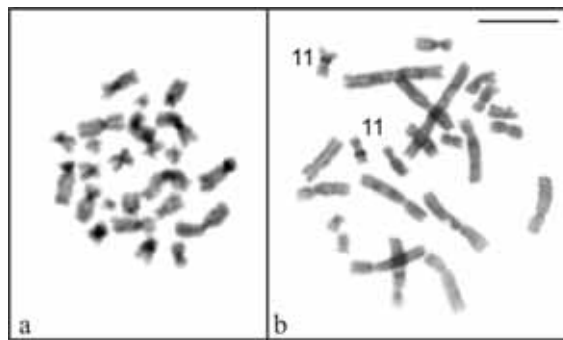


Figure 4

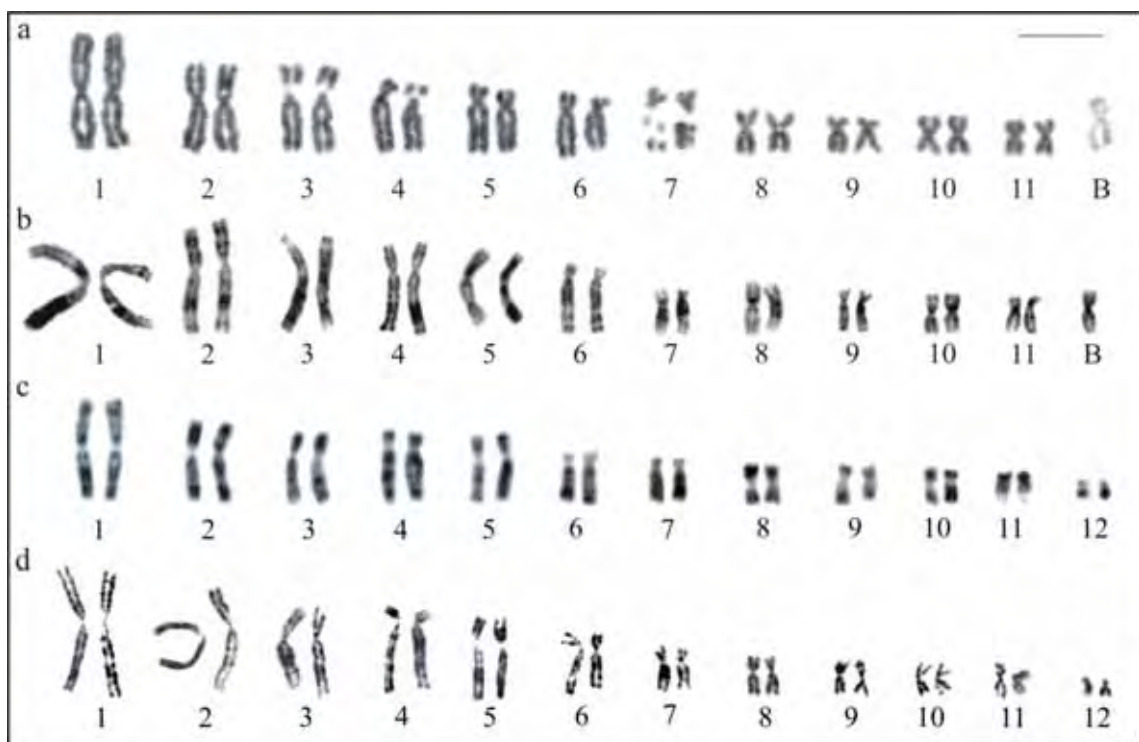


Figure 5

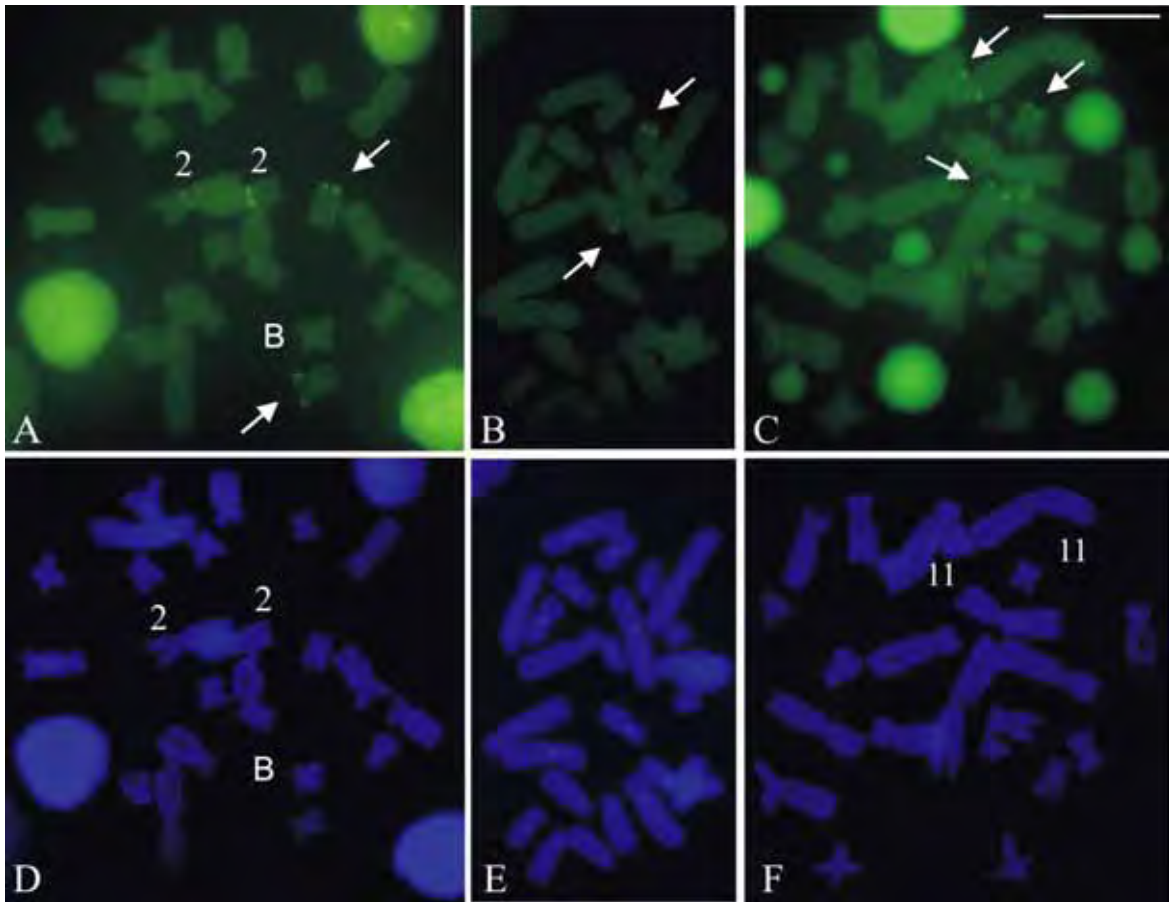


Figure 6

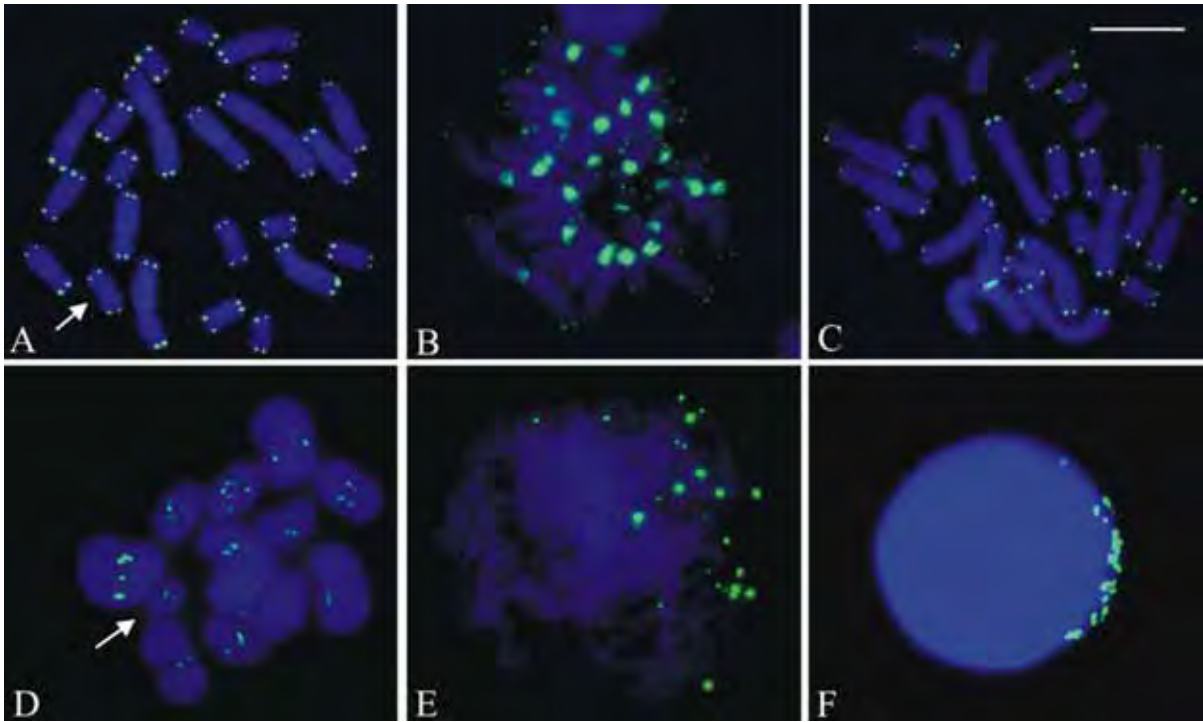
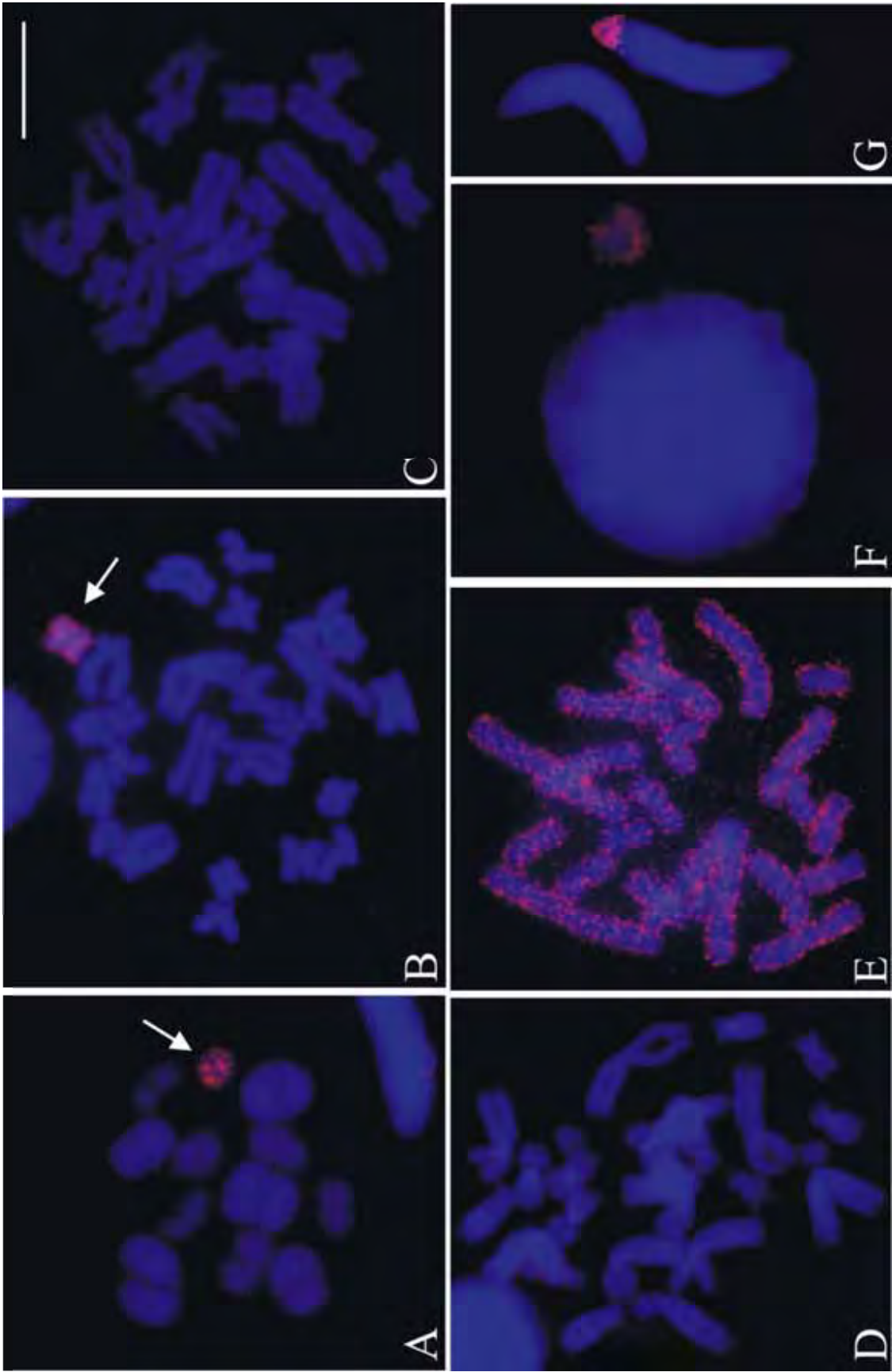


Figure 7



Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hyalinae, Hylidae)*

Simone Lilian Gruber^{1§}, Juliana Zina², Hideki Narimatsu¹, Célio Fernando Baptista Haddad³, Sanae Kasahara¹

¹ UNESP, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

² Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Biológicas, Rua José Moreira Sobrinho, s/n, 45206-000, Jequié, BA, Brazil

³ UNESP, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

§corresponding author

Email addresses:

SLG: sisilgg@hotmail.com

JZ: juzina74@gmail.com

HN: hidekibio@hotmail.com

CFBH: haddad1000@gmail.com

SK: kasahara@rc.unesp.br

* Artigo publicado na BMC Genetics: Gruber SL, Zina J, Haddad CFB, Kasahara S: **Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hyalinae, Hylidae).** *BMC Genetics* 2012, **13**:28. doi:10.1186/1471-2156-13-28.

Resumo

As espécies da Tribo Cophomantini apresentam, em geral, cariótipo $2n=24$, mas os dados sobre *Aplastodiscus* mostram variação no número diploide de $2n=24$ a $2n=18$. Cinco espécies foram cariotipadas, uma delas, pela primeira vez, utilizando técnicas de citogenética convencional e molecular, com o objetivo de realizar uma análise comparativa global à luz da filogenia para o entendimento da evolução cromossômica no gênero. *Aplastodiscus perviridis* apresentou $2n=24$, *A. arildae* e *A. eugenioi*, $2n=22$, *A. callipygius*, $2n=20$ e *A. leucopygius*, $2n=18$. Nas células em metáfase I de duas espécies ocorreram apenas bivalentes, enquanto em *A. arildae*, *A. callipygius* e *A. leucopygius* um tetravalente foi também observado, além dos bivalentes. A incorporação de BrdU produziu bandas de replicação, em especial nos cromossomos maiores, e, uma correspondência de bandas relativamente boa foi notada entre as bandas de alguns deles. A impregnação pela prata e FISH com sonda de DNAr identificaram um único par marcador de RON: o 11 em *A. perviridis* e *A. arildae*, o 6 em *A. eugenioi* e o 9 em *A. callipygius* e *A. leucopygius*. O bandamento C mostrou uma distribuição predominantemente centromérica de heterocromatina e, em uma das espécies, composição molecular distinta da heterocromatina centromérica foi revelada por CMA₃. A sonda telomérica hibridou em todas as extremidades dos cromossomos e, adicionalmente, revelou a presença de sequências semelhantes aos telômeros nas regiões centroméricas de três espécies. Com base na hipótese do cariótipo com $2n=24$ ser o ancestral para *Aplastodiscus* e considerando as diferenças e semelhanças cariotípicas aqui observadas, foram sugeridos dois caminhos evolutivos por meio de eventos de fusão. Um deles correspondeu à redução de $2n=24$ para 22 e o outro, à redução de $2n=24$ para 20, e, subsequentemente, para 18. Com

relação a RON, duas condições foram reconhecidas: a plesiomórfica, representada pela RON em cromossomos homeólogos pequenos, e a derivada, representada pela RON em um par de tamanho médio. Apesar da aparente uniformidade nos padrões de bandamento C, a heterogeneidade na composição molecular de algumas regiões repetitivas foi revelada pela coloração com CMA₃ e pelas marcações teloméricas intersticiais. O tetravalente meiótico deve ocorrer devido a translocações recíprocas de segmentos muito pequenos ou por emparelhamento ectópico não-quiasmático entre sequências repetitivas terminais. A análise citogenética comparativa permitiu traçar a evolução cromossômica e contribuiu para esclarecer as relações dentro do gênero *Aplastodiscus*.

Abstract:

Background: The frogs of the Tribe Cophomantini present, in general, $2n=24$ karyotype, but data on *Aplastodiscus* showed variation in diploid number from $2n=24$ to $2n=18$. Five species were karyotyped, one of them for the first time, using conventional and molecular cytogenetic techniques, with the aim to perform a comprehensive comparative analysis towards the understanding of chromosome evolution in light of the phylogeny.

Results: *Aplastodiscus perviridis* showed $2n=24$, *A. arildae* and *A. eugenioi*, $2n=22$, *A. callipygius*, $2n=20$, and *A. leucopygius*, $2n=18$. In the metaphase I cells of two species only bivalents occurred, whereas in *A. arildae*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius* one tetravalent was also observed besides the bivalents. BrdU incorporation produced replication bands especially in the largest chromosomes, and a relatively good banding correspondence was noticed among some of them. Silver impregnation and FISH with an rDNA probe identified a single NOR pair: the 11 in *A. perviridis* and *A. arildae*; the 6 in *A. eugenioi*; and the 9 in *A. callipygius* and *A. leucopygius*. C-banding showed a predominantly centromeric distribution of the heterochromatin, and in one of the species distinct molecular composition was revealed by CMA₃. The telomeric probe hybridised all chromosome ends and additionally disclosed the presence of telomere-like sequences in centromeric regions of three species.

Conclusions: Based on the hypothesis of $2n=24$ ancestral karyotype for *Aplastodiscus*, and considering the karyotype differences and similarities, two evolutionary pathways through fusion events were suggested. One of them corresponded to the reduction of $2n=24$ to 22, and the other, the reduction of $2n=24$ to 20, and subsequently to 18. Regarding the NOR, two conditions were recognised: plesiomorphy, represented by the homeologous small-sized NOR-bearing pairs, and derivation, represented by the NOR in a medium-sized pair. In spite

of the apparent uniformity of C-banding patterns, heterogeneity in the molecular composition of some repetitive regions was revealed by CMA₃ staining and by interstitial telomeric labelling. The meiotic tetravalent might be due to minute reciprocal translocations or to non-chiasmatic ectopic pairing between terminal repetitive sequences. The comparative cytogenetic analysis allowed to outline the chromosome evolution and contributed to enlighten the relationships within the genus *Aplastodiscus*.

Keywords

amphibian, BrdU, FISH, Ag-NOR, C-band, CMA₃, phylogeny

Background

The original description of *Aplastodiscus* Lutz, 1950, in the family Hylidae, was based on the species *A. perviridis*. However, many questions regarding the taxonomy of this genus remained, because the traits used for its characterisation were shared with representatives of the genus *Hyla* [1]. This fact led to the assignment of the name *Hyla perviridis* [2], and this species was included in the *H. albomarginata* group, along with *H. albomarginata*, *H. albosignata*, and *H. albofrenata*, due to, among other characters, the green colour typical of the species [3].

Based on morphological and bioacoustics data, as well as breeding behaviour of *Hyla cochranae* and *H. perviridis* [1], the genus *Aplastodiscus* was re-characterised, but the authors emphasised that further taxonomic studies were still necessary. Later, based on reproductive mode, it was suggested that the *Hyla albosignata* and *H. albofrenata* species complexes should be included in the genus *Aplastodiscus* [4]. Subsequently, comprehensive reviews of the taxonomy and phylogeny of the family Hylidae were performed [5, 6], confirming the previous suggestion [4]. The 15 known species of *Aplastodiscus* are currently distributed into three groups: the *A. albofrenatus* group (*A. albofrenatus*, *A. arildae*, *A. ehrhardti*, *A. eugenioi*, *A. weygoldti*, and *A. musicus*), the *A. albosignatus* group (*A. albosignatus*, *A. callipygius*, *A. cavicola*, *A. flumineus*, *A. ibirapitanga*, *A. leucopygius*, and *A. sibilatus*), and the *A. perviridis* group (*A. cochranae* and *A. perviridis*) [7].

About half of the known species of *Aplastodiscus* have been karyotyped and the former analysis, based only on standard staining, showed $2n=24$ and $2n=22$ in *A. albofrenatus*, and $2n=20$ and $2n=18$ in *A. albosignatus*, collected in distinct Brazilian

localities [8]. The author admitted that the different karyotypes might correspond, in fact, to distinct species.

Recently, four species of *Aplastodiscus* with $2n=22$, i.e., *A. albofrenatus*, *A. arildae*, *A. ehrhardti*, and *A. eugenioi* were karyotyped and some species-specific chromosome markers were found [9]. Analysing specimens of *A. perviridis* and *A. cochranæ* with $2n=24$, *A. albosignatus* with $2n=20$, and *A. leucopygius* with $2n=18$, the same authors suggested that the karyotype differentiation of these species might have resulted from a reduction in the number of the small-sized chromosomes [10]. These data confirmed the karyotype variability in *Aplastodiscus*, an unusual finding in anurans, which are characterized, in general, by conserved chromosome constitution [11, 12].

In the present paper, a comprehensive comparative analysis was carried out for the first time based on five species of *Aplastodiscus* with distinct diploid numbers, one of them (*A. callipygius*) never karyotyped before. Besides Ag-NOR impregnation, C-banding, and FISH with probes of rDNA and of telomeric repeats, which had been previously used for some species [9, 10], the chromosomes of our sampled species were also analysed with fluorochrome staining and replication-banding after BrdU incorporation. The aim was to search for additional markers, towards a better understanding of chromosome evolution in light of the phylogeny [5, 6], contributing to make clear the relationships within the genus *Aplastodiscus*.

Methods

Analysed species

Cytogenetic analyses were performed on 28 individuals representing five species of *Aplastodiscus* (Table 1), collected in the states of São Paulo (SP) and Minas Gerais (MG). The animals were identified and deposited in the amphibian collection Célio Fernando Baptista Haddad (CFBH) housed in the Department of Zoology, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Chromosome preparation and cytogenetic technique

Direct cytological preparations were obtained from bone marrow, liver, and testes [13] and from intestinal epithelium [14]. In vivo treatment with 5-bromodeoxyuridine (BrdU) was carried out for some specimens [15]. The slides were standard stained with Giemsa, and submitted to Ag-NOR technique [16], C-banding [17], fluorochrome staining with AT-specific DAPI and GC-specific CMA₃ [18], and replication band differentiation using Fluorochrome Plus Giemsa (FPG) or Acridine Orange [19, 20]. The ribosomal probe HM123 [21] was hybridised using the fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique [22] and a telomeric probe, following the manufacturer's manual (Dako Cytomation Denmark A/S Kit). The bi-armed chromosomes were classified as metacentric, submetacentric, or subtelocentric by visual inspection, following the nomenclature of Green and Sessions [23, 24].

Results

Karyotype constitution and meiosis

The specimens of *A. perviridis* showed $2n=24$, $FN=48$ (Fig. 1A), and a karyotype formed by five large pairs with slight variation in size from pairs 2 to 5, one medium pair 6, and six small pairs 7 to 12, with subtle variation in size. Pair 1 was metacentric, pairs 2, 3, 4, and 5 were submetacentric, pair 6 was subtelocentric, and the remaining pairs were classified as metacentric or submetacentric. *Aplastodiscus arildae* and *A. eugenioi*, with $2n=22$, $FN=44$ (Fig. 1B, 1C), had very similar karyotype constitution compared with *A. perviridis*, except that the small-sized group included five pairs 7 to 11 and that pair 2 was clearly metacentric. *Aplastodiscus callipygius* and *A. leucopygius*, with $2n=20$, $FN=40$, and $2n=18$, $FN=36$, respectively (Fig. 1D, 1E), exhibited large-sized pairs 1 to 7, with slight variation from 2 to 7, one medium pair 8, and two small-sized pairs 9 and 10 in *A. callipygius*, and only one small-sized pair 9 in *A. leucopygius*. Pair 1 was metacentric, pairs 2 to 7 were submetacentric, pair 8 was subtelocentric, and the remaining pairs were metacentric or submetacentric in both species.

Secondary constriction was noticed in one or both homologues of chromosome pair 11 in *A. perviridis* and *A. arildae*, as well as in one or both homologues of chromosome pair 9 in *A. callipygius* and *A. leucopygius*. No sex-related chromosome heteromorphism was observed in male (XY) or female (ZW) of *A. eugenioi* and *A. leucopygius*; neither in males (XY) of the remaining species.

In metaphase I cells of *A. perviridis* (Fig. 2A) and *A. eugenioi*, 12 and 11 bivalents, respectively, were observed, while during metaphase II, 12 chromosomes were observed in the former species; for *A. eugenioi* this meiotic stage was not available. In *A. arildae* and *A. callipygius*, diplotene and metaphase I cells invariably showed one tetravalent, plus 9 and 8

bivalents, respectively (Fig. 2B, 2C). *Aplastodiscus callipygius* exhibited 10 chromosomes in metaphase II cells, but this meiotic stage was not available for *A. arildae*. In metaphase I cells of *A. leucopygius* two of the nine bivalents appeared to be connected (Fig. 2D), and during the metaphase II, 9 chromosomes were observed.

Differential staining and FISH

The technique of nucleolar organiser region by silver impregnation was performed in almost all individuals of the sampled species, excepting in two individuals of *A. callipygius*, showing a single pair of Ag-NOR: at the terminal region of the long arms of chromosome 11 in *A. perviridis* and *A. arildae*, at the terminal region of the long arms of chromosome 6 and 9 in *A. eugenioi* and *A. callipygius*, respectively, and at the terminal region of the short arms of chromosome 9 in *A. leucopygius* (Fig. 1). One single Ag-NOR, as shown in Fig. 1C for *A. eugenioi*, was observed eventually in metaphases of some of the individuals in all analysed species. The sites of Ag-impregnation were coincident with the secondary constrictions in most cases. The FISH technique carried out in one single individual of each species confirmed that ribosomal sequences were in the sites previously identified by silver impregnation, always in the two homologues of the corresponding NOR-bearing pair (Fig. 1).

The heterochromatin in all species had a predominantly centromeric distribution, with additional labelling at the NOR site (Fig. 3), but in some metaphases this C-band was very slight or not well visualised as in the Fig. 3C for *A. eugenioi*. Fluorochrome staining was carried out in four species, with exception of *A. eugenioi*. In *A. perviridis*, bright fluorescence was observed with CMA₃ in the NOR and in the centromere of all chromosomes, but less brilliant in the small-sized chromosomes (Fig. 4A). Fluorescence at the NOR site was also observed in *A. arildae* (Fig. 4B), *A. callipygius*, and *A. leucopygius* (data not shown). When stained with DAPI, no particular brilliant region was observed in the chromosomes of any of the four species.

Telomeric probe hybridised all chromosome ends in *A. perviridis* and *A. callipygius* (Fig. 5A, 5C), whereas in *A. leucopygius* additional labelling of interstitial telomeric sequence (ITS) was observed at the centromere region of chromosome 3 (Fig. 5D). In *A. arildae* (Fig. 5B) and *A. eugenioi*, hybridisation occurred in the telomeres and centromeres of all chromosomes, although the fluorescent labelling was subtle in the latter species.

Incorporation by BrdU carried out in *A. perviridis*, *A. arildae*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius* produced replication bands especially in the largest chromosomes, whereas the smallest chromosomes showed poor differentiation (Fig. 6). In spite of the distinct degrees of

banding differentiation, tentative inter-specific comparisons were performed among the large and medium-sized chromosomes, showing relatively good banding correspondence among some chromosomes (e.g., the 1 and the 5 of the four species, the 2 and the 3 of *A. perviridis*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius*, the 6 of *A. perviridis* and the 8 of *A. leucopygius*), and roughly the same banding feature for some others (the 4 of the four species).

Discussion and Conclusions

The present cytogenetic analysis confirmed the variability of $2n=24$, $2n=22$, $2n=20$, and $2n=18$ within the genus *Aplastodiscus*, contrary to that is commonly observed in the subfamily Hyalinae, in general with invariable $2n=24$ karyotypes [25]. Distinct diploid numbers in *Aplastodiscus* were originally reported [8] and, more recently, the sample of karyotyped species was enlarged [9, 10]. Taking into account our report on *A. callipygius*, analysed here for the first time, a total of nine representatives of the genus now have described karyotypes: *A. cochranae* and *A. perviridis* (*A. perviridis* group) with $2n=24$; *A. albofrenatus*, *A. arildae*, *A. ehrhardti*, and *A. eugenioi* (*A. albofrenatus* group) with $2n=22$; *A. albosignatus* and *A. callipygius* with $2n=20$; and *A. leucopygius* with $2n=18$ (*A. albosignatus* group).

It is important to emphasise that several individuals of these species have been collected in more than one locality and no karyotype intraspecific variation in the chromosome number has been found except, at the first sight, in the sample of *A. albofrenatus* ($2n=24$ in Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, and $2n=22$ in Boraceia, SP) and *A. albosignatus* ($2n=20$ in Boraceia, SP, and $2n=18$ in Teresópolis, RJ) [8], although this variation was probably consequence of misidentification, according to the author. Later, Carvalho et al. [9, 10], based on the geographical distribution of *Aplastodiscus* and on the cytogenetic data of some individuals collected in the same or near the localities screened by Bogart [8], concluded that the formerly karyotyped specimens were actually misidentification, and suggested that the animals with $2n=22$, $2n=20$, and $2n=18$ corresponded to *A. arildae*, *A. albosignatus*, and *A. leucopygius*, respectively. Additionally, considering that the range of *A. perviridis* includes the state of Rio de Janeiro [7] and that the diploid number for this species

is $2n=24$ [10, present work], the *A. albofrenatus* from Tijuca Forest, RJ [8], could be *A. perviridis* or some other species of *Aplastodiscus*.

Observing the karyotypes analysed so far with standard Giemsa staining, it was noticed that, although the ordering or the nomenclature adopted for each chromosome pair could differ among the authors, the chromosome constitution was equivalent within each group of species. Even presenting distinct diploid numbers, some shared characteristics could be recognized: the first five chromosome pairs in *A. perviridis*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius* were equivalent in morphology and relative size; similarity also exists for the first five pairs of *A. arildae* and *A. eugenioi*, both exhibiting $2n=22$ karyotypes, but their pair 2 is clearly metacentric and larger than the 2 observed in the three former species; all six species exhibited a subtelocentric medium-sized marker but in distinct positions in the karyograms, that is, in the majority of the species the marker was the pair 6, whereas in *A. callipygius* and *A. leucopygius* it corresponded to pair 8. On the other hand, some conspicuous karyotype differences could be pointed out: a progressive reduction in the number of the small pairs, totalling six in *A. perviridis*, five in *A. arildae* and *A. eugenioi*, two in *A. callipygius*, and one in *A. leucopygius*; the presence in *A. callipygius* and *A. leucopygius* of two large-sized chromosome pairs 6 and 7, not observed in any other karyotype.

Taking into account that $2n=24$ was considered a synapomorphy for Hyalinae [5], most probably the ancestor of *Aplastodiscus* had 24 chromosomes (Fig. 7A), and the karyotype constitution would be equivalent to that observed in the related genera *Bokermannohyla* and *Hypsiboas*, as well as to that of the $2n=24$ *A. cochranae* and *A. perviridis*. Therefore, the chromosome evolution within the genus *Aplastodiscus* occurred primarily by reducing the diploid number from an ancestor with $2n=24$ due to chromosome fusions. However, replication banding data obtained for the first time in species of *Aplastodiscus* could not be used for identifying the probable structural rearrangements, although correspondence of banding patterns had been confirmed among some chromosomes.

Other analysis provided additional data on the karyotype variability within the genus *Aplastodiscus*. Both Ag-impregnation and FISH with an rDNA probe confirmed one pair of NOR-bearing chromosomes for all species. The eventual heteromorphism of Ag-NOR, that is, presence and lack of labelling in metaphases of some of the individuals in all analysed species, was interpreted as result rather from a differential activity than from the deletion in the amount of rDNA repeats, since two FISH signals, equivalent in size in both homologues, were observed in all cases. So, the transcriptional activity of rDNA might be inactivated or to be too low to be detected by silver impregnation in some chromosomes.

In *A. perviridis*, *A. arildae*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius*, the NOR was located in a homeologous small-sized chromosome, although corresponding to the 11 in the two former species and to 9 in the two latter, due to the reduction in the diploid number. This condition of NOR in one of the smallest chromosome pairs was also observed in other species of *Aplastodiscus* [9, 10], as well as in the hylids of genera *Bokermannohyla*, *Hyla*, *Hypsiboas*, and those belonging to *Scinax* of *rubber* clade [25-32], and this can be considered a plesiomorphy for the family. These marker chromosome pairs are most probably homeologous, although with non-coincident position in the case of the karyograms of species with the same chromosome number.

In *A. eugenioi* of the present sample and from the literature [9], the NOR had a derived location, in a medium-pair 6, or pair 7 in the case of *A. ehrhardti* and *A. albofrenatus*, but the latter species had an additional NOR site in chromosome 1 [9]. In the three species the medium-sized pairs bearing NOR, referred by us as the 6, were probably the same, and this condition may constitute a synapomorphy. Gross structural rearrangement seemed not to be the mechanism underlying the change of NOR from a small-sized to a medium-sized chromosome, because the chromosome 6 was always recognized as a subtelocentric marker in all species, independently if bearing or not NOR. Minute structural rearrangements, transposition by means of mobile elements or other mechanisms were not discarded, but they were not demonstrated through the used banding techniques. These mechanisms would also explain the change of NOR from the long to the short arms of chromosome 9 in *A. leucopygius*.

All the sampled species of *Aplastodiscus* had similar heterochromatin distribution, with C-bands in the centromeres and at the NOR sites. Our data on *A. perviridis*, *A. arildae*, and *A. eugenioi* differed from the C-banding pattern of the corresponding species previously analysed [9, 10], that demonstrated additional secondary C-positive regions in some chromosome pairs. This might be indicative of population difference or even be result of technical procedures. In spite of the apparent uniformity in the C-banding, an unequivocal molecular heterogeneity of the heterochromatin was revealed by CMA₃ staining and FISH with a telomeric probe. In fact, the centromeric heterochromatin of the chromosomes of *A. perviridis* was GC-rich repetitive region, as shown by its bright fluorescence after CMA₃ staining. On the other hand, the hybridisation of the telomeric probe outside of the ends of all chromosomes in *A. arildae* and *A. eugenioi*, and chromosome 3 in *A. leucopygius*, indicated the presence of repeats similar to (TTAGGG)_n in the centromeric region. Another possible type of centromere repetitive region corresponded to that of the chromosomes of *A.*

callipygius and *A. leucopygius*, since neither the base-specific fluorochromes nor the telomeric probe yielded a fluorescent labelling.

Occasionally, interstitial hybridisation of the telomeric probe may represent true vestiges of telomeres, corroborating structural rearrangements occurred during chromosome evolution, as described in rodents [33, 34]. Nevertheless, this possibility was excluded in the *Aplastodiscus* species [9, present work], and in other frogs presenting ITS [35, 36]. Regardless, the presence of repetitive DNA bearing telomere-like sequences outside the telomeres might represent an additional cytological marker for species or even species groups.

The meiotic analysis in *A. arildae*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius* confirmed the occurrence of multivalent chromosome pairing, as described in *A. albofrenatus* and *A. arildae* [9]. While in our sample of *A. arildae* and *A. callipygius* a clear tetravalent pairing was seen, in *A. leucopygius* the tetravalent figure was not characteristic, because the involved chromosomes formed two recognizable bivalents. In all these three species, the chromosomes of the largest pair were involved in the tetravalent.

In vertebrates, including frogs [37-40], rings or chains of meiotic multivalents have been reported. The most illustrative case among animals was described in *Ornithorhynchus anatinus* [41], in which the multivalent formation was attributed to sequential reciprocal translocations. The same occurred in one specimen of the frogs *Haddadus binotatus* [39] and *Leptodactylus pentadactylus* [40], which presented meiotic chain and several odd heteromorphic chromosomes in their karyotypes.

In our study there was no evidence of reciprocal translocation to explain the tetravalent formation, unless it involved minute segments, not detected by the used banding techniques. Another explanation would be the non-chiasmatic ectopic pairing between terminal repetitive sequences of non-homologous chromosomes, proposed by Schmid et al. [12] as a reasonable alternative for similar cases described in the literature [9, 37, 38]. Our data gave no support to any of these hypothesis.

Our cytogenetic analysis on *Aplastodiscus* and the comprehensive comparative analysis allowed us to consider the following possible homeologies: chromosomes 1, 4, and 5 of *A. perviridis*, *A. arildae*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius*; the chromosome 2 of *A. perviridis*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius* with the chromosome 3 of *A. arildae* and *A. eugenioi*; the chromosomes 3 of *A. perviridis*, *A. callipygius*, and *A. leucopygius*; the chromosomes 6 and 11 of *A. perviridis*, *A. arildae*, and *A. eugenioi* with the chromosomes 8 and 9, respectively, of *A. callipygius* and *A. leucopygius*; the chromosomes 7, 8, 9, and 10 of *A. perviridis*, *A. arildae*, and *A. eugenioi*; and the chromosome 12 of *A. perviridis* with the

chromosome 10 of *A. callipygius*. The corresponding chromosome 2 of *A. arildae* and *A. eugenioi*, and the chromosomes 6 and 7 of *A. callipygius* and *A. leucopygius* were interpreted as resulted of rearrangement. Based on these presumed data, the chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* from an ancestor with $2n=24$ was outlined. Nevertheless, two evolutionary pathways were proposed: one involving two fusions events, in which participate the small elements 7, 8, 9, and 10, giving rise to two new large-sized pairs 6 and 7, as in the karyotype with $2n=20$ of *A. callipygius* and with $2n=18$ of *A. leucopygius*; and the other, fusion involving the small chromosome 12 and the large chromosome 3, giving rise to the metacentric pair 2, as in the karyotypes with $2n=22$ of *A. arildae* and *A. eugenioi*. This hypothesis is supported by our present cytogenetic data, but undoubtedly, other resolute approaches (e.g., chromosome painting, gene linkage, among others) are still necessary in order to confirm the chromosome evolution within the genus *Aplastodiscus*.

Another achievement of the present study was the confirmation, by means of chromosome analysis, of the relationships among species or species groups of *Aplastodiscus*, as shown in the adapted phylogenetic tree based in Wiens et al. [6], and shown in Fig. 7B. Including the known diploid numbers of all karyotyped species, the two pathways in the chromosome evolution were well visualised, and the cytogenetic data gave support to the molecular phylogeny and distribution of the species in the known groupings. Certainly, further species sampling, especially of those that have never been karyotyped, will be of great interest to confirm or not the relationships within the genus *Aplastodiscus*.

List of Abbreviations

2n: diploid number; Ag-NOR: nucleolar organiser region marked by silver impregnation; BrdU: 5-bromodeoxyuridine; CMA₃: chromomycin A₃; DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenylindole; FISH: fluorescent in situ hybridization; FPG: Fluorochrome Plus Giemsa; FN: fundamental number; ITS: interstitial telomeric sequence; NOR: nucleolar organiser region; rDNA: ribosomal DNA.

Competing Interests

Non-financial competing interests.

Authors Contributions

SLG performed the cytogenetic studies and drafted the manuscript. JZ collected some animals and helped in the review of the manuscript. HN collected some animals and helped with identification. CFBH provided support on zoological information, carried out the species identification, and revised the manuscript. SK supervised the cytogenetic studies, participated in the draft, and in the revision of the final text. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. They also thank to Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) for providing the collection license to JZ, HN, and CFBH.

References

- [1] Garcia PCA, Caramaschi U, Kwet A: **O status taxonômico de *Hyla cochranae* Mertens e a recharacterização de *Aplastodiscus* A. Lutz (Anura, Hylidae).** *Revista Brasileira de Zoologia* 2001, **18**:1197-1218.
- [2] Caramaschi U: ***Aplastodiscus* A. Lutz, 1950, um sinônimo júnior de *Hyla* Laurenti, 1768 (Amphibia, Anura, Hylidae) [abstract].** *Congresso Brasileiro de Zoologia* 1983, **10**: 307.
- [3] Cruz CAG, Peixoto AL: **Espécies verdes de *Hyla*: o complexo “albofrenata” (Amphibia, Anura, Hylidae).** *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* 1985, **8**:59-70.
- [4] Haddad CFB, Faivovich J, Garcia PCA: **The specialized reproductive mode of the treefrog *Aplastodiscus perviridis* (Anura: Hylidae).** *Amphib-reptil* 2005, **26**:87-92.
- [5] Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC: **Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision.** *Bull Am Mus Nat His* 2005, **294**:1-240.
- [6] Wiens JJ, Kuczynski CA, Hua X, Moen D: **An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data.** *Mol Phylogenet Evol* 2010, **55**:871-882.
- [7] Frost DR: **Amphibians of the world: an on-line reference. V5.5.** [<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>]
- [8] Bogart JP: **Evolution of anuran karyotypes.** In: *Evolutionary Biology of Anurans*. Edited by Vial JL. Columbia: University of Missouri Press; 1973:337-349.
- [9] Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM: **NOR dispersion, telomeric sequence detection in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the *Aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae).** *Cytogenet Genome Res* 2009, **126**:359-367.

- [10] Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM: **Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae).** *Genet Mol Res* 2009, **8**:1498-1508.
- [11] Schmid M, Steinlein C, Nanda I, Epplen JT: **Chromosome banding in Amphibia.** In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Edited by Olmo E. Basel: Birkhauser Verlag; 1990:21-45.
- [12] Schmid M, Steinlein C, Bogart JP, Feichtinger W, León P, La Marca E, Diaz LM, Sans A, Chen S-H, Hedges SB: **The chromosomes of Terraranan frogs: insights into vertebrate cytogenetics.** *Cytogenet Genome Res* 2010, **130-131**:1-568.
- [13] Baldissera Jr FA, Oliveira PSL, Kasahara S: **Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome.** *Rev Bras Genet* 1993, **16**:335-345.
- [14] Schmid M: **Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*.** *Chromosoma* 1978, **66**:361-388.
- [15] Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S: **Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining.** *Cytobios* 2000, **103**:25-38.
- [16] Howell WM, Black DA: **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method.** *Experientia* 1980, **36**:1014-1015.
- [17] Sumner AT: **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** *Exp Cell Res* 1972, **75**:304-306.
- [18] Christian A, McNiel E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Wadren C, Bedford JA: **A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes.** *Cytogenet Cell Genet* 1998, **82**:172-179.
- [19] Dutrillaux B, Couturier J: *La Pratique de l'Analyse Chromosomique*. Paris: Masson; 1981.
- [20] Matsuda Y, Chapman VM: **Application of fluorescence in situ hybridization in genome analysis of the mouse.** *Electrophoresis* 1995, **16**:261-272.
- [21] Meunier-Rotival M, Cortadas J, Macaya G: **Isolation and organization of calf ribosomal DNA.** *Nucleic Acids Res* 1979, **6**:2109-2123.
- [22] Pinkel D, Straume T, Gray JW: **Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**:2934-2938.

- [23] Green DM, Sessions SK: **Nomenclature for chromosomes.** In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Edited by Green DM, Sessions SK. San Diego: Academic Press; 1991:431-432.
- [24] Green DM, Sessions SK: **Karyology and Cytogenetics.** In: *Amphibian Biology*. Volume 7. Edited by Heatwole H, Tyler M. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons; 2007:2756-2841.
- [25] Catroli GF, Kasahara S: **Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives.** *Publicatio: Ciências Biológicas e da Saúde* 2009, **15**:67-86.
- [26] Wiley JE: **Chromosome banding patterns of treefrogs (Hylidae) of the Eastern United States.** *Herpetologica* 1982, **38**:507-520.
- [27] King M, Contreras N, Honeycutt RL: **Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S + 28S in-situ hybridization.** *Genetica* 1990, **80**:17-29.
- [28] Anderson K: **Chromosome evolution in Holarctic Hyla treefrogs.** In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Edited by Green DM, Sessions SK. San Diego: Academic Press; 1991:299-331.
- [29] Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL, Haddad CFB: **Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil.** *Cytogenet Genome Res* 2003, **103**:155-162.
- [30] Gruber SL, Haddad CFB, 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* 2007, **130**:281-291.
- [31] Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB, Kasahara S: **Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation.** *Copeia* 2011, **2**:251-263.
- [32] Catroli GF, Faivovich J, Haddad CFB, Kasahara S: **Conserved karyotypes in Cophomantini: cytogenetic analysis of 12 species from 3 species groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae).** *J Herpetol* 2011, **45**:120-128.
- [33] Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y: **Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion.** *Chrom Res* 1998, **6**:643-648.
- [34] Ventura K, O'Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y, Ferguson-Smith MA: **Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents.** *Chrom Res* 2009, **17**:1063-1078.

- [35] Meyne J, Baker AJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyziz RK: **Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes.** *Chromosoma* 1990, **99**:3-10.
- [36] Wiley JE, Meyne J, Little ML, Stout JC: **Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs.** *Cytogenet Cell Genet* 1992, **61**:55-57.
- [37] Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ: **Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence in situ hybridization.** *Chrom Res* 1998, **6**:621-628.
- [38] Siqueira Jr. S, Ananias F, Recco-Pimentel SM: **Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*.** *Genet Mol Biol* 2004, **27**:363-372.
- [39] Campos JRC, Ananias F, Haddad CFB, Kasahara S: **Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae).** *Micron* 2006, **39**:151-159.
- [40] Gazoni T, Gruber SL, Silva APZ, Araújo OGS, Strüssmann C, Haddad CFB, Kasahara S: **Comparative cytogenetic analyses of *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), with description of a new karyotype and a case of multiple sequential translocations [abstract].** *Reunião Brasileira de Citogenética* 2011, **2**:22.
- [41] Grützner F, Rens W, Tsend-Ayush E, El-Mogharbell N, O'Brien PCM, Jones RC, Ferguson-Smith MA, Graves JAM: **In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes.** *Nature* 2004, **3021**:1-5.

Table 1. Species, number of individuals, sex, voucher number, and collecting localities in Brazil.

Species	Number	Sex	Voucher number (CFBH)	Collecting localities
<i>Aplastodiscus perviridis</i>	4	males	22394, 22395, 22401, 22402	Camanducaia, MG
<i>Aplastodiscus arildae</i>	1	male	22387	Serra do Japí, Jundiaí, SP
	4	males	28582, 30409, 30410, 30411	Mogi das Cruzes, SP
<i>Aplastodiscus eugenioi</i>	2	male, female	22373, A505	Ubatuba, SP
<i>Aplastodiscus callipygius</i>	7	males	7514, 7515, 7516, 22396, 22397, 22403, 22404	Camanducaia, MG
<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	3	males	22389, A732, A733	Serra do Japí, Jundiaí, SP
	1	female	22388	
	6	males	28583, 28584, 30412, 30413, 30414, 30415	Mogi das Cruzes, SP

CFBH: Célio Fernando Baptista Haddad Collection, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil

Figure Legends

Figure 1. Giemsa-stained karyotypes of *Aplastodiscus*.

A. *A. perviridis*, male, $2n = 24$; B. *A. arildae*, male, $2n = 22$; C. *A. eugenioi*, male, $2n = 22$; D. *A. callipygius*, male, $2n = 20$. E. *A. leucopygius*, male, $2n = 18$. Insets show marker pairs, visualised by Ag-NOR and FISH with the rDNA probe. Bar = 10 μm .

Figure 2. Giemsa-stained meiotic cells of *Aplastodiscus*.

A. metaphase I of *A. perviridis*, with 12 bivalents; B. metaphase I of *A. arildae*, with nine bivalents and one quadrivalent (arrow); C. metaphase I of *A. callipygius*, with eight bivalents and one quadrivalent (arrow and inset); D. metaphase I of *A. leucopygius*, with nine bivalents (arrow and inset, connected bivalents). Bar = 10 μm .

Figure 3. C-banded karyotypes of *Aplastodiscus*.

A. *A. perviridis*; B. *A. arildae*; C. *A. eugenioi*; D. *A. callipygius*; E. *A. leucopygius*. Bar = 10 μm .

Figure 4. CMA₃-stained metaphases of *Aplastodiscus*.

A. *A. perviridis*; B. *A. arildae*. Bright CMA₃ fluorescence at the NOR site (arrow) and in A, also in the centromeric region of the chromosomes. Bar = 10 μm .

Figure 5. FISH using a telomeric probe in metaphases of *Aplastodiscus*.

A. *A. perviridis*; B. *A. arildae*; C. *A. callipygius*; D. *A. leucopygius*. A hybridisation signal is seen in the centromeric region of chromosome 3 of *A. leucopygius* and in the chromosomes of *A. arildae*. Bar = 10 μm .

Figure 6. Replication-banded karyotypes of *Aplastodiscus*, after BrdU incorporation.

A. *A. perviridis*; B. *A. arildae*; C. *A. callipygius*; D. *A. leucopygius*. Bar = 10 μm .

Figure 7. Adapted phylogenies.

A. phylogenetic tree of Tribe Cophomantini (Hylinae, Hylidae) based on Faivovich et al. [5], showing the position of *Aplastodiscus* and related genera *Hypsiboas* and *Bokermannohyla*; B. phylogenetic tree of genus *Aplastodiscus* based on Wiens et al. [6], with indication of the known diploid number of each karyotyped species [9, 10, present work].

Figura 1

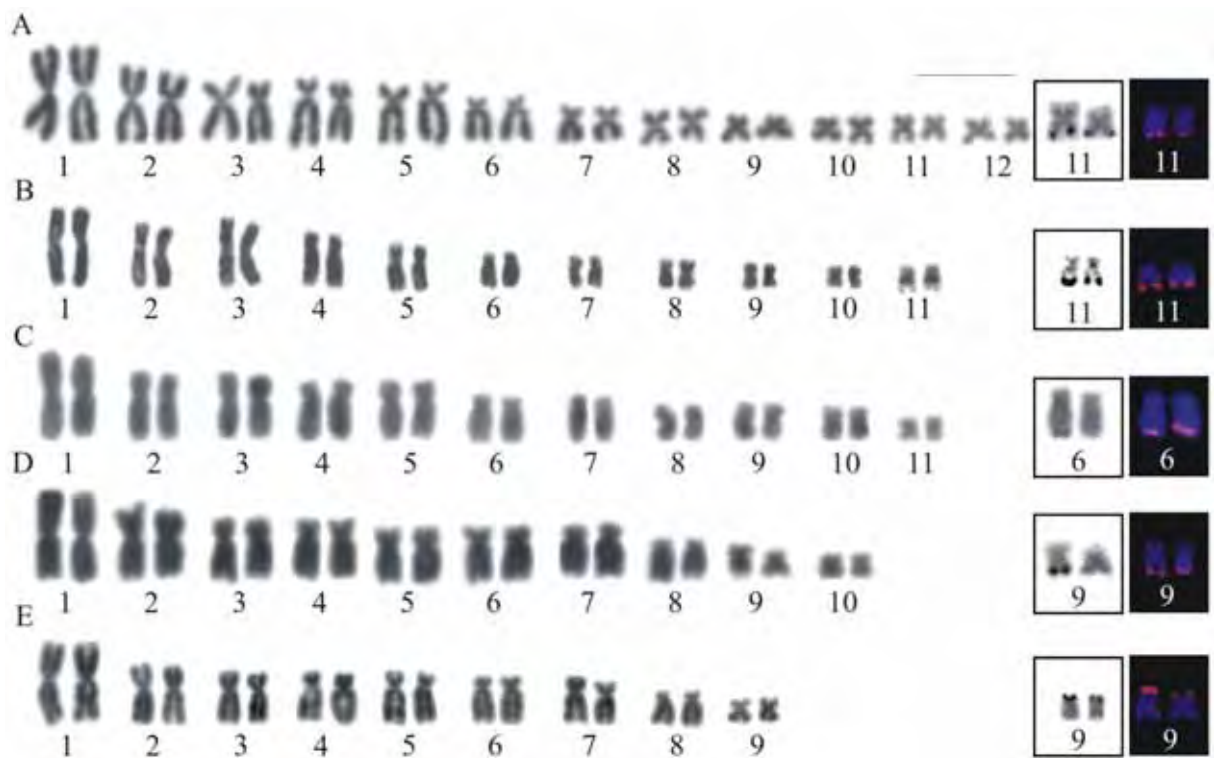


Figure 2

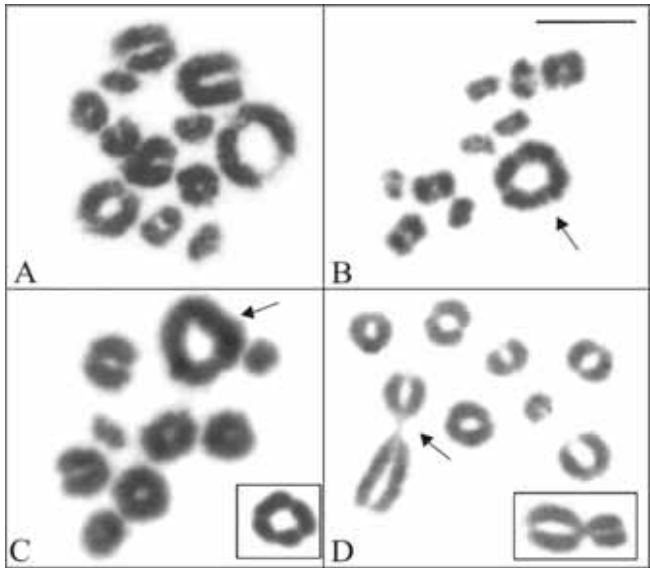


Figure 3

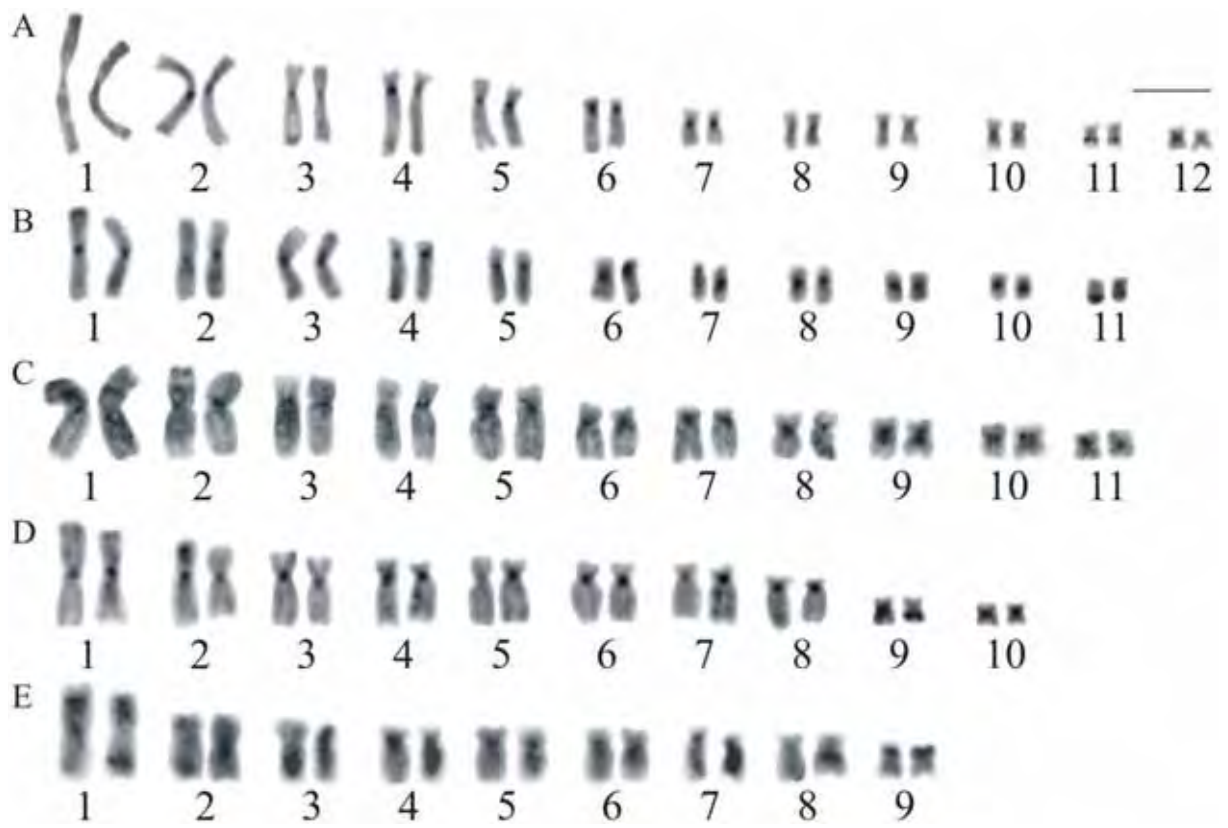


Figure 4

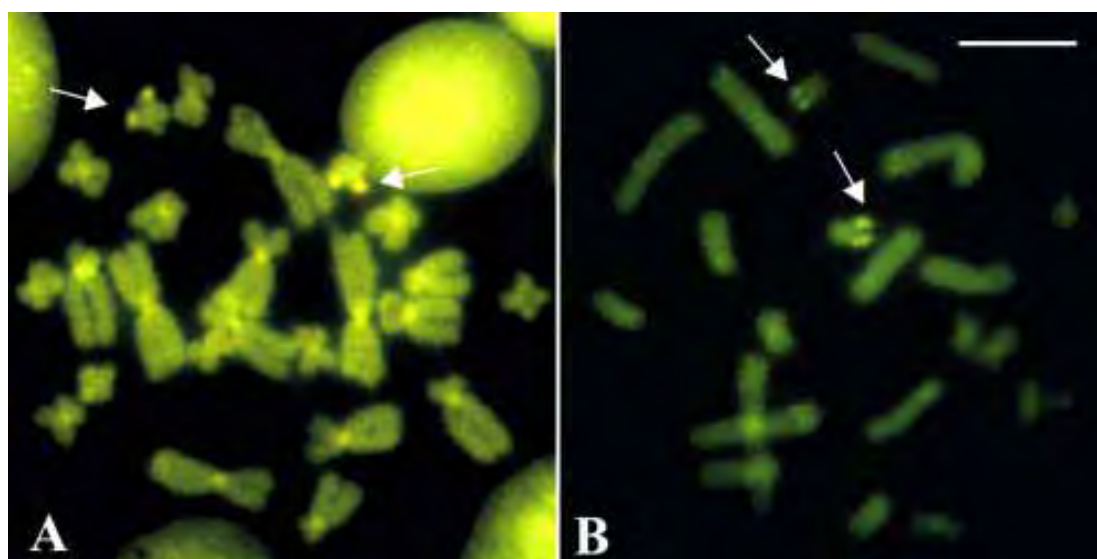


Figure 5

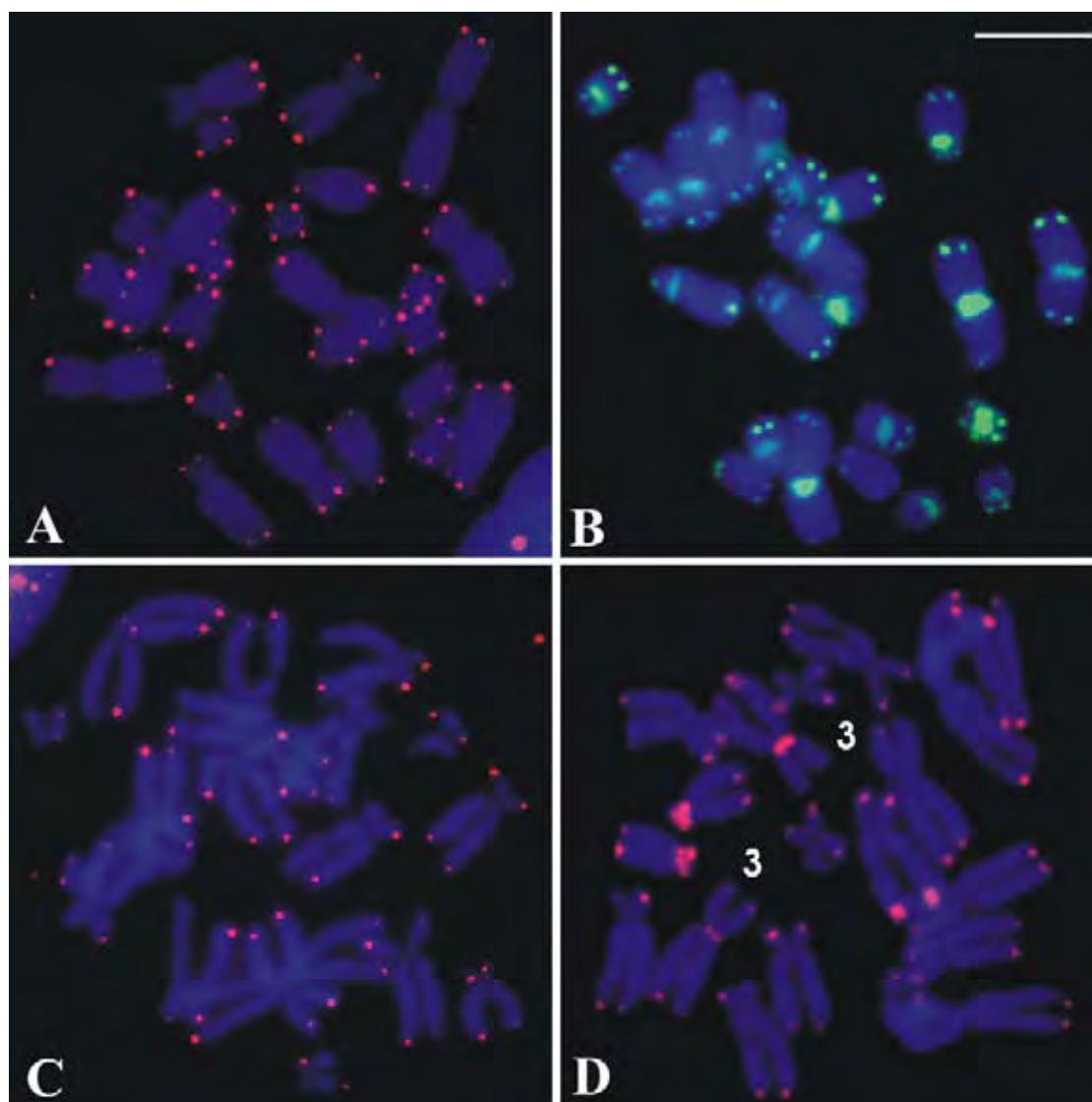


Figure 6

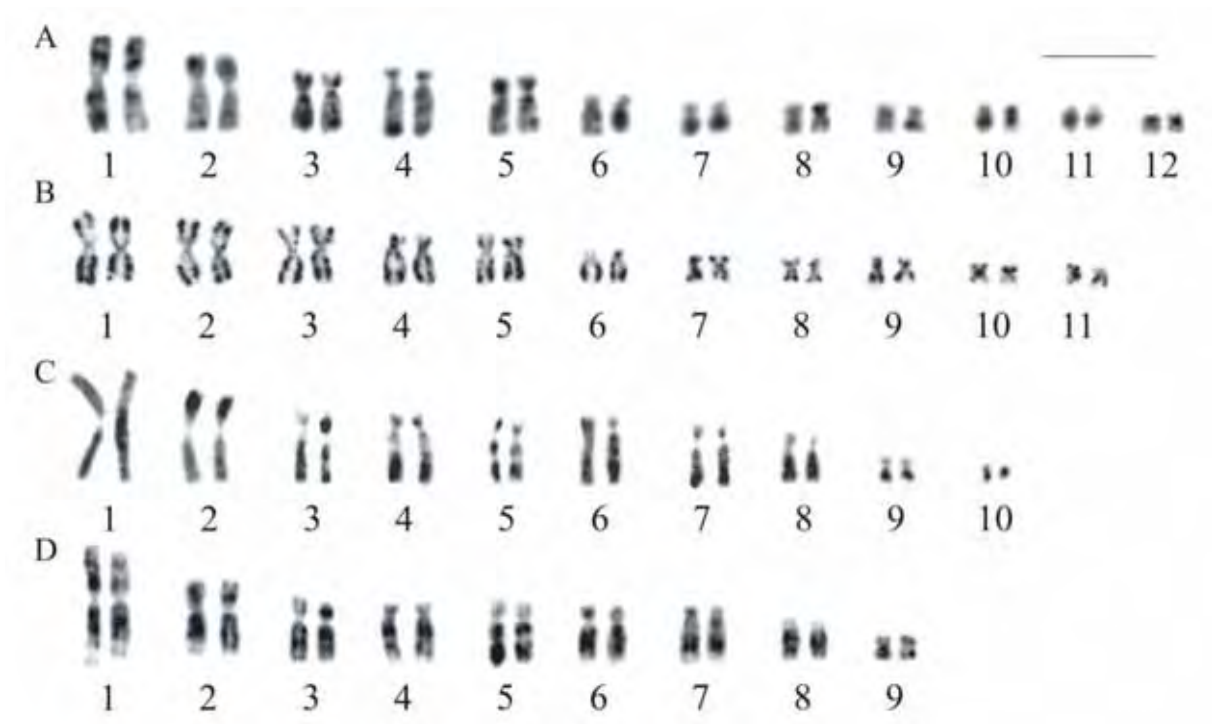
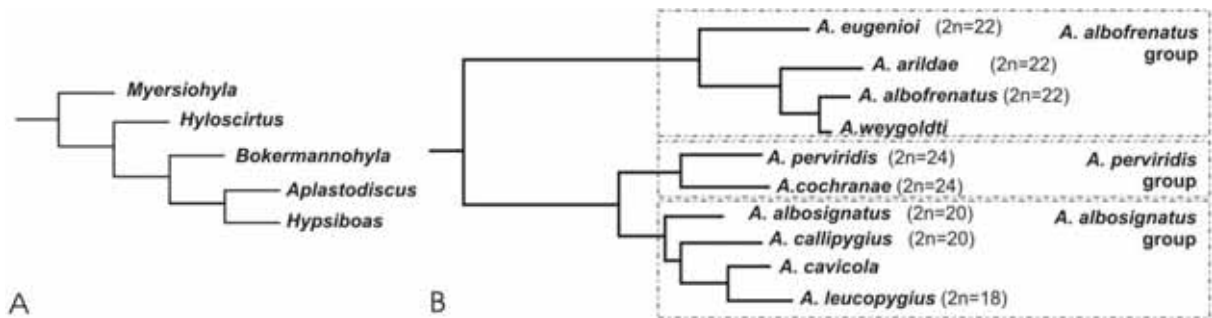


Figure 7



Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques*

Simone Lilian Gruber¹, Célio Fernando Baptista Haddad², Sanae Kasahara^{1§}

¹ UNESP, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil, phone +551935264150, fax +551935264136

² UNESP, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil, phone +551935264242, fax +551935264300

Corresponding author: Simone Lilian Gruber (sisilgg@hotmail.com)

* Artigo publicado na revista Comparative Cytogenetics: Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S: Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. Comp. Cytogenet. 6: 409-423 (2012)

Resumo

Poucas espécies da Tribo Lophiohylini foram cariotipadas até o momento e tais estudos têm sido realizados quase que exclusivamente com coloração convencional. Com base na análise de sete espécies e, com uso de técnicas usuais de bandamento e de citogenética molecular, os cariótipos foram comparados e os dados citogenéticos foram avaliados à luz das filogenias propostas para a Tribo. Cariótipo com $2n=24$ e RON no cromossomo 10, detectada por impregnação pela prata e FISH com sonda de DNAr, era compartilhado por *Aparasphenodon bokermanni* Miranda-Ribeiro, 1920, *Itapotihyla langsdorffii* (Duméril and Bibron, 1841), *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus* (Hensel, 1867) e *T. typhonius* (Linnaeus, 1758). *Phyllodytes edelmoi* Peixoto, Caramaschi et Freire, 2003 e *P. luteolus* (Wied-Neuwied, 1824) tinham o número diploide reduzido de $2n=24$ para $2n=22$, com apenas quatro pares pequenos, e RON nos cromossomos grandes do par 2, mas os cariótipos de ambas espécies eram distintos quanto à morfologia cromossômica dos pares 4 e 6. Com base nos dados da citogenética e das filogenias, presume-se que a evolução cromossômica ocorreu a partir de um ancestral com $2n=24$, no qual um cromossomo pequeno foi translocado para um ou mais cromossomos não identificados. Qualquer que seja a hipótese mais provável, outros rearranjos devem ter ocorrido posteriormente, para explicar as diferenças cariotípicas entre as duas espécies de *Phyllodytes*. A maioria das espécies apresentou uma pequena quantidade de banda C centromérica e estas regiões eram ricas em GC. A técnica de FISH com sonda telomérica identificou as extremidades dos cromossomos e sequências semelhantes a $(TTAGGG)_n$ no DNA repetitivo possivelmente fora dos telômeros em *I. langsdorffii* e *P. edelmoi*. Os dados aqui obtidos representam uma contribuição

importante para a caracterização da variabilidade cariotípicas dentro da tribo Lophiohylini pouco analisada até o presente.

Abstract

Few species of the tribe Lophiohylini have been karyotyped so far, and earlier analyses were performed mainly with standard staining. Based on the analysis of seven species with use of routine banding and molecular cytogenetic techniques, the karyotypes were compared and the cytogenetic data were evaluated in the light of the current phylogenies. Karyotype with $2n = 24$ and NOR in the chromosome 10 detected by Ag-impregnation and FISH with an rDNA probe was shared by *Aparasphenodon bokermanni* Miranda-Ribeiro, 1920, *Itapotihyla langsdorffii* (Duméril and Bibron, 1841), *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus* (Hensel, 1867), and *T. typhonius* (Linnaeus, 1758). *Phyllodytes edelmoi* Peixoto, Caramaschi et Freire, 2003 and *P. luteolus* (Wied-Neuwied, 1824) had reduced the diploid number from $2n = 24$ to $2n = 22$ with one of the small-sized pairs clearly missing, and NOR in the large chromosome 2, but the karyotypes were distinct regarding the morphology of chromosome pairs 4 and 6. Based on the cytogenetic and phylogenetic data, it was presumed that the chromosome evolution occurred from an ancestral with $2n = 24$, in which a small chromosome had been translocated to one or more unidentified chromosomes. Whichever hypothesis is more probable, other rearrangements should have occurred later, to explain the karyotype differences between the two species of *Phyllodytes* Wagler, 1830. The majority of the species presented a small amount of centromeric C-banded heterochromatin and these regions were GC-rich. The FISH technique using a telomeric probe identified the chromosome ends and possibly (TTAGGG)_n-like sequences in the repetitive DNA out of the telomeres in *I. langsdorffii* and *P. edelmoi*. The data herein obtained represent an important

contribution for characterizing the karyotype variability within the tribe Lophiohylini scarcely analysed so far.

Key words

Amphibian cytogenetics, Ag-NOR, C-banding, rDNA probe, telomeric probe, fluorochrome staining

Introduction

The hylids of the subfamily Hyalinae Rafinesque, 1815 are grouped into four large tribes: Cophomantini, Dendropsophini, Hylini, and Lophiohylini (Faivovich et al. 2005, Wiens et al. 2010). In the tribe Lophiohylini 11 genera are assigned and the majority of them included the known casque-headed frogs which are distributed throughout Central and South America. According to Faivovich et al. (2005), despite the phylogenetic review based mainly on molecular gene sequencing, few morphological synapomorphies support the current taxonomy of the tribe Lophiohylini and many unresolved questions still remain. Recently, the separate genus *Phytotriades* Jowers, Downie et Cohen, 2009 was erected for the species *Phyllodytes auratus* (Boulenger, 1917) based on analysis of mitochondrial rDNA sequences.

About 70 species are recognised in the tribe Lophiohylini (Frost 2011), but only a dozen of them from seven genera have been karyotyped (Catroli and Kasahara 2009). Earlier analyses, performed exclusively with standard staining, were conducted during the 1960s and 1970s in the species *Aparasphenodon bruno*i Miranda-Ribeiro, 1920, *Itapotihyla langsdorffii* (Duméril and Bibron, 1841), *Osteopilus septentrionalis* (Duméril and Bibron, 1841), *Trachycephalus mesophaeus* (Hensel, 1867), and *T. typhoni*us (Linnaeus, 1758), all of them with $2n = 24$, and *Osteopilus brunneus* Trueb and Tyler, 1974 with $2n = 34$ (Duellman and Cole 1965, Rabello 1970, Bogart and Bogart 1971, Foresti 1972, Bogart 1973, Cole 1974). Subsequently studies were carried out with use of banding and FISH techniques on some of these species (*A. bruno*i, *I. langsdorffii*, *O. septentrionalis*, and *O. brunneus*) and also in *Argenteohyla siemersi* (Mertens, 1937), *Corythomantis greeningi* Boulenger, 1896, *Osteocephalus taurinus* Steindachner, 1862, *O. dominicensis* (Tschudi, 1838), and *O. marianae* (Dunn, 1926), all of them with $2n = 24$, and in *O. wilderi* (Dunn, 1925) with $2n =$

28 (Schmid 1978, 1980, Anderson 1996, Morand and Hernando 1996, Kasahara et al. 2003, Nunes and Fagundes 2008). The species of the Lophiohylini genera *Nyctimantis* Boulenger, 1882, *Tepuihyla* Ayarzagüena, Señaris and Gorzula, 1993, *Phyllodytes* Wagler, 1830, and *Phytotriades* Jowers, Downie et Cohen, 2008 have never been karyotyped.

The present paper deals with the chromosome analysis of *A. bokermanni* Pombal, 1993, *I. langsdorffii*, *P. edelmoi* Peixoto, Caramaschi et Freire, 2003, *P. luteolus* (Wied-Neuwied, 1824), *T. mesophaeus*, *T. typhoni*, and *Trachycephalus* sp. (probably an undescribed species) with use of routine and molecular cytogenetic techniques. The aim was to analyze species never karyotyped before and to improve the cytogenetic data from some other species, in order to better characterizing the karyotype variability within the tribe Lophiohylini and to carry out a more comprehensive comparative analysis in the light of the current phylogeny.

Material and methods

Cytogenetic analyses were performed with specimens of *Aparasphenodon* Miranda-Ribeiro, 1920, *Itapotihyla* Faivovich, Haddad, Garcia, Frost, Campbell, et Wheeler, 2005, *Phyllodytes*, and *Trachycephalus* Tschudi, 1838 (Table 1) collected in the Brazilian states of Alagoas (AL), Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Mato Grosso (MS), and São Paulo (SP). The voucher specimens were deposited in the amphibian collection Célio Fernando Baptista Haddad (CFBH), housed in the Departamento de Zoologia, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Direct cytological suspensions of bone marrow, liver, and testes were prepared according to the procedures described in Baldissera et al. (1993), and from the intestinal epithelium according to the method of Schmid (1978). The slides were subjected to standard Giemsa staining and to the techniques of Ag-NOR (Howell and Black 1980), C-banding (Sumner 1972), and double staining with the fluorochromes AT-specific DAPI and GC-specific CMA₃ (Christian et al. 1998). Fluorescent in situ hybridisation (FISH) (Pinkel et al. 1986) was carried out using the ribosomal probe HM123 (Meunier-Rotival et al. 1979) and a telomeric probe (TTAGGG)_n according to the DAKO kit instructions (Denmark). The Ag-NOR technique was frequently performed using the same slide after Giemsa staining or FISH technique with the HM123 probe. In both cases, the slides were washed with xylol to remove the immersion oil and then submitted to the technique for obtaining Ag-NOR as usual but decreasing the time of incubation in all steps of the procedure. Chromosomal images were captured with an Olympus digital camera D71 with use of the DP Controller program. The bi-armed chromosomes were classified as metacentric, submetacentric or subtelocentric according to the nomenclature proposed by Green and Sessions (1991, 2007).

Results

Specimens of *Aparasphenodon bokermanni*, *Itapotihyla langsdorffii*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus*, and *T. typhoni* had a diploid number of $2n = 24$ (Fig. 1a-e) and a fundamental number $FN = 48$ and *Phyllodytes edelmoi* and *P. luteolus* had $2n = 22$, $FN = 44$ (Fig. 1f-g). The Table 2 presents the relative length (RL), centromeric index (CI), and the centromeric position (CP) with morphologic classification of the chromosomes of the seven species.

The technique of Ag-NOR was carried out in all species. In the $2n = 24$ karyotypes the Ag-NORs were located on chromosome 10, at the terminal long arm in the case of *A. bokermanni*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus*, and *T. typhoni* (Fig. 1a, c-e), or at the interstitial short arm in *I. langsdorffii* (Fig. 1b). In *P. edelmoi* and *P. luteolus* Ag-NOR was located at the terminal long arm of chromosome 2 (Fig. 1f-g). The Ag-impregnation occurred in the sites of the secondary constriction, although this marker was not always visualised in the standard stained chromosomes. In *A. bokermanni* and *Trachycephalus* sp. and in some individuals of the remaining species, there was variation in the pattern of Ag-NOR labelling. Within the same individual, metaphases exhibited Ag-NORs with conspicuous or slight difference in size or carried two Ag-NORs with equivalent sizes; occasionally a single Ag-NOR per metaphase was also observed in the same cytological preparation. FISH with an rDNA probe was performed in six species, with exception of *P. edelmoi*. Two fluorescent signals were observed in all analysed metaphases (Fig. 1a-e, g). In the species *Trachycephalus* sp. and *T. mesophaeus* the hybridisation signals always presented the same size and in *A. bokermanni*, *I. langsdorffii*, *T. typhoni*, and *P. luteolus* the labelling was heteromorphic in all metaphases.

The C-banding in *A. bokermanni*, *I. langsdorffii*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus*, and *T. typhoni* showed heterochromatin distribution in the pericentromeric regions of all chromosomes (Fig. 2). In *I. langsdorffii* additional C-bands were noticed at terminal (chromosomes 1 and 4) and interstitial (chromosome 5) regions. This technique was carried out in mitotic and meiotic cytological preparations of *P. edelmoi* and *P. luteolus*, but no C-banded region was demonstrated in the chromosomes of these species. The NOR site in all species was brilliant with CMA₃, as well as the chromosome pericentromeric region (Fig. 3a, c-h). The pericentromeric fluorescence was in general faint and not visualised in all chromosomes. In *A. bokermanni* the centromeric signals were particularly prominent in size and brightness (Fig. 3a). No brilliant labelling was observed after DAPI staining in any species, except in *A. bokermanni* which showed slight fluorescence at the terminal short arm of chromosome 10 (Fig. 3b). The chromosome pericentromeric region of this species was DAPI-negative.

The telomeric probe hybridized on the chromosome ends in six of the species, excepting in *P. luteolus* without cytological material available for the FISH technique. Figure 4a-e showed metaphases of *A. bokermanni*, *I. langsdorffii*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus*, and *T. typhoni* with probe labelling at the chromosome ends and, in the case of *I. langsdorffii* (Fig. 4b), also in the pericentromeric region. In *P. edelmoi* no good metaphases were obtained, but the chromosomes showed telomeric labelling. In one metaphase of this species, however, the large-sized chromosome pair 1 and 2 had probe hybridization at the proximal short and long arms (Fig. 4f).

No sex-chromosome pairs were detected in male or female specimens of *I. langsdorffii*, *T. mesophaeus*, *T. typhoni*, and *P. edelmoi*. In the remaining three species only males were karyotyped with no evidence of sex related heteromorphism. Meiotic analysis confirmed the diploid number in all species (Fig. 5a-g). *Aparasphenodon bokermanni*, *I. langsdorffii*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus*, and *T. typhoni* showed 12 bivalents. *Phyllodytes edelmoi* and *P. luteolus* showed 11 bivalents.

The main cytogenetic data obtained in the present study are summarized in the Table 3.

Discussion

The species of the tribe Lophiohylini *A. bokermanni*, *I. langsdoeffii*, *Trachycephalus* sp., *T. mesophaeus*, and *T. typhoni* with $2n = 24$ shared indistinguishable karyotypes even though there was discrepancy in morphological classification shown in Table 2 for some chromosomes, as the chromosome 3 of the species, due to slight differences in the chromosome arm proportion. No evidence of population karyotype difference was observed for *I. langsdoeffii*, *T. mesophaeus*, and *T. typhoni* sampled in distinct locations. Considering previous data for these three species (Rabello 1970, Foresti 1972, Bogart 1973, Kasahara et al. 2003, Nunes and Fagundes 2008), no difference was noticeable in the karyotypes, although the morphological classification of chromosomes and the ordering of the pairs in the distinct karyograms were not the same.

The chromosome constitution with $2n = 24$ herein described is the same as found for the remaining eight species of Lophiohylini analysed so far, corresponding to *Aparasphenodon bruno*i, *Argenteohyla siemersi*, *Corythomantis greeni*ngi, *Osteocephalus taurinus*, *Osteopilus dominicensis*, *O. marianae*, *O. septentrionalis*, and an unidentified species of *Trachycephalus* (see Catroli and Kasahara 2009 for references). This finding suggests a high degree of karyotype conservation within the tribe. Actually, a detailed comparative analysis of the replication banding obtained by BrdU incorporation had shown unequivocal homeology at least among the chromosomes of *A. bruno*i, *C. greeni*ngi, and *I. langsdoeffii* (Kasahara et al. 2003). It is important to emphasise that this conservative pattern of chromosome constitution has been observed in representatives of Hylinae and, according to the molecular phylogeny of Faivovich et al. (2005), a karyotype with $2n = 24$ could be a synapomorphic condition within this subfamily. Another karyotype characteristic shared by

the majority of the Lophiohylini species with $2n = 24$ is the NOR site in a small-sized chromosome (Schmid 1978, 1980, Anderson 1996, Kasahara et al. 2003, Nunes and Fagundes 2008), with the exception of *Argenteohyla siemersi* (Morand and Hernando 1996) with NOR in the chromosome pair 4.

Phyllodytes edelmoi and *P. luteolus*, the first two species of the genus that were analysed so far, had reduced the diploid numbers from $2n = 24$ to $2n = 22$ and the NOR site was in the large-sized chromosome 2. Nevertheless, the karyotypes of these two species were distinct regarding the morphology of pairs 4 and 6, that is, in *P. edelmoi* these pairs were metacentric and in *P. luteolus* they were subtelocentric, as it has been usually observed in Hyalinae species with $2n = 24$. The discrepancy in the morphology of the chromosome pairs 4 and 6 was supported by the chromosome measurements and the mechanism responsible for these differences might be, for example, a pericentric inversion or another type of chromosome rearrangement, but this could not be determined at least with the cytogenetic techniques used here.

Within the sub-family Hyalinae, variation as resulted of fusion events from an ancestral karyotype with 24 chromosomes was described for *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) ($2n = 22$) and for species of the genus *Aplastodiscus* ($2n = 18, 20, 22$) (Gruber et al. 2007, Gruber et al. 2012). Although the chromosomes involved in the rearrangements could not be recognized with certainty in neither case, the derived chromosomes in *H. albopunctatus* and in *Aplastodiscus* species were tentatively identified by their altered morphology regarding the presumed ancestral. The reduction in the diploid number to $2n = 22$ in *Phyllodytes* might also be due to fusion rearrangement of end-to-end or centric type from the ancestral $2n = 24$ karyotype. Taking into account that the two analysed species presented four small pairs instead of five and the NOR was on large-sized pair, the fusion, at first sight, occurred between a small NOR-bearing chromosome and chromosome 2. Nevertheless, the NOR-bearing chromosome 2 of *Phyllodytes* had no noticeable relative size differences regarding the chromosome 2, not carrying NOR, of the $2n = 24$ species. Another possibility is the translocation of one of the smallest chromosomes to chromosome 1, since this element in the *Phyllodytes* species has a larger relative length when compared to the chromosome 1 of $2n = 24$ karyotypes. The translocation of a small pair to more than one unidentified chromosomes, leading to the reduction in the diploid number to $2n = 22$ could not be discarded. Whichever of the hypotheses is more probable, other rearrangements should have occurred later, to explain the differences observed between the karyotypes of the two species of *Phyllodytes*.

Certainly, additional cytogenetic analyses within the genus are necessary to outline the events occurred during the chromosome evolution.

In males and females of *I. langsdorffii*, *P. edelmoi*, *T. mesophaeus*, and *T. typhonius* and in males of *A. bokermanni*, *Trachycephalus* sp., and *P. luteolus* heteromorphic sex chromosomes were not observed. Nevertheless in females of these three latter species sex chromosomes could not be discarded. Anurans, in general, do not present cytological sex chromosome differentiation and both male or female heterogamety has been described in some species (Schmid et al. 2010).

A single NOR pair located in a small-sized chromosome (Schmid 1978, Green and Sessions 2007, Schmid et al. 2010) is a shared characteristic for the majority of the Lophiohylini species and this condition has also been frequently observed in other Hyalinae of the genera *Bokermannohyla* Faivovich, Haddad, Garcia, Frost, Campbell et Wheeler, 2005, *Hyla* Laurenti, 1768, *Hypsiboas* Wagler, 1830, and *Scinax* Wagler, 1830 (clade *S. ruber*) (Catroli et al. 2011, Cardozo et al. 2011). Although the NOR-bearing pair has been referred in the literature to as chromosome pairs 10, 11, or 12, most probably we are dealing with the same pair. In fact, Kasahara et al. (2003) demonstrated close correspondence in the replication banding patterns between the NOR-bearing chromosomes 10 of the Lophiohylini *A. brunoi*, *C. greeningi*, and *I. langsdorffii* and the NOR-bearing chromosomes 12 of the Dendropsophini *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925). As stressed by Cardozo et al. (2011), NOR in a small-sized chromosome is considered a plesiomorphy within the subfamily, wherefore NOR location out of small element, as observed in *Argenteohyla siemersi* and in *Phyllodytes*, is a derived condition.

The NOR marker chromosome in our species of Lophiohylini with $2n = 24$ was considered as the 10 and the rDNA sequences were at the interstitial short arm or at the terminal long arm, but no major differences were observed in the morphology of the chromosomes 10 among distinct species. Therefore, the mechanism that changed the NOR sites apparently was not a gross rearrangement, but minute structural rearrangements or transposition by means of mobile elements could not be discarded. If the movement of the NOR from chromosome 10 to chromosome 2 in *Phyllodytes* species was not a direct consequence of the rearrangement which reduced the diploid number in the genus, one of the two mentioned mechanisms would also be a reasonable explanation for the discrepant NOR site, in *P. edelmoi* and in *P. luteolus*.

The technique of Ag-impregnation showed large variation in the Ag-NOR pattern within the same individual. Nevertheless, the FISH with an rDNA probe revealed that the

NOR labelling in each individual had either equivalent or distinct size in all the analysed cells. Such data allowed us to conclude that most probably the Ag-NOR variation was a result of differential activity of ribosomal gene in *Trachycephalus* sp. and *T. mesophaeus* because the hybridization labelling had the same size in both homologues; on the other hand, different amounts of repetitive rDNA units would be responsible for the observed Ag-NOR variation in *A. bokermanni*, *I. langsdorffii*, and *T. typhoni* because hybridization labelling had distinct sizes in both homologues. The single Ag-NOR seen occasionally in some metaphases could be attributed to the lacking or insufficient amount of the non-histone proteins available for the Ag-impregnation.

The chromosomes of the species herein analysed produced C-banding results only after over treatment of the distinct steps of the technique. However, it was undoubtedly demonstrated that heterochromatin was distributed mainly in the centromeric regions. A similar centromeric C-banding pattern had been described in *A. brunoi*, *C. greeningi*, and *I. langsdorffii* (Kasahara et al. 2003) besides some interstitial and terminal additional C-bands in the latter species. The lack of C-bands in the chromosomes of *P. edelmoi* and *P. luteolus* might be due to the absence of repetitive DNA identifiable by means of C-banding technique. Nevertheless, it will be important to confirm such possibility or if we are dealing with some technical difficulty, since CMA₃ staining at the centromeres in both species, albeit with faint fluorescence, confirmed the presence of repetitive sequences in these regions.

Surprisingly, in spite of the low amount of C-banded heterochromatin, *A. bokermanni* showed conspicuous bright fluorescence at the centromeres, similarly to that observed in *A. brunoi* (Kasahara et al. 2003). This result and the corresponding DAPI-negative fluorescence in both species indicated presence of a particular repetitive DNA characteristic of the genus *Aparasphenodon* with an exceptional GC-content. Besides the centromere, each of these two species had own fluorescent markers in other chromosome regions: *Aparasphenodon brunoi* exhibited a bright CMA₃ site in the long arm of chromosome 5 (Kasahara et al. 2003), whereas *A. bokermanni* had bright CMA₃ site in the long arm of chromosome 10 and bright DAPI site in the short arm of the same chromosome 10. *Itapotihyla langsdorffii* and the species of *Trachycephalus* and *Phyllodytes* showed faint centromeric fluorescence with CMA₃ indicating that the GC-content was not high.

Although the FISH with the telomeric probe is primarily designed for identification of chromosome-ends, this procedure may provide information about the molecular nature of some repetitive sequences. As far as it has been shown, distinct organisms, including frogs (Meyne et al. 1990, Wiley et al. 1992, Nanda et al. 2008, Gruber et al. 2012), disclosed

hybridization out of the telomeres, even in the cases without evidence of chromosome rearrangements. This would mean presence of telomere-like sequences (TTAGGG)_n in sites of repetitive DNA and it seems to explain the labelling out the telomere sites in *I. langsdorffii* and *P. edelmoi*. These data reinforce the importance of the FISH with the telomeric probe used in combination with base-specific fluorochrome staining and C-banding for obtaining information on the content of distinct repetitive regions.

The interstitial hybridization signals of telomeric probe could correspond to vestiges of true telomeres, as reported in rodents (Fagundes et al. 1997, Ventura et al. 2006), but in our sampled species, there was no evidence of telomere remnants resulted probably from chromosome rearrangements. Despite presumed fission and fusion during the chromosome evolution, Anderson (1996) noticed no hybridisation interstitial labelling in the Lophiohylini *Osteopilus septentrionalis* (2n=24) and *O. brunneus* (2n=34).

Based on the data of 22 species, a phylogenetic tree of the Lophiohylini was provided by Faivovich et al. (2005). Later, Jowers et al. (2008) added the molecular information of *Phytotriades auratus* and, more recently, the phylogeny of Lophiohylini was expanded by Wiens et al. (2010) for a total of 35 representatives. All these trees support the monophyly of the tribe, although the relationships of the distinct genera remain unclear. In the phylogeny of Faivovich et al. (2005) *Phyllodytes* appears in an isolated clade at a basal position. In the phylogeny of Wiens et al. (2010) the representatives of Lophiohylini are grouped into two major sister-clades and the species of *Phyllodytes* and *Osteopilus* are included in one of these clades, along with the species with 2n = 24. Regardless of which of the two phylogenetic hypotheses is most accurate, it is clear that 2n = 22 exhibited by the species of *Phyllodytes* is a derived condition.

The present study showed that in spite of the high similarity of the chromosome constitution and of the NOR pattern among the species of Lophiohylini with 2n = 24, the karyotypes could be recognized by the nature of the repetitive sequences, as differentiated through C-banding, base-specific fluorochrome staining, and, in a certain extension, by FISH with telomeric probe. Cytogenetic information on the tribe is still minimal, but the analyses of the available data in light of the phylogeny allowed for visualization of the occurrence of karyotypic variations restricted to the clades of the genera *Phyllodytes* and *Osteopilus*. It would be interesting to enlighten the chromosome evolution with other accurate technical approaches and to extend the karyotyping to other species of Lophiohylini, especially new representatives of *Phyllodytes* and *Phytotriades auratus*.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors thank to Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for providing the collection permits to SLG and CFBH. The authors are grateful to Akio Miyoshi, Carlos Jared, Edson Zefa, Hideki Narimatsu, João Luiz Gasparini, Juliana Zina, Katyuscia de Araujo Vieira, and Olívia Araújo, for help during field work.

References

- Anderson K (1996) A karyological perspective on the monophyly of the hylid genus *Osteopilus*. In Powell R, Henderson RW (Eds) Contributions to the West Indian Herpetology: A Tribute to Albert Schwartz. Society for the Study of Amphibian and Reptiles, New York, 157–168.
- Baldissera Jr FA, Oliveira PSL, Kasahara S (1993) Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Revista Brasileira de Genética* 16: 335–345.
- Bogart JP (1973) Evolution of anuran karyotypes. In Vial JL (ed) Evolutionary Biology of Anurans. Missouri Press, Columbia, 337–349.
- Bogart JP, Bogart JE (1971) Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. *Herpetologica* 27: 229-235.
- Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB, Kasahara S (2011) Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation. *Copeia* 2: 251-263.
- Catroli GF, Kasahara S (2009) Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. *Publicatio UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde* 15: 67-86.
- Catroli GF, Faivovich J, Haddad CFB, Kasahara S (2011) Conserved karyotypes in Cophomantini: cytogenetic analysis of 12 species from 3 species groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology* 45: 120-128.
- Christian A, McNiel E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Wadren C, Bedford JA (1998) A versatile image analysis approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 82: 172-179.
- Cole C (1974) Chromosome evolution in selected treefrogs including casque-headed species (*Pternohyla*, *Triton*, *Hyla* and *Smilisca*). *American Museum Novitates* 2541: 1-10.

Duellman WE, Cole CJ (1965) Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Systematic Zoology* 14: 139-143.

Fagundes V, Vianna-Morgante AM, Yonenaga-Yassuda Y (1997) 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.

Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1–240.

Foresti F (1972) Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura). Master Thesis, Universidade de São Paulo, Brasil. 80pp. [In Portuguese].

Frost DR (2011) Amphibians of the world: an on-line reference. V5.5. Electronic database accessible at (<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>). American Museum of Natural History, New York.

Green DM, Sessions SK (1990) Nomenclature for chromosomes. In Green DM, Sessions SK (Eds) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, Academic Press, San Diego, 431–432.

Green DM, Sessions SK (2007) Karyology and cytogenetics. In Heatwole H, Tyler M (Eds) *Amphibian Biology* v7, Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton, 2756–2841.

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S (2007) Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylineae), 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.

Gruber SL, Zina J, Haddad CFB, Kasahara S (2012) Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylineae, Hylidae). *BMC Genetics* 13: 28. doi:10.1186/1471-2156-13-28.

Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. *Experientia* 36: 1014–1015.

Jowers MJ, Downie JR, Cohen BL (2008) The Golden Tree Frog of Trinidad, *Phyllodytes auratus* (Anura: Hylidae): systematic and conservation status. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 43: 181–188.

Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL, Haddad CFB (2003) Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylineae) from Brazil. *Cytogenetic and Genome Research* 103: 155–162.

Meunier-Rotival M, Cortadas J, Macaya G (1979) Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucleic Acids Research* 6: 2109–2123.

- Meyne J, Baker AJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyziz RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3–10.
- Morand M, Hernando A (1996) Cariotipo y region organizadora del nucleolo en *Argenteohyla siemersi pedersenii* (Anura: Hylidae). *Facena* 12: 141–144.
- Nanda I, Fugate M, Steinlein C, Schmid M (2008) Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenetic and Genome Research* 122: 396–400.
- Nunes RRA, Fagundes V (2008) Cariótipo de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura: Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 23: 21–33.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 2934–2938.
- Rabello MN (1970) Chromosomal studies in Brazilian anurans. *Caryologia* 23: 45–59.
- Schmid M (1978) Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361–388.
- Schmid M (1980) Chromosome banding in Amphibia IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83–103.
- Schmid M, Steinlein C, Bogart JP, Feichtinger W, León P, La Marca E, Diaz LM, Sans A, Chen S-H, Hedges SB (2010) The chromosomes of Terraranan frogs: insights into vertebrate cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research* 130–131: 1–568.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306.
- Ventura K, Silva MJJ, Fagundes V, Yonenaga-Yassuda Y (2006) Nontelomeric 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.
- Wiens JJ, Kuczynski CA, Hua X, Moen D (2010) An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 871–882.
- Wiley JE, Meyne J, Little ML, Storet JC (1992) 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.

Table 1. Species, number of individuals, sex, voucher numbers, and collection locations in Brazil.

species	number	sex	voucher numbers CFBH	collection locations
<i>Aparasphenodon bokermanni</i>	1	male	22575	Cananéia, SP (25°01'19"S; 47°55'41"W)
<i>Itapotihyla langsdorffii</i>	2	males	22369, 22370	Ilhéus, BA (14°47'29"S; 39°02'41"W)
	1	female	30973	Rio Claro, SP (22°25'20"S; 47°34'23"W)
<i>Phyllodytes edelmoi</i>	2	females	22583, 22584	Maceió, AL (09°40'06"S; 35°43'59"W)
	1	male	22585	Maceió, AL (09°40'06"S; 35°43'59"W)
<i>Phyllodytes luteolus</i>	2	males	22462, 22463	Guarapari, ES (20°39'01"S; 40°29'10"W)
<i>Trachycephalus</i> sp.	1	male	20664	Paranaíta, MT (09°40'56"S; 56°28'50"W)
<i>Trachycephalus mesophaeus</i>	3	males	22366, 22367, 22368	Ilhéus, BA (14°47'29"S; 39°02'41"W)
	2	females	22371, 22372	Ilhéus, BA (14°47'29"S; 39°02'41"W)
	1	juvenile	22484	Ubatuba, SP (23°26'19"S; 45°05'25"W)
	1	male	24222	Biritiba Mirim, SP (23°34'17"S; 46°02'15"W)
<i>Trachycephalus typhonius</i>	1	female	22365	Porto Primavera, MS (22°26'01"S 52°58'11"W)
	1	male	10033	Rio Claro, SP (22°25'20"S; 47°34'23"W)

CFBH - Célio Fernando Baptista Haddad Collection, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil

Table 2. Relative length (RL), centromeric index (CI), and nomenclature for centromeric position (CP) on mitotic chromosomes according to Green and Sessions (1991, 2007)

Species	Chromosome number												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>A. bokermanni</i>	RL	15.57	12.93	10.65	9.63	9.48	7.48	5.68	6.78	6.27	6.5	4.12	3.83
	CI	0.479	0.459	0.396	0.263	0.344	0.286	0.321	0.464	0.487	0.284	0.420	0.465
	CP	m	m	m	sm	sm	sm	sm	m	m	sm	m	m
<i>I. langsdorffii</i>	RL	15.06	13.52	11.50	10.41	9.82	7.68	6.59	6.35	5.17	5.00	5.02	3.90
	CI	0.460	0.421	0.355	0.241	0.361	0.225	0.391	0.483	0.472	0.472	0.460	0.467
	CP	m	m	sm	st	sm	st	m	m	m	m	m	m
<i>Trachycephalus</i> sp.	RL	14.57	11.79	11.57	9.95	9.18	7.81	6.75	6.06	4.43	5.15	4.65	4.30
	CI	0.430	0.429	0.383	0.257	0.319	0.261	0.344	0.453	0.456	0.301	0.443	0.461
	CP	m	m	m	sm	sm	sm	sm	m	m	sm	m	m
<i>T. mesophaeus</i>	RL	14.33	13.57	10.66	10.47	9.04	7.98	6.76	6.35	5.94	6.97	4.72	3.83
	CI	0.457	0.435	0.366	0.268	0.370	0.224	0.338	0.481	0.424	0.351	0.353	0.414
	CP	m	m	sm	sm	sm	st	sm	m	m	sm	sm	m
<i>T. typhonius</i>	RL	15.63	12.80	11.05	10.51	10.06	8.16	7.07	6.02	5.02	5.23	4.59	4.10
	CI	0.462	0.397	0.364	0.236	0.314	0.200	0.317	0.424	0.444	0.304	0.461	0.485
	CP	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	sm	m	m
<i>P. edelmoi</i>	RL	18.38	13.74	12.88	9.90	9.74	7.73	6.86	6.77	4.88	4.06	3.74	--
	CI	0.453	0.403	0.335	0.430	0.341	0.414	0.367	0.404	0.440	0.444	0.472	--
	CP	m	m	sm	m	sm	m	sm	m	m	m	m	--
<i>P. luteolus</i>	RL	16.62	12.56	11.11	10.65	9.57	8.72	8.38	7.05	5.38	4.80	4.56	--
	CI	0.450	0.422	0.370	0.249	0.352	0.237	0.336	0.354	0.472	0.430	0.443	--
	CP	m	m	sm	st	sm	st	sm	sm	m	m	m	--

m = metacentric; sm = submetacentric; st = subtelocentric.

Table 3. Data on chromosome number, chromosome formula, NOR and telomeric sequence localization, C-band distribution and molecular content of repetitive DNA sequences of studied species.

species	2n	formula	NOR	Tel	C bands	DAPI	CMA ₃
<i>Aparasphenodon bokermanni</i>	24	7m+5sm	11qt	T	C+NOR	10pt	C*+NOR
<i>Itapotihyla langsdorffii</i>	24	8m+2sm+2st	11pi	T+C	C+NOR	--	C+NOR
<i>Trachycephalus</i> sp.	24	7m+5sm	11qt	T	C+NOR	--	C+NOR
<i>Trachycephalus mesophaeus</i>	24	5m+6sm+1st	11qt	T	C+NOR	--	C+NOR
<i>Trachycephalus typhonius</i>	24	6m+4sm+2st	11qt	T	C+NOR	--	C+NOR
<i>Phyllodytes edelmoi</i>	22	8m+3sm	2qt	T+C	C+NOR	--	C+NOR
<i>Phyllodytes luteolus</i>	22	5m+4sm+2st	2qt	---	C+NOR	--	C+NOR

m = metacentric; sm = submetacentric; st = subtelocentric; p = short chromosome arm; q = long chromosome arm; i = interstitial region; t = terminal region; T = telomere; C = centromeric/ pericentromeric region; * intense mark;

Figure legends

Figure 1 a-g. Giemsa-stained karyotypes. **a** *Aparasphenodon bokermanni*, male, $2n = 24$, **b** *Itapotihyla langsdorffii*, male, $2n = 24$, **c** *Trachycephalus* sp., male, $2n = 24$, **d** *T. mesophaeus*, male, $2n = 24$, **e** *T. typhoni*, male, $2n = 24$; **f** *Phyllodytes edelmoi*, male, $2n = 22$, **g** *P. luteolus*, male, $2n = 22$. The insets show the chromosome pairs with Ag-NOR and FISH using the rDNA probe. Bar = 10 μm .

Figure 2 a-e. C-banded karyotypes. **a** *Aparasphenodon bokermanni*, **b** *Itapotihyla langsdorffii*, **c** *Trachycephalus* sp., **d** *T. mesophaeus*, **e** *T. typhoni*. Bar = 10 μm .

Figure 3 a-h. Fluorochrome-stained metaphases. **a, c-h** CMA₃, **b** DAPI, **a-b** *Aparasphenodon bokermanni*, **c** *I. langsdorffii*, **d** *Trachycephalus* sp., **e** *T. mesophaeus*, **f** *T. typhoni*, **g** *Phyllodytes edelmoi*, **h** *P. luteolus*. Bright DAPI fluorescence at the terminal short arms of chromosomes 10 (arrows) and the negative centromeric region are shown in **a**. CMA₃ fluorescent labelling of the NOR site (arrows) and in the centromeric region of chromosomes in **a, c-h**. Bar = 10 μm .

Figure 4 a-f. FISH using a telomeric probe. **a** *Aparasphenodon bokermanni*, **b** *Itapotihyla langsdorffii*, **c** *Trachycephalus* sp., **d**, *T. mesophaeus*, **e** *T. typhoni*, **f** *P. edelmoi*. In **b** hybridisation labelling is visible in the centromeric region of the chromosomes and in **f**, at the proximal short and long arms of chromosomes 1 and 2 observed with telomeric probe hybridisation (left) and with DAPI staining (right). Bar = 10 μm .

Figure 5 a-g. Giemsa-stained diakinesis and metaphases I cells. **a** *Aparasphenodon bokermanni*, $2n = 24$, **b** *Itapotihyla langsdorffii*, $2n = 24$, **c** *Trachycephalus* sp., $2n = 24$, **d** *T. mesophaeus*, $2n = 24$, **e** *T. typhoni*, $2n = 24$, **f** *Phyllodytes edelmoi*, $2n = 22$, **g** *P. luteolus*, $2n = 22$. Bar = 10 μm .

Figure 1



Figure 2



Figure 3

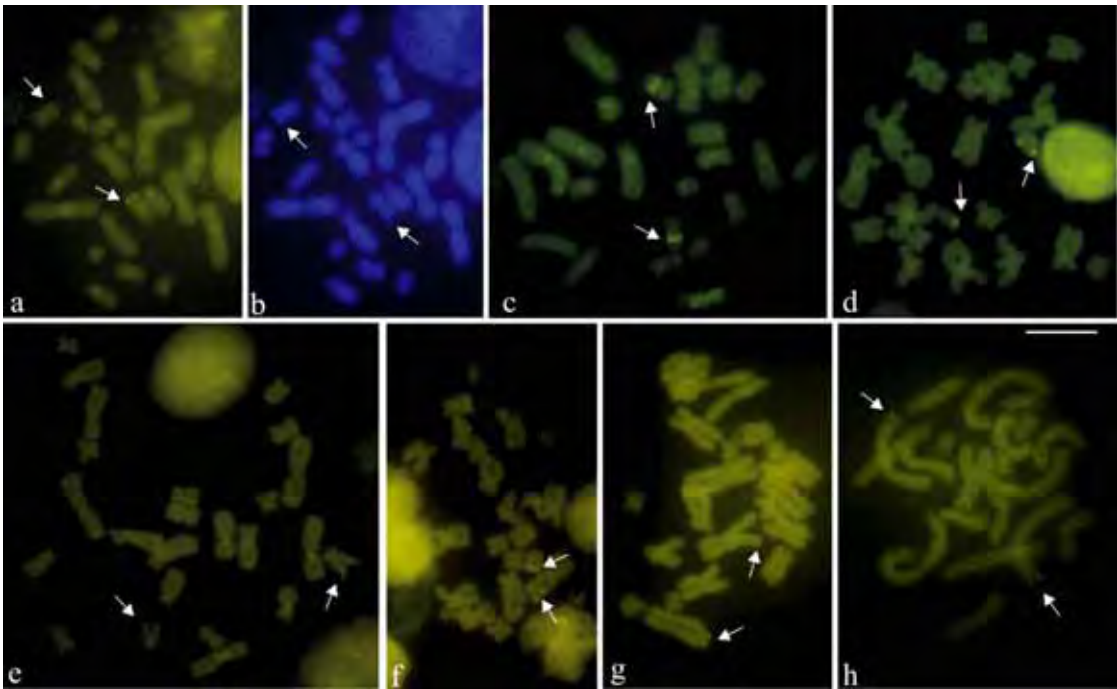


Figure 4

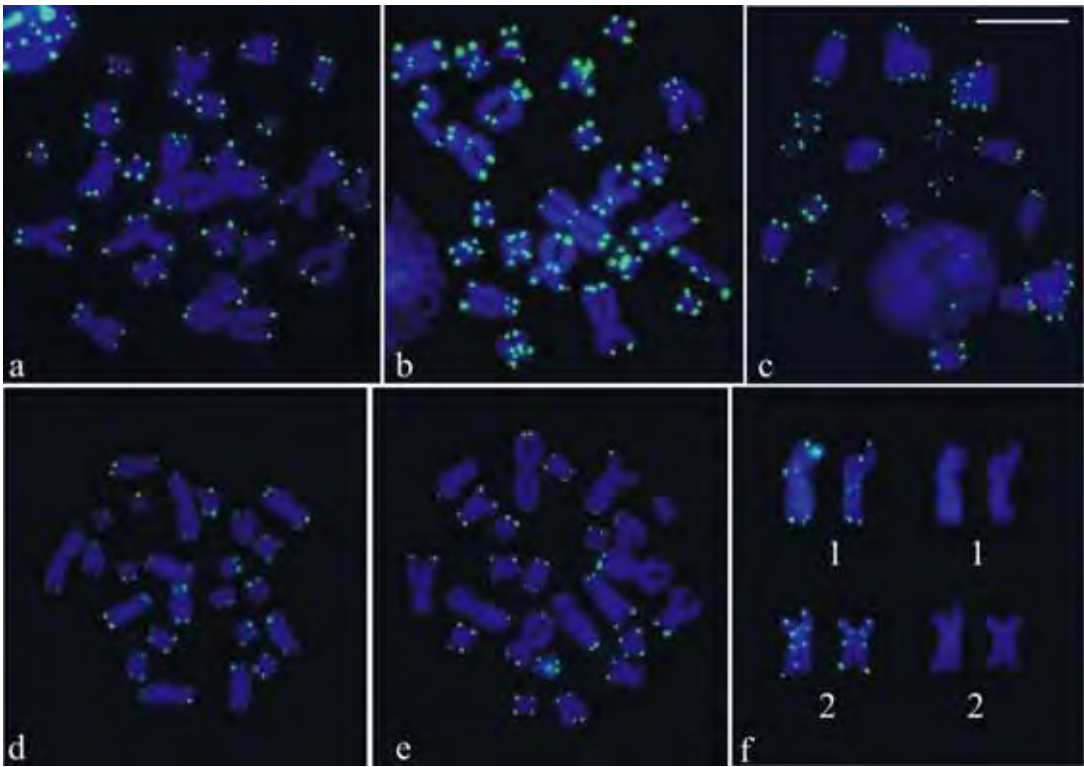
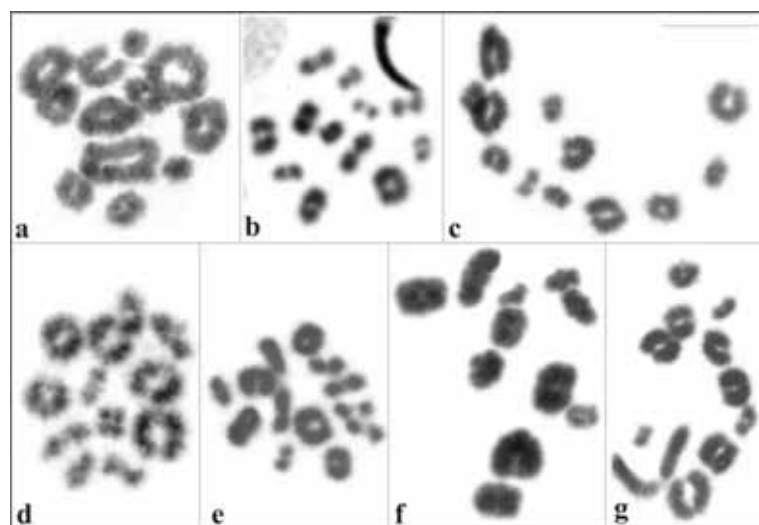


Figure 5



8. Considerações Finais

Os resultados das análises cromossômicas em 171 espécimens da família Hyliidae e as informações citogenéticas para a referida família já existentes na literatura foram avaliados sob a luz das filogenias moleculares, permitindo delinear um panorama geral conforme abaixo.

- que o cariótipo básico com $2n=24$ é predominante nas diferentes tribos da subfamília Hyliinae, sendo, de fato, muito conservado em número e morfologia cromossômica, quando analisados com coloração convencional e, em certa extensão, em relação às bandas de replicação obtidas com incorporação de BrdU e à distribuição de bandas C;
- que dentro de diferentes tribos de Hyliinae ocorrem grupamentos nos quais há constituições cromossômicas que divergem do cariótipo básico: na tribo Cophomantini, nas espécies do gênero *Aplastodiscus* com variação interespecífica nos números diploides de $2n=22$, $2n=20$ e $2n=18$, além do $2n=24$ e nas espécies *Hypsiboas albopunctatus* e *Hypsiboas* sp. aff. *albopunctatus*, que mostraram redução no número diploide para $2n=22$, além de ocorrência de cromossomo B na primeira delas; nas espécies da tribo Dendropsophini do gênero *Dendropsophus*, todas com $2n=30$ e número variável de cromossomos telocêntricos; nas espécies da tribo Lophyohylini do gênero *Phyllodytes* nas quais há redução no número diploide para $2n=22$ e diferenças na morfologia de alguns pares de cromossomos;

- que a subfamília Phyllomedusinae, juntamente com a Pelodryadinae, compreendendo espécies com $2n=26$, número diploide esse considerado basal dentro da família Hylidae e que a principal tendência evolutiva é a redução do $2n=26$ ancestral para $2n=24$ presente na maioria das espécies de Hyalinae. Posteriormente, houve redução para números menores, como $2n=22$, $2n=20$ e $2n=18$, observados nos gêneros *Acris*, *Aplastodiscus*, *Hypsiboas* e *Phyllodytes*, resultantes basicamente de fusões, bem como aumento, como $2n=28$ e $2n=34$ observados em *Osteopilus*, resultantes basicamente de fissões;
- que dois eventos de poliploidia estão na origem de duas novas espécies da família Hylidae, *Hyla versicolor* ($2n=4x=48$) da subfamília Hyalinae, tribo Hylini, e *Phyllomedusa tetraploidea* ($2n=4x=52$) da subfamília Phyllomedusinae, sendo a primeira tetraploide por autopoliploidia de *Hyla chrysoscelis* ($2n=2x=24$) e a segunda, tendo a diploide *Phyllomedusa distincta* ($2n=2x=26$) na linha de ancestralidade, por autopoliploidia ou mesmo aloploidia que não pode ser descartada;
- que, embora cariótipos variáveis aparentem ser muitas vezes produtos de reordenamentos sequenciais, análises citogenéticas comparativas pormenorizadas mostram caminhos evolutivos que ocorreram independentemente. Esse deve ter sido o caso das espécies de *Aplastodiscus*, cujos cariótipos, partindo de um ancestral com $2n=24$, devem ter, por um lado, sofrido redução para $2n=22$, e de outro, redução para $2n=20$ e posteriormente para 18. Um outro caso é o das espécies de *Phyllodytes*, cujos cariótipos descritos com $2n=22$ devem ter se diferenciado por reordenamentos distintos;
- que a localização das regiões organizadoras de nucléolo está em um único par de cromossomos pequenos, que é o mesmo compartilhado por espécies das diferentes tribos de Hyalinae, sendo esse caráter considerado plesiomórfico da subfamília. Localização de RONS em cromossomos grandes ou médios é menos frequente e pode ser considerado caráter derivado;
- que o estudo das sequências repetitivas é uma abordagem promissora no estudo dos cariótipos conservados de Hylidae, pois, com raras exceções, a técnica de banda C pouco contribui para distinguir individualmente os cariótipos. Por outro lado, a coloração com fluorocromos base-específicos é de relevância, na medida em que tem revelado diferenças cariotípicas quanto às constituições moleculares de DNA repetitivo. Surpreendentemente, o

FISH com sondas teloméricas também contribui nessas análises quando revelam a presença de sequências do tipo (TTAGGG)_n fora dos telômeros, não relacionadas a resquícios de rearranjos estruturais;

- que o cromossomo B de *Hypsiboas albopunctatus* pode ser um isocromossomo, saturado de sequências repetitivas que não são compartilhadas com os cromossomos A da espécie, mas que estão presentes de forma dispersa no genoma de *H. raniceps*, uma espécie próxima do mesmo grupo de *H. albopunctatus*, indicando ser um transposon. Aparentemente, o B é eliminado durante a meiose, mas não é possível associar esse evento com algum tipo de controle na transmissão do supernumerário;

- que as espécies diploide e tetraploide de *Phyllomedusa* e os híbridos triploides têm RONS múltiplas, mas o número de sítios de DNAr em cada forma não é proporcional ao nível de ploidia, indicando que deve existir um mecanismo que atua no sentido de regular a atividade gênica, por inativação e até mesmo por deleção das RONS, em direção ao que pode ser o início de um processo de diploidização. A população de *P. tetraploidea* tem usualmente RONS nos cromossomos 1 e 8, porém, RONS ativas ou mesmo inativas foram observadas nos cromossomos 9. Isso pode indicar que ainda subsiste na espécie uma característica remanescente do ancestral diploide, cujas RONS estão nos cromossomos 1 e 9, mas a possibilidade de introgressão de caracteres via híbridos não pode ser descartada.