

Constituição cariotípica em leptodactílídeos do gênero *Leptodactylus* e em espécies de famílias relacionadas à Leptodactylidae (Amphibia: Anura)

Tese de Doutorado 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)

João Reinaldo da Cruz de Campos

Maio
2010

João Reinaldo da Cruz de Campos

**Constituição cariotípica em leptodactílídeos do
gênero *Leptodactylus* e em espécies de famílias
relacionadas à Leptodactylidae
(Amphibia: Anura)**

Tese de Doutorado 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)

Orientador: Dra. Sanae Kasahara

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil

2010

João Reinaldo da Cruz de Campos

**Constituição cariotípica em leptodactílídeos do
gênero *Leptodactylus* e em espécies de famílias
relacionadas à Leptodactylidae
(Amphibia: Anura)**

Tese de Doutorado 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)

Rio Claro, maio de 2010

597.8
C198c Campos, João Reinaldo Cruz
Constituição cariotípica em leptodactílídeos do gênero *Leptodactylus*
e em espécies de famílias relacionadas à *Leptodactylidae* / João Reinaldo
Cruz Campos. - Rio Claro : [s.n.], 2010
168 f. : il., figs., tabs., mapas

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

1. Anuro. 2. Citogenética. 3. Cromossomos. 4. Anfíbios. 5. FISH. I.
Título.

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

Ao meu pai João de Campos (in memorian)

Sei que estive sempre ao meu lado torcendo por mim, o tempo todo sentia isso. Ainda que não esteja fisicamente aqui, tuas idéias e teus ensinamentos sempre me acompanham. Obrigado por todo o exemplo de dignidade e honestidade que você nos deu. Inquestionavelmente, você foi um herói. Te amo muito.

“Quando penso em você, fecho os olhos de saudade”

(Cecília Meireles)

À minha mãe Maria Ap. B. Campos

Meu eterno porto-seguro. Amor incondicional. Você tem um papel muito importante na minha formação pessoal e profissional. Você me ensinou a ser justo, bom e estar sempre de bem com a vida e as pessoas. Obrigado por todo o apoio e compreensão que sempre dedicou a mim. Obrigado pela torcida e pela presença em toda a minha vida. Este trabalho é uma vitória nossa, pois se não estivesse do meu lado não o teria realizado. Te amo sempre.

*“Estou sempre alegre, essa é a melhor maneira de
vencer os obstáculos da vida”*

(Charlie Chaplin)

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Sanae Kasahara, meus sinceros agradecimentos por tudo o que me ensinou durante esses anos em que passamos juntos, por toda a paciência, insistência, ética, bom senso, dignidade e honestidade que mostrou. Espero que esta Tese represente apenas o final de uma fase, e não o de uma amizade pessoal e profissional;

À Universidade Estadual Paulista (UNESP - Rio Claro) por me receber e permitir que fizesse parte deste Programa de Pós-Graduação;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido, Processo No. 06/56193-8;

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

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pelas licenças de coleta concedidas (14434-1 e 16681-1);

Ao Prof. Dr. Célio F. B. Haddad e equipe, pelos animais fornecidos e pela identificação dos exemplares coletados;

Aos Doutores Fernando Ananias, Julián Faivovich, Itamar A. Martins e Cínthia A. Brasileiro, e aos Biólogos Marcos Yamamoto e Hideki Narimatsu, pelos animais coletados;

Ao Departamento de Morfologia (UNESP-Botucatu) em especial ao Prof. Dr. Fausto Foresti e a Dra. Cristiane Dias, pelo auxílio na técnica de FISH com sonda telomérica e nos testes com microdissecção de cromossomos inteiros;

Ao Departamento de Biologia Celular (UNICAMP-Campinas) em especial a Prof. Dra. Luciana Lourenço Bolsoni e a pós-graduanda Juliana Nascimento pela assistência na realização da técnica de FISH com sonda ribossômica;

Aos Professores do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências (UNESP-RC), por todo carinho e amizade, em especial às Professoras Doutoras Ana Maria Costa Leonardo, Maria Izabel S. Camargo, Carmem S. Fontanetti Christofolletti e Maria A. Marin-Morales, pelas longas e interessantes conversas sobre vida pessoal e profissional, Doralice Maria Cella e Marielle Cristina Schneider por todo o carinho demonstrado e pelas aulas de ikebana que muitas satisfações me deram, e Patrícia P. P. Maltempi pela pessoa maravilhosa que é, e por toda a ajuda nas técnicas de citogenética molecular;

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial ao Gerson de Souza Melo, Lucila Segala, Mônica Iamonte, Maria da Graça, Neusa Perinotto e Sandra Veloso, pelos inúmeros momentos de descontração na hora do lanche, e principalmente pelo carinho e prontidão com que sempre me atenderam;

À ex-técnica de laboratório Rogilene A. do Prado, pela amizade e pelo exemplo de força e determinação;

À Profa. Dra. Cleusa Nagamachi da Universidade Federal do Pará (UFPA), pela simpatia que sempre demonstrou e pelas dicas na elaboração do Projeto de Pesquisa;

Ao parecerista FAPESP, que analisou meus relatórios e deu importantes sugestões sobre os meus trabalhos;

Aos amigos de laboratório do Departamento de Biologia, com os quais convivi um período muito intenso da minha vida. Tudo teria sido muito difícil sem a amizade de vocês. Quero registrar um agradecimento especial à Bárbara C. Manzano, Cintya Ap. Christofolletti, Dânia E. C. Mazeo, Daniela Moraes Leme, Edson Lourenço Silva, Frederico G. C. Arnoldi, Janaína Pedro, Jaqueline Bianchi, Márcia M. Hoshina, Maria Eduarda Marreta, Matheus M. Roberto, Milena de Júlio, Renata Carita, Tamaris Gimenez Pinheiro, Tatiana da Silva Souza e Thaís C. Casimiro Fernandes;

Aos amigos de laboratório do Departamento de Morfologia da UNESP de Botucatu, em especial à Cristiane Dias, Daniela Figueiredo, Márcio Chiachio, Kelly T. Abe e Adriana K. Takako, por toda atenção, amizade e carinho de sempre;

À Glaucilene Ferreira Catroli e Simone Lilian Gruber: trabalhar com vocês, ainda que em períodos diferentes, foi um grande privilégio que levarei comigo para sempre. Gosto muito de vocês e não quero me distanciar nunca;

À Cristiane Márcia Miléo, um presente que a vida me deu. Estar contigo durante este tempo foi algo mágico, como tudo o que passamos juntos. Onde quer que estejamos tenho certeza que essa magia não irá acabar. Obrigado pela pessoa maravilhosa que você é e por poder participar da tua vida de uma maneira tão intensa;

Ao Thiago Gazoni, pela paciência que teve e que me ensinou a ter. Obrigado por ter sido tão atencioso todo este tempo, pois sempre que precisei você esteve presente. Que teu caminho seja sempre iluminado, cheio de felicidades e que continue com o mesmo enorme coração. Sucesso amigo;

Ao André Luis Bombeiro, um agradecimento muito especial por toda a atenção, paciência e compreensão. A você que esteve sempre presente, é pouco dizer obrigado por tudo, é preciso muito mais, pois foram vários os períodos difíceis em que esteve comigo, me apoiando e me fazendo entender muitas coisas que aconteciam. Sei que estaremos sempre unidos e que alcançaremos todos os nossos objetivos. Você teve um papel extremamente importante nesta jornada. Seja sempre feliz, e conte comigo em todos os momentos da sua vida;

À família Bombeiro, em especial ao Flamarion R. Bombeiro e Elizete I. F. P. Bombeiro, por todo o carinho e pelos exemplos de determinação e coragem;

À minha família, por compreender a minha ausência durante esses últimos anos e por sempre me receber de braços e coração abertos;

E finalmente, a Deus, por permitir que tantas pessoas especiais façam parte da minha vida.

Índice

Resumo.....	01
Abstract.....	03
Introdução Geral.....	05
Objetivos.....	17
Material.....	18
Métodos e Técnicas.....	21
Análise Cromossômica.....	28
Referências Bibliográficas.....	30
Capítulo I.....	41
Resumo.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	45
Resultados.....	46
Discussão.....	71
Referências Bibliográficas.....	92
Capítulo II.....	103
Resumo.....	104
Introdução.....	105
Material e Métodos.....	107
Resultados.....	108
Discussão.....	118
Referências Bibliográficas.....	124
Capítulo III.....	128
Resumo.....	129
Introdução.....	130
Material e Métodos.....	132
Resultados.....	133
Discussão.....	143
Referências Bibliográficas.....	148
Considerações Finais.....	152
Anexos.....	155

Resumo

Até recentemente, a família Leptodactylidae era considerada polifilética, mas nenhum dos trabalhos realizados antes de 2006 resolveu essa polifilia. Nesse ano, quase que simultaneamente, duas grandes revisões foram publicadas, com base principalmente em sequenciamento gênico e sem considerar dados citogenéticos, resultando em filogenias que mudaram radicalmente a taxonomia e a sistemática de muitos grupos de anuros. Leptodactylidae foi uma das famílias que passou por grandes transformações, sendo os gêneros reduzidos de 57 para apenas quatro. Na presente Tese, foram analisados os cariótipos de nove espécies do gênero *Leptodactylus* e 19 representantes de famílias relacionadas à Leptodactylidae, cujos dados são apresentados em três partes.

No primeiro capítulo são apresentados cariótipos com $2n=20$, nos exemplares de *Vitreorana eurygnatha* e *V. uranoscopa* (Centrolenidae); $2n=22$, em *Adelophryne baturitensis* (Eleutherodactylidae), *Brachycephalus ephippium*, *Ischnocnema guentheri*, *I. manezinho* e *I. parva* (Brachycephalidae), *Leptodactylus furnarius*, *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. mystaceus*, *L. podicipinus* e *L. syphax* (Leptodactylidae), *Odontophrynus americanus* (Cycloramphidae), *Physalaemus barrioi*, *P. cuvieri* e *P. moreirae* (Leiuperidae); e $2n=26$ para *Cycloramphus boraceiensis*, *C. brasiliensis*, *C. ryakonastes*, *Thoropa miliaris* e *Zachaenus parvulus* (Cycloramphidae), *Flectonotus* sp. e *Gastrotheca microdiscus* (Hemiphractidae). São também descritos o padrão de Ag-RON e bandamento C para a grande maioria das espécies. Os dados cromossômicos aqui obtidos, juntamente com os disponíveis na literatura, foram

avaliados à luz das árvores filogenéticas atuais, tendo sido observada grande concordância com as alterações propostas.

O segundo capítulo trata dos cariótipos de três espécies de *Leptodactylus* que pertenciam ao gênero *Adenomera*, com $2n=24$ em *L. cf. marmoratus*, $2n=23$ em *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), e $2n=26$ em *L. hylaedactylus*, com diferentes números de cromossomos de um ou dois braços. Os exemplares de *Leptodactylus* cf. *marmoratus* mostraram uma variação com relação à morfologia do par 12. Todos possuem Ag-RON no par 6, confirmada pela técnica de FISH com sonda de DNAr, mas os exemplares de uma das localidades têm, adicionalmente, Ag-RON em um dos cromossomos 8. Em *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) e *L. hylaedactylus* a Ag-RON está localizada nos pares 11 e 7, respectivamente. O padrão de banda C é predominantemente centromérico, sendo DAPI-positivo apenas nos cromossomos de *L. cf. marmoratus*. Por outro lado, sítios brilhantes com CMA₃ coincidentes com a Ag-RON são visualizados nas três espécies. Os dados obtidos sugerem que a evolução cariotípica no gênero é baseada, principalmente, em fusões cêntricas e inversões pericêntricas.

No terceiro capítulo, é descrito, pela primeira vez, o cariótipo de *Holoaden luederwaldti* com $2n=18$ cromossomos. Um único exemplar da amostra apresentou $2n=3x=27$, resultante de uma triploidia natural. Outra variação encontrada se refere a dois tipos morfológicos de cromossomos 8, em condição heteromórfica, tanto em macho quanto em fêmea, ou homomórfica subtelocêntrica, não tendo sido observado cariótipo com dois cromossomos submetacêntricos. A localização da Ag-RON é no par 8, na região intersticial quando o cromossomo é subtelocêntrico e proximal quando submetacêntrico, confirmada pela técnica de FISH com sonda de DNAr. A banda C centromérica é brilhante com DAPI, e a que aparece no mesmo sítio da Ag-RON é fluorescente com CMA₃. A sonda telomérica hibridou na região dos telômeros de todos os cromossomos, sem evidência de marcação intersticial. Estudos de novos exemplares de *H. luederwaldti* seriam interessantes para avaliar a extensão da variação na morfologia dos cromossomos 8, bem como a frequência com que ocorrem indivíduos triploides na população.

Abstract

Until recently, the family Leptodactylidae was considered polyphyletic, but no paper published before 2006 clarify this question. In that year two extensive revisions were published, almost simultaneously, based mainly on gene sequencing with no contribution of cytogenetic data. These studies resulted in phylogenetic trees which have radically changed the taxonomy and systematic of several groups of frogs. Leptodactylidae was one of the families that suffered great modifications, and the number of genus was reduced from 57 to only 4. In this work, the karyotypes of 9 species of *Leptodactylus* and representatives of 19 families related to Leptodactylidae were analyzed, and the data are presented in three parts.

The first chapter describes the karyotypes with $2n=20$, in species of *Vitreorana eurygnatha* and *V. uranoscopa* (Centrolenidae); $2n=22$ in *Adelophryne baturitensis* (Eleutherodactylidae), *Brachycephalus ephippium*, *Ischnocnema guentheri*, *I. manezinho* and *I. parva* (Brachycephalidae), *Leptodactylus furnarius*, *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. mystaceus*, *L. podicipinus* and *L. syphax* (Leptodactylidae), *Odontophrynus americanus* (Cycloramphidae), *Physalaemus barroioi*, *P. cuvieri* and *P. moreirae* (Leiuperidae); and $2n=26$ in *Cycloramphus boraceiensis*, *C. brasiliensis*, *C. ryakonastes*, *Thoropa miliaris* and *Zachaenus parvulus* (Cycloramphidae) *Flectonotus* sp. and *Gastrotheca microdiscus* (Hemiphractidae). The C band and Ag-RON patterns are described for the majority of the species. The chromosomal data obtained here, along with those available in the literature, were analyzed in the light of the current phylogenetic trees, and are in accordance to the proposed modifications.

The second chapter reports the karyotypes of three *Leptodactylus* species belonging to the former genus *Adenomera*, with $2n=24$ in *L. cf. marmoratus*, $2n=23$ in *Leptodactylus* sp. (aff *bokermanni*), and $2n=26$ in *L. hylaedactylus*, bearing different numbers of uni or bi-armed chromosome pairs. Specimens of *Leptodactylus* cf. *marmoratus* showed a variation with regard to the morphology of pair 12. All of them, have Ag-NOR in pair 6, confirmed by FISH using an rDNA probe, but the samples of one locality have, in addition, Ag-NOR on one of the chromosomes 8. In *Leptodactylus* sp. (aff *bokermanni*) and *L. hylaedactylus*, Ag-NOR is located in the pairs 11 and 7, respectively. The C-band pattern is predominantly centromeric, with DAPI brilliant staining only in the chromosomes of *L. cf. marmoratus*. Moreover, bright region after CMA₃, coincident with Ag-NOR site, is observed in the three species. The data suggest that the karyotype evolution in the genus is primarily based on centric fusions and pericentric inversions.

In the third chapter is described, for the first time, the karyotype of *Holoaden luederwaldti* with $2n=18$ chromosomes. One specimen of the sample had $2n=3x=27$, resulted from a natural triploidy. Another variation refers to two morphological types of chromosomes 8 in heteromorphism, visualized in males and females, or in subtelocentric homomorphic condition. No specimen with two submetacentric chromosomes 8 was observed. The Ag-NOR at the interstitial region of the subtelocentric chromosome 8, and at the proximal region in the submetacentric chromosomes 8, were confirmed by FISH with an rDNA probe. The centromeric C-band is brilliant with DAPI, and those that appear on the same site of Ag-NOR, are fluorescent with CMA₃. The telomeric probe labeled only at the telomeres of the chromosomes, with no evidence of interstitial bands. Analyses of more specimens of *H. luederwaldti* would be interesting to evaluate the extent of variation in morphology of the chromosomes 8, and the frequency of triploid individuals in the population.

Introdução Geral

A taxonomia e sistemática da família Leptodactylidae: um breve histórico de alterações e incertezas

A família Leptodactylidae tem sido, desde o início da década de 1970, alvo de muitas discussões sobre a taxonomia e, principalmente, sobre a sistemática de suas espécies. Até o ano de 2006, a família agrupava 57 gêneros e foi por muito tempo considerada uma das mais diversificadas entre os anuros, como constam nos antigos levantamentos feitos por Frost (1985, 2000, 2002, 2004). O único impresso na forma de uma publicação foi o do ano de 1985, tendo sido os demais já na forma *online*, periodicamente atualizados, até o extenso trabalho realizado em 2006 (FROST et al., 2006). A partir de então, Frost retomou a disponibilização dos dados de taxonomia e sistemática de anuros e anfíbios em geral, em 2006, 2008, 2009 e a mais recente em abril de 2010, permitindo o acesso rápido às alterações introduzidas na classe.

Um dos trabalhos marcantes que trata das questões de taxonomia e sistemática de Leptodactylidae foi realizado por Lynch em 1971 que, com base em algumas sinapomorfias, propôs a criação de quatro subfamílias para agrupar os leptodactílideos, correspondendo a Ceratophryinae, Hylodinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae. Pouco tempo depois, Heyer (1975), ainda com base em caracteres morfológicos, acrescentou a subfamília Grispicinae. Em seguida, Frost (1985) revalidou a proposta de quatro subfamílias apresentada por Lynch (1971) e, em 2004, o autor suprimiu a nomenclatura Hylodinae, redistribuindo suas espécies, e

incluiu Cycloramphinae e Eleutherodactylinae, portanto elevando para cinco o número de subfamílias, não considerando, porém, Grispicinae.

Diversos outros trabalhos trataram da polifilia de Leptodactylidae (entre outros, FORD e CANATELLA, 1993; RUVINSKY e MAXON, 1996; HAAS, 2003; DARST e CANATELLA, 2004; NASCIMENTO et al., 2005; FAIVOVICH et al., 2005) com base em caracteres morfológicos e moleculares, porém, nenhuma proposta mais conclusiva sobre a taxonomia e sistemática da família foi apresentada. Na revisão de Faivovich et al. (2005), feita para a família Hylidae com base em dados de sequenciamento de DNA e algumas poucas informações citogenéticas, a subfamília Hemiphractinae foi retirada de Hylidae e alocada, sem maiores comentários, em Leptodactylidae.

A classe Amphibia apresentava, de um modo geral, conflitos na taxonomia e sistemática, e isso motivou a realização de uma extensa revisão coordenada por Frost (FROST et al., 2006) que, principalmente com base em dados de sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares, resultou em uma significativa mudança para os anfíbios. Dentre as famílias que mais passaram por alterações está Leptodactylidae, de modo que os gêneros das seis subfamílias até então sugeridas, isto é, Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Hemiphractinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae, foram em sua grande maioria realocados em novos táxons. Assim, apenas 11 dos 57 gêneros permaneceram dentro de Leptodactylidae, sendo eles *Edalorhina*, *Engystomops*, *Eupemphix*, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus* (incluindo as espécies de *Adenomera*, *Lithodytes* e *Vanzolinius*), *Physalaemus*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola*, *Paratelmatobius*, *Scythrophrys* e *Somuncuria*. Os demais 43 gêneros foram distribuídos nas famílias Batrachophrynidae, Brachycephalidae, Cycloramphidae, Ceratophryidae e Thoropidae, bem como em Amphignathodontidae, Cryptobatrachidae e Hemiphractidae, essas três últimas criadas para acomodar as espécies de Hemiphractinae. A grande maioria das famílias mencionadas, com exceção de Brachycephalidae, constitui novos táxons que foram propostos por Frost et al. (2006). A análise dos dados moleculares resultou em três agrupamentos distintos entre os antigos leptodactídeos, sendo dois separados pelas famílias Limnodynastidae e Myobatrachidae, e o terceiro pelas famílias Hylidae e Centrolenidae (Figura 1).

Mesmo após o exaustivo trabalho de Frost et al. (2006), em que foi analisado um grande número de representantes de toda a classe, questionamentos acerca de alguns grupos permaneceram e ainda permanecem até o presente. Tal fato, levou Grant et al. (2006) a realizar uma publicação com implicações taxonômicas no grupo de dendrobatídeos e seus relacionados. Nessa revisão, Leptodactylidae foi novamente analisada, tendo sido observado que a família ainda não era monofilética. Dessa forma, os autores apresentaram uma nova proposta para a sistemática e a taxonomia da família, reduzindo-a para apenas quatro gêneros, pois somente *Leptodactylus*, *Hydrolaetare*, *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys* permaneceram como Leptodactylidae. Os demais sete gêneros passaram a compor a nova família Leiuperidae. É interessante notar que as espécies analisadas foram agrupadas em dois clados intermediados por Ceratophryidae e Cycloramphidae, de modo que o primeiro agrupamento corresponde a Leptodactylidae e o segundo, a Leiuperidae (Figura 2).

Com todas as modificações, Leptodactylidae deixou de ser considerada a mais diversificada entre os vertebrados, compreendendo atualmente apenas 97 espécies, pois o então gênero *Eleutherodactylus*, o mais especioso entre os vertebrados, com mais de 800 espécies, deixou de pertencer à família. Primeiramente, esse gênero foi alocado por Frost et al. (2006) na família Brachycephalidae e, mais recentemente, de acordo com uma extensa revisão realizada por Hedges et al. (2008), os antigos *Eleutherodactylus* passaram a constituir, junto com outros gêneros, o grupo denominado Terrarana. Foi então confirmada a hipótese de polifilia de *Eleutherodactylus* e suas espécies reagrupadas em diversos gêneros de diferentes famílias, criados ou revalidados, sendo *Ischnocnema* em Brachycephalidae, *Craugastor* e *Haddadus* em Craugastoridae, *Diasporus* e *Eleutherodactylus* em Eleutherodactylidae, *Hypodactylus*, *Lynchi* e *Pristimantis* em Strabomantidae.

Os atuais leptodactilídeos possuem uma ampla distribuição geográfica ocupando a região sul da América do Norte, toda a América do Sul e algumas ilhas situadas na região do Caribe (FROST, 2010). Em particular, são muito abundantes no Brasil, em especial na Mata Atlântica e Amazônia, de modo que mais de 70 espécies possuem ocorrência em território brasileiro, sendo várias delas endêmicas (SBH, 2010). Esse número, no entanto, é certamente maior, pois existem muitas espécies ainda não descritas. Uma confirmação disso é a constante descrição de

novas espécies no decorrer dos últimos anos (GIARETTA e COSTA, 2007; BERNECK et al., 2008; CARAMASCHI et al., 2008; GARCIA et al., 2009).

Além disso, há espécies fazendo parte dos chamados complexos de espécies, que necessitam de análises mais detalhadas.

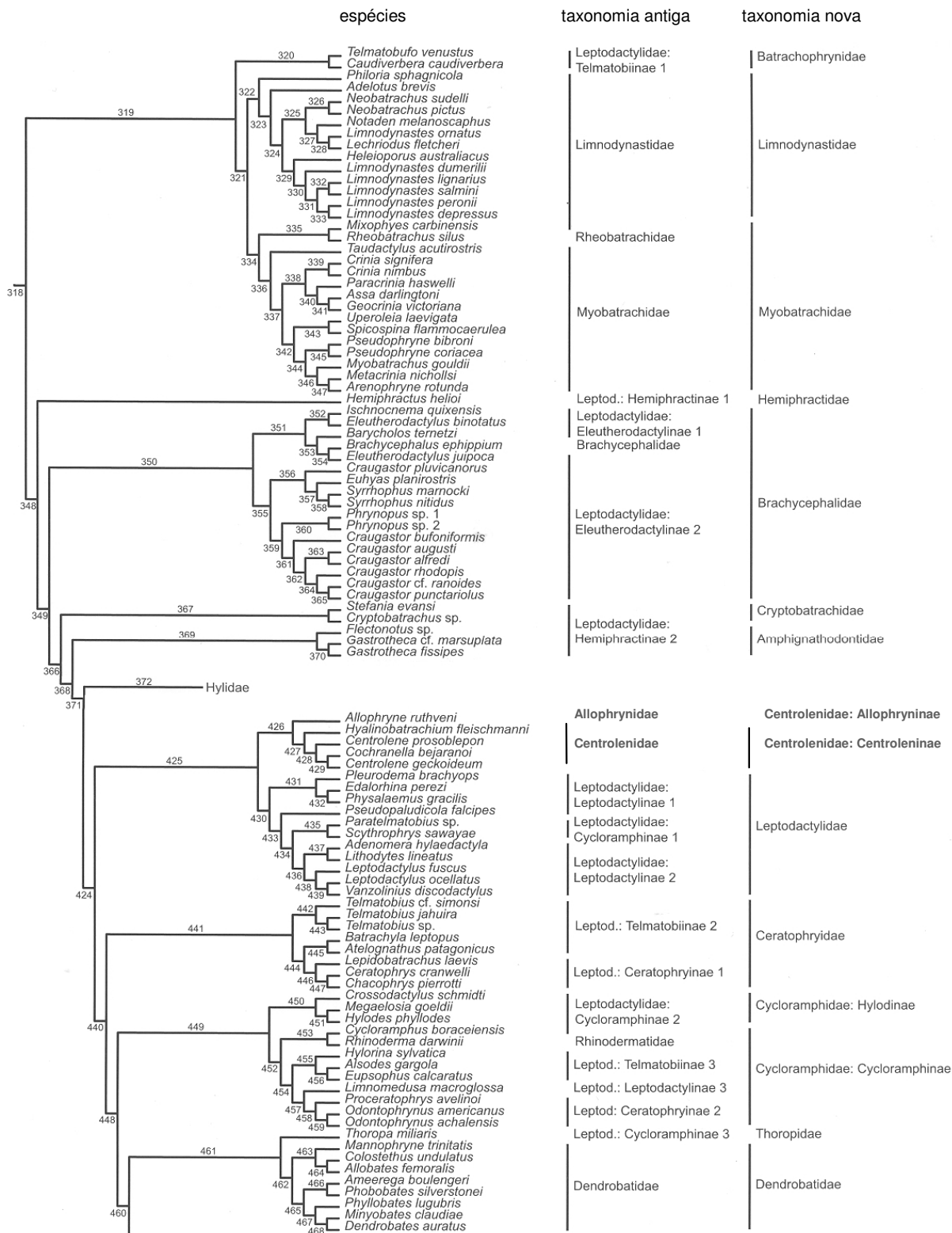


Figura 1- Parte modificada da árvore filogenética de maior parcimônia apresentada em Frost et al. (2006). Notar que Leptodactylidae foi subdividida em outras famílias, tendo sido separados três agrupamentos, dois deles intermediados por Limnodynastidae e Myobatrachidae, e o terceiro por Hylidae, não mostrada em detalhe nessa figura, e Centrolenidae

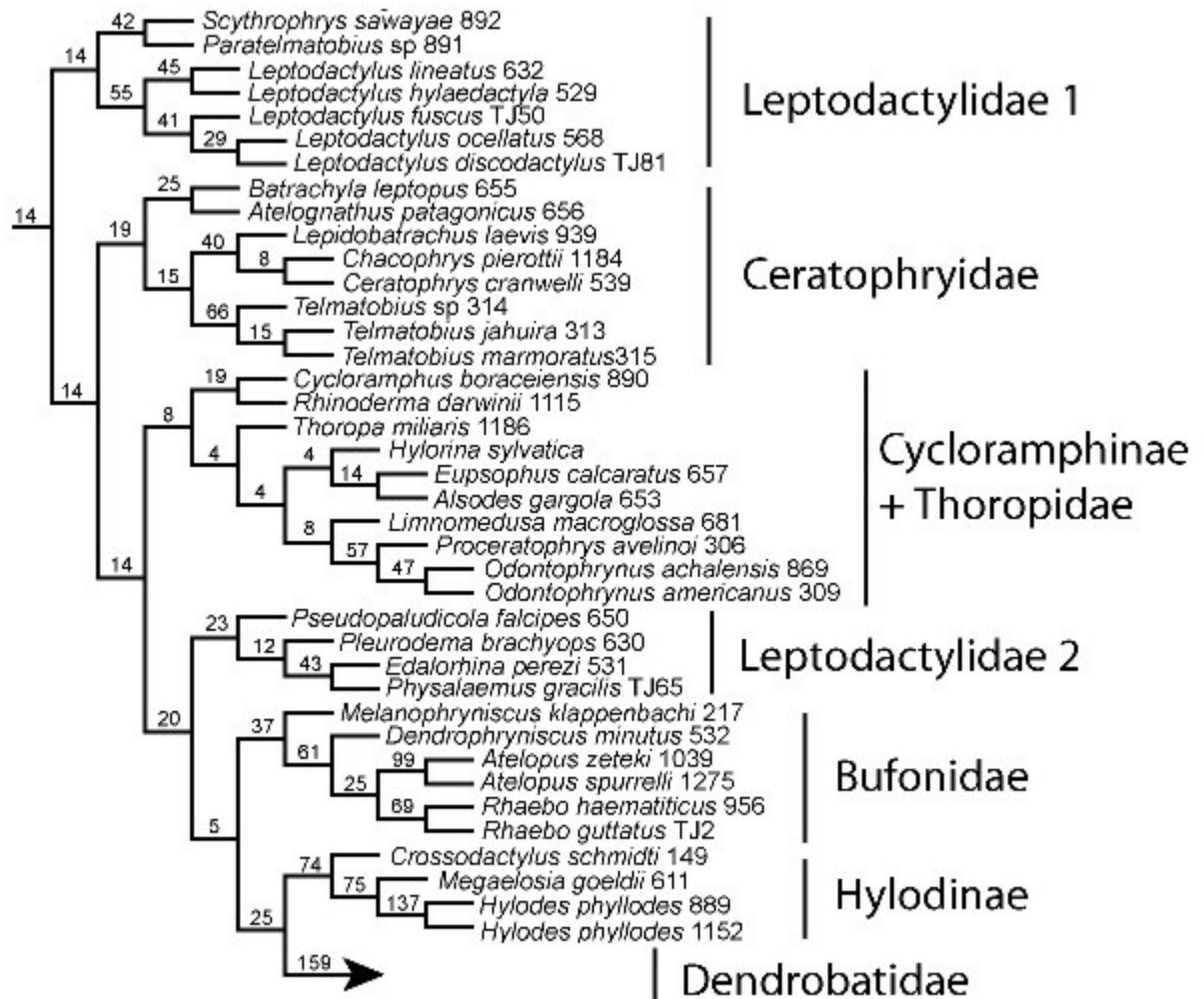


Figura 2. Parte da árvore filogenética de maior parcimônia apresentada em Grant et al. (2006). Notar que as espécies de Leptodactylidae (*sensu* FROST et al., 2006) foram agrupadas em dois clados distintos. O clado Leptodactylidae 1 corresponde aos atuais leptodactídeos, o clado Leptodactylidae 2 corresponde a Leiuperidae, ambos intermediados por Ceratophryidae, Thoropidae e Cycloramphidae

Os estudos cromossômicos em *Leptodactylidae* e famílias relacionadas

A citogenética de vertebrados tem passado por grandes avanços nos últimos anos, principalmente por causa da utilização cada vez mais frequente de técnicas mais resolutivas e diversificadas de diferenciação cromossômica e, como consequência, os estudos de cromossomos deixaram de ser baseados somente na observação de células coradas convencionalmente (SUMNER, 1990; VERMA e BABBU, 1995). Os primeiros estudos citogenéticos de anfíbios, inclusive no Brasil, apresentavam em sua maioria somente o número diploide da espécie, muitas vezes determinado pela análise de células meióticas (MORESCALCHI, 1973). Apesar das limitações técnicas, os trabalhos, como os realizados inicialmente por citogeneticistas brasileiros como Beçak e seus colaboradores (BEÇAK et al., 1966; BEÇAK, 1968; BEÇAK et al., 1967; BEÇAK e BEÇAK, 1974), identificaram casos importantes e inquestionáveis de variações numéricas e estruturais de autossomos, presença de supernumerários e cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, tanto pela análise de preparações mitóticas quanto meióticas.

Sem dúvida, a coloração convencional fornece informações relevantes, porém, o advento das técnicas de Ag-RON e de bandamento C, possibilitou a identificação de sítios particulares dos cromossomos, correspondentes respectivamente, às regiões organizadoras de nucléolo (número e posição) e às regiões de heterocromatina (distribuição e quantidade). Variação tanto no número como na localização das Ag-RON têm sido observadas com frequência, podendo ser marcadores populacionais, ou mesmo interespecíficos, em vários grupos zoológicos, incluindo os anfíbios anuros (entre outros, LOURENÇO et al., 1998; SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2000a; Silva et al., 2000b; CAMPOS et al., 2008; CAMPOS et al., 2009; presente trabalho). Com relação ao padrão de banda C, além de variações interpopulacionais quanto à distribuição e quantidade de heterocromatina (ANANIAS et al., 2007a; CAMPOS et al., 2008), pode-se comprovar a ocorrência de inversão pericêntrica, como mostrado em *Leptodactylus latrans* (na ocasião *Leptodactylus ocellatus*) por Silva et al. (2000a), em que o referido rearranjo foi corroborado pela posição da banda C. A técnica de banda C tem sido importante também na identificação de cromossomos sexuais que são homomórficos com coloração convencional, sendo distinguidos apenas pelo padrão de bandamento C (SCHMID et al., 2003; BARALE et al., 1990).

Nos últimos anos, o emprego mais rotineiro de coloração com fluorocromos base-específicos, de incorporação de 5-bromodeoxiuridina (BrdU) para identificação de bandas de replicação e de localização de regiões específicas pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), permitiram a identificação de marcadores citológicos mais elucidativos para o entendimento dos mecanismos de evolução cromossômica e das modificações ocorridas nos cariótipos. É importante ressaltar que tais abordagens têm, além disso, fornecido dados para se conhecer a organização e constituição molecular de regiões cromossômicas particulares e, em certa extensão, têm contribuído para a taxonomia e sistemática. De fato, pela comparação mais efetiva dos cariótipos, possibilitam o estabelecimento do grau de proximidade de espécies e às vezes a identificação de novas entidades específicas, seja nos casos de complexos de espécies ou de espécies crípticas.

O uso de fluorocromos base-específicos tem sido importante, pois esses corantes mostram a natureza molecular de regiões repetitivas, inclusive daquelas que não são necessariamente marcadas pela banda C. Atualmente, são empregados diferentes tipos de fluorocromos sendo os mais comuns o DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) que é AT específico e CMA₃ (cromomicina A₃); adicionalmente, para melhorar a intensidade dos sinais ou promover o aparecimento de um outro padrão, pode-se realizar uma contra-coloração com corante não-fluorescente, como distamicina A e actinomicina D, que são respectivamente, AT e GC-específicos (VERMA e BABU, 1995; SCHMID et al., 2002a).

O BrdU pode ser utilizado *in vivo* ou *in vitro*, e sob diversos tipos de tratamento, como os contínuos ou descontínuos, usando diferentes tempos de duração. As diferenças dos padrões de marcação, por sua vez, são conseguidas por vários tipos de coloração (DUTRILLAUX e COUTURIER, 1981; MIURA, 1995). Com essa técnica, podem ser diferenciadas bandas eucromáticas dos tipos G ou R, assim como as regiões de heterocromatina que são de replicação tardia. O uso do BrdU é relevante por ser capaz de promover bandas transversais ao longo dos cromossomos, o que permite o correto emparelhamento dos homólogos, principalmente nos casos em que os cromossomos estão mais distendidos (*high resolution banding*) e, além disso, possibilita detectar homeologias entre cromossomos de espécies diferentes (MIURA, 1995; KASAHARA et al., 2003; GRUBER et al., 2007).

Certamente, o desenvolvimento das técnicas de FISH constitui um dos maiores avanços dentro da citogenética, já que diversos tipos de sondas podem ser utilizadas, como a sonda de DNAr dos tipos 18S, 28S e 5S, DNA teloméricos e de regiões repetitivas em geral, principalmente as presentes nos cromossomos B e as ligadas na diferenciação de cromossomos sexuais. O advento dessa técnica forneceu uma ampla variedade de marcadores citológicos, culminando na aplicação de FISH com sondas obtidas a partir de fragmentos cromossômicos curtos, braços cromossômicos, ou até mesmo cromossomos inteiros, que podem ser obtidas pela metodologia de microdissecção, que consiste na raspagem de apenas um cromossomo ou parte dele, seguido de amplificação e marcação (WEIMER et al., 1999).

Uma técnica mais elaborada para obtenção de cromossomos inteiros destinados a experimentos de pintura cromossômica é a de citometria de fluxo, e as sondas obtidas permitem a realização de técnicas mais sofisticadas como o FISH-*multi-color* (M-FISH), que consiste na hibridação de vários cromossomos simultaneamente. O uso do M-FISH possibilita a aplicação de FISH-*cross-species*, ou seja, que o genoma de uma espécie seja hibridado em preparações citológicas de outra. Diversos trabalhos, inclusive realizados por pesquisadores brasileiros, têm sido efetuados nos últimos anos, principalmente para a comparação entre diferentes espécies (PIECZARKA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; VENTURA et al., 2009). O M-FISH, pode também ser utilizado para se entender o comportamento dos cromossomos durante a meiose, como nos casos de formação de cadeias de multivalentes em ornitorrinco (GRÜTZNER et al., 2004) e de trivalentes em morcegos com sistema múltiplo de cromossomos sexuais (NORONHA, 2006). Mais recentemente, tem-se observado com mais frequência a utilização de FISH em fibras de DNA (*fiber-FISH*), de modo que é possível verificar de maneira precisa a localização e organização das regiões repetitivas diretamente na fibra de DNA (VERMA e BABU, 1995; TOMITA et al., 2008).

Técnicas mais resolutivas, como as de bandamentos e de FISH, além de fornecer dados adicionais sobre a estrutura dos cromossomos, auxiliam na compreensão dos mecanismos envolvidos nos rearranjos responsáveis pela diferenciação dos cariótipos. Com isso, comparações mais efetivas podem ser feitas e questões pendentes sobre sistemática de grupos zoológicos, incluindo os anfíbios anuros, podem, sem dúvida, serem elucidadas.

De acordo com extensos levantamentos de informações citogenéticas feitos a partir da década de 1990 (KING, 1990; KURAMOTO, 1990), pode-se dizer que um número relativamente pequeno de espécies de leptodactídeos, cerca de 270 entre mais de 1100 (AMARO-GHILARDI, 2005), havia sido cariotipado antes das modificações taxonômicas preconizadas por Frost et al. (2006) e Grant et al. (2006). Após ambas as revisões somam-se pouco mais de 40 o número de Leptodactylidae cariotipados, sendo a grande maioria de espécies de *Leptodactylus*, com 36 representantes (BARBIERI, 1950; SAEZ e BRUM, 1960; BIANCHI e MOLINA, 1967; BIANCHI et al., 1973; BOGART, 1967; 1973; 1974; BEÇAK, 1968; BEÇAK et al., 1970; BRUM-ZORRILLA e SAEZ, 1968; LEÓN, 1970; MORESCALCHI, 1970; MORESCALCHI e GARGIULO, 1968; MORESCALCHI et al., 1968; DENARO, 1972; HEYER, 1972; HEYER e DIMENT, 1974; HEYER, 1978; BARRIO, 1973; SAVAGE e DE WEESE, 1979; BARALE et al., 1990; SILVA et al., 2000a, SILVA et al., 2000b; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2006; AMARO-GHILARDI et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; CAMPOS et al., 2009; e presente trabalho). Outros dois gêneros da família, isto é, *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys*, possuem apenas quatro espécies cariotipadas dentro de cada gênero (LOURENÇO et al., 2000; LOURENÇO et al., 2003; LOURENÇO et al., 2007). É importante ressaltar que nenhuma das três espécies descritas de *Hydrolaetare* foi cariotipada até o momento.

A grande maioria dos trabalhos com *Leptodactylus*, *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys* é de décadas passadas e baseada somente em cromossomos corados de modo convencional. Apenas publicações mais recentes apresentam informações obtidas com uso de coloração diferencial, de modo que dados sobre cromossomos de Leptodactylidae são ainda bastante escassos frente a grande diversidade e ampla distribuição do grupo em território brasileiro.

Na atual família Leptodactylidae, pode-se observar uma predominância de cariótipos com $2n=22$, porém, esse número está praticamente restrito às espécies de *Leptodactylus*, pois todos os exemplares de *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys* cariotipados até o presente possuem $2n=24$. É importante ressaltar que os cariótipos com $2n=22$ de *Leptodactylus* são altamente similares incluindo cromossomos do tipo metacêntrico e submetacêntrico, com algumas constituições variantes nas quais aparecem cromossomos telocêntricos. Dentro do gênero *Leptodactylus*, são encontradas também variações no número diploide, como é o caso de *Leptodactylus silvanimbus* (AMARO-GHILARDI et al., 2006) com $2n=24$, e das espécies

Leptodactylus andreae e *Leptodactylus hylaedactylus* com $2n=26$, *Leptodactylus marmoratus* com $2n=24$ e *Leptodactylus* sp. (aff *bokermanni*) com $2n=23$ (BOGART, 1970; 1973; 1974; CAMPOS et al., 2009, presente trabalho), enfatizando que todas elas pertenciam ao antigo gênero *Adenomera*, e ainda *Leptodactylus lineatus* com $2n=18$ (BOGART, 1970) descrita anteriormente como *Lithodytes lineatus*.

Mesmo considerando os dados cariotípicos das espécies que pertenciam à antiga família Leptodactylidae, o número diploide de $2n=22$ é, em certa extensão, o mais encontrado, sendo que determinados grupos mostram adicionalmente uma grande conservação cariotípica, com pouca ou nenhuma variação também em relação à morfologia e tamanho dos cromossomos, sendo praticamente todos do tipo metacêntrico ou submetacêntrico. De fato, pode-se constatar uma alta similaridade entre cariótipos de *Leptodactylus* e de outros gêneros, como *Physalaemus*, *Engystomops* e *Eupemphix*, atualmente alocados na família Leiuperidae. Por outro lado, na família Leiuperidae há gêneros que mostram uma grande variabilidade no número diploide, como é o caso de *Pseudopaludicola* com $2n= 16, 18, 20$ e 22 (SAEZ e BRUM, 1960; BEÇAK, 1968; BRUM-ZORRILLA e SAEZ, 1968; BATISTIC et al., 1969). Outro exemplo é o gênero *Eleutherodactylus*, *sensu* Frost et al. (2006), que foi considerado um caso extremo de abundância de número de espécies e de variação cariotípica intragenérica, pois entre mais de 100 espécies cariotipadas dentre as mais de 800 descritas, havia registros de números diploides de $2n=18, 20, 22, 24, 26, 30, 31, 32, 34$ e 36 (revisão em CAMPOS e KASAHARA, 2006). As variações cariotípicas até então observadas, tanto no número como na morfologia dos cromossomos, têm sido explicadas por rearranjos diversos como inversões pericêntricas e fusão/fissão, embora nem sempre se tenha uma confirmação por técnicas usuais de bandamento. Tal fato vem reforçar a proposta de Hedges et al. (2008) de que *Eleutherodactylus* era completamente polifilético.

Adicionalmente, há casos em que a variação do número de cromossomos é decorrente de poliploidia, que está presente em espécies como *Ceratophrys aurita* com $2n=8x=104$ (BEÇAK et al., 1967), *Ceratophrys ornata* $2n=8x=104$ (BOGART, 1967; SCHMID et al., 1985), *Ceratophrys joazeirensis* com $2n=8x=104$ (VIEIRA et al., 2006), *Odontophrynus americanus* com $2n=4x=44$ (entre dezenas de outros, BEÇAK et al., 1966; SCHMID et al., 2003; SALAS, 2006; ROSSET et al., 2006), *Pleurodema bibroni* (*Pleurodema darwini*) com $2n=4x=44$ (BARRIO e RINALDI de

CHIERI, 1970) e *Pleurodema kriegi* com $2n=4x=44$ (BARRIO e RINALDI de CHIERI, 1970; BOGART e WASSERMAN, 1972).

Diferença cariotípica decorrente de cromossomos B para os antigos Leptodactylidae foi descrita em *Megaelosia massarti*, atualmente alocada em Hylodidae (ROSA et al., 2003) e, mais recentemente, em Physalaemus olfersii (MILANI et al., 2010), alocada em Leiuperidae. Além disso, cromossomos sexuais citologicamente diferenciados em de sistema XX:XY foram demonstrados para *Engystomops petersi* (LOURENÇO et al., 1998; LOURENÇO et al., 1999; LOURENÇO et al., 2000) e para representantes do gênero *Eleutherodactylus*, *sensu* Frost et al. (2006), no qual foram identificados cromossomos do tipo XX:XY (SCHMID et al., 2003), ZZ:ZW (SCHMID et al. 2002b) e até mesmo sistemas múltiplos de determinação do sexo $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ (SCHMID et al., 1992). Outra espécie que apresenta cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ:ZW é *Procetophrys boiei* (ANANIAS et al., 2007b), atualmente pertencente a família Cycloramphidae.

É importante observar que dentre as diversas famílias que hoje passaram a alocar os antigos leptodactilídeos, algumas sequer tiveram representantes cariotipados; no caso de outras, apenas uma única espécie ou um só gênero foi analisado do ponto de vista citogenético. É, portanto, imprescindível que novos estudos cromossômicos, preferencialmente com bandamentos, sejam realizados nas espécies dos atuais Leptodactylidae e de famílias relacionadas, pois assim sendo, mais elementos elucidativos podem ser obtidos para a compreensão dos mecanismos de evolução que conduzem a diferenciação dos cariótipos. Sem dúvida, a citogenética pode ser uma importante ferramenta para auxiliar nas questões de taxonomia e sistemática que ainda existem nesses anuros.

Objetivos

Os antigos leptodactílídeos eram numericamente os mais abundantes entre os anuros, especialmente no Brasil, sendo endêmicas muitas das espécies. Apesar da diversidade, poucos representantes foram estudados citogeneticamente, mostrando um cariótipo em geral conservado, pelo menos com coloração convencional. Nos últimos anos, ocorreram drásticas modificações na taxonomia e sistemática, algumas delas ainda não completamente esclarecidas, como resultado de revisões baseadas principalmente em sequenciamento de genes, com nenhuma contribuição de dados cromossômicos. Desenvolvemos, então, o presente trabalho de citogenética, no qual foram estudadas não só espécies dos atuais Leptodactylidae como também de famílias a ela relacionadas, com a finalidade de aumentar o conhecimento sobre seus cromossomos, principalmente com coloração diferencial e também avaliar em que medida a citogenética poderia contribuir para o esclarecimento de questões que os trabalhos de revisão de taxonomia e sistemática deixaram abertas.

No presente trabalho, são apresentados:

- os cariótipos de *Adelophryne baturitensis*, *Brachycephalus ephippium*, *Cycloramphus boraceiensis*, *Cycloramphus brasiliensis*, *Cycloramphus ryakonastes*, *Flectonotus* sp., *Gastrotheca microdiscus*, *Vitreorana eurygnatha*, *Vitreorana uranoscopa*, *Ischnocnema guentheri*, *Ischnocnema manezinho*, *Ischnocnema parva*, *Leptodactylus furnarius*, *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus mystaceus*, *Leptodactylus podicipinus*, *Leptodactylus syphax*, *Odontophrynus*

americanus, *Physalaemus barroioi*, *Physalaemus cuvieri*, *Physalaemus moreirae*, *Thoropa miliaris* e *Zachaenus parvulus*, analisados com coloração convencional, Ag-RON e banda C, na maioria dos casos;

- os cariótipos de *Leptodactylus marmoratus*, *Leptodactylus hylaedactylus* e *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) (Leptodactylidae) que, até a primeira revisão de 2006, pertenciam ao gênero *Adenomera*, analisados com técnicas de coloração convencional, Ag-RON, banda C, fluorocromos base-específicos e FISH com sonda de DNAr;

- o cariótipo inédito de *Holoaden luederwaldti* (Strabomantidae), com descrição de um caso de triploidia natural, analisado com coloração convencional, Ag-RON, banda C, fluorocromos base-específicos e FISH com sondas de DNAr e DNA telomérico.

Material

Na presente tese, foram analisados exemplares pertencentes a 28 espécies, distribuídas em 13 gêneros e oito famílias (Tabela 1). Os animais amostrados foram por nós coletados em diferentes períodos da elaboração do trabalho (Licença IBAMA No. 14434-1 e 18681-1. Anexo) e por outros colaboradores. A identificação dos espécimes foi feita pelo Prof. Dr. Célio F. B. Haddad, do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP. Após o sacrifício, os exemplares foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e depositados na Coleção de Anfíbios (CFBH) do Departamento de Zoologia desse Instituto, com os seus respectivos números de tombo. Em algumas espécies, devido ao pequeno tamanho dos exemplares, não foi possível a determinação do sexo.

Tabela 1. Relação de exemplares analisados na presente Tese, indicando espécies, quantidade amostrada, sexo e número de tombo na Coleção de Anfíbios do Departamento de Zoologia

Espécie	Local de coleta	Quantidade e Sexo	Número CFBH
<i>Adelophryne baturitensis</i>	Viçosa do Ceará, CE	4?	25852, 54-55, 61
<i>Brachycephalus ephippium</i>	São José do Barreiro, SP	5F, 1?	22562-67
	Ilha do Cardoso, SP	3?	22572-74
<i>Cycloramphus boraceiensis</i>	Parati, RJ	2M, 7J	22611-13 22616-21
<i>Cycloramphus brasiliensis</i>	Guapimirim, RJ	1F, 2M	22601-03
<i>Cycloramphus ryakonastes</i>	Morretos, PR	2M, 1J	22568-70
<i>Flectonotus</i> sp.	Caraguatatuba, SP	1M	A815

<i>Gastrotheca microdiscus</i>	Pilar do Sul, SP	1M	11541
<i>Holoaden luederwaldti</i>	Campos do Jordão, SP	2F, 5M	19550-56
<i>Vitreorana eurygnatha</i>	Poços de Calda, MG	1M	A934
<i>Vitreorana uranoscopa</i>	São José do Barreiro, SP	1M, 2J	22587-89
<i>Ischnocnema guentheri</i>	Parati, SP	1M	22614
<i>Ischnocnema manezinho</i>	Morretos, SP	1M	22571
<i>Ischnocnema parva</i>	Biritiba Mirim, SP	2J	24223-24
<i>Leptodactylus furnarius</i>	Itirapina, SP	1M, 1J	04537 A621
<i>Leptodactylus fuscus</i>	Rio Claro, SP	1J	03997
<i>Leptodactylus hylaedactylus</i>	Amapá, AP	2F, 2M	17155-58
	Macapá, AP	5F, 3M, 1J	17146-54
	Porto Velho, RO	2F	17159-60
<i>Leptodactylus marmoratus</i>	Salesópolis, SP	1J	13650
	Santa Branca, SP	19F, 5M	11511-12 11514-25 11532-37
	São Luiz do Paraitinga, SP	1M, 1J	A499, A370
	Ilha de Alcatrazes, SP	4F, 1M, 1J	17137-43
	Ubatuba, SP	1M	13651
<i>Leptodactylus latrans</i>	Camanducaia, MG	2M	A677, A681
	Ilha do Bananal, GO	1J	25872
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Macapá, SP	1F, 4M	25873-76, A793
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Porto Nacional, TO	4M	07049-52
<i>Leptodactylus siphax</i>	Alto Paraizo, GO	1M	25877
<i>Leptodactylus</i> sp. (aff. <i>bokermanni</i>)	Santa Branca, SP	1M	11531
<i>Odontophrynus americanus</i>	Campos Novos, SC	5J	25867-71
<i>Physalaemus barrio</i>	São José do Barreiro, SP	2M	22541-42
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Biritiba Mirim, SP	1F, 2M	21017 21020-21
<i>Physalaemus moreirae</i>	Biritiba Mirim, SP	1M, 1J	22419-20
<i>Thoropa miliaris</i>	Petrópolis, RJ	1M	10173
<i>Zachaeus parvulus</i>	Petrópolis	1M	10175

F=fêmea

M=macho

J=jovem

?=sexo não identificado

Métodos e Técnicas

Basicamente, as preparações citológicas para o estudo de cromossomos mitóticos e meióticos dos anuros foram obtidas seguindo-se Schmid (1978) e Baldissera Jr et al. (1993). Esses procedimentos, assim como as demais técnicas citogenéticas de coloração e de marcação cromossômica, constam da apostila de autoria de S. Kasahara (não publicada) adotada no Laboratório de Citogenética de Anuros do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP. Os procedimentos são descritos a seguir de maneira sumarizada.

Obtenção das preparações citológicas a partir de epitélio intestinal, segundo Schmid (1978)

O animal é tratado previamente com colchicina 1% na proporção 0,1mL/10g do animal, por um período de 4 horas. Decorrido esse tempo, o exemplar é anestesiado com lidocaína 5% em creme, o animal o intestino inteiro é retirado e aberto longitudinalmente, sendo então colocado em solução hipotônica de KCl 0,075M e mantido por 45 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, dois procedimentos podem ser seguidos: (a) o intestino inteiro é colocado em uma placa de Petri com fixador Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético) recém preparado e gelado, e raspado com a ajuda de uma espátula e a suspensão, centrifugada passando pelo menos por dois banhos de fixador antes da preparação das lâminas; (b) o intestino inteiro é armazenado em tubo criogênico contendo fixador e nesse caso, um pequeno pedaço do intestino é raspado em fixador fresco, no momento da preparação da lâmina. Eventualmente, também foram

retirados testículos e amostras de outros tecidos ou órgãos e preparados de acordo com a metodologia descrita a seguir.

Obtenção das preparações citológicas a partir de baço, fígado, medula óssea e testículo, segundo Baldissera Jr et al. (1993)

Preparações citológicas foram também obtidas de medula óssea, fígado e testículos. Nesse caso, o exemplar é previamente tratado com fitohemaglutinina, na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso do animal, por cerca de 24 a 48 horas, e aproximadamente 12 horas antes do sacrifício, é injetada solução de colchicina 0,01%, na mesma proporção da fitohemaglutinina. O animal é anestesiado com lidocaína 5%, dissecado, são retiradas as tíbias e os fêmures, sendo o canal ósseo lavado sucessivamente com KCl 0,075M para remover toda a medula, e biópsias de fígado e os testículos são dissociadas com injeções de solução hipotônica. As suspensões celulares são incubadas a 37°C por 45 minutos e decorrido esse tempo, são feitos três pré-fixações por cinco minutos cada com cerca de seis gotas de fixador Carnoy. A suspensão é centrifugada por nove minutos a 1000 rpm, o sobrenadante descartado e são feitos dois novos banhos de fixador. As suspensões são mantidas em geladeira por cerca de 24 horas, e antes da confecção de lâminas, ou são transferidas para tubos criogênicos e armazenadas em freezer -20°C por um período mais longo.

Confecção das lâminas

As lâminas são imersas em álcool absoluto comercial e secas com um pano macio. São, então, colocadas sobre um suporte em banho-maria a 60°C, de modo que a água fique bem próxima da lâmina. Após alguns segundos uma ou duas gotas da suspensão desejada são pingadas e as lâminas rapidamente secas ao ar. Antes de aplicar as técnicas de coloração, as lâminas são envelhecidas por pelo menos 24 horas, em temperatura ambiente, ou são armazenadas em freezer.

Coloração convencional pelo Giemsa

A lâmina é submetida a uma hidrólise em HCl 1N por cinco minutos a 60°C, e após lavagem com água destilada, corada por sete minutos com solução de Giemsa em tampão de sódio e fosfato, pH 6,8 (1mL de solução comercial de corante em

30mL de tampão). Uma nova lavagem é feita e a lâmina é posta para secar a temperatura ambiente.

Marcação das regiões organizadoras de nucléolo pelo nitrato de prata (Ag-RON), segundo Howell e Black (1980)

A lamina é hidrolisada por três minutos em HCl 1N a 60°C, e em seguida, lavada com água destilada e seca ao ar. Sobre a lâmina são então pingadas uma gota de solução coloidal reveladora (gelatina a 2% com ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%. A lâmina é coberta com lamínula e incubada em banho-maria a 60°C por cerca de dois minutos em uma placa de Petri umedecida. Após lavagem com água destilada, é feita uma coloração rápida de cerca de 30 segundos com solução de Giemsa, a mesma utilizada para coloração convencional. Pode-se empregar a técnica de Ag-RON de maneira sequencial em lâminas previamente analisadas com colocação convencional e nesse caso, o óleo de imersão é retirado com lavagens sucessivas em álcool absoluto, e após reidratação da lâmina por cerca de 10 minutos e submetida ao procedimento acima, diminuindo-se, porém, o tempo de hidrólise para apenas um minuto.

Marcação de regiões heterocromáticas (banda C), segundo Sumner (1972)

É feita uma hidrólise da lâmina por 45 minutos em HCl 0,2N em temperatura ambiente. Após lavagem em água destilada, é incubada por um tempo variável de 20 a 40 segundos em solução de hidróxido de bário octahidratado a 5% a temperatura de 60°C. A lâmina é passada rapidamente em HCl 1N a 60°C, lavada e incubada por 45 minutos em 2xSSC, também a 60°C. Em seguida, a lâmina é corada por 15 minutos com solução de Giemsa, a mesma usada para coloração convencional.

Coloração por fluorocromos AT e GC-específicos com uso de Distamicina (A), segundo Schweizer (1980)

São colocados sobre a lâmina 120µL de DA, que é coberta com lamínula e incubada no escuro por 15 minutos. Em seguida, a lamínula é retirada com jatos de água corrente durante um minuto, a lâmina é incubada em tampão McIlvaine por cinco minutos, sobre ela, sem secá-la, são colocados 120µL de Cromomicina A₃

(CMA₃) e coberta com lamínula, e incubada por 60 minutos no escuro. A lamínula é retirada com jatos de água corrente e a lâmina novamente incubada em tampão McIlvaine por cinco minutos. Decorrido esse tempo, é imersa em solução de Distamicina A (DA), preparada com 100µL de solução estoque (0,2µg/mL) e 50mL de tampão McIlvaine, por 15 minutos. A lâmina é, então, lavada com jatos de água corrente por um minuto e incubadas em tampão McIlvaine por cinco minutos. Em seguida, a lâmina é cuidadosamente seca com papel absorvente e montada com lamínula, usando 50µL de sacarose 50% ou glicerol. A lâmina é guardada no escuro por um tempo variável de um a três meses antes da observação ao microscópio de luz ultra-violeta e com emprego de filtros adequados para cada fluorocromo.

Coloração por fluorocromos AT e GC-específicos sem uso de contracolorante, segundo Christian et al. (1998)

A lâmina é incubada em solução de formamida a 70% diluída em 2xSSC, aquecida a 70°C, por cerca de 2 minutos. São dados dois banhos em 2xSSC à temperatura ambiente por 2 minutos cada e, em seguida, a lâmina é passada em série alcoólica gelada (70%, 90% e 100%), por 2 minutos cada. Depois de bem seca, são colocados sobre ela 80µL de CMA₃ (20µg/mL em Cl₂Mg a 32mM). O material é coberto com lamínula e deve permanecer em câmara escura na geladeira por cerca de 30 minutos. Em seguida, a lâmina é passada por três banhos de 1x PBS à temperatura ambiente por 2 minutos cada e, sem que secá-las completamente, montar a lamínula com 50µL de DAPI + *antifading* (80µL de DAPI a 2µL/mL dissolvido em 1mL de *antifading*). Aguardar no mínimo 10 minutos, retirar o excesso de líquido com papel filtro e observar em microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

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

Preparação da sonda HM123 de Meunier-Rotival et al. (1979)

A sonda HM123 de *Xenopus laevis* foi marcada por nicktranslation utilizando o kit BioNickTM Labelling System da Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante.

Em tubo criogênico, no gelo, são colocados 5µL de dNTPmix 10x, 10µL de sonda (100ng/mL), 5µL de mix de enzima 10x, e 25µL de água ultra-pura. A solução é centrifugada a 15000rpm por 5 segundos e incubada a 16°C por 40 minutos. Decorrido o tempo de incubação, são colocados 5µL de stop-buffer, 5µL de acetato

de sódio 3M e 100µL de etanol absoluto gelado. O tubo com a solução é armazenado em freezer -20°C por 3 horas, e depois centrifugado a 15000rpm por 15 minutos. O sobrenadante é descartado e adicionado 50µL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 15000rpm por 5 minutos. O sobrenadante é novamente descartado e, após secar completamente a sonda, são acrescentados 20µL de água ultra-pura

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo Viegas-Péquignot (1992)

Sobre a lâmina é colocado 150µL de RNase (100µg/mL) e depois de coberta com lamínula, é incubada a 37°C por 1h. Decorrido esse tempo são dados três banhos de 3 minutos cada em solução de 2xSSC. A lâmina é, então, desidratada em série alcoólica a 50%, 75% e a 100%, por 3 minutos cada, e seca em temperatura ambiente. Desnaturar a lâmina em solução de formamida 70% a 70°C por 2 minutos, e lavar em 2xSSC gelado por 2 minutos, seguida de desidratação em série alcoólica por 2 minutos cada. Sem secar completamente a lâmina, é colocado 10µL de sonda por área de hibridação, que deve ser coberta com lamínula. A lâmina é incubada *overnight* a 37°C, em um recipiente forrado com papel toalha umedecido com solução de formamida utilizada para desnaturação. Em seguida, são dados dois banhos em formamida 50% a 37°C por dois minutos cada, e após, dois banhos em 2xSSC a 37°C por 2 minutos cada. São dados dois banhos em PBT por 5 minutos cada, e em seguida, é acrescentado na lâmina 100µL de anti-biotina e coberta com lamínula. A lâmina é incubada em placa umedecida com PBS ou PBT a 37°C por 45 minutos. Decorrido esse tempo, a lâmina é lavada em dois banhos de PBT por 5 minutos cada. É então colocado sobre a lâmina 100µL de anti-goat IgG-FITC, coberta com lamínula e incubada em placa umedecida com PBS ou PBT a 37°C por 45 minutos no escuro. Após a incubação, as lamínulas são coradas por 10 minutos em solução preparada com 100µL de DAPI (0,2mg/mL) em 80mL de água destilada, e em seguida montadas com 30µL de *antifading*.

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNA telomérico

Preparação da sonda telomérica (TTAGGG)_n

Os procedimento de obtenção e marcação da sonda telomérica foram baseados em uma reação de PCR de marcação utilizando 2,5µL de tampão da polimerase, 0,7µL de MgCl 2M, 2µL de dATP, 2µL de dCTP, 2µL de dGTP, 1µL de

dTTP, 1µL de 16-dUTP-biotina ou 11-dUTP-digoxigenina, 2µL de *primer* TLF (TTAGGG)₅, 2µL de *primer* TLR (CCCTAA)₅ e 8,5µL de água ultra pura. A PCR de marcação ocorreu com o seguinte ciclo:

Temperatura	Tempo	Repetições
95°C	5 min	1
95°C	40 seg	29
50°C	40 seg	29
68°C	2 min	29
68°C	5 min	1
12°C	forever	

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo Pinkel (1986)

A lâmina é incubada em solução de formamida a 70% em 2xSSC pH7, a 70°C por um tempo variável entre 2 e 5 minutos, dependendo do tempo de envelhecimento e, em seguida, é desidratada em série alcoólica gelada 70%, 90% e 100% por 2 minutos cada, e seca ao ar. Em um tubo criogênico são misturados 6µL da sonda com 24µL do mix de hibridação, preparado com 10,5µL de formamida, 6µL de sulfato dextrano a 50%, 3µL de 20xSSC e 4,5µL de água. A solução assim obtida é aquecida a 90°C por 10 minutos e transferida imediatamente para um recipiente com gelo. Sobre a lâmina, são colocados 30µL da e depois de coberta com lamínula, é incubada a 37°C por 18 horas. Após esse tempo, a lamínula é retirada e são dados dois banhos com formamida a 15% em 0,75xSSC a 43°C por 2 minutos cada, seguido de dois banhos com 2xSSC, também a 43°C, por 2 minutos cada, e, finalmente, mais três banhos com 2xSSC misturado com 0,1% de triton a 43°C por 2 minutos cada. É acrescentado 50µL de tampão de bloqueio (leite em pó desnatado a 5% em 2xSSC e 1% de triton) na lâmina e essa é incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem com 2xSSC, 6µL do anticorpo FITC diluído em 24µL do tampão de bloqueio são colocados na lâmina por 30 minutos a 37°C. Depois de lavagem em 2xSSC a 43°C por 2 minutos, são feitos dois banhos em 2xSSC com 0,1% triton a 43°C por 2 minutos cada. Em seguida, 6µL do anticorpo Anti-Avidina FITC na diluição 1:100 da solução comercial são colocados sobre a

lâmina, a qual é incubada por 30 minutos a 37°C. Finalmente, é feita uma lavagem em 2xSSC a 43°C por 2 minutos e duas em 2xSSC com 0,1% de triton a 43°C por dois minutos cada.

Quando a sonda é marcada com Digoxigenina, apenas um anticorpo é utilizado. Nesse caso, 30µL de anti-digoxigenina são colocados sobre o material e a lâmina é incubada a 37°C por 30 minutos.

Para a visualização no microscópio, a lâmina é corada com DAPI (100µL de DAPI na concentração de 2mg/mL em 80mL de água destilada) por 10 minutos e montada com lamínula usando 25µL de *antifading*.

Análise cromossômica

As preparações cromossômicas submetidas aos diferentes procedimentos de coloração e de marcação cromossômica foram analisadas ao microscópio de luz e as melhores metáfases ou fases meióticas posteriormente fotografadas ao fotomicroscópio Zeiss, sob um aumento de 1000x, utilizando-se filme preto e branco Copex HDP 13, da Agfa, o qual é revelado com Dektol diluído 1:4 a 25°C por 6 minutos. O processo de interrupção foi feito com ácido acético 28%, diluído na proporção de 1:19 em água destilada, e a fixação, com fixador endurecedor 1:1 por cerca de 15 minutos. Quando coradas com fluorocromos, as metáfases foram observadas e fotografadas sob luz ultravioleta em microscópio de fluorescência Leica DMLB com filtros adequados, sob um aumento de 1000x, utilizando-se filme preto e branco T-Max da Kodak. Para a revelação desse, é utilizado D76 ou Microdol puro, a 20°C, durante 9 minutos sob agitação, a interrupção feita com ácido acético 28%, diluído na proporção de 1:19 em água destilada, e a fixação, com fixador endurecedor a 20°C por 15 minutos. As cópias do material fotografado foram obtidas no ampliador fotográfico e feitas em papel Kodabrome II, RC, F-3, da Kodak ou em papel Ilford Multigrade IV-RC de Luxe.

Para a documentação fotográfica do material citológico foi utilizada também a captura digital de imagens, com luz comum ou de fluorescência, no fotomicroscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera digital Olympus modelo D71. As imagens foram capturadas e processadas no programa DPControler.

As montagens dos kariogramas foram feitas a partir de impressão das fotos obtidas de negativos, copiadas em papel ou digitalizados, bem como por meio de

programas de edição de imagens quando obtidas por captura. O emparelhamento dos pares foi feito por inspeção visual e em ordem decrescente de tamanho, adotando-se a nomenclatura proposta por Green and Sessions (1991, 2007) de cromossomos metacêntrico, submetacêntrico ou subtelocêntrico para os elementos de dois braços, e de telocêntrico, os que apresentavam somente um braço.

Referências Bibliográficas

Amaro-Ghilardi RC (2005) Estudos citogenéticos comparativos em 26 espécies da família Leptodactylidae (Amphibia, Anura). Tese de Doutorado Instituto de Biociências USP São Paulo SP.

Amaro-Ghilardi RC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y (2004) Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). *Caryologia* 57:53-65.

Amaro-Ghilardi RC, Skuk G, Sa R, Rodrigues MT, Yassuda YY (2006) Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. *Phyllomedusa* 5:119-133.

Ananias F, Bombeiro AL, Silva KDB, Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (2007a) Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae) and karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implications. *Acta Zoologica Sinica* 53:285-293.

Ananias F, Modesto ADS, Mendes SC, Napoli MF (2007b) Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. *Hereditas* 144:206-212.

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

Barale GD, Pinna Senn E, Lisanti JA (1990) Polimorfismo de bandas C ligado al sexo en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). Ver UNRC 10:51-53.

Barbieri F (1950) Observaciones sobre los cromosomas y espermatozoides en algunos batrachios del genero *Leptodactylus*. Acta Zool Lilloana IX:455-463.

Barrio A (1973) *Leptodactylus* geminus, una nueva especie del grupo *fuscus* (Anura, Leptodactylidae). Physis 32:199-206.

Barrio A, Rinaldi de Chieri P (1970) Estudios citogeneticos sobre el genero *Pleurodema* y sus consecuencias evolutivas (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Physis 30:309-319.

Batistic RF, Beçak W, Beçak ML (1969) Variação cromossomica no genero *Pseudopaludicola* (Anura). Ciência e Cultura 21:260.

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

Beçak ML, Beçak W (1974) Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae - Amphibia). Experientia 30:624-625.

Beçak ML, Beçak W, Rabello MN (1966) Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frogs *Odontophrynus americanus*. Chromosoma 19:188-93.

Beçak ML, Beçak W, Rabello MN (1967) Further studies on polyploid amphibians (Ceratophryidae) I. Mitotic and meiotic aspects. Chromosoma 22:192-201.

Beçak ML, Beçak W, Vizotto LD (1970) A diploid population of the polyploid amphibian *Odontophrynus americanus* and an artificial intraspecific triploid hybrid. Experientia 26:545-546.

Berneck BVM, Costa COR, Garcia PCA (2008) A new species of *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic Forest of São Paulo State, Brazil. Zootaxa 1795: 46-56.

Bianchi NO, Molina JO (1967) DNA replication patterns in somatic chromosomes of *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Anura) Chromosoma 22:391-400.

Bianchi NO, Bianchi MS, Vidal-Rioja L (1973) Hetrochromatin late replication and secondary constrictions in the complement of *Leptodactylus ocellatus*. Caryologia 26:397-403.

Bogart JP (1967) Chromosome of the South American amphibians family Ceratophryidae with a reconsideration of the taxonomic status of *Odontophrynus americanus*. Can J Genet Cytol 9:531-542.

Bogart JP (1970) Los cromosomas de anfibios anuros del género *Eleutherodactylus*. Act IV Congr Latin Zool 1:65-78.

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

Bogart JP (1974) A karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). Copeia 3:728-737.

Bogart JP, Wasserman AO (1972) Diploid-poliploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. Cytogenetics 11:7-24.

Brum-Zorrilla N, Saez FA (1968) Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia, Abura). Experientia 24:969.

Campos JRC, Kasahara S (2006) Os cromossomos dos anfíbios anuros do gênero *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae: Eleutherodactylinae). Publ. Ci. Biol. Saúde 12: 27-38.

Campos JRC, Ananias F, Haddad CFB, Kasahara S (2008) Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae). *Micron* 39:151-159.

Campos JRC, Ananias F, Brasileiro CA, Yamamoto M, Haddad CFB, Kasahara S (2009) Chromosomal evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. *Hereditas* 146:104-111.

Caramaschi U, Feio RN, São-Pedro VA (2008) A new species of *Leptodactylus* Fitzinger (Anura, Leptodactylidae) from Serra do Brigadeiro, State of Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Zootaxa* 1861:44-54.

Christian A, McNiel E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Waldren C, Bedford J (1998) A versatile image analyses approach for simultaneous chromosome identification and localisation of FISH probes. *Cytogenet Cell Genet* 82:172-179.

Cisneros-Heredia DF, McDiarmid RW (2007) Revision of the characters of Centrolenidae (Amphibia: Anura: Athesphatanura), with comments on its taxonomy and the description of new taxa of glassfrogs. *Zootaxa* 1572:1-82.

Darst CR, Cannatella DC (2004) Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 31:462-475.

Denaro L (1972) Karyotypes of Leptodactylidae anurans. *J Herpetology* 6:71-74.

Dutrillaux B, Couturier J (1981) *La Pratique de l'Analyse Chromosomique*. Paris, Masson, pp 86.

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

Ford LS, Cannatella DC (1993) The major clades of frogs. *Herpetol Monog* 7:94-117.

Frost DR (1985) *Amphibians Species of the World. A Taxonomic and Geographical Reference*. Kansas: Allen Press, Inc, and The Association of Systematics Collection, pp 732.

Frost DR (2010) *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History>, New York, USA.

Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, De 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 (2006) The amphibian tree of life. *Bull of the Am Museum of Nat Hist* 297:1-370.

Garcia PCA, Berneck BVM, Costa COR (2009) A new species of *Paratelmatobius* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from Atlantic ain Forest of southeastern Brazil. *South Am J of Herpetology* 4(3):217-224.

Giaretta AA, Costa HCM (2007) A redescription of *Lepodactylus joly* Sazima and Bokermann (Anura, Leptodactylidae) and the recognition of a new closely related species. *Zootaxa* 1608:1-10.

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

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

Green DM, Sessions SK (2007) Karyology and Cytogenetics. In: *Amphibian Biology, Volume 7. Systematics*. Heatwole H, Tyler M (Eds). Surrey Beatty and Sons, pp. 2756-2841.

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S (2007) Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n=24$ to $2n=22$ in the genus. *Genetica* 130:281-291.

Grützner F, Rens W, Tsend-Ayush E, El-Moghharbel N, O'Brien PCM, Jones RC, Ferguson-Smith MA, Graves JAM (2004) In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* 3021:1-5.

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

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

Heyer WR (1972) The status of *Leptodactylus pumilo* Boulenger (Amphibia, Leptodactylidae) and the description of a new species of *Leptodactylus* from Ecuador. *Contrib Sci Los Angeles Co Mus Hist Nat* 231:1-8.

Heyer WR (1975) *Adenomera lutzii* (Amphibia:Leptodactylidae), a new species of frog from Guyana. *Proc of the Bio Society of Washington* 88:315-318.

Heyer WR (1978) Systematic of fuscus group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae) *Sci Bull Nat Hist Mus Los Angeles Co.* Nº 29, pp 85.

Heyer WR, Diment MJ (1974) The karyotype of *Vanzolinius discodactylus* and comments on usefulness of karyotypes in determining relationships in the *Leptodactylus*-complex (Amphibia, Leptodactylidae). *Proc of the Bio Society of Washington* 87:327-336.

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

Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL, Haddad CFB (2003) Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae), from Brazil. *Cytogenetics and Cell Genetics* 103:155-162.

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

Kuramoto M (1990) A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. Bull Fukuoka Univ Educ 39:83-127.

León PE (1970) Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. Rev Biol Trop 17:119-124.

Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1998) Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. Chrom Res 6:621-628.

Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1999) Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). Can J Zool 77:624-631.

Lourenço LB, Garcia PC, Recco-Pimentel SM (2000) Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae) with phylogenetic comments. Hereditas 113:201-209.

Lourenço LB, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM (2003) Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae) and new insights on the relationship with the leptodactylid *Paratelmatobius*. The Italian J of Zoology 70:183-190.

Lourenço LB, Bacci-Júnior M, Martins VG, Recco-Pimentel SM, Haddad CFB (2007) Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). Genetica 132:255-266.

Lynch JD (1971) Evolutionary relationship, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. Misc Publ Mus Nat Univ Kansas 53:1-238.

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

Milani M, Cassini CS, Recco-Pimentel SM, Lourenço LB (2010) Karyotypica data reveals an interpopulational variation in *Physalaemus olfersii* and the first report of a supernumerary chromosome in the genus. Animal Biology Journal, no prelo.

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

Morescalchi A (1970) Some trends of karyological evolution in the anura. *Act IV Congr Latin Zoll* 1:159-166.

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

Morescalchi A, Gargiulo G (1968) Su alcune relazione carilogiche del genere *Bufo* (Amphibia, Salientia). *Rend Accad Sci Fis Mat* 35:117-120.

Morescalchi A, Gargiulo G, Olmo E (1968) Note citotassonomiche sui Leptodactylidae (Amphibia, Salientia). *Boll Zoll* 35:333-334.

Nascimento LB, Caramaschi U, Cruz CAG (2005) Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq do Museu Nac Rio de Janeiro* 63:297-320.

Noronha RCR (2006) Comportamento meiótico e evolução dos cromossomos sexuais na família Phyllostomidae (Chiroptera): análise por hibridação *in situ* com fluorocromos. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas, UFPA, Belém, PA.

Oliveira EHC, Habermann FA, Lacerda O, Sbalqueiro IJ, Wienberg J, Müller S (2005) Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma*, 114:338-343.

Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'Brien PCM, Yang Y, Rens W, Barros RMS, Noronha RCR, Rissino J, Oliveira EHC, Ferguson-Smith MA (2005) Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Res* 13:339-347.

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

Rosa C, Aguiar Jr O, Giaretta AA, Recco-Pimentel SM (2003) Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in leptodactylid frog. *Copeia*, 1:166-174.

Rosset SD, Baldo D, Lanzone C, Basso NG (2006) Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *J of Herpetol* 40:465-477.

Ruvinsky I, Maxon LR (1996) Phylogenetic relationship among Bufonoid frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 3:533-547.

Saez FA, Brum N (1960) Chromosome of South American amphibians. *Nature* 185: 945.

Salas N (2006) Análisis cromosómicos de *Odontophrynus americanus*, *O. achalensis*, *O. cordobae* y *O. occidentalis* (Anura: Leptodactylidae) de la provincial de Córdoba, Argentina. *Rev Esp Herp* 20:31-38.

Savage JM, De Weese JE (1979) A new species of leptodactylid frog, genus *Eleutherodactylus*, from Cordillera de Talamanca, Costa Rica. *Bull S Calif Acad Sci* 78:107-115.

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

Schmid M, Haaf T, Schempp W (1985) Chromosome Banding in Amphibia IX. The diploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma* 91:172-184.

Schmid M, Steinlein C, Feichtinger W (1992) Chromosome Banding in Amphibia XVII. First demonstration of multiple sex chromosome in amphibian: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma* 101:284-92.

Schmid M, Haaf T, Steinlein C, Nanda I, Mahony M (2002a) Chromosome banding in Amphibia XXV. Karyotype evolution and heterochromatin characterization in Australian *Mixophyes* (Anura, Myobatrachidae). Cytogenet Genome Res 97:239-253.

Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Visbal Garcia R, Fernández Badillo A (2003) Chromosome Banding in Amphibia. XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). Cytogenet Genoma Res 101:62-73.

Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Rupprecht A, Haaf T, Kaiser H (2002b) Chromosome banding in amphibia XXIII: Giant sex chromosomes and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Leptodactylidae). Cytogenet Genome Res 97:81-94.

Schweizer D (1980) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma 58:307-324.

Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (1999) Nucleolus organizer region in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hereditas 131:135-141.

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

Silva APZ, Baldissera Jr FA, Haddad CFB, Kasahara S (2000b) Karyotypes and nucleolus organizer regions in four species of the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). Iheringia - Sér Zool 88:158-164.

Silva APZ, Haddad CFB, Galassi GG, Kasahara S (2006) Multiple organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. Genetica 130:281-291.

Silva APZ, Garcia PCA, Martins VG, Bacci M, Kasahara S (2004) Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. Amphibia-Reptilia 25:185-196.

Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2010) Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/> (acesso em janeiro de 2010).

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

Sumner AT (1990) C-banding and related methods. In: *Chromosome Banding*. Unwin Hyman (Ed). London, pp. 39-69.

Tomita R, Murai J, Miura Y, Ishihara H, Liu S, Kubotera Y, Honda A, Hatta R, Kuroda T, Hamada H, Sakamoto M, Munemura I, Nunomura O, Ishikawa K, Genda Y, Kawasaki S, Suzuki K, Meksem K, Kobayashi K (2008) Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene *L³* of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences. *Theor Appl Genet* 117:1107–1118.

Ventura K, O'Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y, Ferguson-Smith MA (2009) 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. *Chromosome Research* 17:1063-1078.

Verma RS, Babu A (1995) *Human Chromosomes. Principles and Techniques*, New York, McGraw-Hill, pp 419.

Viegas-Péquignot E (1992) *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: *In situ hybridization: a practical approach* (Ed D G Wilkinson) Oxford University Press, pp137-158.

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

Weimer J, Kiechle M, Senger G, Wiedemann U, Ovens-Raeder A, Schuierer S, Kautza M, Siebert R, Arnold N (1999) An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Res* 7:355-362.

Constituição cariotípica em seis espécies de *Leptodactylus* (Leptodactylidae) e em 18 representantes das famílias Brachycephalidae, Centrolenidae, Cycloramphidae, Eleutherodactylidae, Hemiphractidae e Leiuperidae (Amphibia, Anura)

Resumo

Considerando as grandes mudanças ocorridas em Leptodactylidae após as revisões de filogenia, realizadas principalmente com base em sequenciamento gênico, apresentamos os dados citogenéticos de seis espécies de *Leptodactylus* e 18 representantes de famílias relacionadas à Leptodactylidae, totalizando 12 cariótipos inéditos. Foram encontrados três números diploides distintos, sendo $2n=20$ nos exemplares de *Vitreorana eurygnatha* e *V. uranoscopa* (Centrolenidae); $2n=22$ em *Adelophryne baturitensis* (Eleutherodactylidae), *Brachycephalus ephippium*, *Ischnocnema guentheri*, *I. manezinho* e *I. parva* (Brachycephalidae), *Leptodactylus furnarius*, *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. mystaceus*, *L. podicipinus* e *L. syphax* (Leptodactylidae), *Odontophrynus americanus* (Cycloramphidae), *Physalaemus barroioi*, *P. cuvieri* e *P. moreirae* (Leiuperidae); e $2n=26$ para *Cycloramphus boraceiensis*, *C. brasiliensis*, *C. ryakonastes*, *Thoropa miliaris* e *Zachaenus parvulus* (Cycloramphidae), *Flectonotus* sp. e *Gastrotheca microdiscus* (Hemiphractidae). O padrão de Ag-RON e de distribuição da banda C foi determinado para a grande maioria dos representantes, sendo espécie-específico em vários casos. Os cariótipos das espécies aqui amostradas, juntamente com os disponíveis na literatura, indicam a formação de agrupamentos com constituições cariotípicas semelhantes, os quais coincidem com os clados das árvores filogenéticas aceitas atualmente. Portanto, os dados cromossômicos obtidos no presente trabalho dão suporte às reestruturações propostas para a taxonomia e sistemática da antiga família Leptodactylidae.

Introdução

As grandes revisões de taxonomia e sistemática realizadas nos últimos cinco anos promoveram substanciais mudanças em quase toda a classe Amphibia (FAIVOVICH et al., 2005; FROST et al., 2006; GRANT et al., 2006; HEDGES et al., 2008), tendo sido muitas espécies realocadas em outras famílias que foram criadas ou revalidadas. Uma família que passou por uma grande reestruturação foi Leptodactylidae que, até o ano de 2006, compreendia 57 gêneros e, após a revisão de Frost et al. (2006), foi reduzida para 11, passando, logo em seguida, com Grant et al. (2006), para apenas quatro, isto é, *Leptodactylus*, *Hydrolaetare*, *Paratelmatobius* e *Scythrophrys*. A grande maioria das revisões foi baseada principalmente em dados de sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares, sem levar em conta nenhuma informação citogenética. Apenas no trabalho de Faivovich et al. (2005) foram considerados alguns poucos dados citogenéticos.

A antiga família Leptodactylidae foi considerada não-monofilética sob o ponto de vista da morfologia, osteologia, miologia e, mesmo com os dados recentes de sequenciamento de DNA, permaneceram ainda alguns questionamentos. A parafilia já havia sido constatada por Lynch (1971), com base em caracteres morfológicos e, mais tarde, por outros autores que alegaram não existirem sinapomorfias evidentes para o grupo (FORD e CANATELLA, 1993; RUVINSKY e MAXON, 1996; HAAS, 2003; DARST e CANATELLA, 2004; FAIVOVICH et al., 2005), porém, nenhum novo arranjo taxonômico foi proposto, a não ser algumas modificações na divisão das subfamílias.

Segundo levantamentos realizados por King (1990), Kuramoto, (1990), Amaro-Ghilardi (2005) e Campos e Kasahara (2006), o número de espécies de Leptodactylidae cariotipadas correspondia a mais de 270 entre as cerca de 1100 espécies conhecidas. Na presente data, após as revisões de 2006, totalizam aproximadamente 40, distribuídas em quase todos os gêneros, com exceção de *Hydrolaetare*, ainda sem nenhuma espécie cariotipada. Os atuais leptodactilídeos possuem uma ampla distribuição geográfica e, em particular, com abundância no Brasil, incluindo muitos casos de endemismo (FROST, 2010). Mesmo com ocorrência em quase todo o território brasileiro, são relativamente escassos os estudos citogenéticos realizados em representantes da nossa fauna, sendo a maioria dos trabalhos da década de 1970 e baseados apenas em coloração convencional (BEÇAK, 1968; BEÇAK et al., 1970; BOGART, 1970; DENARO, 1972, entre outros). Mais recentemente foram realizados trabalhos com várias técnicas de coloração diferencial (KASAHARA et al., 1998; SILVA et al., 2000a; SILVA et al., 2004; LOURENÇO et al., 2000; LOURENÇO et al., 2003; LOURENÇO et al., 2007; AMARO-GHILARDI, 2005; AMARO-GHILARDI et al., 2006; CAMPOS et al., 2009).

No presente trabalho, foram analisadas espécies de *Leptodactylus* (Leptodactylidae) e de representantes de Brachycephalidae, Centrolenidae, Cycloramphidae, Eleutherodactylidae, Hemiphractidae e Leiuperidae, sendo que a maior parte deles, com exceção de *B. ephippium*, *V. eurygnatha* e *V. uranoscopa*, estava incluída na família Leptodactylidae. A espécie *B. ephippium*, foi amostrada por ter relação com alguns representantes que pertenciam a Leptodactylidae, enquanto *V. eurygnatha* e *V. uranoscopa* pertencem a família Centrolenidae, que foi considerada por diversos autores como próxima dos leptodactilídeos. Tais análises foram baseadas em coloração convencional, marcação de Ag-RON e bandamento C, com a finalidade de aumentar o conhecimento sobre as constituições cariotípicas e os possíveis mecanismos envolvidos na sua diferenciação, bem como para avaliar em que medida os dados citogenéticos dão suporte às alterações propostas pelas revisões de taxonomia e sistemática.

Material e Métodos

Análises citogenéticas foram feitas em 24 espécies de 12 gêneros de sete famílias (Tabela 1), totalizando 86 exemplares provenientes de diversas localidades do Brasil (Tabela 1 do item Material). Todos os exemplares amostrados estão depositados na Coleção de Anfíbios CFBH do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de medula óssea, fígado, baço e testículos, de acordo com Baldissera Jr et al. (1993), ou de epitélio intestinal, segundo Schmid (1978), com pequenas adaptações em ambos os casos. A coloração convencional foi realizada com Giemsa diluído em tampão de sódio-fosfato pH 6,8. Ag-RON e bandamento C foram obtidos pelas técnicas de Howell e Black (1980) e Sumner (1972), respectivamente. Os cromossomos com dois braços foram classificados por inspeção visual como metacêntrico, submetacêntrico ou subtelocêntrico, e os de um só braço, como telocêntrico, seguindo a nomenclatura de Green e Sessions (1991, 2007).

Resultados

Os resultados obtidos são apresentados de forma sumarizada na Tabela 1 e descritos a seguir.

Família Leptodactylidae

As espécies *L. furnarius*, *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. mystaceus* e *L. syphax* apresentam $2n=22$ e $NF=44$ (Figuras 1, 2a, 2c). O par 1 é um metacêntrico grande; os pares 2 a 7 são grandes e médios, apresentando uma diminuição gradativa de tamanho, com os pares 2, 3 e 7 submetacêntricos, o par 4 subtelocêntrico e os pares 5 e 6 metacêntricos; os demais pares são pequenos e têm morfologia de difícil definição, sendo do tipo metacêntrico ou submetacêntrico. *Leptodactylus podicipinus* apresenta também $2n=22$, mas $NF=36$ (Figura 2b), devido à morfologia telocêntrica dos pares 7, 9, 10 e 11, sendo os demais equivalentes em tamanho e morfologia aos cromossomos das outras espécies. A Ag-RON está localizada nos braços curtos dos cromossomos 8, na região terminal em *L. fuscus* e *L. latrans* (Figura 1c) e intersticial em *L. furnarius* e *L. podicipinus* (Figuras 1a, 2b), enquanto em *L. mystaceus* está na região intersticial dos braços curtos do mesmo par (Figura 2a); em *L. syphax* a marcação está inequivocamente na região intersticial dos braços curtos dos cromossomos 3 (Figura 2a). Constricção secundária evidente foi observada no mesmo sítio da Ag-RON em metáfases de *L. mystaceus*, *L. podicipinus* e *L. syphax*, não tendo sido visualizada em nenhum cromossomo das demais espécies. A banda C marca predominantemente na região centromérica (Figuras 11, 12), no entanto, as regiões terminais de alguns cromossomos aparecem mais coradas, como em *L.*

syphax. Bandas intersticiais são visualizadas em sítios coincidentes com a Ag-RON em todas as espécies e nos braços curtos dos cromossomos 3 e 6 de *L. latrans*, nos braços longos dos cromossomos 3 e 4 e braços curtos dos cromossomos 8 e 9 de *L. syphax* que parece também mostrar bandas pericentroméricas, principalmente nos pares 1, 4 e 7.

Família Brachycephalidae

As espécies *B. ephippium*, *I. guentheri*, *I. manezinho* e *I. parva* apresentam $2n=22$ e $NF=44$ (Figuras 3, 4). O par 1 é um metacêntrico grande; os pares 2 a 6 grandes e médios, com diminuição gradativa de tamanho; os demais pares, de 7 a 11 são pequenos. As três espécies de *Ischnocnema* apresentam pares 1 e 6 metacêntricos; pares 2, 3, 4, 5 e 7 submetacêntricos; e pares 8, 9, 10 e 11 de difícil definição morfológica, sendo metacêntricos ou submetacêntricos. *Brachycephalus ephippium* mostra um cariótipo equivalente ao das espécies de *Ischnocnema*, exceto o par 7 que é, indubitavelmente, subtelocêntrico e do par 5 que é metacêntrico. Em *I. guentheri* e *I. manezinho*, a Ag-RON está localizada intersticialmente nos braços longos dos cromossomos 6 (Figuras 4a, 4b), em *I. parva* a marcação está na região terminal dos braços curtos dos cromossomos 6 (Figura 4c), enquanto que em *B. ephippium* é visualizada na região proximal dos braços longos dos cromossomos 8 (Figura 3). Nos cariótipos de *I. guentheri* e *I. manezinho*, há uma evidente constrição secundária, em sítio coincidente com a Ag-RON; em *I. parva*, a constrição secundária foi observada nos braços curtos dos cromossomos 3 em sítio que não foi impregnado pela prata. O padrão de bandamento C foi determinado em quase todas as espécies, com exceção de *I. manezinho*, e se caracteriza por fortes e grandes blocos na região centromérica-pericentromérica dos cromossomos (Figura 13). Adicionalmente, em *B. ephippium* são visualizadas marcações bem sutis nos braços longos dos cromossomos 7 e 9.

Família Centrolenidae

As espécies *V. eurygnatha* e *V. uranoscopa* apresentam $2n=20$ e $NF=40$ (Figura 5), sendo observada uma diminuição gradativa de tamanho dos pares grandes e médios 1 ao 8; os pares 9 e 10 são nitidamente pequenos. Os pares 1, 5, 6 e 9 são do tipo metacêntrico, enquanto os pares 2, 3, 4, 7, 8 e 10, submetacêntricos. A Ag-RON de *V. eurygnatha* está na região intersticial dos braços

curtos dos cromossomos 6 (Figura 5a) e, em *V. uranoscopa*, na região proximal dos braços curtos dos cromossomos 2 (Figura 5b). Uma evidente constrição secundária coincidente com o sítio da Ag-RON pode ser visualizada em *V. eurygnatha*. A heterocromatina C-positiva nas duas espécies é observada na região centromérica de todos os cromossomos e nos sítios coincidentes com a Ag-RON (Figura 14). Adicionalmente, em *V. uranoscopa* é visualizada uma banda C intersticial nos braços longos dos cromossomos 7.

Família Cycloramphidae

A espécie *O. americanus* apresenta $2n=22$ e $NF=44$, enquanto *C. boraceiensis*, *C. brasiliensis*, *C. ryakonastes*, *T. miliaris* e *Z. parvulus* possuem $2n=26$ e $NF=52$, exceto *C. boraceiensis* que mostra $NF=50$ (Figuras 6, 7). Em todas as espécies o par 1 é um metacêntrico grande; são grandes e médios, com diminuição gradativa de tamanho, os pares 2 a 7 em *O. americanus*, enquanto em *C. boraceiensis*, *C. brasiliensis*, *C. ryakonastes*, *T. miliaris* e *Z. parvulus*, correspondem aos pares 2 a 5; os demais pares, 8 a 11 na primeira espécie e 6 a 13 nas demais, são pequenos e com morfologia de difícil classificação. Em *O. americanus* os cromossomos 1, 5, 6 e 7 são metacêntricos e os pares 2, 3 e 4, submetacêntricos, enquanto os demais pares são do tipo metacêntrico ou submetacêntrico. Nas outras cinco espécies os cromossomos 1 e 5 são metacêntricos, 2, 3 e 4, submetacêntricos e os pares de 6 a 13 são do tipo metacêntrico ou submetacêntrico, exceto em *C. boraceiensis* no qual o par 6 é, sem dúvida, telocêntrico. A Ag-RON está na região intersticial dos braços curtos do par 3 em *O. americanus* (Figura 6a), e no par 6 das outras espécies, exceto *C. ryakonastes* na qual o padrão não foi obtido, sendo na região proximal dos braços longos em *C. boraceiensis* e *T. miliaris* (Figura 6b, 7b), na região intersticial dos braços longos em *C. brasiliensis* (Figura 6c) e na região terminal dos braços longos em *Z. parvulus* (Figura 7c). Constrição secundária evidente é visualizada na mesma posição da Ag-RON em *O. americanus*, *C. boraceiensis* e *C. brasiliensis*. A marcação da banda C em *O. americanus* é bem sutil (Figura 15a), sendo localizada na região centromérica de alguns cromossomos, intersticialmente nos cromossomos 3, no mesmo sítio da Ag-RON, e nos braços longos dos cromossomos 9. *Cycloramphus boraceiensis* e *C. brasiliensis* mostram padrão centromérico de banda C (Figuras 15b, 16a), sendo as marcações mais evidentes na segunda espécie a qual, além disso, tem banda C na. Banda C

coincidente com o sítio da Ag-RON não foi visualizada somente em *C. brasiliensis*. Em *T. miliaris* as bandas C são também centroméricas (Figura 16b), e as regiões terminais da maioria dos pares cromossômicos aparecem marcadas por essa técnica. Além disso, bandas intersticiais são visualizadas nos braços curtos e longos dos pares 1, 3 e 5, nos braços curtos do par 2 e nos braços longos dos pares 4 e 6, sendo esse último o portador da Ag-RON.

Família Eleutherodactylidae

A espécie *A. baturitensis* tem $2n=22$ e $NF=44$ (Figura 8). O par 1 é um metacêntrico grande; os pares 2 a 8 são grandes e médios com variação gradativa de tamanho, e os demais, pequenos. Os pares 1 e 6 são metacêntricos, o 2, 3, 8 e 11, submetacêntricos, enquanto os pares 4, 5, 7, 9 e 10 são subtelocêntricos. A Ag-RON está na região intersticial dos braços longos do par 4 (Figura 8). Apesar de as metáfases disponíveis pelo bandamento C estarem incompletas, pôde-se notar que na espécie ocorre pouca heterocromatina centromérica e que o sítio da Ag-RON mostra-se C-positivo.

Família Hemiphractidae

As espécies *Flectonotus* sp. e *G. microdiscus* apresentam $2n=26$, cromossomos, porém com $NF=42$ e $NF=50$, respectivamente (Figura 9). Em ambas, o par 1 é um metacêntrico grande; os pares 2 a 5 são grandes e médios, com variação gradativa de tamanho, e os demais pares 6 a 13, pequenos. No cariótipo de *Flectonotus* sp., os pares 2, 3, 4 são submetacêntricos e os pares 5, 8, 11, 12 e 13, telocêntricos, os pares 6, 7, 9 e 10 são do tipo metacêntrico ou submetacêntrico. Em *G. microdiscus* os pares 2 a 5 são submetacêntricos, os pares 6 a 12 são metacêntricos ou submetacêntricos, enquanto o par 13 é, inequivocamente, telocêntrico. A Ag-RON em *G. microdiscus* está na região terminal dos telocêntricos 13 (Figura 9b), não tendo sido localizada em *Flectonotus* sp. O padrão de banda C foi obtido apenas para *G. microdiscus* e se caracteriza por marcações centroméricas em todos os cromossomos e pericentromérica nos pares 3, 4, 10 e 11; os cromossomos 2 e 3 têm marcações na região terminal dos braços longos e apenas o par 5 possui marcação intersticial, também nos braços longos (Figura 17).

Família Leiuperidae

As espécies *P. barrioi* e *P. cuvieri* mostram $2n=22$ e $NF=44$, enquanto *P. moreirae* também com $2n=22$ tem $NF=42$ (Figura 10). Nas três espécies o cromossomo 1 é um metacêntrico grande, os pares 2 a 7 são grandes e médios com variação gradativa de tamanho, e os pares 8 a 11, pequenos. Em *P. barrioi* e *P. cuvieri* os pares 5 e 6 são metacêntricos e 2, 3, 4, e 7, submetacêntricos; enquanto em *P. moreirae* os pares 2 a 7 são submetacêntricos. Os demais pares 8 a 11 são metacêntricos ou submetacêntricos em todas as três espécies, com exceção do par 11 de *P. moreirae* que é telocêntrico. A Ag-RON está na região terminal dos braços longos do par 11 em *P. barrioi* (Figura 10a), na região intersticial dos braços longos do par 8 em *P. cuvieri* (Figura 10b) e na região intersticial dos braços curtos do par 6 em *P. moreirae* (Figura 10c). Em todas as espécies foram observadas uma evidente constrição secundária no mesmo sítio da Ag-RON. A heterocromatina C-positiva está na região centromérica de todos os cromossomos das três espécies (Figura 18). Em *P. barrioi* são observadas bandas pericentroméricas nos braços curtos dos cromossomos 3 e braços longos dos cromossomos 7, além de banda C na região coincidente com a Ag-RON. Em *P. cuvieri*, bandas intersticiais são visualizadas nos braços curtos dos cromossomos 2 e 8, sendo nesse último coincidente com o sítio da Ag-RON. Em *P. moreirae*, bandas intersticiais são observadas apenas nos braços longos dos cromossomos 5 e, muito sutilmente, portanto nem sempre visível, na região da Ag-RON, ou seja, nos braços curtos do par 6.

Tabela 1. Morfologia dos cromossomos, número diploide/número fundamental de braços e posição da Ag-RON nas espécies analisadas

Família Gênero Espécie	par	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	2n/NF	Ag- RON
Leptodactylidae																
Leptodactylus																
<i>furnarius</i>		M	SM	SM	ST	M	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	8qi
<i>fuscus</i>		M	SM	SM	ST	M	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	8pt
<i>latrans</i>		M	SM	SM	ST	M	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	8pt
<i>mystaceus</i>		M	SM	SM	ST	M	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	8pi
<i>podicipinus</i>		M	SM	SM	ST	M	M	T	M/SM	T	T	T			22/36	8qi
<i>syphax</i>		M	SM	SM	ST	M	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	3pi
Brachycephalidae																
Brachycephalus																
<i>ephippium</i>		M	SM	SM	SM	SM	M	ST	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	8qp
Ischinocnema																
<i>guentheri</i>		M	SM	SM	SM	SM	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	6qi
<i>manezinho</i>		M	SM	SM	SM	SM	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	6qi
<i>parva</i>		M	SM	SM	SM	SM	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	6pt
Centrolenidae																
Vitreorana																
<i>eurygnatha</i>		M	SM	SM	SM	M	M	SM	SM	M	SM				20/40	6pi
<i>uranoscopa</i>		M	SM	SM	SM	M	M	SM	SM	M	SM				20/40	2pp
Cycloramphidae																
Odontophrynus																
<i>americanus</i>		M	SM	SM	SM	M	M	M	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	3pi
Cycloramphus																
<i>boraceiensis</i>		M	SM	SM	SM	M	T	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	26/50	6qt
<i>brasiliensis</i>		M	SM	SM	SM	M	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	26/52	6qi
<i>ryakonastes</i>		M	SM	SM	SM	M	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	26/52	
Thoropa																
<i>miliaris</i>		M	SM	SM	SM	M	M/SM	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	26/52	6qp
Zachaeus																
<i>parvulus</i>		M	SM	SM	SM	M	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	26/52	6qt
Eleutherodactylidae																
Adelophryne																
<i>baturitensis</i>		M	SM	SM	ST	ST	M	ST	SM	ST	ST	SM			22/44	4qi
Hemiphractidae																
Flectonotus																
sp.		M	SM	SM	SM	T	M/SM	M/SM	T	M/SM	M/SM	T	T	T	26/42	
Gastrotheca																
<i>microdiscus</i>		M	SM	SM	SM	SM	M/SM	M/SM	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM	T	26/50	13qt
Leiuperidae																
Physalaemus																
<i>barrio</i>		M	SM	SM	SM	M	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	11qt
<i>cuvieri</i>		M	SM	SM	SM	M	M	SM	M/SM	M/SM	M/SM	M/SM			22/44	8qi
<i>moreirae</i>		M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M/SM	M/SM	M/SM	T			22/42	6pi

M =metacêntrico
SM =submetacêntrico
ST =subtelocêntrico
T =telocêntrico
M/SM=metacêntrico ou submetacêntrico

pi=região intersticial dos braços curtos
pt= região terminal dos braços curtos
pp= região proximal dos braços curtos
qp= região proximal dos braços longos
qi= região intersticial dos braços longos
qt= região terminal dos braços longos

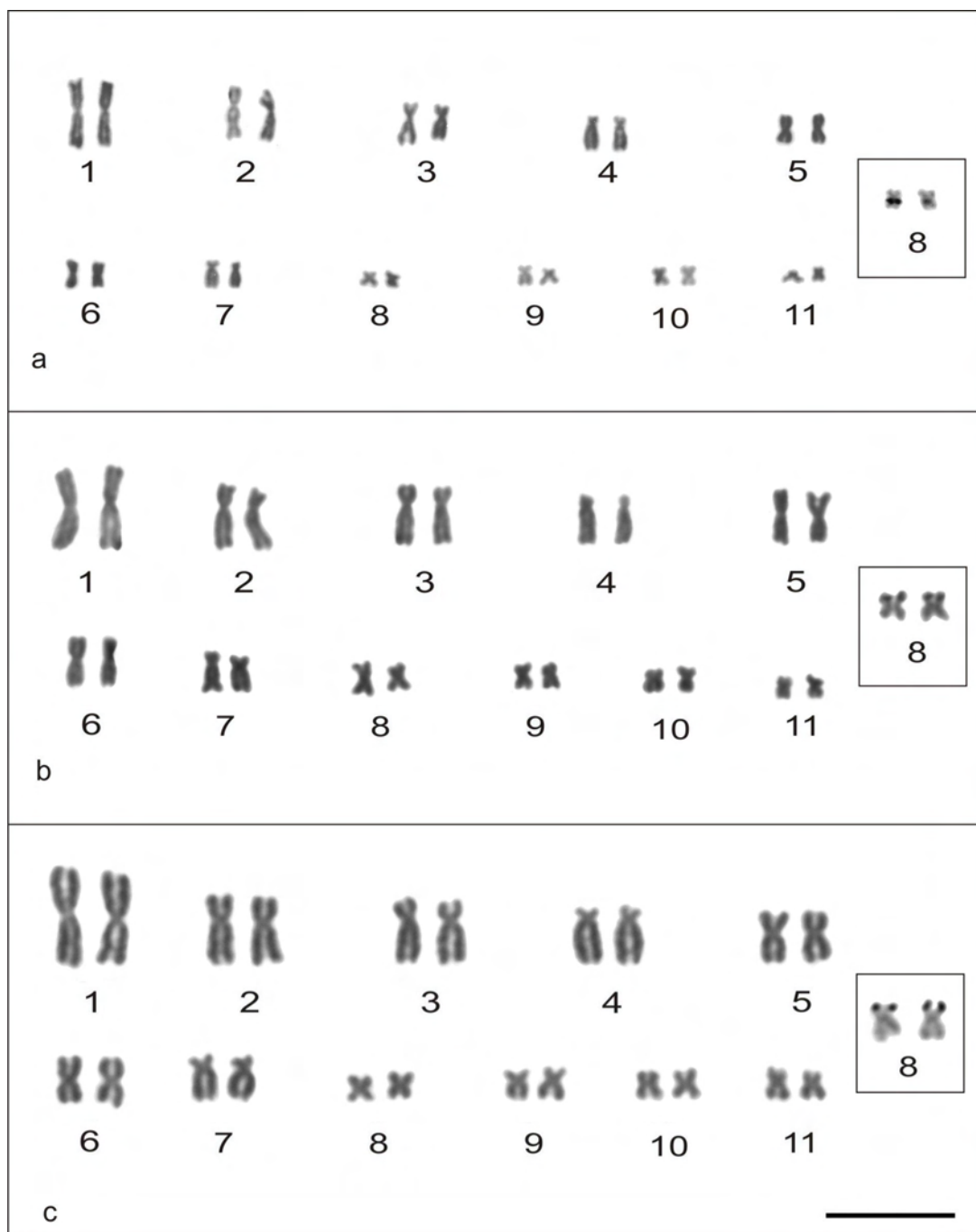


Figura 1. Cariótipos após coloração convencional com $2n=22$ de (a) *Leptodactylus furnarius*, (b) *Leptodactylus fuscus* e (c) *Leptodactylus latrans*. Em detalhes são mostrados os pares portadores da Ag-RON. Barra=15 μ m

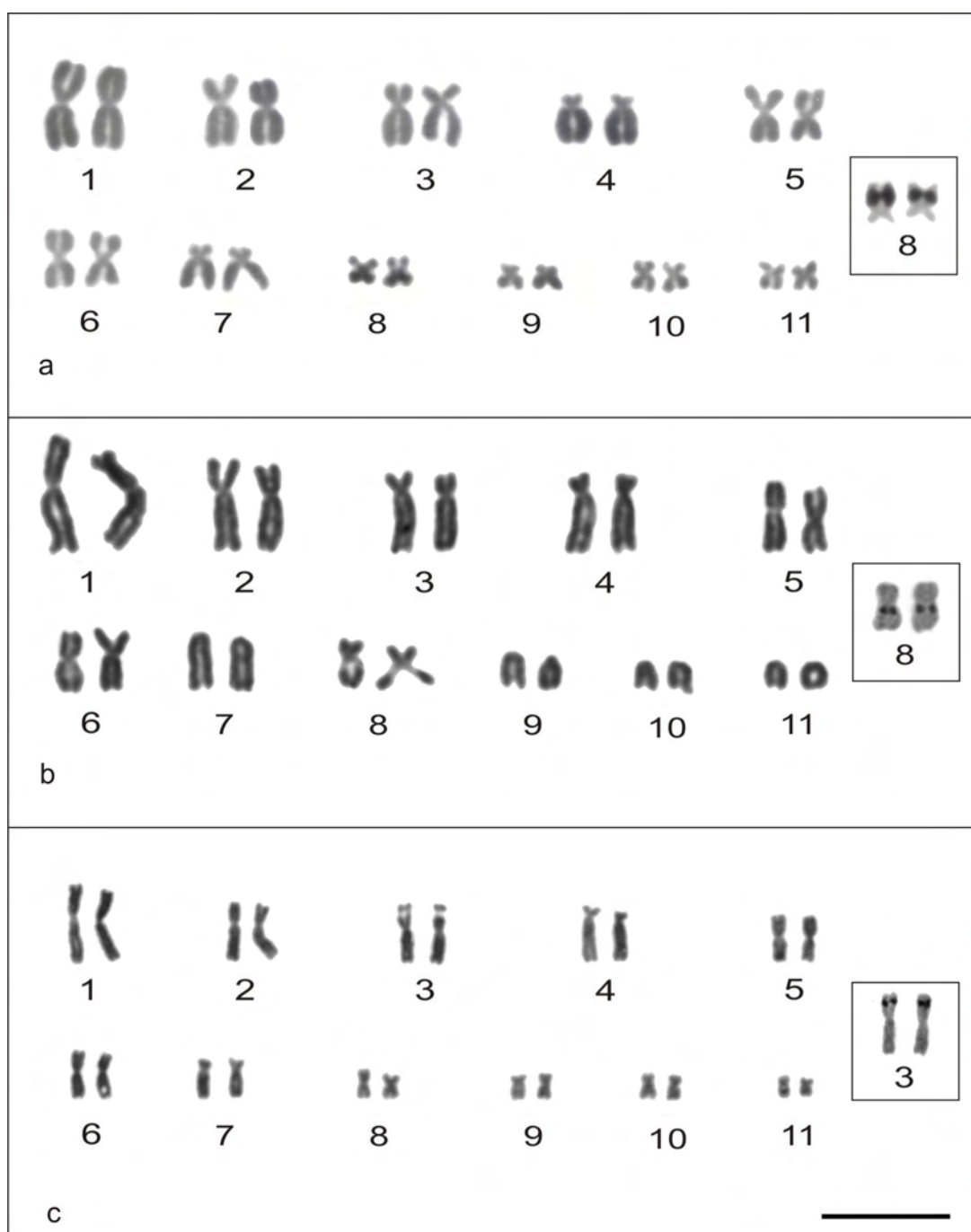


Figura 2. Cariótipos após coloração convencional com $2n=22$ de (a) *Leptodactylus mystaceus*, (b) *Leptodactylus podicipinus* e (c) *Leptodactylus syphax*. Em detalhes são mostrados os pares portadores da Ag-RON. Barra=15 μ m

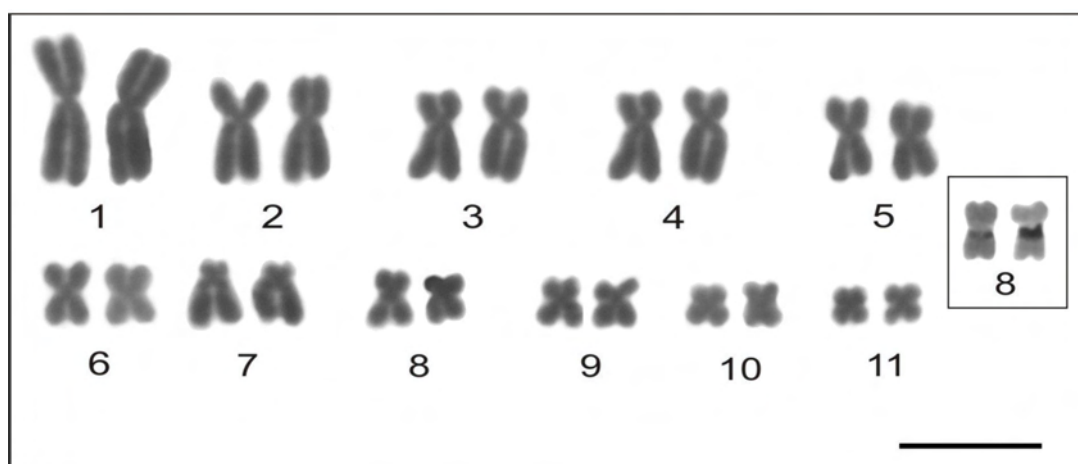


Figura 3. Cariótipo após coloração convencional com $2n=22$ de *Brachycephalus ephippium*. Em detalhe é mostrado o par portador da Ag-RON. Barra=15 μ m

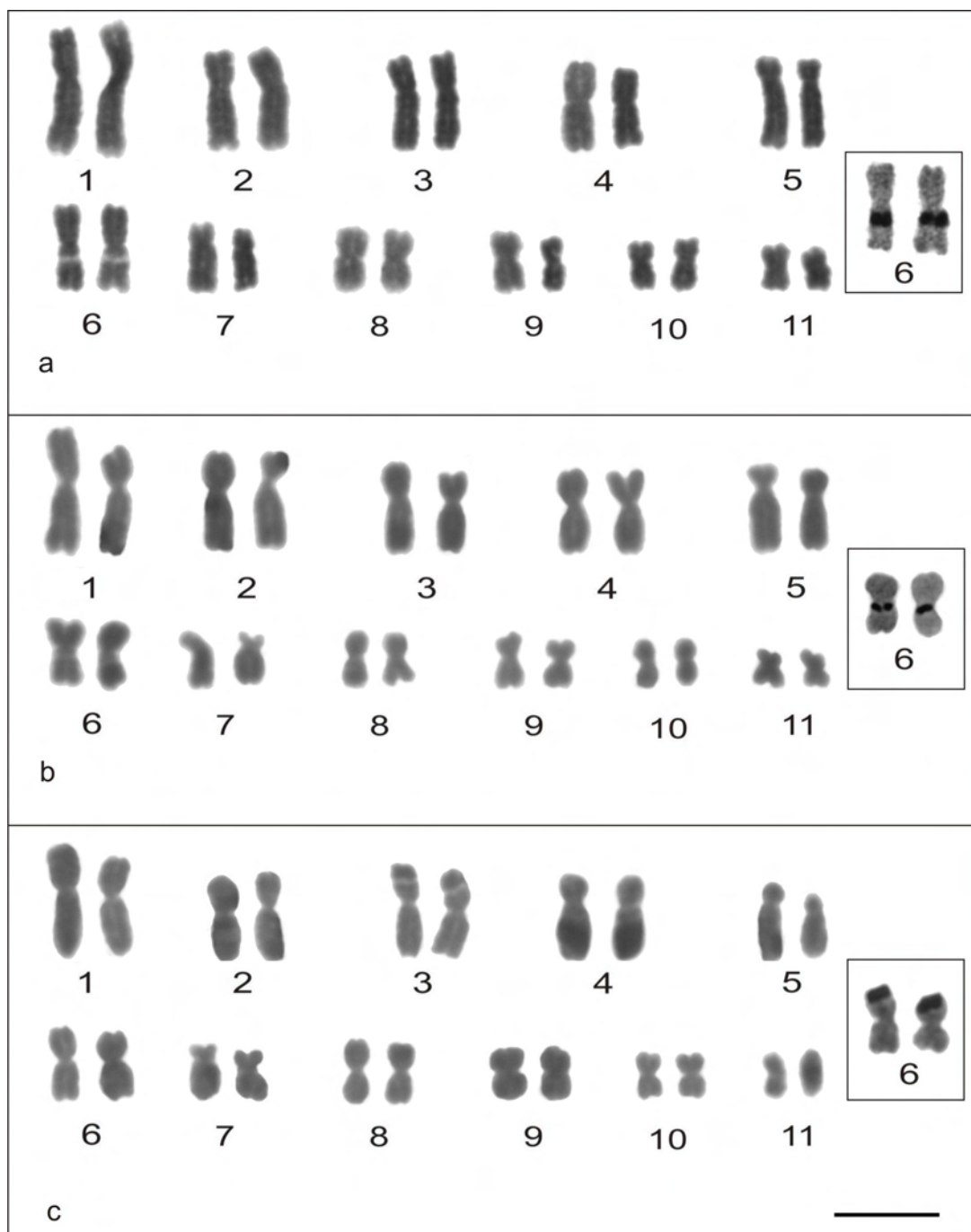


Figura 4. Cariótipos após coloração convencional com $2n=22$ de (a) *Ischnocnema guentheri*, (b) *Ischnocnema manezinho* e (c) *Ischnocnema parva*. Em detalhes são mostrados os pares portadores da Ag-RON. Barra=15 μ m

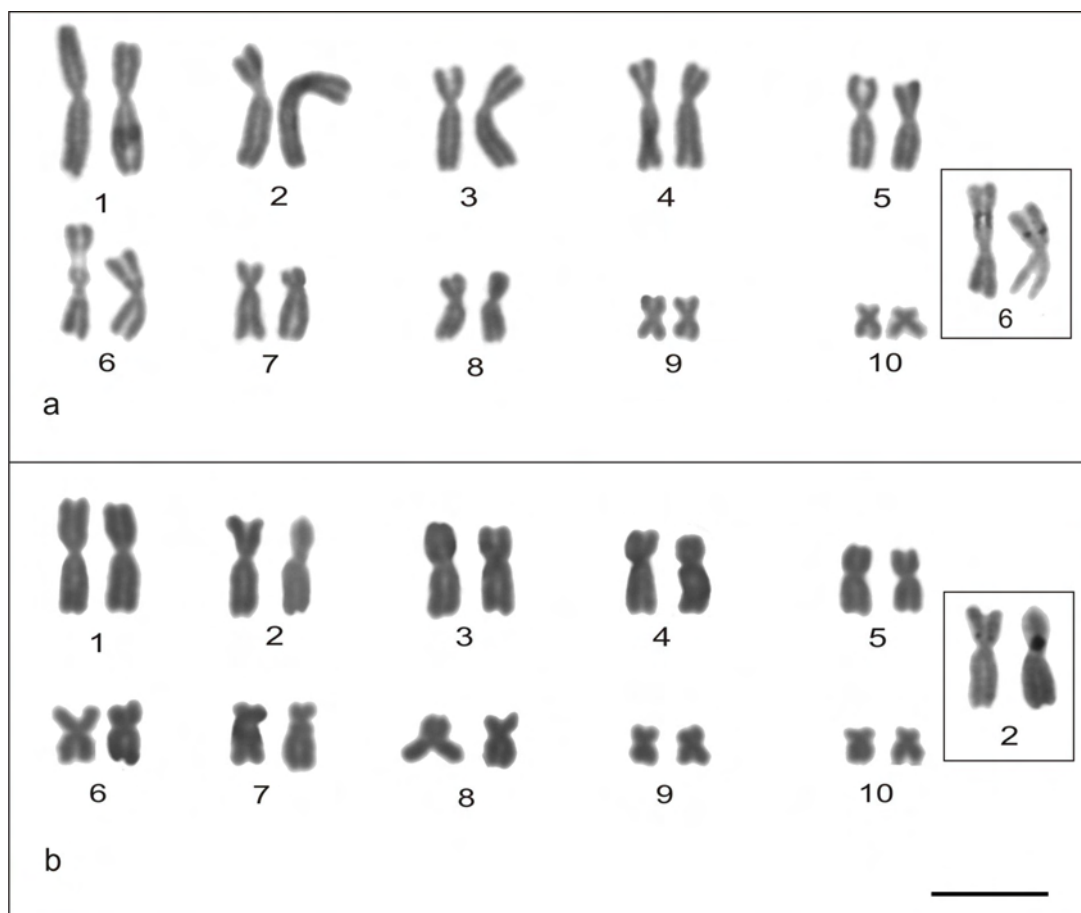


Figura 5. Cariótipos após coloração convencional com $2n=20$ de (a) *Vitreorana eurygnatha*, (b) *Vitreorana uranoscopa*. Em detalhes são mostrados os pares portadores da Ag-RON. Barra=15µm

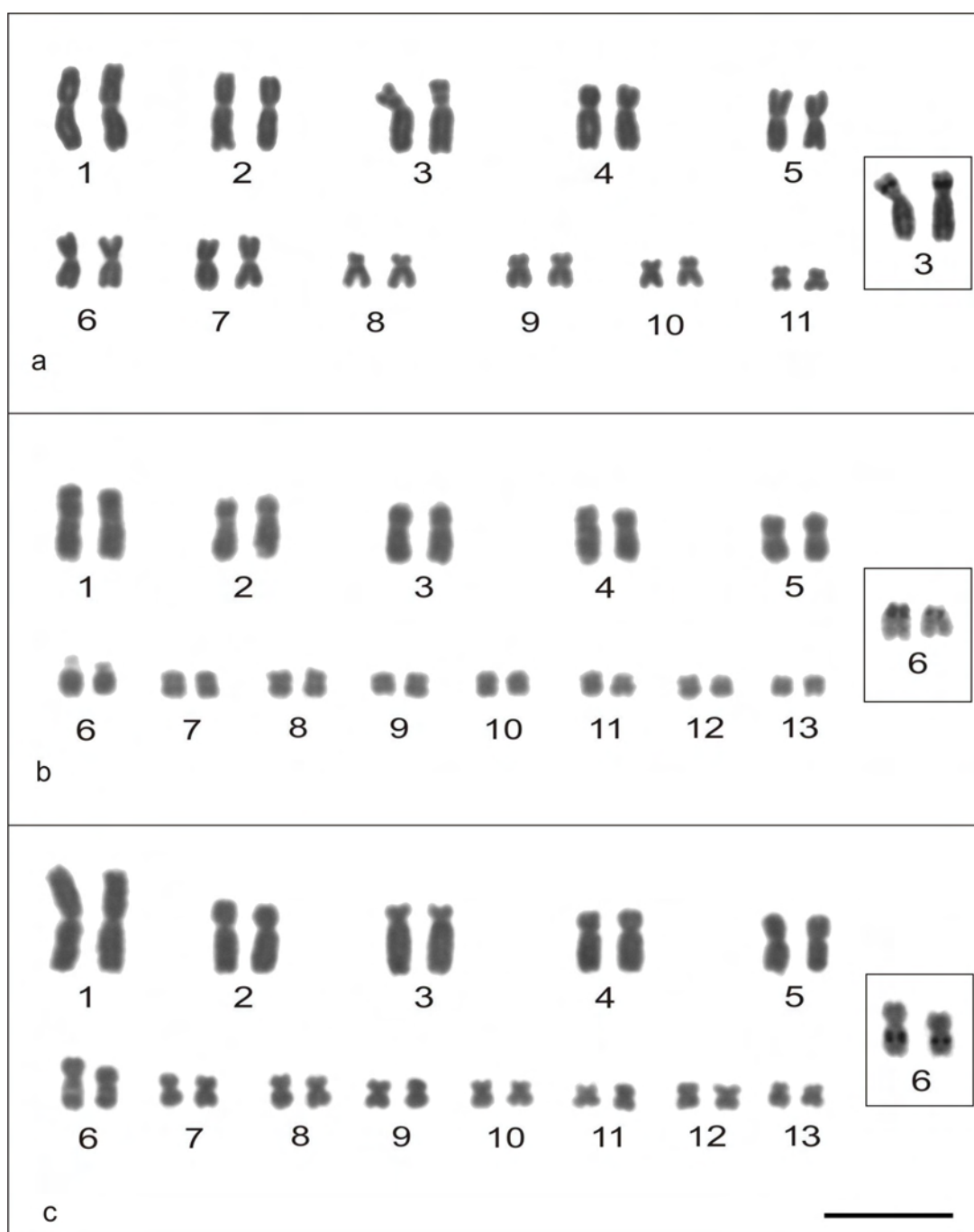


Figura 6. Cariótipos após coloração convencional com $2n=22$ de (a) *Odontophrynus americanus*, com $2n=26$ de (b) *Cycloramphus boraceiensis* e (c) *Cycloramphus brasiliensis*. Em detalhes são mostrados os pares portadores da Ag-RON. Barra=15 μ m

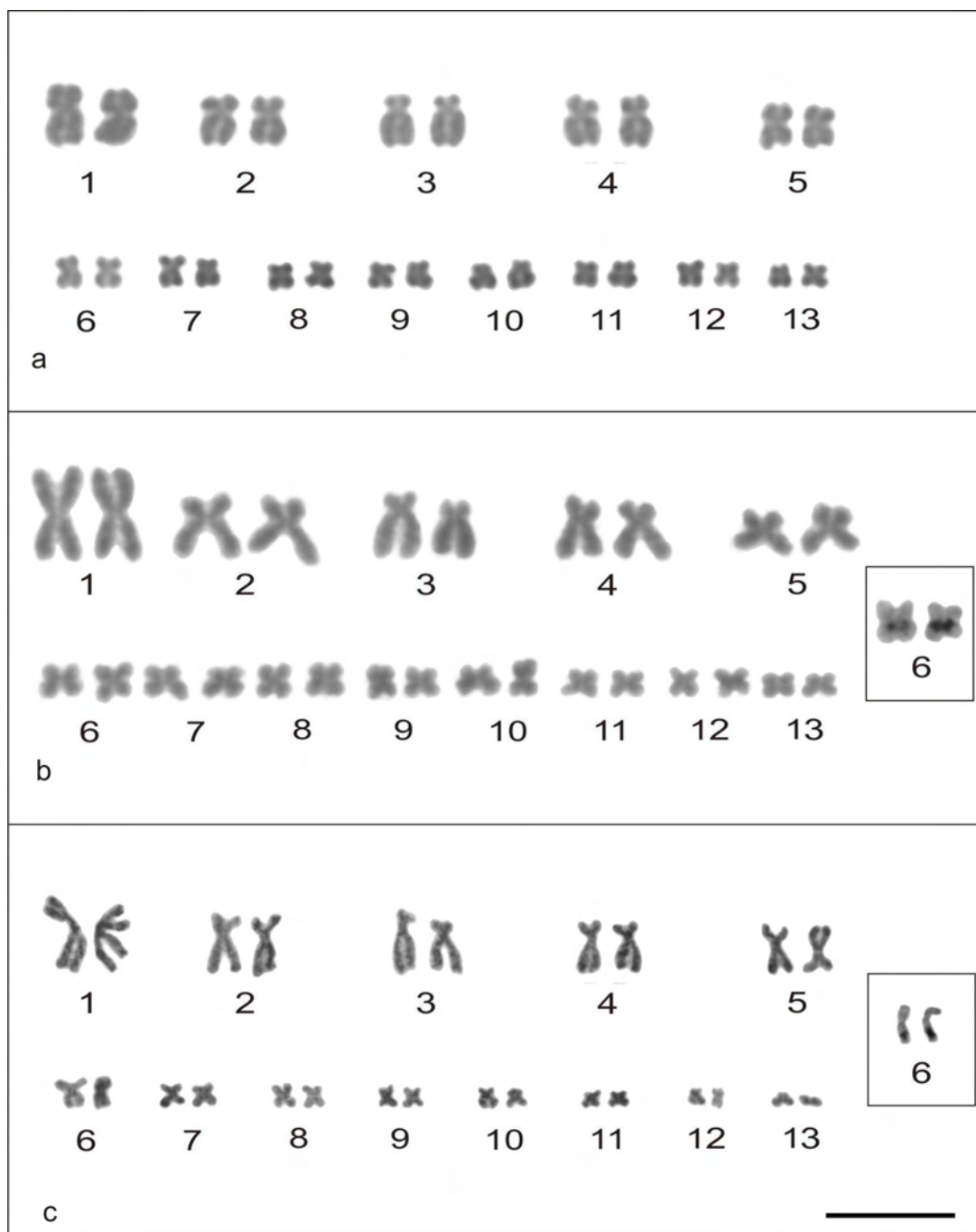


Figura 7. Cariótipos após coloração convencional com $2n=26$ de (a) *Cycloramphus ryakonastes*, (b) *Thoropa miliaris* e (c) *Zachaenus parvulus*. Em detalhe são mostrados os pares portadores da Ag-RON. Barra=15 μ m

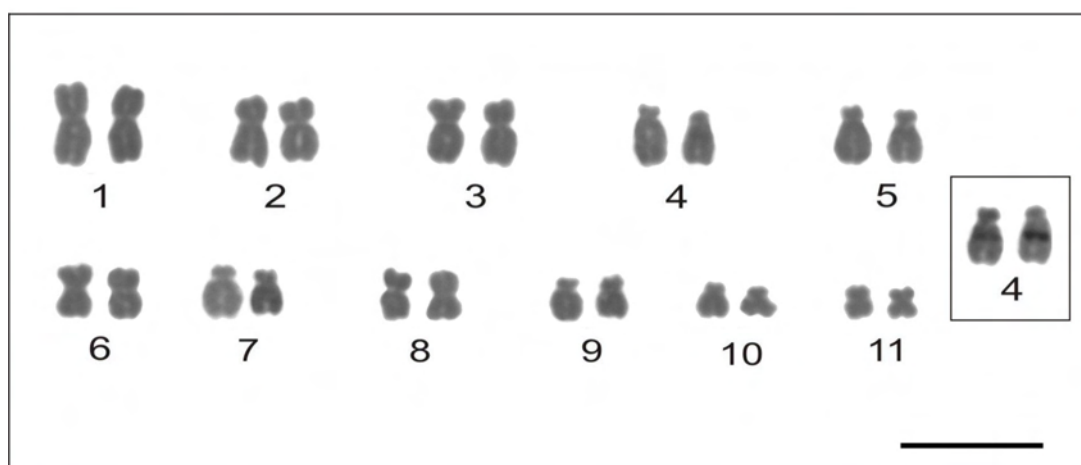


Figura 8. Cariótipos após coloração convencional com $2n=22$ de *Adelophryne baturitensis*. Em detalhe é mostrado o par portador da Ag-RON. Barra= $15\mu\text{m}$

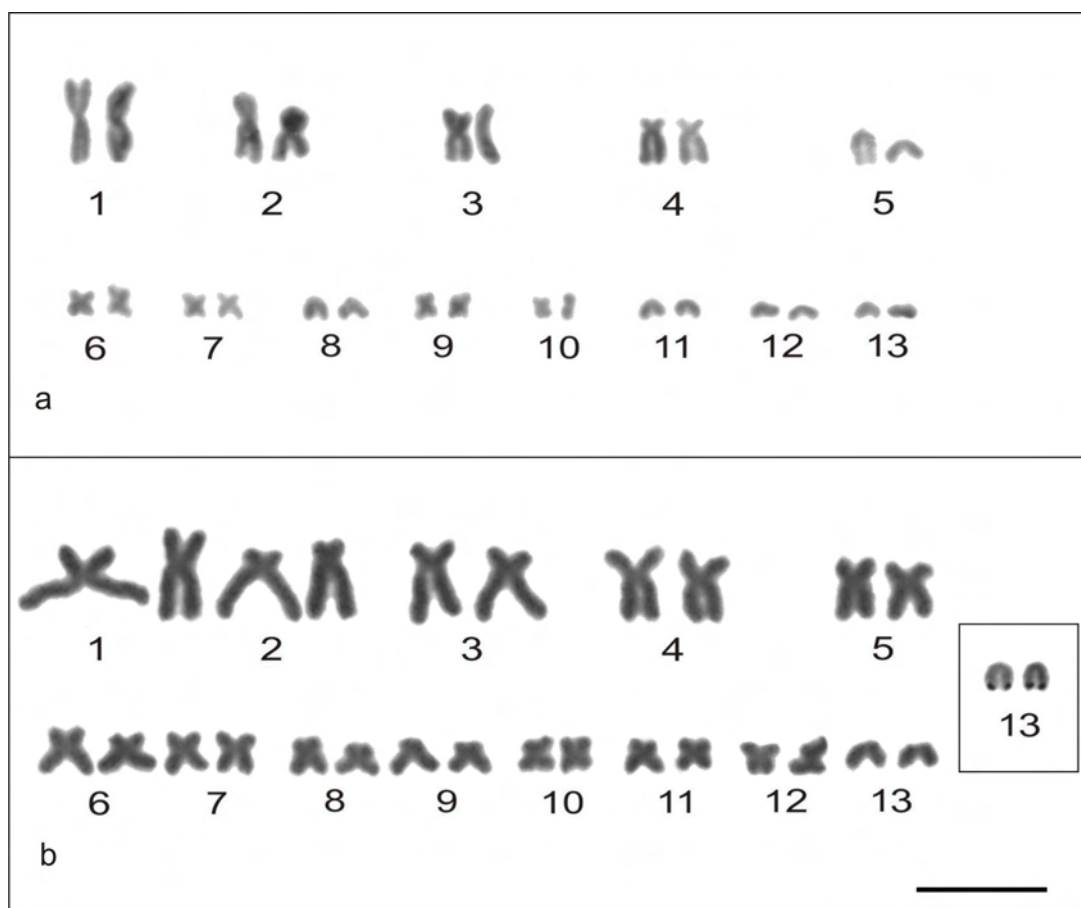


Figura 9. Cariótipos após coloração convencional com $2n=26$ de (a) *Flectonotus* sp. e (b) *Gastrotheca microdiscus*. Em detalhe é mostrado o par portador da Ag-RON. Barra= $15\mu\text{m}$

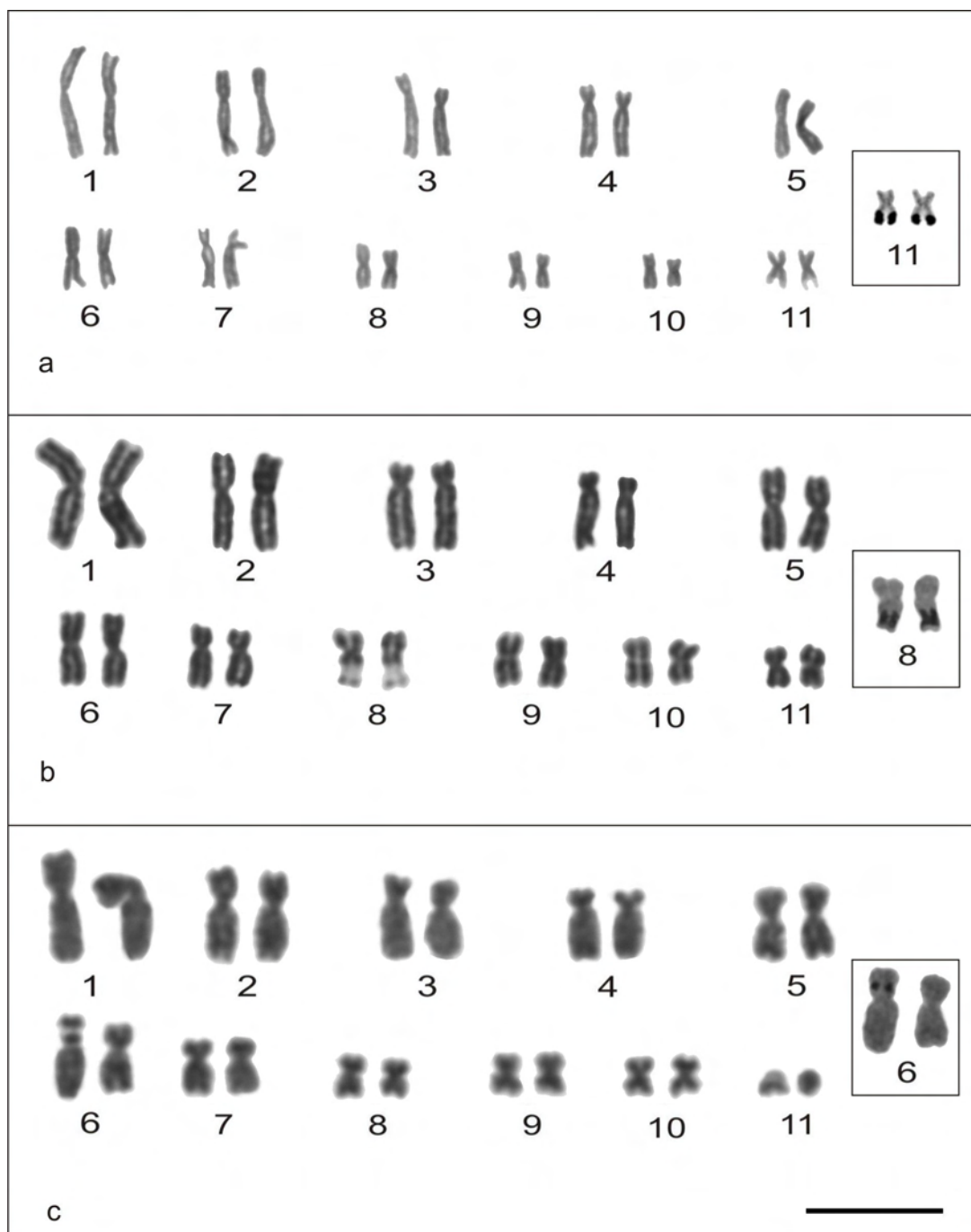


Figura 10. Cariótipos após coloração convencional com $2n=22$ de (a) *Physalaemus barroioi*, (b) *Physalaemus cuvieri* e (c) *Physalaemus moreirae*. Em detalhes são mostrados os pares portadores da Ag-RON. Barra=15 μ m

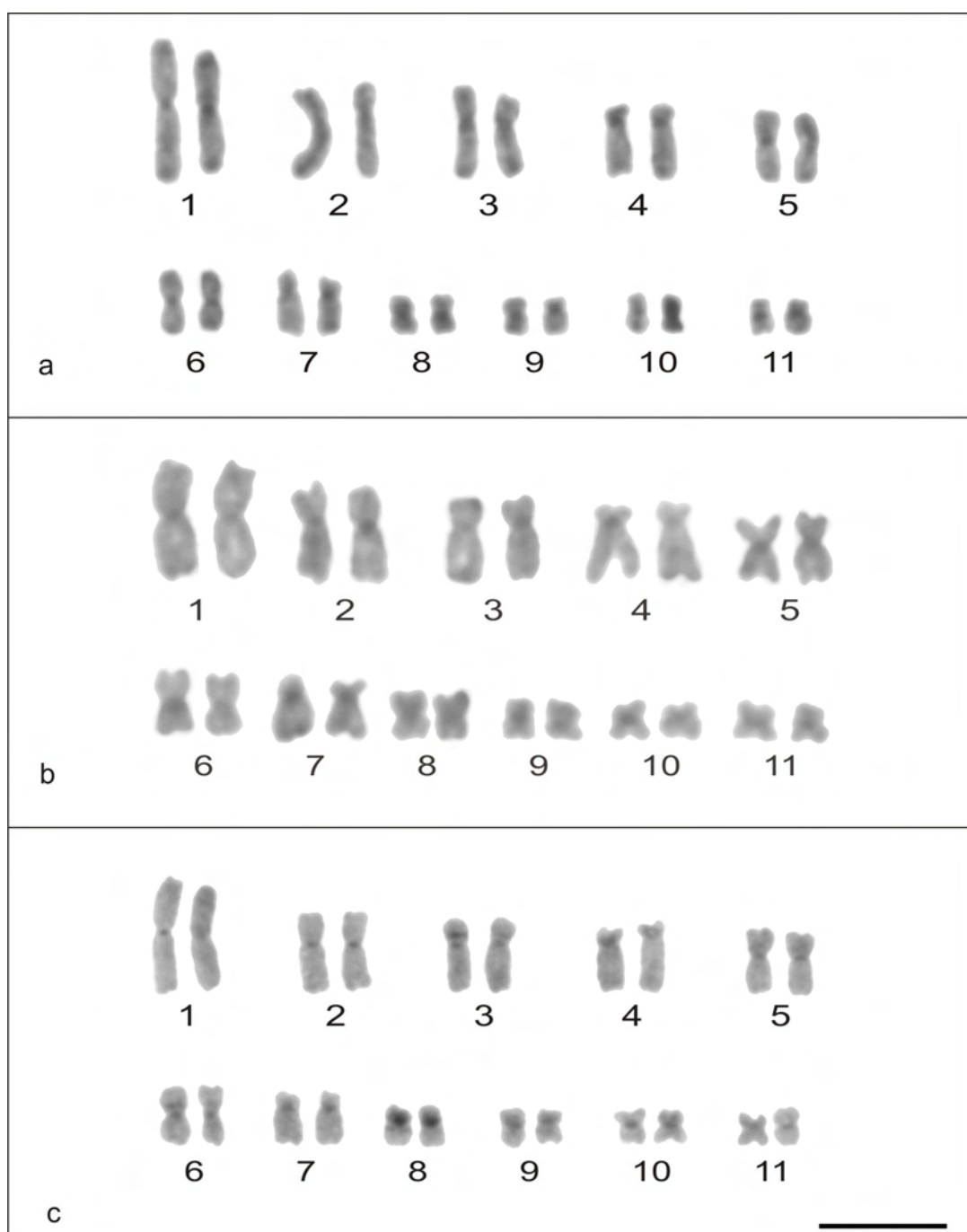


Figura 11. Cariótipos após banda C de (a) *Leptodactylus furnarius*, (b) *Leptodactylus fuscus* e (c) *Leptodactylus latrans*. Barra=15µm

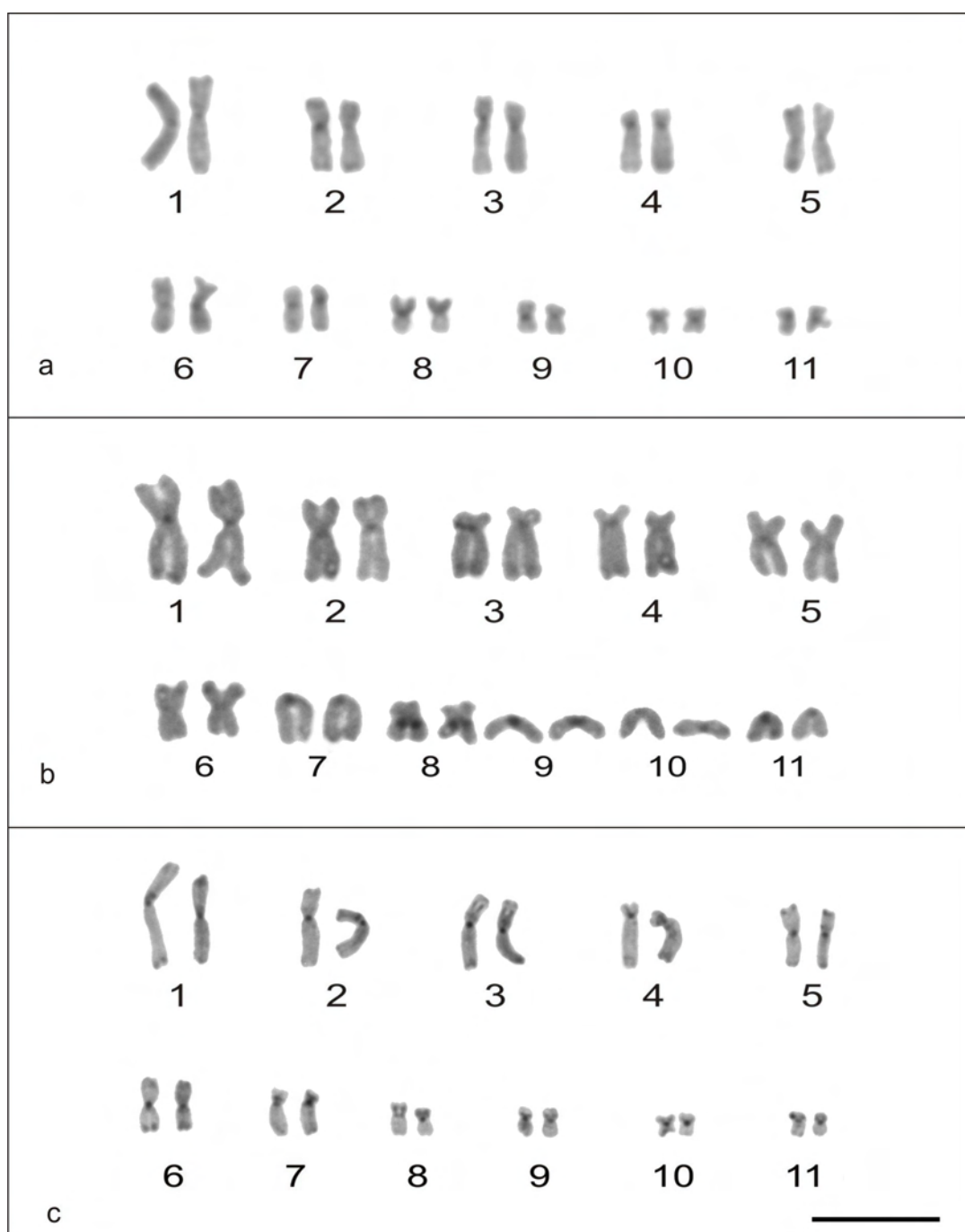


Figura 12. Cariótipos após banda C de (a) *Leptodactylus mystaceus*, (b) *Leptodactylus podicipinus* e (c) *Leptodactylus syphax*. Barra=15μm

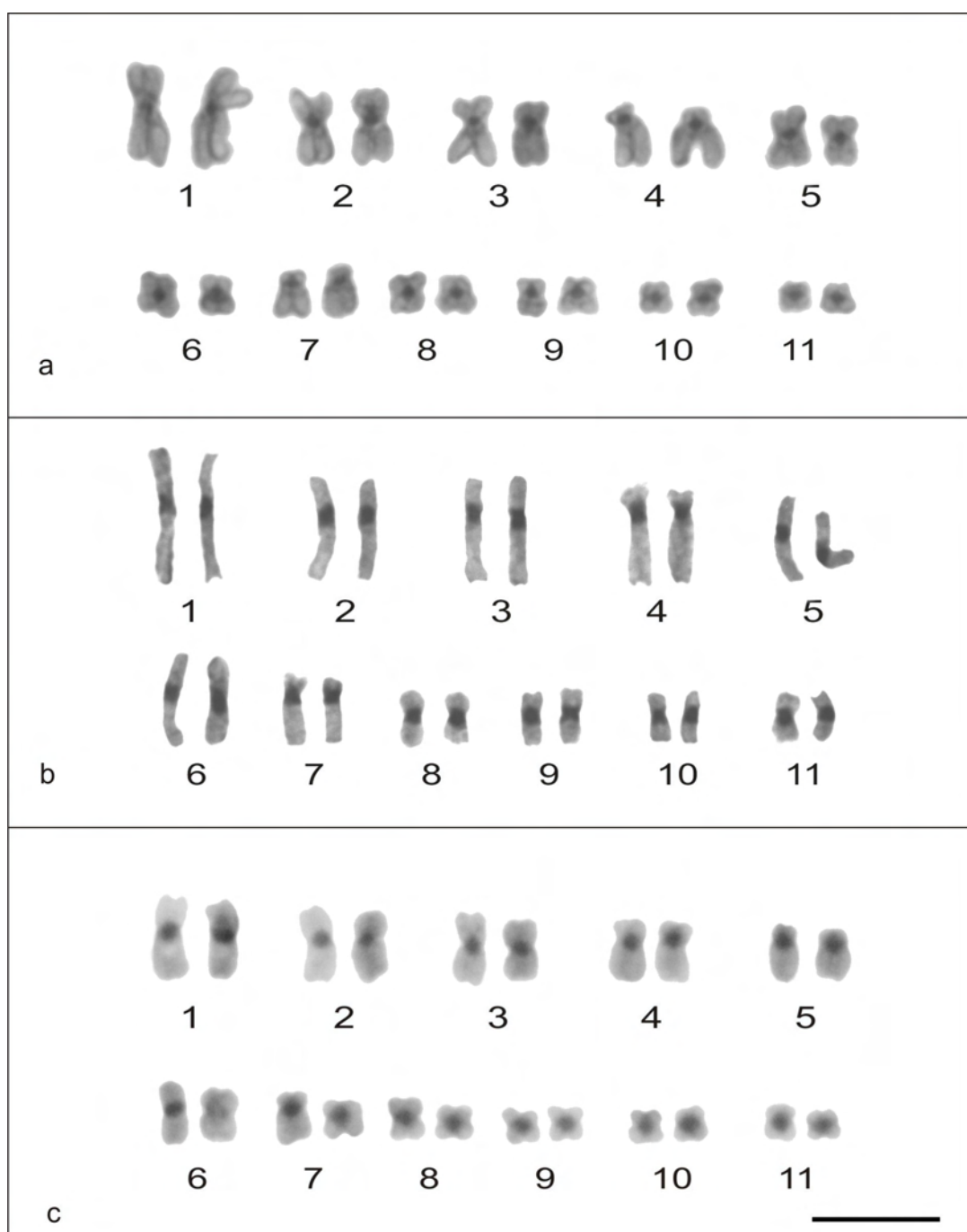


Figura 13. Cariótipos após banda C de (a) *Brachycephalus ephippium*, (b) *Ischnocnema guentheri* e (c) *Ischnocnema parva*. Barra=15µm

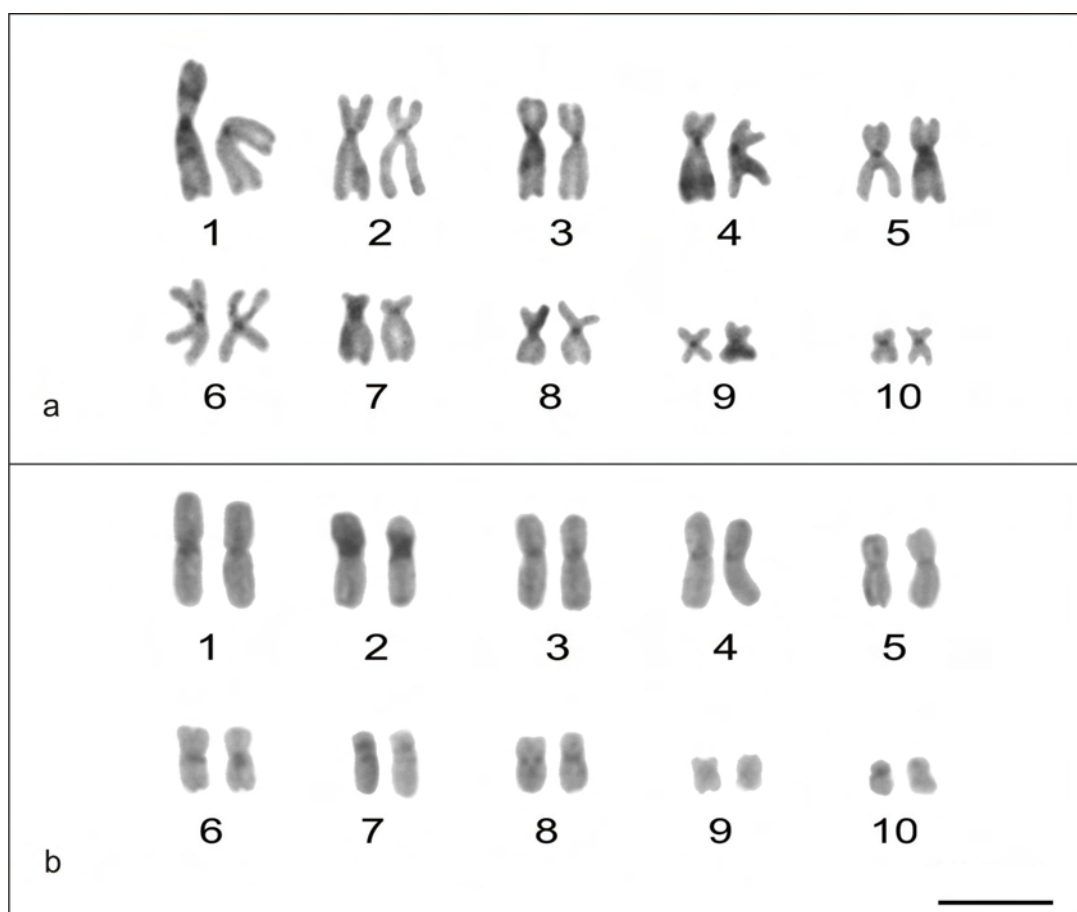


Figura 14. Cariótipos após banda C de (a) *Vitreorana eurygnatha* e (b) *Vitreorana uranoscopa*. Barra=15 μ m

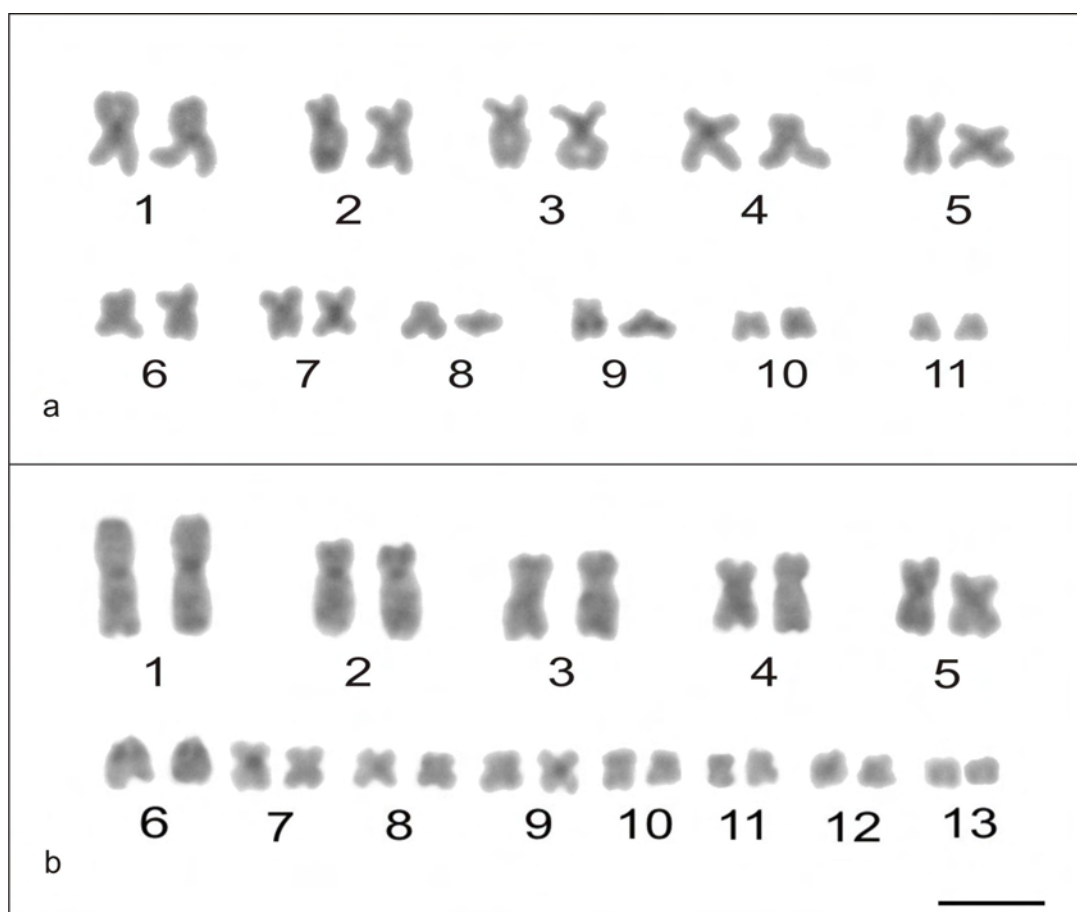


Figura 15. Cariótipos após banda C de (a) *Odontophrynus americanus* e (b) *Cycloramphus boraceiensis*. Barra=15µm

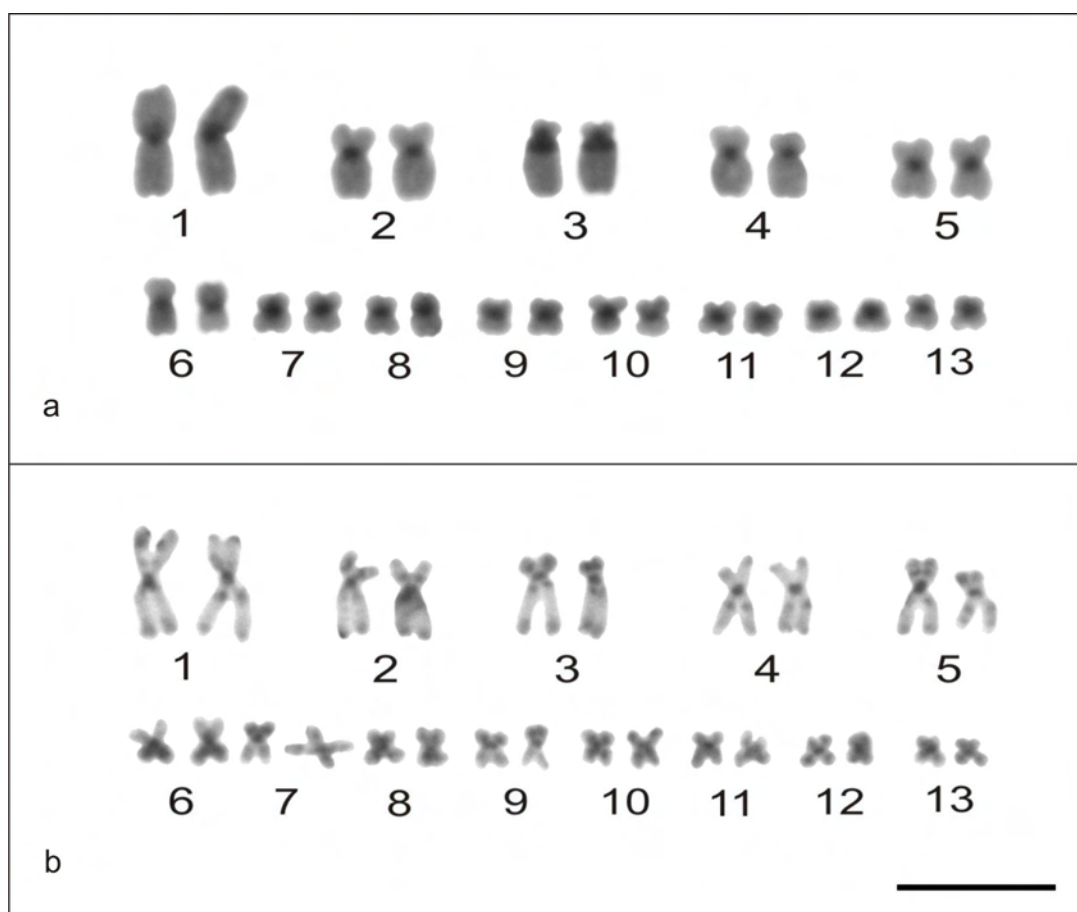


Figura 16. Cariótipos após banda C de (a) *Cycloramphus brasiliensis* e (b) *Thoropa miliaris*. Barra=15µm

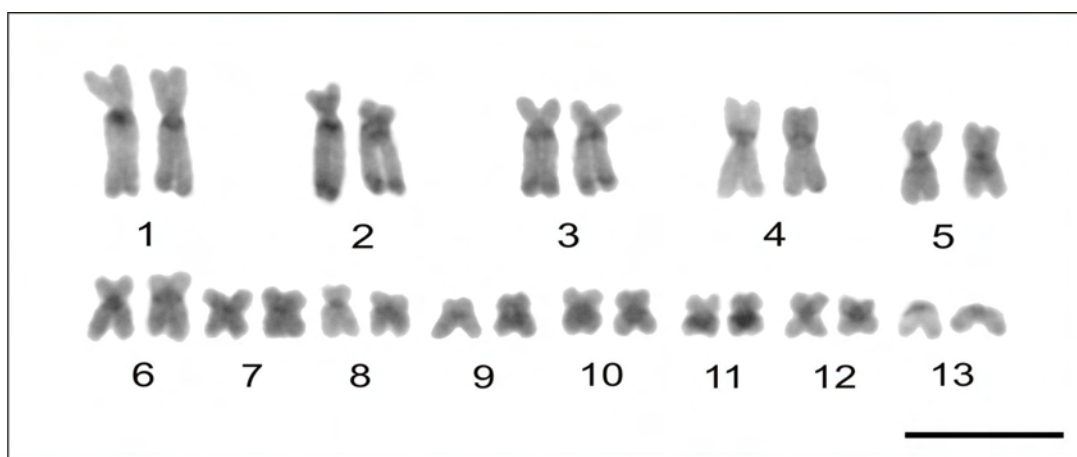


Figura 17. Cariótipo após banda C de *Gastrotheca microdiscus*. Barra=15µm

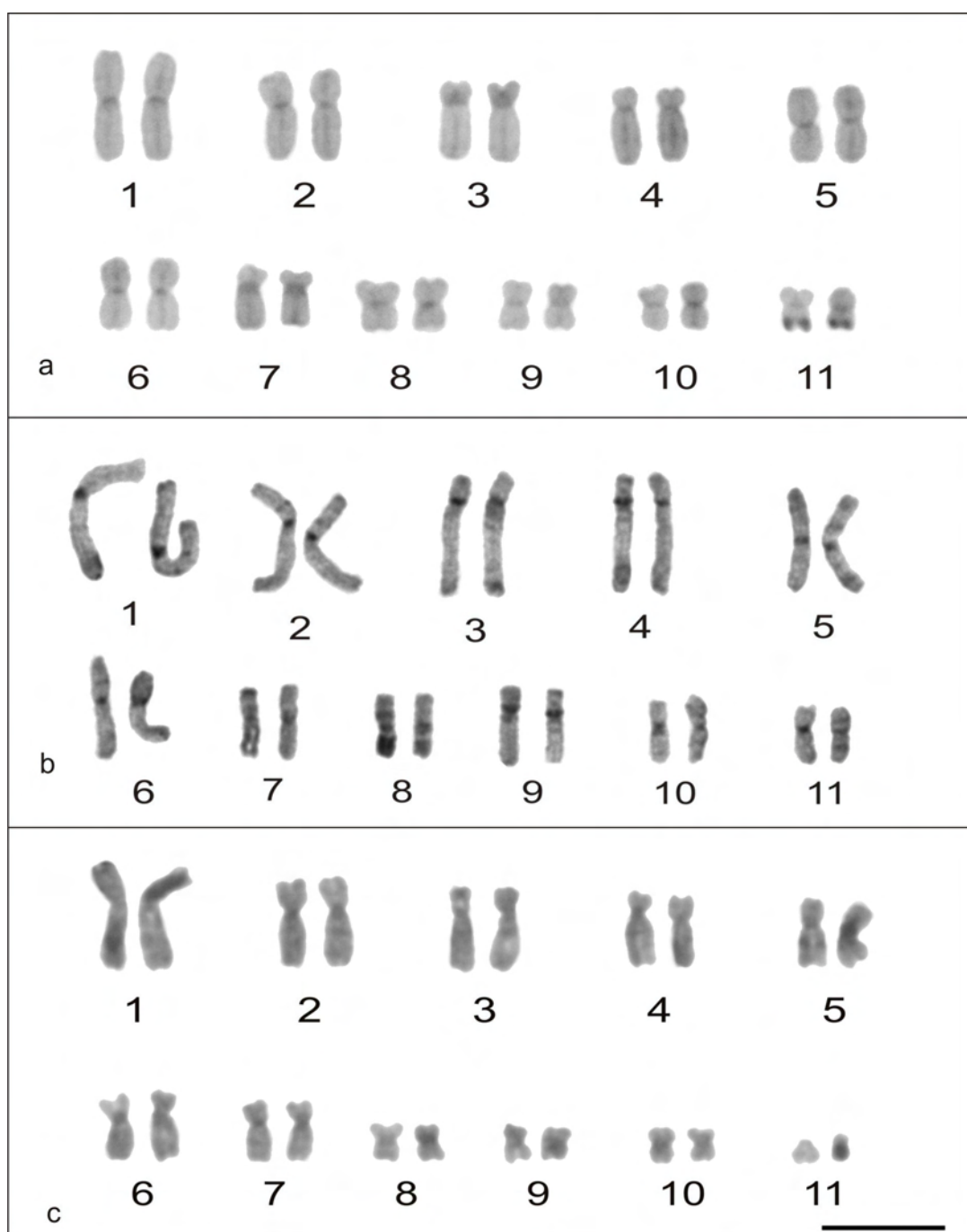


Figura 18. Cariótipos após banda C de (a) *Physalaemus barroioi*, (b) *Physalaemus cuvieri* e (c) *Physalaemus moreirae*. Barra=15µm

Discussão

No presente trabalho, foram analisados seis representantes do gênero *Leptodactylus* (Leptodactylidae) e 18 espécies que, com exceção de *B. ephippium*, *V. eurygnatha* e *V. uranoscopa*, estavam alocadas em Leptodactylidae e atualmente pertencem a outras famílias, sendo elas Brachycephalidae, Cycloramphidae, Eleutherodactylidae, Hemiphractidae e Leiuperidae. A espécie *B. ephippium*, assim como outros 11 representantes do gênero, sempre esteve alocada na família Brachycephalidae, enquanto *V. eurygnatha* e *V. uranoscopa*, na família Centrolenidae, que tem sido considerada como grupo-irmão dos atuais Leptodactylidae e Leiuperidae (FROST et al., 2006; GRANT et al., 2006; FROST, 2010). O número diploide de $2n=22$ foi observado para a grande maioria das espécies, isto é, 15 das 24, enquanto $2n=26$ foi encontrado em sete delas e $2n=20$ em apenas duas. Os três números diploides são relativamente conservados dentro de cada uma das famílias amostradas, tendo sido notada discrepância apenas em Cycloramphidae, uma vez que *O. americanus* apresenta $2n=22$, enquanto as demais espécies possuem $2n=26$. Com frequência os anfíbios possuem, além de número diploide coincidente, morfologia cromossômica muito semelhante entre os representantes de um grupo de espécies, gênero ou família, quando observados pela coloração convencional; contudo, diferenças sutis nas proporções de braços de certos cromossomos não podem ser totalmente afastadas em alguns casos. A conservação cariotípica é bastante evidente em determinados grupos taxonômicos, de modo que o mesmo cariótipo modal é encontrado para todas as espécies do gênero e são, além disso, indistinguíveis até mesmo com o uso de algumas técnicas

de coloração diferencial. Um exemplo dessa condição é o de algumas espécies dos bufonídeos do gênero *Rhinella*, que compartilham o mesmo $2n=22$ com cromossomos morfológicamente idênticos e, além disso, igual localização de Ag-RON e de distribuição da heterocromatina C-positiva (BEÇAK, 1968; KASAHARA et al., 1996; BALDISSERA et al., 1999; AZEVEDO et al., 2003; AMARO-GHILARDI et al., 2008).

Da família Leptodactylidae foram cariotipados *L. furnarius*, *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. mystaceus*, *L. podicipinus* e *L. syphax*, sendo que os dados citogenéticos da primeira e da última espécie são inéditos. Os outros quatro representantes já tiveram seus cromossomos estudados por Beçak (1968), Brum-Zorilla e Saez (1968), Beçak et al. (1970), Denaro (1972), Bogart (1974), Heyer e Diment (1974), Savage e De Weese (1979), Silva et al. (2000a) e Silva et al. (2004), entre outros. Excetuando *L. podicipinus* com $2n=22$ e $NF=36$, nenhuma diferença cariotípica marcante foi encontrada entre os achados de nossas amostras, assim como em relação às descrições das espécies anteriormente analisadas na literatura, embora algumas divergências com relação à nomenclatura dos pares cromossômicos possam existir devido aos distintos parâmetros de classificação adotados. Os cariótipos com $2n=22$ e $NF=44$ são praticamente indistinguíveis entre si pela coloração convencional e, no caso de algumas delas, também pelo padrão de Ag-RON e banda C. O NF de *L. podicipinus* é menor devido à ocorrência de quatro pares telocêntricos, que se supõe diferirem dos correspondentes cromossomos homeólogos de dois braços por rearranjo do tipo inversão pericêntrica (HEYER e DIMENT, 1974; SILVA et al., 2000a). É importante enfatizar que no trabalho de Denaro (1972) o par 11 é tratado como submetacêntrico, mas na figura apresentada pela autora, o referido par é claramente telocêntrico, não diferindo, portanto, dos resultados da presente amostra.

Além de *L. podicipinus*, cariótipos contendo cromossomos telocêntricos são descritos para outras três espécies, sendo elas *L. latinasus*, *L. natalensis* e *L. wagneri*, que têm $2n=22$ e até quatro pares de um braço só (BRUM-ZORRILLA e SAEZ, 1968; BOGART, 1970; 1974; HEYER e DIMENT, 1974; SILVA et al., 2000a). Após a sinonimização de *Adenomera* com *Leptodactylus* proposta por Frost et al. (2006), a relação de espécies do gênero com pares telocêntricos passou a incluir *L. andreae* com $2n=26$ e seis pares telocêntricos, *L. hylaedactylus* com $2n=26$ e nove pares telocêntricos, *L. marmoratus* com $2n=24$ e sete pares telocêntricos e

Leptodactylus sp. (aff. *bokermanni*) com $2n=23$ e sete pares telocêntricos, não considerando a fusão heteromórfica entre um cromossomo 7 e um 9 observado no único exemplar analisado (BOGART, 1970; 1973; 1974; CAMPOS et al., 2009).

Segundo Heyer e Diment (1974), cariótipos com número alto de cromossomos e com pares telocêntricos, como é o caso de *L. hylaedactylus*, indicam uma condição mais ancestral dentro de *Leptodactylus*, de modo que a evolução cariotípica no gênero se deve por redução do número de cromossomos devida principalmente a mecanismos de fusão, porém, não se descartando outros rearranjos como as inversões. Com os dados citogenéticos acumulados, é possível indicar que as espécies pertencentes aos antigos gêneros *Adenomera* e *Lithodytes* estão na linhagem ancestral dos *Leptodactylus* com $2n=22$ (comentários em CAMPOS et al., 2009, na presente Tese). Com essas considerações, podemos observar alguns estágios da evolução cariotípica dentro de *Leptodactylus*: o cariótipo mais ancestral seria um semelhante ao de *L. hylaedactylus* e *L. andreae*, seguido de *L. marmoratus* e *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) e, entre os *Leptodactylus* de 22 cromossomos, os cariótipos de *L. latinasus*, *L. natalensis*, *L. podicipinus* e *L. wagneri*, seriam mais basais do que todos os demais cariótipos com $2n=22$ sem cromossomos telocêntricos. Quanto a *L. lineatus*, é possível que a espécie seja basal, embora apresente um cariótipo com características derivadas, ou seja, baixo $2n$ e ausência de pares telocêntricos. Com relação ao cariótipo de *L. silvanimbus* com $2n=24$, sem nenhum cromossomo telocêntrico, poderia, segundo Amaro-Ghilardi et al. (2006), ter surgido de um ancestral com $2n=22$, a partir de fissão cêntrica seguida de inversão, ou representar um cariótipo ancestral das espécies com $2n=22$, presumindo a ocorrência de inversão pericêntrica seguida de fusão cêntrica.

Com exceção de *L. syphax*, as demais espécies analisadas mostram Ag-RON nos cromossomos 8, porém, em diferentes posições, confirmando dados obtidos anteriormente para a maioria dos *Leptodactylus* já cariotipados (SILVA et al., 2000a; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; SILVA et al., 2006). É importante ressaltar que determinar se a localização da Ag-RON é no braço curto ou no braço longo é de certa forma subjetiva, pois o cromossomo tem a morfologia metacêntrica, porém há uma inequívoca diferença na posição da marcação, que pode ser intersticial, proximal ou terminal. A localização da Ag-RON nos braços curtos dos cromossomos 3 em *L. syphax* é inédita para o

gênero, pois nenhuma outra espécie cariotipada tem marcação nesse sítio. Outras exceções são *L. petersi*, cuja Ag-RON está nos braços longos dos cromossomos 4 e *L. mystacinus* que apresenta três distintos padrões interpopulacionais de Ag-RON, correspondendo à marcação no braço curto do par 4, no braço curto do par 8, ou ambas no mesmo indivíduo (AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2006). Os resultados de Ag-RON indicam, portanto, que esse pode ser um marcador importante em *Leptodactylus*, pois permite distinguir algumas vezes cariótipos entre espécies ou mesmo entre populações.

As espécies de *Leptodactylus* do presente trabalho mostram banda C centroméricas com algumas poucas bandas intersticiais, muitas vezes de difícil caracterização, sendo a mais comum aquela associada à Ag-RON. Tal padrão tem sido o descrito para as espécies cariotipadas por Silva et al. (2000a), Amaro-Ghilardi et al. (2004), Silva et al. (2006), Amaro-Ghilardi et al. (2006) e por Campos et al. (2009), embora com alguns relatos mais consistentes de marcações intersticiais, como é o caso de *L. latrans*. Silva et al. (2000a) observaram distintos padrões em duas populações dessa espécie, sugerindo uma possível diferenciação cariotípica em um complexo de espécies de região de altitude e ao nível do mar, enquanto que Amaro-Ghilardi et al. (2004) descreveram polimorfismos de banda C em quatro populações da mesma espécie. *Leptodactylus latrans* do presente trabalho tem bandas intersticiais nos braços curtos dos cromossomos 3 e 6, também visualizadas na população de Guaratuba, PR (SILVA et al., 2000a). *Leptodactylus syphax* foi a única espécie que mostrou um padrão de bandamento C com bandas intersticiais mais evidentes, além de ter marcada a região terminal da maioria dos cromossomos.

Da família Brachycephalidae são inéditos os dados de *I. manezinho*, já que as demais espécies foram anteriormente cariotipadas, isto é, *B. ephippium* por Duellmann e Trueb (1994) e Ananias et al. (2006), enquanto *I. guentheri* e *I. parva*, por Beçak (1968), Brum-Zorrilla e Saez (1968), Beçak e Beçak (1974), Siqueira Jr et al. (2004) e, mais recentemente, por Campos et al. (2008). As três espécies de *Ischnocnema* mostraram cariótipos muito semelhantes entre si e não diferem em relação aos descritos na literatura. *Brachycephalus ephippium* também possui cariótipo equivalente aos apresentados na literatura e, embora tenha o mesmo $2n=22$ e $NF=44$ como nas três espécies de *Ischnocnema*, possui um cariótipo facilmente distinguível, pela presença inequívoca dos pares subtelocêntricos 4 e 7, assim como do par metacêntrico 5, todos eles correspondentes a pares do tipo

submetacêntrico em *I. guentheri*, *I. manezinho* e *I. parva*. Certamente, estudos citogenéticos em outras espécies de *Brachycephalus* seriam muito úteis para que uma comparação mais efetiva entre os cariótipos dos dois gêneros possa ser feita, buscando dados adicionais que corroborem a colocação de *Ischnocnema* e *Brachycephalus* na mesma família (Brachycephalidae), o que foi feito com base principalmente em caracteres moleculares (FROST et al., 2006; HEDGES et al., 2008).

Na espécie *B. ephippium* o padrão de Ag-RON é correspondente ao apresentado por Ananias et al. (2006), sendo as marcações observadas na região intersticial dos braços longos do par 8. As Ag-RON de *I. guentheri* e *I. manezinho* estão na posição intersticial dos braços longos dos cromossomos 6, não diferindo do descrito para a primeira espécie por Siqueira Jr et al. (2004) e Campos et al. (2008). Com relação a *I. parva* da nossa amostra, a Ag-RON na região terminal dos braços curtos dos cromossomos 6, é diferente do descrito por esses mesmos autores, que relatam marcação semelhante à observada em *I. guentheri*. É, sem dúvida, interessante aumentar a amostra de *I. parva* de Biritiba Mirim, SP, para verificar se a Ag-RON pode ser considerada um marcador para essa população. Em nossa amostra de *I. parva* é possível observar uma evidente constrição secundária nos braços curtos dos cromossomos 3, não descrita para nenhuma espécie de *Ischnocnema*. Tal região, que deve ser de sequência repetitiva, não foi marcada pelo bandamento C e nem pela técnica de Ag-RON, ainda que não se possa afastar completamente a hipótese de que corresponda a uma região de DNAr.

O bandamento C é bastante similar em *B. ephippium*, *I. guentheri* e *I. parva* com fortes e grandes blocos visualizados na região centromérica e pericentromérica de todos os cromossomos, coincidindo com o padrão para elas descrito na literatura (SIQUEIRA JR et al., 2004; ANANIAS et al., 2006; CAMPOS et al., 2008). Quanto a *B. ephippium*, é possível notar marcações discretas na região intersticial dos braços longos dos cromossomos 7 e 9, não relatadas por Ananias et al. (2006), cuja amostra apresenta marcação C-positiva no mesmo sítio da Ag-RON, não observada em nossos exemplares. Essas diferenças podem ser decorrentes de artefatos técnicos, ou mesmo uma variação populacional.

Apenas oito representantes descritos de *Ischnocnema* foram cariotipados até o momento, isto é, além das três espécies analisadas no presente trabalho, são conhecidas as constituições cromossômicas de *I. holti* (LUCCA et al., 1974) e *I.*

lactea (LUCCA e JIM, 1974) com $2n=20$, *I. juipoca* (CAMPOS et al., 2008; SIQUEIRA JR, 2008) com $2n=22$, *I. paulodutra* (SIQUEIRA JR, 2008) e *I. ramagii* (NAPOLI et al., 2009) com $2n=30$. Em Campos et al. (2008) é descrito o cariótipo para um único indivíduo de uma espécie não identificada de *Eleutherodactylus*, cujos cromossomos são idênticos aos de *I. juipoca*. Sendo assim, é possível que esse representante pertença também a *Ischnocnema*, cujas espécies estavam alocadas em *Eleutherodactylus*, correspondendo tal exemplar a mais uma espécie cariotipada no gênero.

É possível notar que as espécies de *Ischnocnema* mostram cariótipos relativamente pouco conservados, já que em uma amostra tão pequena foram encontrados $2n=20$, $2n=22$ e $2n=30$, nem sempre com constituições idênticas entre os cariótipos com o mesmo número diploide. Os cariótipos com $2n=20$ ou $2n=22$ podem ser caracterizados pela presença ou ausência de cromossomos telocêntricos, enquanto aqueles com $2n=30$ são diferenciados pelo par 5 que é o único cromossomo de dois braços em uma delas. É importante ressaltar que as espécies de *Ischnocnema* que mostram cariótipos semelhantes entre si estão alocadas em um mesmo grupo de espécies, estando aquelas com $2n=20$ no grupo de *I. lactea*, enquanto *I. guentheri* e *I. manezinho* estão no grupo de *I. guentheri*, e *I. parva* no grupo de *I. parva*. Segundo Hedges et al. (2008), esses dois últimos grupos são altamente relacionados, sugestão reforçada pelos dados cariotípicos idênticos obtidos para os exemplares (SIQUEIRA JR et al., 2004; CAMPOS et al., 2008), ainda que na atual mostra de *I. parva* tenha sido observada uma variação na posição da Ag-RON. Com relação a *I. juipoca*, que também mostra $2n=22$, tem cariótipo mais discrepante e está alocado no grupo de *I. verrucosa*, não associado a nenhum dos outros dois agrupamentos citados. As duas espécies de *Ischnocnema* com $2n=30$, *I. paulodutra* e *I. ramagii*, estão alocadas no grupo de *I. ramagii*. Análises citogenéticas em outros representantes dos agrupamentos propostos por Hedges et al. (2008) serão importantes para verificar se, de fato, os cariótipos são de certa forma conservados dentro dos grupos, assim como para se avaliar em que medida a localização da Ag-RON pode ou não contribuir para a caracterização dos diferentes agrupamentos.

Os dados aqui apresentados para as espécies de *V. eurygnatha* e *V. uranoscopa* são inéditos e constituem o menor número diploide da amostra, sendo $2n=20$ e $NF=40$ em ambas, que possuem cariótipos praticamente idênticos com

coloração convencional. No entanto, com o uso da técnica de coloração pela prata os cariótipos podem ser facilmente diferenciados, uma vez que a Ag-RON se mostrou um bom marcador, pois está localizada nos braços curtos dos cromossomos 6 em *V. eurygnatha* e nos braços curtos dos cromossomos 2 em *V. uranoscopa*. Com relação ao bandamento C, as marcações observadas para as duas espécies são muito semelhantes, existindo uma sutil marcação intersticial nos braços longos dos cromossomos 7 de *V. uranoscopa* não observada em *V. eurygnatha*. Poucas espécies de centrolenídeos foram cariotipadas até o momento e todas elas mostram número diploide de $2n=20$, estabelecidos pela análise de células meióticas, o que impossibilita a determinação da morfologia dos cromossomos (DUELLMAN e COLE, 1965; DUELLMAN, 1967).

Nos últimos anos diversos trabalhos têm testado a monofilia da família Centrolenidae sob pontos de vista morfológico, comportamental e molecular (CISNEROS-HEREDIA e McDIARMID, 2006; FROST et al. 2006; CISNEROS-HEREDIA e McDIARMID, 2007), tendo sido propostas algumas alterações ao nível genérico. Esses últimos autores criaram um novo gênero denominado *Nymphargus* e, além disso, sugeriram que as espécies então conhecidas como *Hyalinobatrachium eurygnathum*, *Hyalonobatrachium uranoscopum* e *Hyalinobatrachium parvulum* não deveriam pertencer ao gênero *Hyalinobatrachium*. Logo em seguida, com base em dados de sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares, Guayasamin et al. (2008) verificaram que as três espécies tornavam, de fato, o gênero *Hyalinobatrachium* não monofilético e, mais recentemente, Guayasamin et al. (2009) propuseram a criação de um novo gênero denominado *Vitreorana*, no qual foram alocadas *H. eurygnathum*, *H. uranoscopum* e *H. parvulum*, juntamente com cinco outros representantes.

Entre as seis espécies da família Cycloramphidae aqui analisadas, *O. americanus* é a única que apresenta um cariótipo mais discrepante, com $2n=22$, enquanto as demais cinco, possuem $2n=26$, dos quais *C. ryakonastes* e *C. brasiliensis* foram cariotipadas pela primeira vez. O número de cromossomos de *O. americanus*, *C. boraceiensis*, *T. miliaris* e *Z. parvulus* não diferem daqueles descritos na literatura (revisão em KING, 1990; KURAMOTO, 1990; AMARO-GHILARDI, 2005). É importante ressaltar que *O. americanus* é considerado um complexo de espécies, o qual inclui formas diploides ($2n=2x=22$) e tetraploides ($2n=4x=44$) e, como resultado de hibridação entre elas, é possível encontrar os intermediários

triploides ($2n=3x=36$), como mencionado nas revisões acima citadas. O cariótipo observado na nossa amostra de *O. americanus* corresponde ao descrito para populações diploides analisadas por Beçak et al. (1970), Bogart e Wasserman (1972), Barrio e Pistol de Rubel (1972), Beçak e Beçak (1974), Batistic et al. (1973), Ruiz e Beçak (1976), Ruiz et al. (1981), Almeida et al. (1986), Rosset et al. (2000) e Salas (2006).

As cinco espécies de Cycloramphidae com $2n=26$ mostram um cariótipo muito semelhante entre si, sendo a única discrepância a presença inequívoca do par 6 telocêntrico em *C. boraceiensis*, que nas demais corresponde a um cromossomo de dois braços. Tal diferença na morfologia é, muito provavelmente, decorrente de rearranjos cromossômicos como a inversão pericêntrica. Entre os representantes de *Cycloramphus* cariotipados, apenas *C. dubius* (BEÇAK et al., 1970) mostra cromossomos 6 telocêntricos, como em *C. boraceiensis*, o que faz com essas duas espécies apresentem $NF=50$ e não 52, como nas demais. Amaro-Ghilardi (2005) apresenta os cariótipos de *Cycloramphus acangatan* e *Cycloramphus eleutherodactylus*, ambas com $2n=26$ e $NF=52$, com cariótipos morfologicamente idênticos aos de *C. brasiliensis*, *C. ryakonastes*, *T. miliaris* e *Z. parvulus*.

Com relação a Ag-RON, a marcação ocorre nos cromossomos 3 de *O. americanus* e nos cromossomos 6 das demais cinco espécies, ainda que em posições diferentes. É importante ressaltar que o padrão de Ag-RON não foi estabelecido para *C. ryakonastes* da nossa amostra, mas R. Noletto e colaboradores (em preparação) localizaram esse marcador na região intersticial dos braços longos do par 6, assim como observado em *C. brasiliensis*. Amaro-Ghilardi (2005) relata Ag-RON também no par 6 para *Cycloramphus eleutherodactylus*, enquanto em *Cycloramphus acangatan*, a região marcada é proximal nos braços curtos dos cromossomos 1, à semelhança de *Hylodes asper* e *Hylodes phyllodes*, ambas com $2n=26$ (AMARO-GHILARDI, 2005) e que pertenciam a mesma subfamília Cycloramphinae antes da reestruturação taxonômica feita por Frost et al. (2006). Em anuros, variação tanto no número como na posição das Ag-RON, tem sido explicada por diversos mecanismos, sendo os mais comuns as transposições de elementos genéticos móveis e amplificação de cistrons ribossômicos, seguidas ou não de erros de reinserção do DNA e até mesmo por rearranjos grosseiros, como inversão pericêntrica e translocações recíprocas (WILEY et al., 1989; KING, 1990; FOOTE et

al., 1991; SCHMID et al., 1995; KAISER, 1996; LOURENÇO et al., 1998; SILVA et al., 2000b; CAMPOS et al., 2008).

Em *O. americanus* pouca heterocromatina foi observada, de modo que nem todos os cromossomos apresentam os centrômeros mais corados, ou por falta de regiões C-positivas ou por artefatos técnicos. Apesar disso, bandas intersticiais foram visualizadas nos braços curtos do par 3, em sítio coincidente com a Ag-RON, e nos braços longos do par 9. Bandamento C em *O. americanus* foi descrito para uma população tetraploide por Schmid et al. (1985), com ocorrência de bandas intersticiais nos cromossomos 3, 4 e 11. *Cycloramphus boraceiensis*, à semelhança do descrito por Silva et al. (2001) e Amaro-Ghilardi (2005), apresentou também pouca marcação de banda C, sendo exclusivamente centromérica e associada a região da Ag-RON. Já *C. brasiliensis*, com fortes bandas nas regiões centroméricas-pericentroméricas de todos os pares, mostra um forte bloco claramente pericentromérico nos braços longos dos cromossomos 3. A espécie *T. miliaris*, por sua vez, mostrou um padrão de banda C mais discrepante para o grupo, pois diversas bandas intersticiais foram observadas em, pelo menos, todos os cromossomos grande e médios. É interessante aumentar a amostra de bandamento C de *T. miliaris* para verificar se o padrão aqui apresentado foi favorecido pela ocorrência de cromossomos com condensação mais distendida, como descrito em *I. juipoca* em Campos et al. (2008), ou se, de fato, há vários blocos C-positivos espelhados pelos cromossomos da espécie.

Na revisão de Frost et al. (2006), o gênero *Thoropa* foi alocado na então criada família Thoropidae que, logo em seguida, foi sinonimizada com Cycloramphidae por Grant et al. (2006). Verdade (2005), com base em estudos de morfologia externa e interna, sugere monofilia entre os gêneros *Cycloramphus* e *Zachaenus*, propondo que sejam sinonimizados e, além disso, a autora propõe que *Thoropa* seja considerada grupo-irmão para o clado *Cycloramphus*+*Zachaenus*. Os dados citogenéticos até agora obtidos dão suporte a essas propostas, pois os cariótipos dos três gêneros parecem ser altamente conservados não só quanto ao número e morfologia cromossômica, assim como em relação a localização da Ag-RON nos cromossomos 6. Maxon et al. (1981) já haviam relatado um alto grau de parentesco entre *Cycloramphus* e *Zachaenus* e, mais tarde, Heyer (1983) e Heyer e Maxon (1982), consideraram também o grupo formado por esses dois gêneros como monofiléticos. Tais considerações já haviam sido comentadas anteriormente nos

trabalhos de Lynch (1971), que alocou *Cycloramphus* e *Zachaenus* na subfamília Telmatobiinae, tribo Grypiscini, e, logo em seguida, por Heyer (1975), que os associou a *Thoropa* e a outros seis gêneros, formando o grupo dos gripiscíneos.

A espécie *Adelophryne baturitensis* da família Eleutherodactylidae com $2n=22$ e $NF=44$, foi cariotipada pela primeira vez no presente trabalho. Em todas as metáfases analisadas pelo Giemsa, foram aplicadas sequencialmente a técnica de Ag-RON, que mostrou marcação na região intersticial dos braços longos dos cromossomos 4.

O gênero *Adelophryne* está alocado em Phyzelaphryninae que, juntamente com Eleutherodactylinae, constitui a família Eleutherodactylidae (FROST, 2010). É importante ressaltar que nenhuma espécie da primeira subfamília foi cariotipada, enquanto que da segunda, alguns representantes possuem o mesmo número diploide de *Adelophryne baturitensis* (ver revisão em CAMPOS e KASAHARA, 2006). Sem dúvida, estudos cromossômicos mais detalhados e em maior número de representantes da família seriam de grande importância para se conhecer a diversificação cariotípica dentro de Eleutherodactylidae, assim como para se ter elementos mais elucidativos que possam auxiliar na compreensão dos diferentes números diploides observados, fato ainda característico dessa família (CAMPOS e KASAHARA, 2006).

Embora *A. baturitensis* seja, conforme sugestão de Silvano e Borges-Najosa (1994), considerada como ameaçada no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, alguns trabalhos em preparação, como o de D. Loebmann e colaboradores (comunicação pessoal), sugerem a retirada da espécie dessa categoria, uma vez que grande quantidade de exemplares pode ser facilmente encontrada em campo.

Apesar do mesmo número diploide de $2n=26$, os Hemiphractidae *Flectonotus* sp. e *G. microdiscus* mostram diferentes NF, sendo 42 e 50, respectivamente. Isso ocorre devido à presença de cinco pares telocêntricos na primeira espécie, enquanto a segunda tem somente um, tornando os cariótipos facilmente distinguíveis entre si pela coloração convencional. Dados citogenéticos para ambas as espécies são aqui descritos pela primeira vez, não tendo sido possível determinar o padrão de Ag-RON e da banda C para *Flectonotus* sp. Desse gênero apenas as espécies *Flectonotus fitzgeraldi* e *Flectonotus pygmaeus* foram cariotipadas até o momento (DUELLMAN e GRAY, 1983; SCHMID et al., 1988, respectivamente) e ambas apresentam

constituições cariotípicas bastante diferentes da observada para *Flectonotus* sp. De fato, os cariótipos dessas duas espécies além de ter $2n=28$, são compostos de pequenos cromossomos telocêntricos, diferindo dos demais padrões encontrados para a família Hemiphractidae. Técnicas de Ag-RON e de banda C foram aplicadas apenas para *F. pygmaeus*, sendo o sítio marcado pela prata observado na região terminal do par 2 (SCHMID et al., 1988). Quanto ao padrão de bandamento C, há grandes blocos heterocromáticos em todos os cromossomos de modo que, segundo esses autores, cada par de homólogos pode ser identificado pelas bandas C visualizadas.

Do gênero *Gastrotheca*, algumas espécies já foram analisadas citogeneticamente, sendo que todas elas mostram $2n=26$ cromossomos. A citogenética do gênero pode ser caracterizada pela presença de cromossomos sexuais citologicamente diferenciados do tipo XX:XY ou pela presença de cromossomos B (SCHMID et al., 1988; SCHMID et al., 1990; SCHMID et al., 1994; SCHMID et al., 2002a; SCHMID et al., 2002c). Apesar de a nossa amostra incluir um único macho, não foi notada evidência de cromossomos sexuais diferenciados citologicamente, nem pela coloração convencional, nem pela técnica de banda C. O número de cromossomos de um só braço é bastante útil na distinção dos cariótipos de *G. microdiscus* e *Gastrotheca walkeri*, com um e dois pares respectivamente, de *Gastrotheca espeletia* com quatro pares e de *Gastrotheca riobambae* com sete pares, enquanto as demais espécies cariotipadas não possuem nenhum par telocêntrico. Com relação a Ag-RON o exemplar de *G. microdiscus* mostra marcação em localização bem discrepante, localizada no pequeno telocêntrico 13, enquanto nas demais espécies é visualizada nos cromossomos 6. Em certa extensão, *G. microdiscus* apresenta um padrão de distribuição da heterocromatina semelhante ao das demais espécies, com blocos bem corados na região centromérica e pericentromérica de vários cromossomos, porém com marcações de menor intensidade. Estudos citogenéticos que incluam análises da natureza dessa heterocromatina seriam de grande importância para se conhecer as relações entre essas bandas, não só nas espécies de *Gastrotheca* como também em *Flectonotus*. Adicionalmente, uso de sondas obtidas a partir de regiões repetitivas associadas a diferenciação dos cromossomos sexuais poderia revelar se tais sequências também estão presentes no genoma de *G. microdiscus*.

Da família Leiuperidae foram analisadas três espécies de *Physalaemus*, ou seja, *P. barrioi*, *P. cuvieri* e *P. moreirae*, todas com $2n=22$, embora com NF diferentes, sendo 44 nas duas primeiras e 42 em *P. moreirae* devido à presença do par 11 telocêntrico. Os dados são inéditos para *P. barrioi* e *P. moreirae*, enquanto *P. cuvieri* foi analisado por Beçak (1970), Silva et al. (1999) e Quinderé et al. (2009), não havendo diferenças cariotípicas em relação ao observado em nossa amostra. De um modo geral, os cariótipos das três espécies de *Physalaemus* se mostram bastante conservados com coloração convencional, sendo a variação mais significativa a presença do par 11 telocêntrico em *P. moreirae*. Com base em seus resultados e em cariogramas disponíveis na literatura, Silva et al. (2000b) propuseram duas fórmulas cariotípicas muito semelhantes para o gênero *Physalaemus*, com diferença no par 11 que pode ser de um ou dois braços, alteração essa que deve ser decorrente de uma inversão pericêntrica.

A técnica de Ag-RON permite a diferenciação dos cariótipos das três espécies aqui analisadas, uma vez que em cada um deles a marcação se encontra em pares diferentes, sendo o 11 em *P. barrioi*, o 8 em *P. cuvieri* e o par 6 em *P. moreirae*. O padrão de Ag-RON nas espécies de *Physalaemus* tem, em certa extensão, se mostrado variável em número, localização e em posição (SILVA et al., 1999; AMARAL et al., 2000; SILVA et al., 2000b; QUINDERÉ et al., 2009). No entanto, na maioria dos exemplares cariotipados o par 8 é quase sempre marcado, mesmo nos casos em que padrões múltiplos foram descritos (SILVA et al., 1999; QUINDERÉ et al., 2009). Esses dois trabalhos descrevem uma extensa variação populacional de Ag-RON em exemplares de *P. cuvieri* coletados no Brasil e na Argentina, embora quase sempre mostrando padrão com marcações nos cromossomos 8 ou 11. Nas três espécies de *Physalaemus* analisadas por Amaral et al. (2000) a localização da Ag-RON foi descrita como sendo nos cromossomos 9, mas ao observar a figura, o cromossomo poderia ser o 8 como descrita aqui e nos demais trabalhos da literatura. Ag-RON única no par 11, à semelhança de *P. barrioi*, foi descrita para *Physalaemus spiniger*, além de algumas populações de *P. cuvieri* (SILVA et al., 2000b). Com relação às marcações no par 6 em *P. moreirae*, pode-se dizer que essa localização é inédita para o gênero.

Pouca heterocromatina foi observada nas espécies analisadas, de modo que, além das marcações centroméricas e no sítio coincidente com as Ag-RON, apenas bandas pericentroméricas nos braços curtos dos cromossomos 3 e braços longos

dos cromossomos 7 foram visualizadas em *P. barrioi*, assim como bandas intersticiais nos braços curtos dos cromossomos 2 de *P. cuvieri* e nos braços longos dos cromossomos 5 de *P. moreirae*. Das espécies apresentadas na literatura com bandamento C, *Physalaemus biligonigerus*, *Physalaemus fuscumaculatus* e *Physalaemus* sp. apresentam fortes blocos C-positivos na região centromérica de todos os cromossomos e nos braços curtos do par 3 (AMARAL et al., 2000; SILVA et al., 2000b).

No trabalho de Frost et al. (2006) os genes mitocondriais e nucleares de cerca de 520 espécies de anuros foram sequenciados, porém, apesar do grande número de representantes amostrados, corresponde a menos de 10% do total descrito para a ordem. As conclusões obtidas foram precursoras de extensas alterações na taxonomia que geraram polêmicas, resultando inclusive na publicação de um texto (WIENS, 2007) com críticas ao trabalho. As propostas apresentadas por Frost et al. (2006) são, no entanto, seguidas pela grande maioria dos pesquisadores e, a partir delas, outros trabalhos têm tratado de questões de taxonomia e sistemática de anuros com base, principalmente em caracteres moleculares, destacando-se as revisões de Grant et al. (2006) e Hedges et al. (2008).

Após as análises de Frost et al. (2006), as espécies que estavam incluídas na então polifilética família Leptodactylidae foram redistribuídas em três agrupamentos intercalados por outras famílias (Figura 1 do item Introdução Geral). Ao confrontar o número diploide, por nós encontrados juntamente com os disponíveis na literatura para representantes desses agrupamentos (KING, 1990; KURAMOTO, 1990; AMARO-GHILARDI, 2005), é possível notar que o número de cromossomos parece ser conservado dentro das diferentes famílias. Pode-se dizer que os cariótipos com $2n=22$ e $2n=26$ são predominantes para os representantes da antiga família Leptodactylidae, ainda que sejam encontrados números diploides como 16, 18, 20, 24, 28, 30, 32, 34 e 36, sendo a maioria, principalmente os mais altos, observados em espécies que pertencem ou pertenciam ao gênero *Eleutherodactylus*, que atualmente estão espalhadas nas famílias Craugastoridae e Eleutherodactylidae (FROST, 2010), e em *Pseudopaludicola*, alocado em Leiuperidae, cujos demais gêneros possuem todos $2n=22$.

O primeiro dos agrupamentos correspondia à família Batracophrynidae que incluía apenas dois gêneros, ou seja, *Caudiverbera* e *Telmatobufo* (FROST et al., 2006). Atualmente, essa família foi suprimida, já que a única espécie de

Caudiverbera, *C. caudiverbera*, foi sinonimizada com *Calyptocephalella gayi*, gênero pertencente à família Calyptocephalellidae, que passou a incluir também *Telmatobufo* (FROST, 2010). Dessa família existem dados citogenéticos para *C. gayi* com $2n=26$ (BRUM-ZORRILLA e SAEZ, 1968; KURAMOTO, 1972; MORESCALCHI, 1973; FORMAS e ESPINOSA, 1975; DIAZ e VELOSO, 1979; VELOSO e ITURRA, 1979) e para os três representantes descritos de *Telmatobufo*, isto é, *T. australis*, *T. bullock* e *T. venustus*, todas com $2n=26$ (FORMAS e ESPINOZA, 1975; FORMAS e CUEVAS, 2000), sendo os cariótipos constituídos por cromossomos de dois braços praticamente indistinguíveis nos dois gêneros. De acordo com comentários em Frost (2010), ambos são considerados muito relacionados, não só do ponto de vista citogenético, como também sob vários outros aspectos, incluindo os de morfologia interna ou externa e os moleculares. Os dados de sequenciamento gênico de Frost et al. (2006) indicam que as espécies ora alocadas em Calyptocephalellidae estão distantes dos atuais leptodactídeos, assim como, em certa extensão, é mostrado pelas informações citogenéticas. As duas únicas espécies de Leptodactylidae com $2n=26$ (*L. andreae* e *L. hylaedactylus*) apresentam cariótipos muito divergentes dos observados em Calyptocephalellidae, por incluir vários cromossomos telocêntricos.

É interessante notar que as espécies dos antigos leptodactídeos analisadas na árvore de máxima parcimônia de Frost et al. (2006), formam duas grandes ramificações, sendo que na primeira delas, estão *Calyptocephalella* e *Telmatobufo*, com $2n=26$, em uma posição mais basal em relação às demais espécies que, salvo algumas exceções, possuem $2n=24$ cromossomos (KING, 1990; KURAMOTO, 1990), provavelmente derivado de um ancestral com $2n=26$. A outra ramificação inclui a atual família Leptodactylidae e, entre outras, aquelas que passaram a alocar as espécies não mais consideradas como leptodactídeos, formando os dois outros agrupamentos.

No segundo agrupamento são encontradas as famílias Hemiphractidae, Brachycephalidae, Craugastoridae, Eleutherodactylidae e Strabomantidae, sendo a primeira delas a única que tem mostrado, majoritariamente, número diploide alto com $2n=26$, $2n=28$ e $2n=30$. O número diploide $2n=26$ foi encontrado em *Flectonotus* sp. e *G. microdiscus* da nossa amostra e em alguns outros exemplares de *Gastrotheca* (SCHMID et al., 1988; SCHMID et al., 1990; SCHMID et al., 2002a; SCHMID et al., 2002c), com uma constituição cariotípica, de certa forma, diferente daquelas observadas em espécies de Calyptocephalellidae. Nos cariótipos de

hemifractídeos podem ser observadas variações como presença de cromossomos telocêntricos, de cromossomos sexuais diferenciados citologicamente, e de distribuição da heterocromatina. De fato, as bandas C em Hemiphractidae correspondem a grandes blocos localizados nas regiões centroméricas e pericentroméricas e, além disso, casos com marcações nas regiões terminais de todos os cromossomos. Dos cinco gêneros atualmente alocados nessa família, apenas *Hemiphractus* não possui representantes cariotipados, sendo que nos demais, a maioria ou a totalidade das espécies tem $2n=26$. Os cromossomos dessas espécies parecem, de um modo geral, não ter relações de proximidade com os atuais leptodactilídeos, o que corrobora a inclusão dos gêneros *Cryptobatrachus*, *Flectonotus*, *Gastrotheca*, *Hemiphractus* e *Stefania* em uma família à parte de Leptodactylidae, como proposto por Frost et al. (2006). É importante enfatizar que tais gêneros compunham uma subfamília de Hylidae, a Hemiphractinae, que foi alocada por Faivovich et al. (2005) em Leptodactylidae, sem maiores comentários sobre as relações entre elas. De fato, os cinco gêneros alocados em Hemiphractidae parecem não estar mesmo relacionados aos atuais leptodactilídeos.

Ainda dentro do segundo agrupamento, encontramos as espécies de antigos leptodactilídeos que pertenciam anteriormente à subfamília Eleutherodactylinae e que, após a revisão de Frost et al. (2006), passaram a fazer parte de Brachycephalidae junto com o gênero *Brachycephalus* que já pertencia à essa família. Mais recentemente, Hedges et al. (2008) realizaram, com base em dados morfológicos e moleculares, uma análise mais detalhada em Brachycephalidae e a maioria de suas espécies foram redistribuídas nas novas famílias Craugastoridae, Eleutherodactylidae e Strabomantidae, sendo que muitos dos seus representantes passaram também por mudanças ao nível genérico. Os gêneros *Brachycephalus* e *Ischnocnema* que permaneceram dentro da família Brachycephalidae incluem espécies com cariótipos com $2n=22$ (a maioria) e com $2n=20$ e $2n=30$, porém, os primeiros diferem, na maioria das vezes, na morfologia de alguns pares de cromossomos, assim como nos padrões de banda C e Ag-RON, como foi também observado no presente trabalho. Tais cariótipos diferem dos encontrados nos leptodactilídeos do gênero *Leptodactylus* com $2n=22$ pela presença e posição de cromossomos telocêntricos e subtelocêntricos. Sem dúvida, é interessante cariotipar outras espécies de *Brachycephalus* para que se possa conhecer o cariótipo de

outros representantes do gênero, assim como de *Ischnocnema*, para se avaliar a extensão da variabilidade cariotípica.

Nas espécies de Brachycephalidae (*sensu* FROST et al., 2006) que estão atualmente nas famílias Craugastoridae, Eleutherodactylidae e Strabomantidae de Hedges et al. (2008), os números diploides encontrados mostram uma excepcional variação, com cariótipos portadores de 18 a 36 cromossomos (revisão em KING, 1990; KURAMOTO, 1990; CAMPOS e KASAHARA, 2006). Os de números mais altos são constituídos, majoritariamente ou em sua totalidade, por cromossomos de um só braço. Embora existam nessas famílias representantes com $2n=22$, é interessante notar que as constituições cariotípicas incluem, via de regra, cromossomos telocêntricos e, principalmente subtelocêntricos, como é o caso do eleutherodactídeo *A. baturitensis* da nossa amostra, cujo cariótipo tem cinco pares com essa última morfologia; a localização da Ag-RON é, em geral, em cromossomos diferentes do observado nos leptodactídeos com $2n=22$, nos quais o par marcador é frequentemente o oitavo. De fato, a Ag-RON é no par 1 em *Haddadus binotatus* (CAMPOS et al., 2008), no par 11 em *Barycholos ternetzi* (CAMPOS et al., 2008), e nos subtelocêntricos 4 de *A. baturitensis* (presente trabalho). Ainda há muito a se conhecer sobre as constituições cariotípicas das espécies pertencentes às famílias Brachycephalidae, Craugastoridae, Eleutherodactylidae e Strabomantidae, sendo indispensável o estudo citogenético de maior número possível de representantes de todos os seus gêneros. Tais dados poderiam auxiliar na compreensão das relações filogenéticas, mas, sobretudo, para se estabelecer os mecanismos de diferenciação envolvidos nesses cariótipos tão divergentes.

O terceiro agrupamento é o que compreende a maioria dos representantes que pertenciam aos antigos leptodactídeos que, após as revisões de Frost et al. (2006) e de Grant et al. (2006), foram distribuídos em cinco famílias, ou seja, Ceratophryidae, Cycloramphidae, Hylodidae, Leiuperidae e Leptodactylidae. Dentro dessas famílias encontramos um grande número de gêneros, cujas espécies possuem uma ampla distribuição na região Neotropical, tendo sido já cariotipadas um grande número delas. Os dados cromossômicos disponíveis até a presente data, alguns deles descritos pela primeira vez no presente trabalho, mostram que as espécies apresentam, predominantemente, cariótipos com $2n=22$ e $2n=26$, incluindo alguns poucos casos com $2n=18$ e $2n=24$, todos eles em leptodactídeos. De certa forma, pode-se dizer que os dados acumulados para as espécies que compõem o

terceiro agrupamento estão de acordo com as relações propostas nas árvores filogenéticas de Frost et al. (2006) e de Grant et al. (2006).

Entre as espécies consideradas Leptodactylidae em Frost et al. (2006) podia ser observado, majoritariamente, $2n=22$ cromossomos, principalmente pelo fato de a grande maioria dos representantes cariotipados serem dos gêneros *Leptodactylus* e *Physalaemus*. Após a revisão de Grant et al. (2006), essa família foi subdividida em Leptodactylidae e Leiuperidae, com quatro e sete gêneros, respectivamente. Dois dos gêneros da primeira família, isto é, *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys*, possuem cariótipos altamente similares com $2n=24$ indicando a grande proximidade de ambos também do ponto de vista citogenético, o que corrobora a proposta de proximidade sugerida por Lynch (1971) e a localização dos dois gêneros nas árvores de Frost et al. (2006) e Grant et al. (2006). *Leptodactylus* tem mostrado, na maioria das vezes, espécies com $2n=22$ cromossomos, com exceção de *L. silvanimbus* ($2n=24$), das espécies que pertenciam aos antigos gêneros *Adenomera* ($2n=24$ e $2n=26$) e *Lithodytes* ($2n=18$). É importante ressaltar que, até o momento, nenhuma espécie de *Hydrolaetare* foi cariotipada, o que seria altamente indicado, pois o gênero, mesmo não tendo sido amostrado nos trabalhos de revisão de 2006, foi alocado na família Leptodactylidae por Frost et al. (2006), seguindo comentários de Heyer (1970), que aproximou o gênero às espécies de *Leptodactylus*. Além disso, os primeiros autores sugerem que tal alocação seja cuidadosamente reavaliada.

Na família Leiuperidae, há dados citogenéticos para representantes de todos os gêneros propostos e, majoritariamente, é observado $2n=22$ cromossomos. O gênero *Pseudopaludicola* é uma exceção a essa conservação de número diploide, pois apresenta espécies com $2n=16$, 18, 20 ou 22.

Apesar das espécies de Leptodactylidae e Leiuperidae terem sido consideradas da mesma família por Frost et al. (2006) e a maioria delas apresentar $2n=22$, na revisão de Grant et al. (2006) há um claro distanciamento entre as duas famílias. De fato, podemos observar na árvore proposta por esses últimos autores que Leptodactylidae está separado de Leiuperidae por duas famílias, a Ceratophryidae e a Cycloramphidae. Do ponto de vista citogenético, não parece ser muito claro nem a proximidade nem o distanciamento dos representantes das duas famílias, pois há casos em que os cariótipos são equivalentes e casos com diferenças marcantes, como a presença de um cromossomo 11 telocêntrico. Silva et al. (2000b) sugerem duas fórmulas cariotípicas para espécies de *Physalaemus*,

Engystomops e *Eupemphyx* levando em conta se os cromossomos 11 são de um ou dois braços. Quanto ao padrão de Ag-RON, é quase sempre observado nos cromossomos 8 de *Leptodactylus*, e em espécies de Leiuperidae tem se mostrado variável quanto a sua localização, ainda que boa parte dos representantes possuam marcação no par 11. Tal fato sugere que a Ag-RON não pode ser considerada um bom marcador para espécies dessas famílias.

Um ponto a ser comentado é a inclusão de todas as espécies de *Adenomera*, *Lithodytes* e *Vanzolinius* em *Leptodactylus*, decorrente da sinonimização desses três gêneros por Frost et al. (2006). Esse assunto tem sido muito discutido ao longo das últimas décadas (revisão em CAMPOS et al., 2009). A discrepância observada nos cariótipos dessas espécies, excetuando *Leptodactylus discodactylus* (antigamente *Vanzolinius discodactylus*), está de acordo com a separação observada entre elas nas árvores apresentadas em 2006. É importante enfatizar que, Frost et al. (2006) sinonimizaram as espécies pertencentes aos gêneros *Adenomera* e *Lithodytes* e as colocaram como subgênero de *Leptodactylus*, sendo que logo em seguida Grant et al. (2006) descon sideraram a denominação *Leptodactylus (Lithodytes)* sugerida pelos primeiros autores. Com relação à espécie *L. discodactylus*, é bastante aceitável que permaneça no gênero *Leptodactylus*, não só pelas relações de parentescos (ver comentários em FROST et al., 2006; FROST, 2010), mas também pela constituição cariotípica. Considerando essas colocações, seria muito útil realizar análises citogenéticas com técnicas mais resolutivas, para auxiliar nos questionamentos sobre a sinonimização das espécies que pertenciam a *Adenomera* e *Lithodytes* a *Leptodactylus*. De qualquer modo, esses representantes são altamente relacionados sob vários caracteres e, se de fato pertencem ao mesmo gênero, seria interessante a revalidação da denominação de “grupo de *L. marmoratus*”, sugerido por Heyer (1973), para se acomodar as 11 espécies que pertenciam a *Adenomera* e a única espécie do gênero *Lithodytes* (*L. lineatus*).

Quanto a Centrolenidae, análises com diversas abordagens têm mostrado diferentes relações entre essa família e outros anuros (ver comentários em GUAYASAMIN et al., 2009), tendo sido também considerada por Frost et al. (2006) como grupo-irmão de Leptodactylidae (*sensu* FROST et al., 2006) e, em seguida, indicada por Grant et al. (2006) como grupo-irmão de diversas famílias, incluindo as que comportam espécies que pertenceram a Leptodactylidae. Apenas alguns representantes de centrolenídeos foram cariotipados até o momento, sendo eles

pertencentes aos gêneros *Centrolene*, *Cochranella* e *Hyalinobatrachium*, todos com $2n=20$ (DUELLMAN e COLE, 1965; DUELLMAN, 1967), e as duas espécies de *Vitreorana*, *V. eurygnatha* e *V. uranoscopa*, do presente trabalho. Essas duas espécies de centrolenídeos mostram discrepância não só no número diploide em relação à maioria dos leptodactídeos, antigos e atuais, nos quais predominam $2n=22$ e $2n=26$, mas também em relação à constituição cariotípica. De fato, diferenças podem ser observadas no par 1, que não é de tamanho visivelmente maior que o segundo par, como visualizado em todos os outros cariótipos, e na marcante queda de tamanho entre os pares 8 e 9, tornando os dois últimos pares nitidamente pequenos. As relações filogenéticas entre Centrolenidae e os demais anuros, não estão ainda bem delimitadas, seria, então, de grande importância ampliar as análises citogenéticas desse grupo, para a busca de elementos que corroborem com essa questão.

Ainda dentro desse terceiro agrupamento encontramos as famílias Ceratophryidae, Cycloramphidae e Hylodidae, cujos representantes mostram em sua grande maioria $2n=26$. Em Ceratophryidae, somente um dos sete gêneros, o *Batrachophrynus*, não possui representantes cariotipados e apenas algumas espécies de *Telmatobius* e *Ceratophrys* são as exceções dos cariótipos com $2n=26$ (revisão em KING, 1990; KURAMOTO, 1990; AMARO-GHILARDI, 2005). Em Cycloramphidae é também possível dizer que o número diploide de $2n=26$ é o principal na família, havendo poucas exceções, isto é, em exemplares de *Alsodes* e *Eupsophus*, com $2n=28$ e $2n=30$, e $2n=22$ em todas as espécies analisadas de *Macrogenioglottus*, *Proceratophrys* e *Odontophrynus* (revisão em KING, 1990; KURAMOTO, 1990; AMARO-GHILARDI, 2005). É importante comentar que há casos de poliploidia em *Odontophrynus*, mas sempre com um cariótipo básico de $2n=2x=22$. Alguns Cycloramphidae possuem cariótipos equivalentes e, além da semelhança na constituição cariotípica, há em alguns casos concordância na localização das Ag-RON, como nas espécies de *Cycloramphus* (exceto *C. acangatan*), *Thoropa* e *Zachaenus* (SILVA et al, 2001; AMARO-GHILARDI, 2005; presente amostra). Após o trabalho de Grant et al. (2006), as espécies de *Thoropa* foram transferidas de Thoropidae, que foi suprimida, para Cycloramphidae, cuja proximidade já havia sido sugerida por autores como Heyer e Maxon (1983) e Verdade (2005). Como se pode observar, os dados citogenéticos também estão de

acordo com essa alteração, considerando a grande similaridade entre os cariótipos das espécies dos gêneros *Thoropa*, *Cycloramphus* e *Zachaenus*.

A família Cycloramphidae está dividida em duas subfamílias, a Alsodinae e a Cycloramphinae. É interessante notar que *Cycloramphus* e *Zachaenus* estão alocados em Cycloramphinae e *Thoropa* em Alsodinae, mas devido à semelhança cariotípica aqui observada e as relações de proximidades sugeridas por Heyer e Maxon (1983) e Verdade (2005), seria importante analisar novos exemplares desses gêneros, não só sob o ponto de vista citogenético, para avaliar a possibilidade da alocação de *Thoropa* em uma mesma subfamília junto a *Cycloramphus* e *Zachaenus*. Na subfamília Alsodinae estão alocadas espécies de *Macrogenioglottus*, *Odontophrynus* e *Proceratophrys*, cujos cariótipos têm mostrado sempre $2n=22$, o que, de acordo com as propostas de Bogart (1973), corresponde a um cariótipo mais derivado entre as espécies que pertenciam aos leptodactídeos. É interessante notar que na árvore de Frost et al. (2006), as espécies de *Odontophrynus* e *Proceratophrys* são as que ocupam uma posição mais derivada na família, em concordância com os dados citogenéticos. Nessas análises de sequenciamento molecular não foram incluídos exemplares de *Macrogenioglottus*, o que seria interessante para verificar se o gênero também ficaria associado aos outros dois que possuem o mesmo $2n=22$. Na família Hylodidae representantes dos três gêneros já foram cariotipados, sendo que *Hylodes* e *Crossodactylus* apresentam $2n=26$ em quase todas as espécies, enquanto *Megaelosia* possui uma variação na constituição cariotípica, incluindo números diploides de 28, 30 e 32. Sem dúvida, a retirada dos gêneros atualmente alocados em Hylodidae, Ceratophryidae e Cycloramphidae da antiga família Leptodactylidae está de acordo também sob o ponto de vista citogenético, pois seus cariótipos possuem constituições bastante diferentes dos observados nos Leptodactylidae, em geral com $2n=22$ e 24.

Levando-se em conta todas essas considerações, é possível notar que, também do ponto de vista citogenético, a antiga família Leptodactylidae não era, de fato, monofilética. A drástica redução ocorrida nessa família durante os últimos anos, que passou a comportar apenas quatro dos 57 gêneros originalmente propostos, parece ter resolvido uma série de questionamentos sobre a monofilia dos leptodactídeos em relação a vários caracteres, inclusive os citogenéticos. No entanto, algumas pendências ainda existem em alguns grupos, como é o caso dos *Leptodactylus* que incluem espécies dos antigos gêneros *Adenomera* e *Lithodytes*,

com $2n=18$, 24 e 26. Sem dúvida, novos estudos que incluam técnicas citogenéticas mais resolutivas devem ser realizados para que se possam buscar elementos elucidativos que ajudem na compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação dos cariótipos das espécies ora discutidas. É também de grande importância, expandir a amostragem da constituição cariotípica ao maior número possível de espécies, e incluir os dados cromossômicos nos estudos que buscam esclarecer as dúvidas que existem sobre a taxonomia e sistemática desse e de outros grupos de anuros.

Referências Bibliográficas

Almeida TMB, Ruiz IRG, Beçak W (1986) Ribosomal gene activity detected by silver staining in two diploide populations of *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura) from Southern Brazil. Rev Brasil Genet IX 3:433-437.

Amaral MJLV, Cardoso AJ, Recco-Pimentel SM (2000) Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). Caryologia 53:283-288.

Amaro-Ghilardi RC (2005) Estudos citogenéticos comparativos em 26 espécies da família Leptodactylidae (Amphibia, Anura). Tese de Doutorado, USP 162pp .

Amaro-Ghilardi RC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y (2004) Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). Caryologia 57:53-65.

Amaro-Ghilardi RC, Silva MJJ, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y (2008) Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetica 134:159-168.

Amaro-Ghilardi RC, Skuk G, Sa R, Rodrigues MT, Yassuda YY (2006) Karyotypes of eighth species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. Phyllomedusa 5:119-133.

Ananias F, Giaretta AA, Recco-Pimentel SM (2006) Cytogenetics of *Brachycephalus ephippium* (Anura, Brachycephalidae) with comments on its relationship to the Bufonidae. Amphibia-Reptilia 27:121-125.

Azevedo MFC, Foresti F, Ramos PRR, Jim J (2003) Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. *Gen and Mol Biology* 26:289-294.

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. *Rev Brasil Genet* 16:335-345.

Baldissera Jr FA, Batistic RF, Haddad CFB (1999) Cytotaxonomic considerations with the description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo* (Anura: Bufonidae). *Amphibia-Reptilia* 20:413-420.

Barrio A, Pistol de Rubel D (1972) Encuesta cariotípica de poblaciones argentino-uruguayas de *Odontophrynus americanus* (Anura-Leptodactylidae) relacionada con otros rasgos taxonómicos. *Physis* 31:281-291.

Batistic RF, Beçak W, Beçak ML (1973) DNA autoradiographic patterns in diploid, triploid and tetraploid amphibians (Ceratophrydidae). *Cytologia* 38:687-697.

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

Beçak ML, Beçak W (1974) Diploidization in *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae - Amphibia). *Experientia* 30:624-625.

Beçak ML, Beçak W, Vizotto LD (1970) A diploid population of the polyploid amphibian *Odontophrynus americanus* and an artificial intraspecific triploid hybrid. *Experientia* 26:545-546.

Bogart JP (1970) Los cromosomas de anfibios anuros del género *Eleutherodactylus*. *Act IV Congr Latin Zool* 1:65-78.

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

Bogart JP (1974) A karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). *Copeia* 3:728-737.

Bogart JP, Wasserman AO (1972) Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics* 11:7-24.

Brum-Zorlla N, Saez FA (1968) Chromosomes of Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Experientia* 24:969.

Campos JRC, Kasahara S (2006) Os cromossomos dos anfíbios anuros do gênero *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae: Eleutherodactylinae). *Publ. Ci. Biol. Saúde* 12: 27-38.

Campos JRC, Ananias F, Haddad CFB, Kasahara S (2008) Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae). *Micron* 39:151-159.

Campos JRC, Ananias F, Brasileiro CA, Yamamoto M, Haddad CFB, Kasahara S (2009) Chromosomal evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. *Hereditas* 146:104-111.

Cisneros-Heredia, D. F. & McDiarmid, R.W. (2006) Review of the taxonomy and conservation status of the Ecuadorian glassfrog *Centrolenella puyoensis* Flores & McDiarmid (Amphibia: Anura: Centrolenidae). *Zootaxa* 1361:21–31.

Cisneros-Heredia DF, McDiarmid RW (2007) Revision of the characters of Centrolenidae (Amphibia: Anura: Athesphatanura), with comments on its taxonomy and the description of new taxa of glassfrogs. *Zootaxa* 1572:1-82.

Darst CR, Cannatella DC (2004) Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 31:462-475.

Denaro L (1972) Karyotypes of Leptodactylidae anurans. *J Herpetology* 6:71-74.

Diaz NF, Veloso A (1979) Sistemática y evolución de los anfíbios de Chile. *Arch Biol Med Exper* 12:59-79.

Duellman WE (1967) Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Sys Zool* 16:38-43.

Duellmann WE, Cole CJ (1965) Studies of chromosomes of some anuran Amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Sys Zool* 14:139-143.

Duellman WE, Gray P (1983) Developmental biology and systematics of the egg-brooding hylid frogs, genera *Flectonotus* and *Fritziana*. *Herpetologica* 39:333-359.

Duellman WE, Trueb L (1994) *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill, 670pp.

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

Foot DL, Wiley JE, Little ML, Meyne J (1991) Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. *Cytogenet. Cell Genet* 57:196-199.

Ford LS, Cannatella DC (1993) The major clades of frogs. *Herpetol Monog* 7:94-117.

Formas JR, Espinosa DE (1975) Karyological relationships of frogs of the genus *Telmatobufo* (Anura:Leptodactylidae). *Herpetologica* 31:429-432.

Formas JR, Cuevas CC (2000) Comparative cytogenetic analysis of the Chilean leptodactylidae frog genus *Telmatobufo*, with the description of the chromosomes of *T. venustus*. *Proc. Biol. Soc. Washington* 113:890-899.

Frost DR (2010) *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, New York, USA>.

Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, De 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 (2006) The amphibian tree of life. *Bull of the Am Museum of Nat Hist* 297:1-370.

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

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

Green DM, Sessions SK (2007) Karyology and Cytogenetics. In: *Amphibian Biology, Volume 7. Systematics*. Heatwole H, Tyler M (Eds). Surrey Beatty and Sons, pp. 2756-2841.

Guayasamin JM, Castroviejo-Fisher S, Ayarzagüena J, Trueb L, Vilà C (2008) Phylogenetic relationships of glassfrogs (Centrolenidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* 48:574–595.

Guayasamin JM, Castroviejo-Fisher S, Trueb L, Ayarzagüena J, Rada M, Vilà C (2009) Phylogenetic systematics of Glassfrogs (Amphibia: Centrolenidae) and their sister taxon *Allophryne ruthveni*. *Zootaxa* 2100:1–97.

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

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

Heyer WR (1970) Studies of the frogs of the genus *Leptodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae). VI. Biosystematics of the melanototus group. *Contrib Sci Natur Hist Museum* 191:1-48.

Heyer WR (1973) Systematic of the *marmoratus* group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). *Contrib Sci Natur Hist Museum* 251:1-50.

Heyer WR (1974) Relationships of the *marmoratus* species group (Amphibia, Leptodactylidae) within the subfamily Leptodactylinae. *Contrib Sci Natur Hist Museum* 254:1-45.

Heyer WR (1975) *Adenomera lutzi* (Amphibia:Leptodactylidae), a new species of frog from Guyana. *Proc of the Bio Society of Washington* 88:315-318.

Heyer WR (1977) A discriminant function analysis of the frogs of the genus *Adenomera* (Amphibia: Leptodactylidae). Proc of the Biol Society of Washington 89:581-592.

Heyer R (1983) Variation and systematic of frogs of the genus *Cycloramphus* (Amphibia, Leptodactylidae). Arquivos de Zoologia 30:235-339.

Heyer WR, Diment MJ (1974) The karyotype of *Vanzolinius discodactylus* and comments on usefulness of karyotypes in determining relationships in the *Leptodactylus*-complex (Amphibia, Leptodactylidae). Proc of the Bio Society of Washington 87:327-336.

Heyer WR, Maxson LR (1982) In: Prance GT (Ed) Biological Diversification in the Tropics. Columbia Univ Press, New York, pp. 375-388.

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

Kaiser H, Mais C, Bolaños F, Steinlein C (1996) Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. Genetica 98:95-102.

Kasahara S, Silva APZ, Haddad CFB (1996) Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). Brazilian Journal of Genetics 19:237-242.

Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL (1998) Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). Genetics and Molecular Biology 21:471-476.

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

Kuramoto M (1972) Karyotypes of three leptodactylid frogs from Chile, with a discussion on the chromosome numbers of the family Leptodactylidae. Bull Fukuoka Univ Educ 21:133-141.

Kuramoto M (1990) A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. Bull Fukuoka Univ Educ 39:83-127.

Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (2008) Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP (Eds). Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade 19. vol II, Brasília, DF.

Lourenço LB, Garcia PC, Recco-Pimentel SM (2000) Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae) with phylogenetic comments. *Hereditas* 113:201-209.

Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1998) Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chrom Res* 6:621-628.

Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1999) Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). *Can J Zool* 77:624-631.

Lourenço LB, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM (2003) Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae) and new insights on the relationship with the leptodactylid *Paratelmatobius*. *The Italian J of Zoology* 70:183-190.

Lourenço LB, Bacci-Júnior M, Martins VG, Recco-Pimentel SM, Haddad CFB (2007) Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica* 132:255-266.

Lynch JD (1971) Evolutionary relationship, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. *Misc Publ Mus Nat Univ Kansas* 53:1-238.

Lucca EJ, Jim J (1974) Os cromossomos de alguns Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Rev Brasil Biol* 34:407-410.

Lucca EJ, Jim J, Foresti F (1974) Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia* 27:183-192.

Maxon LR, Heyer WR, Maxon RD (1981) Phylogenetic relationships of the Brazilian leptodactylid frog genera *Craspedoglossa*, *Cycloramphus* and *Zachaenus*. *Experientia* 37:144-145

Morescalchi A (1973) Amphibia. In Cytotaxonomy and vertebrate evolution. Chiarelli AB, Capanna G (Eds) Acad Press, London and New York, pp. 233-348.

Napoli MF, Ananias F, Fonseca PM, Silva APZ (2009) Morphological and karyotypic contributions for a better taxonomic definition of the frog *Ischnocnema ramagii* (Boulenger, 1888) (Anura, Brachycephalidae). South American Journal of Herpetology, 4:164-172.

Quinderé YRSD, Lourenço, Andrade GV, Tomatis C, Baldo D, Recco-Pimentel SM (2009) Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing Regions. Biol Res 42:79-92.

Rosset SD, Baldo D, Lanzone C, Basso NG (2006) Review of the Geographic Distribution of Diploid and Tetraploid Populations of the *Odontophrynus americanus* Species Complex (Anura: Leptodactylidae). J Herpetol 40:465-477.

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

Ruiz IRG, Beçak W (1976) Further studies on polyploid amphibians V. C-banding in diploid and tetraploid species of *Odontophrynus*. Chromosoma 54:69-71.

Ruvinsky I, Maxon LR (1996) Phylogenetic relationship among Bufonoid frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol Phylogenet Evol 3:533-547.

Salas N (2006) Análisis cromosómico de *Odontophrynus americanus*, *O. achalensis*, *O. cordobae* y *O. occidentalis* (Anura: Leptodactylidae) de la provincia de Córdoba, Argentina. Rev Esp Herp 20:31-38.

Savage JM, De Weese JE (1979) A new species of Leptodactylidae frog, genus *Eleutherodactylus*, from the Cordillera de Talamanca, Costa Rica. Bull Southern California Acad Sci 78:107-115.

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

Schmid M, Klett R (1994) Chromosome banding in Amphibia XX. DNA replication patterns in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). Cytogenet Cell Genet 65:122-126.

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

Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I, Haaf T (2002c) Chromosome banding in Amphibia XXIV. The B chromosomes of *Gastrotheca espeletia* (Anura, Hylidae). Cytogenet Genome Res 97:205-218.

Schmid M, Steinlein C, Feichtinger W, Friedl R, Almeida CG, Duellman WE (1988) Chromosome banding in Amphibia XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). Chromosoma 97:33-42.

Schmid M, Steinlein C, Feichtinger W, Friedl R, Almeida CG, Haaf T, Hillis DM, Duellman WE (1990) Chromosome banding in Amphibia XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). Chromosoma 99:413-23.

Schmid M, Feichtinger W, Weimer R, Mais C, Bolaños F, León P (1995) Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). Cytog Cell Genet 69:18-26.

Schmid M, Haaf T, Steinlein C, Nanda I, Mahony M (2002b) Chromosome banding in Amphibia. XXV. Karyotype evolution and heterochromatin characterization in Australian *Mixophyes* (Anura, Myobatrachidae). Cytogenet Genome Res 97:239-253.

Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Nanda I, Mais C, Haaf T, Visbal Garcia R, Fernández Badillo (2002a) Chromosome banding in Amphibia XXII. Atypical Y chromosomes in *Gastrotheca walkeri* and *Gastrotheca ovifera* (Anura, Hylidae). Chromosoma 96:228-238.

Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (1999) Nucleolar organizer regions of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hereditas 131:135-141.

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

Silva APZ, Baldissera Jr FA, Haddad CFB, Kasahara S (2000b) Karyotypes and nucleolus organizer regions in four species of the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia - Sér. Zool* 88:158-164.

Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (2001) Cytogenetic studies in *Cycloramphus boraceiensis* Heyer, 1983 (Anura, Leptodactylidae). *Rev Bras Zool* 18:111-115.

Silva APZ, Haddad CFB, Galassi GG, Kasahara S (2006) Multiple organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica* 130:281-291.

Silva APZ, Garcia PCA, Martins VG, Bacci M, Kasahara S (2004) Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. *Amphibia-Reptilia* 25:185-196.

Siqueira Jr S (2008) Análise de espécies brasileiras de Terraranas (Amphibia: Anura) utilizando estudos cromossômicos e da ultraestrutura do espermatozóide. Tese de Doutorado. UNICAMP 141pp.

Siqueira Jr S, Ananias F, Recco-Pimentel SM (2004) Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. *Gen and Mol Biology* 27:363-372.

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

Veloso A, Iturra P (1979) Possibilidades del análisis citogenético en un estudio de banded cromosómico en dos especies de anfibios (Anura: Leptodactylidae). *Arch Biol Med Exper* 12:91-96.

Verdade VK (2005) Relações filogenéticas entre as espécies dos gêneros *Cycloramphus* Tschudi 1838 e *Zachaenus* Cope 1866 (Anura, Leptodactylidae). Tese de Doutorado, USP 170pp.

Wiens JJ (2007) Book review: The amphibian tree of life. Q Rev Biol 82:55–56.

Wiley JE, Little ML, Romano MA, Blount DA, Cline GR (1989) Polymorphism in the location of the 18S and 28S rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. Chromosoma 97:481-487.

Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations

¹João Reinaldo Cruz Campos; ²Fernando Ananias; ³Cíntia Aguirre Brasileiro;
⁴Marcos Yamamoto; ¹Célio Fernando Baptista Haddad; ¹Sanae Kasahara

¹Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil; ²Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brasil; ³Museu de História Natural, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil; ⁴Departamento do Meio Ambiente, Votorantim Celulose e Papel S/A, Santa Branca, SP, Brasil

Campos, J. R. C., Ananias, F., Brasileiro, C. A., Yamamoto, M., Haddad, C. F. B. and Kasahara, S. 2009. Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. *Hereditas* 146:104-111.

Abstract

Karyotypic analyses on three species of *Leptodactylus* from Brazil showed $2n=24$ in *L. cf. marmoratus*, $2n=23$ in *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), and $2n=26$ in *L. hylaedactylus*, with distinct numbers of bi and uni-armed chromosomes. *Leptodactylus* cf. *marmoratus* presented a variation as regard to the morphology of the pair 12. All specimens of *L. cf. marmoratus* had Ag-NOR in the pair 6, confirmed by FISH technique, but the sample from one of the localities presented additional Ag-NOR in one of the chromosomes 8. In *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) and *L. hylaedactylus* the chromosome pairs bearing Ag-NOR are 11 and 7, respectively. The C banding patterns are predominantly centromeric, but only in *L. cf. marmoratus* this heterochromatin appeared very brilliant with DAPI. On the other hand, bright labelling was noticed with CMA₃ in the three species, on the Ag-NOR site. The data obtained here are in accordance with the proposed phylogeny to the genus, and the chromosomal analyses in these *Leptodactylus* showed that the karyotype evolution was based mainly in centric fusion and pericentric inversion.

Introduction

The species previously identified as belonging to the genus *Adenomera* were allocated in *Leptodactylus* after the revision of Frost *et al.* (2006), but the relationships of both genera have long been a target of many discussions. Firstly, the species *A. marmorata* was renamed *L. marmoratus* by Heyer (1973), due to its geographic distribution and several morphological characteristics shared with some *Leptodactylus*, as size, shape, texture, and colour pattern. Soon after, Heyer (1974) carried out an extensive revision on the relationships within the subfamily Leptodactylinae, using primitive and derived states for 50 morphological characters. The study showed that the relationships in the *marmoratus* group were better explained by placing the species in a distinct genus, so the name *Adenomera* was revalidated. Several other papers have dealt with this question using distinct parameters (see HEYER, 1975; 1977; 1998; HEYER and MAXSON, 1982; ANGULO *et al.* 2003; KOKUBUM and GIARETTA, 2005), and in all of them the genera *Adenomera* and *Leptodactylus* were accepted, although their separation was not very clear. Heyer (1998) and Kokubum and Giaretta (2005) presented evidence that *Adenomera* renders *Leptodactylus* paraphyletic, and that the genus *Lithodytes* was the sister-taxon of *Adenomera*.

The revision of Frost *et al.* (2006), based predominantly on molecular data, introduced great changes in all the Amphibia class, and according to it, the number of genera in the family Leptodactylidae, was reduced from 57 to 11, and soon after, to four, by Grant *et al.* (2006). *Leptodactylus*, the most speciose of them with 85 species, includes currently the former *Leptodactylus* and the representatives of

Adenomera, *Lithodytes*, and *Vanzolinius* (FROST, 2008). Some of the remainder genera were distributed into other families, some of them already recognised and others revalidated or created. Nevertheless, many questions about the new taxonomy still exist.

Leptodactylus marmoratus is a species-complex and the correct identification of the specimens probably is hindered by the very similar morphology (e.g. Angulo et al., 2003). In fact, Kwet (2006) suggested that populations of *L. marmoratus* from Southern Brazil belong to, at least, four distinct species, so that these specimens must be treated as *L. cf. marmoratus*.

Relatively few species of *Leptodactylus* have hitherto been karyotyped and almost all of them are characterised by $2n=22$ chromosomes (revisions in KING, 1990; KURAMOTO, 1990; AMARO-GHILARDI, 2005). The exceptions are *L. andreae* and *L. hylaedactylus* with $2n=26$, *L. marmoratus* and *L. silvanimbus* with $2n=24$, and *L. lineatus* with $2n=18$ (BOGART, 1970; 1973; 1974; AMARO-GHILARDI et al., 2004). Only *L. silvanimbus* was also analysed with differential staining (AMARO-GHILARDI et al., 2004).

Considering that cytogenetic data in *Leptodactylus* with diploid numbers different of $2n=22$ are scarce, we carried out, chromosome analyses in *L. cf. marmoratus*, *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), and *L. hylaedactylus* using, for the first time, Ag-NOR and C-banding techniques, FISH using an rDNA probe, and base pair-specific fluorochrome staining. Besides a better evaluation on the karyotype diversity within this group, these data were useful to explain its relationships with the species of *Leptodactylus* with $2n=22$.

Material and methods

Cytogenetic analyses were performed in 34 specimens of *Leptodactylus* cf. *marmoratus* and in one *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) from Southeastern Brazil, and in 15 *L. hylaedactylus* from Northern Brazil (Table 1). The localities where the species were collected are showed in Fig. 1. One of the five collection sites of *L.* cf. *marmoratus* is Ilha dos Alcatrazes, municipality of São Sebastião, about 35km from the coast of state of São Paulo. All the voucher specimens were deposited in the Coleção de Anfíbios (CFBH) of the Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Chromosome spreads were obtained from bone marrow, liver, spleen, and testes, according to the procedures described in Baldissera Jr et al. (1993), or from intestinal epithelium, following Schmid (1978), with minor modifications. Conventional staining was performed with Giemsa diluted in phosphate-buffered saline, pH 6.8. Ag-NOR impregnation and C-banding were obtained by the techniques of Howell and Black (1980) and Sumner (1972), respectively. Fluorochrome staining was performed with AT-specific 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and GC-specific chromomycin A₃ (CMA₃), both combined with distamycin A (DA) by the method of Schweizer (1980), or without DA counterstain according to Christian et al. (1998). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with rDNA probe, the HM123 (MEUNIER-ROTIVAL et al. 1979) was carried out following the method of Viegas-Péquignot (1992). The bi-armed chromosomes were classified as metacentric or submetacentric, and the uni-armed, as telocentric or subtelocentric, by visual inspection, following the nomenclature of Green and Sessions (1991).

Results

Karyotype description

All males and females of *Leptodactylus* cf. *marmoratus* showed $2n=24$ chromosomes, distributed into four large, two medium and six small-sized pairs (Fig. 2a and 2b). The karyotype of specimens from Santa Branca, and Ilha dos Alcatrazes, is formed by two metacentric pairs (1 and 5), three submetacentric pairs (2-4), and seven telocentric pairs (6-12). The remainder specimens from the other three localities have a very similar karyotype, but the homologues of pair 12 are metacentrics. Frequently, the chromosomes 6 showed a prominent proximal secondary constriction (Fig. 2a). *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) presented an odd diploid number of $2n=23$ (Figure 2c), with two metacentric pairs (1 and 5), three submetacentric pairs (2-4), one subtelocentric pair (8), four telocentric pairs (6, 10-12), and three unpaired chromosomes, one of them being metacentric, equivalent in size to the chromosome pair 5, and two telocentrics, probably, chromosomes 7 and 9. Males and females of *L. hylaedactylus* from the three localities showed $2n=26$ (Fig. 2d), with three large submetacentric pairs (1-3), one medium metacentric pair (4), and nine telocentric pairs (5-13), one of them medium-sized (5) and the remainder of small size. Secondary constriction can be visualised in a variable number of small telocentric chromosomes, always at the proximal region.

Male specimens of *L.* cf. *marmoratus* and *L. hylaedactylus* exhibited, respectively, 12 and 13 bivalents in diplotene/metaphase I, and 12 and 13 chromosomes in metaphase II cells. The male of *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*)

showed 10 bivalents and one trivalent in diplotene/metaphase I (Fig. 3a-b). No cells in metaphase II were observed in the meiotic cytological preparation.

Differential staining

In *Leptodactylus* cf. *marmoratus*, Ag-NOR is located at the proximal region of both homologues of the telocentric pair 6, in the same site of the secondary constriction (Fig. 4a). Nevertheless, differently from what was observed in the majority of the samples, the specimens from Ilha dos Alcatrazes showed a very subtle silver impregnation. Within the same specimen only one Ag-NOR was visualised in some metaphases; and an additional Ag-positive site at the proximal region of a small telocentric chromosome, probably the 8, could be noticed in rare metaphases (Fig. 4b). The NOR site was confirmed by FISH in the specimen from Salesópolis (Fig. 5). In *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), the Ag-NOR is at the terminal long arms of the telocentrics 11 (Fig. 4c), and in *L. hylaedactylus* at the proximal region of the telocentrics 7 (Fig. 4d). C-banding showed heterochromatin at the centromeric region of the chromosomes in the three species (Fig. 6). In addition, a C-positive band was observed at the same site of Ag-NOR in *L. cf. marmoratus* (Fig. 6a), and in *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) the telocentric 7 exhibited a pericentromeric C band (Fig. 6b).

With DAPI, counterstained or not with DA, a very brilliant fluorescence was observed in the centromeric region of the chromosomes in *L. cf. marmoratus* from Santa Branca, whereas with CMA₃ only the Ag-NOR site appeared with slight fluorescence with both procedures (Fig. 7a and 7b). In *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) no fluorescent band with DAPI/DA was visualised, but with CMA₃/DA the site of the Ag-NOR was extremely bright (Fig. 7c). In *L. hylaedactylus* no particular fluorescent band was observed with DAPI/DA, but with CMA₃/DA the NOR bearing chromosomes, as well as some of the small telocentrics showed a slight fluorescence in the site of the secondary constriction (Fig. 7d).

Table 1. Species, number and sex, voucher number, and collection locality of specimens of *Leptodactylus*

Species	Number and sex	Voucher number	Collection locality
<i>L. cf. marmoratus</i>	1J	CFBH13650	Salesópolis, SP 23°33'S 45°50'W
	19F, 5M	CFBH11511-12	Santa Branca, SP
		CFBH11514-25	23°23'S 45°53'W
		CFBH11532-37	
	1M, 1J	A499, A370	São Luís do Paraitinga, SP 23°13'S 45°17'W
	4F, 1M, 1J	CFBH17137-43	Ilha de Alcatrazes, SP 24°05'S, 45°41'W
<i>Leptodactylus</i> sp. (aff. <i>bokermanni</i>)	1M	CFBH13651	Ubatuba, SP 23°26'S 45°04'W
			Santa Branca, SP 23°23'S 45°53'W
<i>L. hylaedactylus</i>	2F, 2M	CFBH17155-58	Amapá, AP 02°57'N 50°47'W
	5F, 3M, 1J	CFBH17146-54	Macapá, AP 00°02'N 51°03'W
	2F	CFBH17159-60	Porto Velho, RO 08°45'S 63°54'W
F: female; M: male; J: juvenile			



Figure 1. Collection localities of the species: 1- Amapá, AP; 2- Macapá, AP; 3- Porto Velho, RO; 4- Santa Branca, SP; 5- São Luíz do Paraitinga, SP; 6- Salesópolis, SP; 7- Ubatuba, SP; 8- Ilha dos Alcatrazes, SP. *Leptodactylus* cf. *marmoratus* was collected in 4, 5, 6, 7, and 8, *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) in 4, and *L. hylaedactylus* in 1, 2, and 3

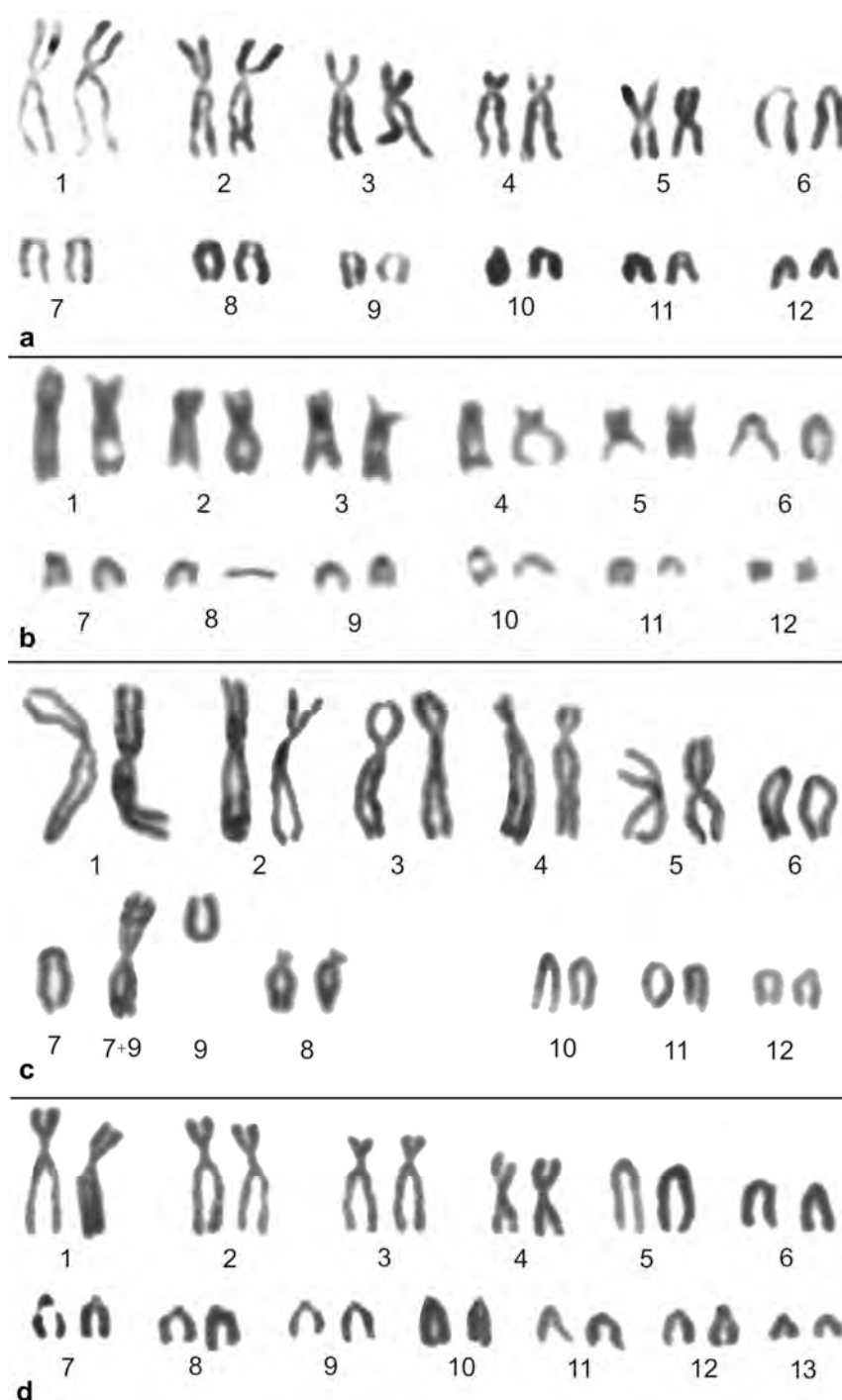


Figure 2. Giemsa stained karyotype. *Leptodactylus cf. marmoratus*, Karyotype A (a) and Karyotype B (b); *Leptodactylus sp. (aff. bokermanni)* (c); *L. hylaedactylus* (d). Note secondary constriction in the chromosomes 6 in (a) and in some small sized telocentrics, e.g. 7, 8, 9, and 12 in (d)

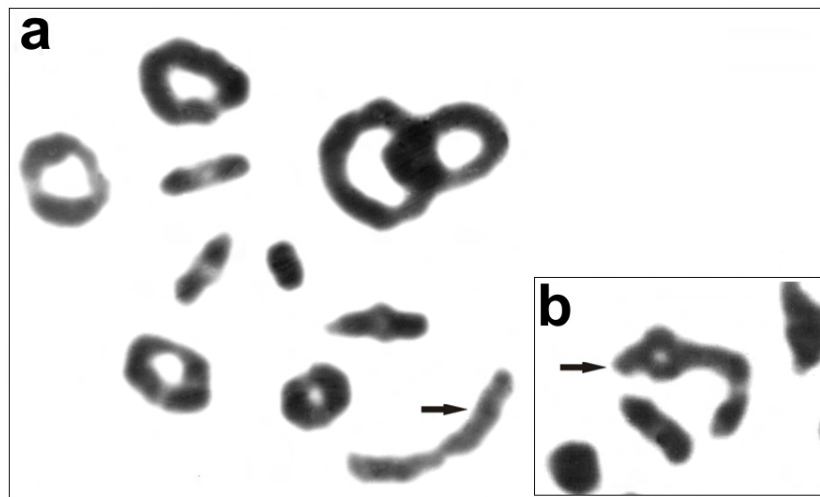


Figure 3. Diplotene/Metaphase I of *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), showing one trivalent and ten bivalents (a) and partial Diplotene/Metaphase I of the same animal (b). Arrows indicate the trivalent

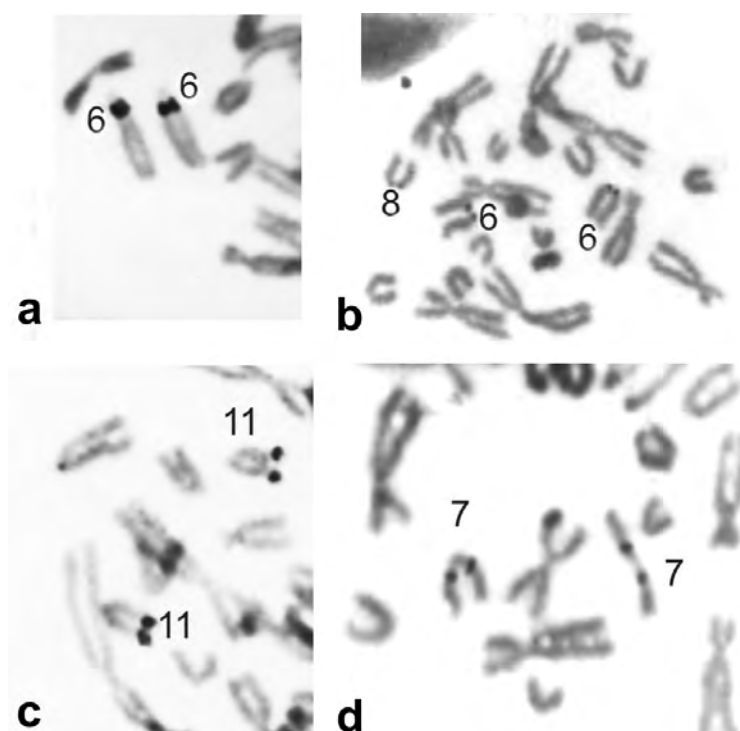


Figure 4. Partial metaphases after Ag-NOR technique. *Leptodactylus* cf. *marmoratus* from Santa Branca (a), *L. cf. marmoratus* from Ilha dos Alcatrazes (b), *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) from Santa Branca (c), and *L. hylaedactylus* from Macapá (d)

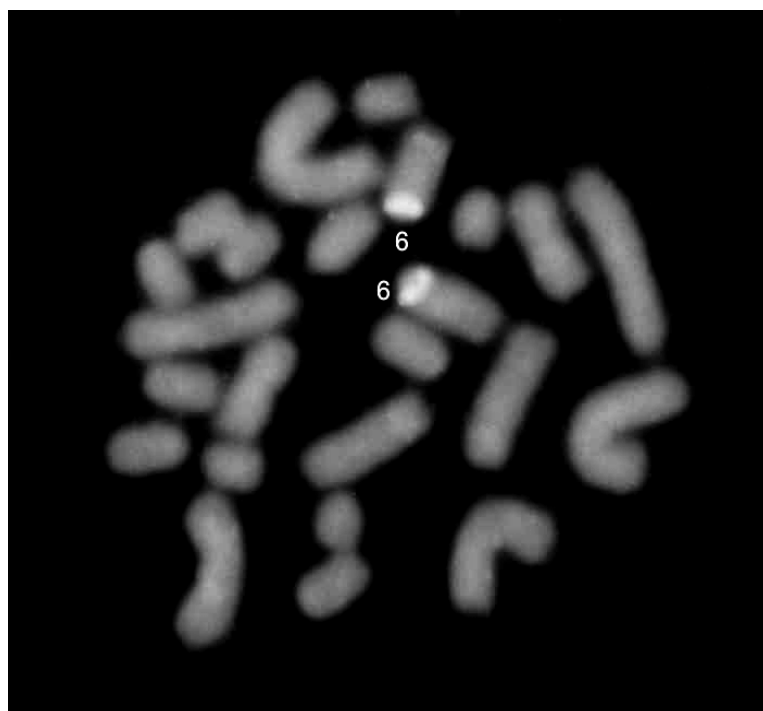


Figure 5. Metaphase of *Leptodactylus* cf. *marmoratus* with FISH using the rDNA probe HM123

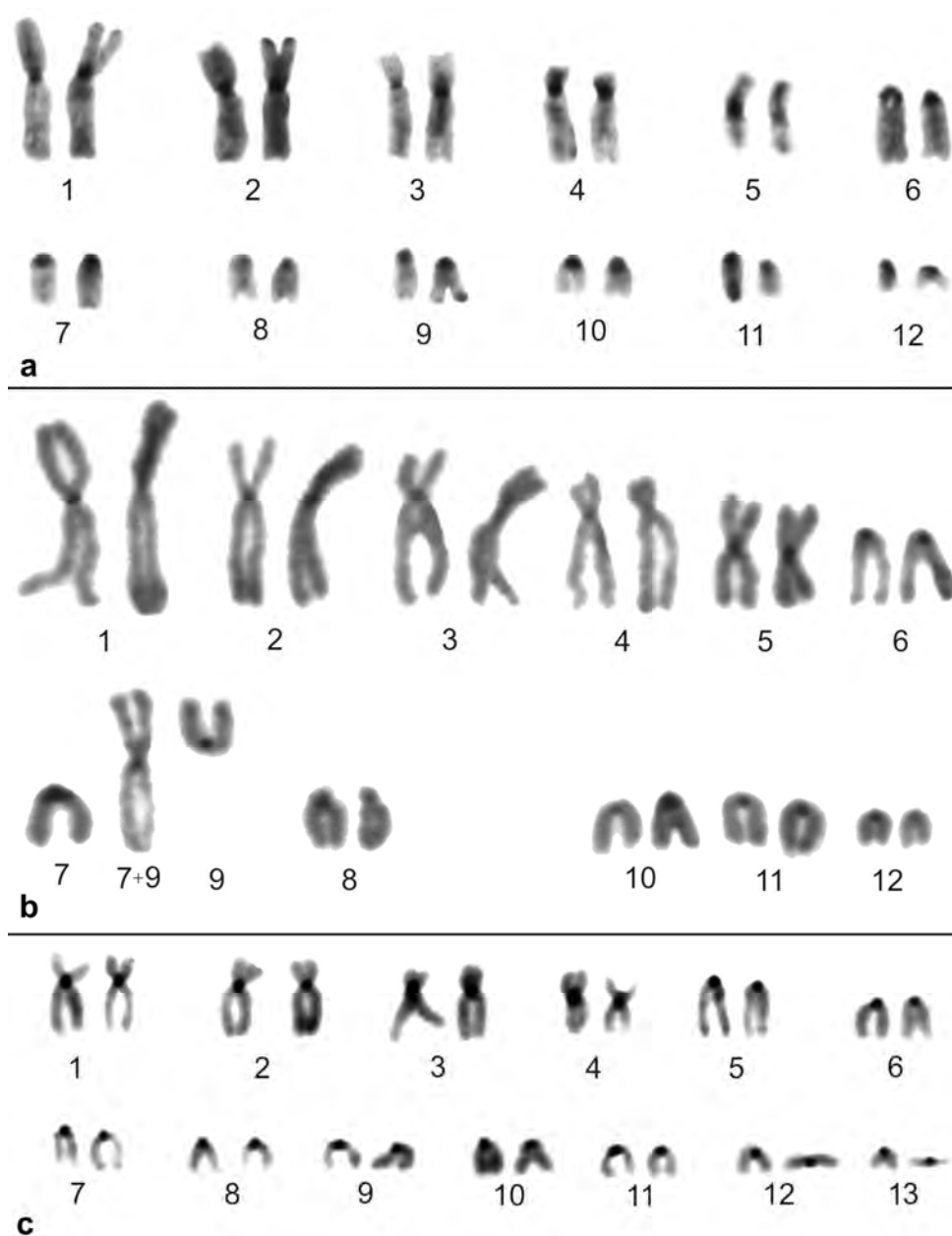


Figure 6. C banded karyotype of *Leptodactylus* cf. *marmoratus* (a), *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) (b), and *L. hylaedactylus* (c). Observe the proximal heterochromatin in the odd telocentric 7 of *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*)

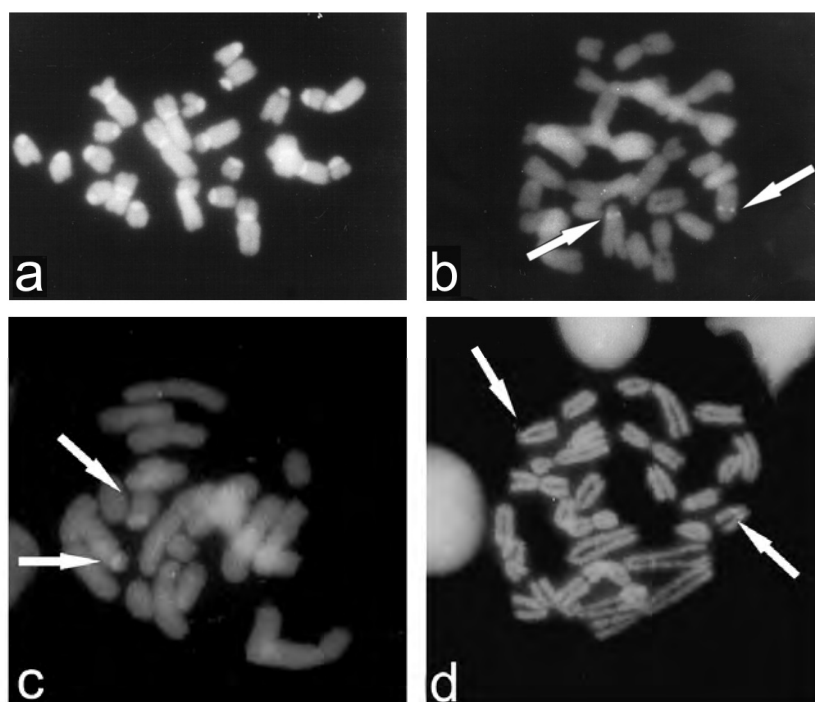


Figure 7. Metaphases with fluorochrome staining. DAPI (a) and CMA₃ (b) in *Leptodactylus* cf. *marmoratus*, CMA₃ (c) in *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), and CMA₃ (d) in *L. hylaedactylus*. Arrows indicate chromosomes bearing Ag-NOR

Discussion

The species of *Leptodactylus* of the present paper showed distinct diploid numbers of $2n=23$, 24 , and 26 , but the $FN=34$ is observed in all three species, with exception of some individuals with $2n=24$, $FN=36$. Differently to that observed in the majority of *Leptodactylus* analysed so far presenting $2n=22$, $FN=44$, with no telocentric or subtelocentric chromosomes, the species exhibited a high and variable number of uni-armed chromosomes in their karyotypes.

Specimens of *L. cf. marmoratus*, from two localities, including those from island, showed Karyotype A with $2n=24$, $FN=34$, characterised by seven telocentric pairs, the same that had been found by Bogart (1974) in specimens from a not mentioned locality, but also in the state of São Paulo. The Karyotype B with $2n=24$, described in specimens from the remainder localities is equivalent to Karyotype A, regarding the morphology of almost the totality of the chromosome pairs. The remarkable difference is the smallest chromosome pair that is of the metacentric type, explaining the $FN=36$.

The two morphological types of chromosomes 12 probably resulted from a pericentric inversion. Considering that the metacentric chromosome pair 12 has been found in three distinct localities, the possibility of intra-specific geographical karyotypic differences might be suggested, despite the few analysed specimens in each sample. Nevertheless, taking into account that *L. marmoratus* has long been considered a species-complex, the hypothesis that the different karyotypes here observed could be ascribed to distinct species, is not ruled out. In this case, it would be important to analyse other characters, such as vocalisation, external and internal

morphologies, geographic distribution, and mainly sequencing of nuclear and mitochondrial genes, in addition to cytogenetic studies.

The Ag-NOR pattern in *L. cf. marmoratus* is the same among the individuals from the all five localities showing the chromosomes 6 labelled at the proximal region, confirmed by FISH with an rDNA probe. It would be interesting to use this technique in order to verify whether the subtle labelling in the chromosomes 6 in the specimens from Ilha dos Alcatrazes is due to a differential gene activity or may represent, in fact, a less amount of repetitive sequences. This technique will also be useful to confirm the third Ag-positive site in one of the chromosomes 8, as true NOR or not, since associated proteins in heterochromatic regions with silver affinity have already been described in some amphibian species (KASAHARA et al., 1996; SILVA et al., 2006; ANANIAS et al., 2007a). Undoubtedly, both techniques of Ag-NOR and FISH should be extended to a larger number of specimens, from Ilha dos Alcatrazes and from Santa Branca, in order to evaluate if the NOR is a good cytological marker to differentiate Karyotype A from these two geographical regions.

The specimen of *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) showed a peculiar karyotype constitution, highly indicative of a centric fusion. This rearrangement involves two telocentric chromosome pairs, among those of larger size, probably, the 7 and the 9, because the odd metacentric is a large sized chromosome. Less probable, the centric fission occurred in a $2n=22$ karyotype, because the chromosomal evolution in this group seems to be towards the reduction in the chromosome numbers (HEYER and DIMENT, 1974). This rearrangement in heteromorphic condition was fully confirmed by the presence of a meiotic trivalent.

At first sight, the specimen *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) shares several morphological characters with *L. bokermanni*, also occurring in São Paulo state. Nevertheless, a more detailed analysis showed that is a representative of an unknown species, not described so far. Considering that only one specimen was karyotyped, it is not possible to know if the rearrangement is a sporadic variant or if is present in the other individuals. This question might be investigated increasing the sample size from the same locality, which is also relevant to ascertain the basic chromosome number of *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*). If bearing $2n=24$, with seven telocentric pairs, the karyotype would be very similar to the Karyotype A of *L. cf. marmoratus*, occurring in the same locality of Santa Branca. Nevertheless some clear differences can be pointed out, such as the presence of the subtelocentric pair

8, and Ag-NOR site located on the terminal region of the telocentric 11 in *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*).

The karyotype of *L. hylaedactylus* is the most discrepant among the analysed species, had also been described by Bogart (1974) for specimens from Peru. In *L. hylaedactylus* there are four bi-armed chromosome pairs, but the large metacentric pair 1, characteristic of *L. cf. marmoratus* and *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), is missing. On the other hand, in *L. hylaedactylus* a higher number of telocentric pairs is observed with two additional pairs, probably, the large telocentric pairs 5 and 6, since their sizes correspond, respectively, to the long and short arms of the metacentric 1 of *L. cf. marmoratus* and *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*). The seven smallest telocentric pairs in the Karyotype A of *L. cf. marmoratus* and in *L. hylaedactylus* seem to be homeologous, including the chromosome pairs bearing Ag-NOR, although they were in a different position in the karyograms. All these facts support the hypothesis that the karyotypic differentiation among the species of the present study is based, predominantly, on centric fusion. High-resolution procedures, like replication banding after BrdU treatment or chromosome painting using microdissection, might be used to confirm or not the structural rearrangements occurred in differentiation of these karyotypes.

The three species of the present study exhibited practically the same C banding pattern. The large pericentromeric C band in the odd chromosome 7 of *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) might represent a karyological species-specific character. This marker C band, however, is not visualised in the metacentric 7+9, suggesting its loss during the fusion process. The base-pair contents of some repetitive regions were provided by the fluorochrome staining. This was the case of the centromeric heterochromatin of *L. cf. marmoratus* which is AT-rich. The brilliant sites with CMA₃ observed in the negative heteropicnotic regions in some of the conventionally stained small telocentrics of *L. hylaedactylus* are an indication that GC-rich heterochromatin occurs in these chromosomes, although not C-banded. As usually observed the Ag-NOR sites in all three species also showed CMA₃ brilliant labelling.

In 1974, Heyer and Diment established a phylogeny based on the diploid number and chromosome morphology of 23 species of *Leptodactylus*, four of them are currently to *L. andreae*, *L. hylaedactylus*, *L. marmoratus*, and *L. discodactylus*. According to this phylogeny, $2n=26$ and the presence of uni-armed chromosomes in

the karyotype, as exhibited by *L. andreae* and *L. hylaedactylus*, is the most primitive condition, whereas the karyotype with $2n=24$, also bearing uni-armed chromosome pairs, as shown by *L. marmoratus*, is derived. The $2n=22$ was considered as a secondarily derived state, the karyotype with at least one uni-armed chromosome pair being more primitive than the karyotype with exclusively bi-armed chromosomes.

According to Heyer and Diment (1974), the predominant mechanism responsible for the karyotype differentiation is the centric fusion, but pericentric inversions must also have occurred. Our chromosome data is in accordance with this hypothesis, since the large metacentric 1 of *L. cf. marmoratus* and *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), as well as the odd metacentric of this latter species are produced by centric fusion. On the other hand, pericentric inversions have occurred in chromosomes 12 in Karyotype B of *L. cf. marmoratus* and 8 of *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), altering their morphology.

The chromosome constitution of *L. hylaedactylus* and *L. andreae* is very close, both sharing the same $2n=26$ diploid number (BOGART, 1974), without the large metacentric pair 1, characteristic of the remainder species of the present study, but differing in the FN, which is 34 and 40, respectively. In fact, in *L. andreae* the number of telocentric pairs is six, instead of nine like in *L. hylaedactylus*, and they correspond to the small-sized chromosomes 7-10, and 12-13; the bi-armed chromosome pairs 5, 6, and 11 might be, therefore, resulted from a pericentric inversion in chromosomes originally of the telocentric type.

Although Bogart (1970) had already described the karyotype of *Leptodactylus lineatus* (as *Lithodytes lineatus*) with $2n=18$, $FN=36$, all of them of the bi-armed type, this information was not considered in the phylogenetic analysis of Heyer and Diment (1974). According to their hypothesis this karyotype would correspond to the most derived in the group. Despite the very different diploid numbers, the karyotypes of *L. lineatus* with $2n=18$ and *L. hylaedactylus* with $2n=26$ are relatively close, presuming four centric fusions in an ancestral $2n=26$ karyotype, among the small-sized chromosomes, and one pericentric inversion in the chromosome 5.

Taking into account the cytogenetic information available in the literature and our own data, a karyotype evolution within the former genera *Adenomera* and *Lithodytes* could be visualised. From an ancestral karyotype with $2n=26$ and nine telocentric pairs, as exhibited by *L. hylaedactylus*, two evolutionary lineages could be suggested. One of them corresponds to that of the species *L. andreae* ($2n=26$) and

L. lineatus ($2n=18$), without the large metacentric 1, and the other, of the species *L. cf. marmoratus* ($2n=24$) and *L. sp. (aff. bokermanni)* ($2n=23$), both bearing this marker.

The species of *Leptodactylus* with $2n=22$ chromosomes, certainly belong to the second lineage, also retaining the marker metacentric 1, as well as *L. silvanimbus* with $2n=24$ (AMARO-GHILARDI et al., 2004). In order to explain the presence of all chromosomes of the bi-armed type, characteristic of the majority of the $2n=22$ *Leptodactylus* (HEYER and DIMENT, 1974; SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004), it would be necessary to assume one more centric fusion and pericentric inversions in a variable number of telocentrics. In fact, in *Leptodactylus* with $2n=22$, the karyotypes have in general no telocentrics, but some of them, like in *L. latinasus*, *L. "natalensis"*, *L. wagneri*, and *L. podicipinus* have one to four telocentric pairs (BOGART, 1970; SILVA et al., 2000). The metacentric morphology of the chromosomes of pair 12 in the Karyotype B of *L. cf. marmoratus* reinforces our suggestion.

The present analysis on chromosome evolution showed that the species belonging to the former *Lithodytes* and *Adenomera* are very close. This is supported by previous studies carried out by Heyer (1998) and Kokubum and Giaretta (2005), using morphological and reproductive characters and by Frost *et al.* (2006), based mainly on molecular data. In the phylogeny proposed by the latter authors, *L. lineatus* and *L. hylaedactylus* form a sister-taxon that is basal, regarding the group of *Leptodactylus* with $2n=22$. Certainly, cytogenetic analysis using high-resolution procedures and nuclear or mitochondrial gene sequencing should be extended to other species of *Leptodactylus*, previously recognised as belonging to the genus *Adenomera*, for a better understanding of phylogenetical relationships within the genus *Leptodactylus*.

Acknowledgements

We are grateful to Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (doctoral, post-doctoral and grant fellowships), Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (researcher fellowship), and Biodiversitas/CEPAN for financial support; Votorantim Celulose e Papel S/A for providing access to animals; IBAMA for collecting permits (02010.000253/04-21, 02010-003315/05-38, and 02010.002059/06-42); Marinha do Brasil and ESEC Tupinambás for visiting permits to Ilha dos Alcatrazes. We are also indebted to Cristiane M. Miléo for helping us with the figures.

References

Amaro-Ghilardi RC (2005) Estudos citogenéticos comparativos em 26 espécies da família Leptodactylidae (Amphibia, Anura). Tese de Doutorado Instituto de Biociências USP São Paulo SP.

Amaro-Ghilardi RC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y (2004) Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). *Caryologia* 57:53-65.

Ananias F, Bombeiro AL, Silva KDB, Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (2007) Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae) and karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implications. *Acta Zoologica Sinica* 53:285-293.

Angulo A, Cocroft RB, Reichele S (2003) Species identity in the genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) in southeastern Peru. *Hepertologica* 59:490-504.

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. *Rev Brasil Genet* 16:335-345.

Bogart JP (1970) Los cromosomas de anfibios anuros del género *Eleutherodactylus*. *Act IV Congr Latin Zool* 1:65-78.

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

Bogart JP (1974) A karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). Copeia 3:728-737.

Christian A, McNiel E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Waldren C, Bedford J (1998) A versatile image analyses approach for simultaneous chromosome identification and localisation of FISH probes. Cytogenet Cell Genet 82:172-179.

Frost DR (2008). Amphibian Species of the World: an Online Reference. V 5.2 (15 July, 2008) Eletronic database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Am Museum of Nat Hist.

Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, De 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 (2006) The amphibian tree of life. Bull of the Am Museum of Nat Hist 297:1-370.

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

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

Heyer WR (1973) Systematic of the *marmoratus* group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). Contrib Sci Natur Hist Museum 251:1-50.

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

Heyer WR (1975) *Adenomera lutzi* (Amphibia:Leptodactylidae), a new species of frog from Guyana. Proc of the Bio Society of Washington 88:315-318.

Heyer WR (1977) A discriminant function analysis of the frogs of the genus *Adenomera* (Amphibia: Leptodactylidae). Proc of the Biol Society of Washington 89:581-592.

Heyer WR (1998) The relationships of *Leptodactylus diedrus* (Anura, Leptodactylidae). Alytes 16:1-24.

Heyer WR, Diment MJ (1974) The karyotype of *Vanzolinius discodactylus* and comments on usefulness of karyotypes in determining relationships in the *Leptodactylus*-complex (Amphibia, Leptodactylidae). Proc of the Bio Society of Washington 87:327-336.

Heyer WR, Maxson LR (1982) In: Prance GT (Ed) Biological Diversification in the Tropics. Columbia Univ Press, New York, pp. 375-388.

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

Kasahara S, Silva APZ, Haddad CFB (1996) Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). Brazilian Journal of Genetics 19:237-242.

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

Kokubum MN, Giaretta AA (2005) Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) with endotrophic tadpoles: systematic implications. Journal of Natural History 39:1745-1758.

Kwet A (2006) Bioacoustic in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) from Santa Catarina, southern Brazil. Proceedings of the 13th Congress of Societas Europaeae Herpetologica pp 77-80.

Kuramoto M (1990) A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. Bull Fukuoka Univ Educ 39:83-127.

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

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

Schweizer D (1980) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-324.

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

Silva APZ, Haddad CFB, Galassi GG, Kasahara S (2006) Multiple organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica* 130:281-291.

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

Viegas-Péquignot E (1992) In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: *In situ hybridization: a practical approach* (Ed D G Wilkinson) Oxford University Press, pp137-158.

The karyotype of *Holoaden luederwaldti* (Anura, Strabomantidae), with report of natural triploidy

¹João Reinaldo Cruz Campos; ²Itamar Alves Martins; ³Célio Fernando Baptista Haddad; ¹Sanae Kasahara

¹Departamento de Biologia and ³Departamento de Zoologia, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil; ²Departamento de Biologia-IBB, UNITAU, Taubaté, SP, Brazil

Abstract

The genus *Holoaden* includes three species described so far and the unique cytogenetic data is related to *H. bradei*, with $2n=18$, based on conventional staining. In the present paper we report, for the first time, the data on the chromosomes of *H. luederwaldti*, which presented $2n=18$ and a case of natural triploidy, with $2n=3x=27$. In this sample, another karyotypic variation was observed due to the occurrence of two types of chromosomes 8, which have submetacentric or subtelocentric morphologies. Homomorphic subtelocentric or heteromorphic condition was observed among the diploid specimens, whereas the triploid has one submetacentric and two subtelocentric 8. In all specimens, the Ag-NOR is located in the chromosome 8, at the interstitial long arms when subtelocentric, or in the proximal region when submetacentric, confirmed by FISH with HM123 probe. The C banding showed centromeric distribution of the heterochromatin, fluorescent after DAPI staining, and C-positive band was also observed in the Ag-NOR site, bright with CMA₃. The FISH using telomeric probe labelled exclusively the telomere regions. Although the same $2n=18$ chromosomes have been observed in *H. luederwaldti* and *H. bradei*, some differences in both karyotype can be visualised, mainly as regard to the morphology of the last chromosome pairs.

Introduction

In the last years, several revisions, mainly based on molecular sequences data, have dealt with the systematic and taxonomy of amphibians, as performed by Faivovich et al. (2005), Frost et al. (2006), Grant et al. (2006), and Hedges et al. (2008). According to the last authors, the genus *Holoaden* Miranda-Ribeiro, 1920, formerly recognised as belonging to Brachycephalidae, was assigned in the new family named Strabomantidae, subfamily Holoadeninae. Only two species were reported to this genus, *Holoaden bradei* and *Holoaden luederwaldti*, both endemic from the Atlantic Forest in southeastern Brazil, but recently Pombal Jr et al. (2008) described a new species, *Holoaden pholeter*, from a montane rainforest area, also in southeastern Brazil. According to these last authors a superficial examination of one specimen from Salesópolis, SP, identified as *H. luederwaldti*, deposited in the MZUSP (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo) might be a new undescribed species. At present, the only cytogenetic data obtained for this genus is based on conventional staining, and refers to the karyotype of *H. bradei* with $2n=18$ (LUCCA et al., 1974). As regarding to the 39 remainder species of Holoadeninae, the chromosome data are also very scarce and only *Barycholos ternetzi* with $2n=22$ was analysed, with conventional and differential staining (CAMPOS et al., 2008; SIQUEIRA Jr et al., 2009).

Polyploidy has been previously reported in lower vertebrates, including anuran species belonging to different families with distinct levels of ploidy (BEÇAK et al., 1966; BOGART, 1967; BOGART and WASSERMAN, 1972; TYMOWSKA, 1991; KASAHARA and HADDAD, 1996; SCHMID et al., 2003; VIEIRA et al., 2006; among

others). Nevertheless, with regard to triploidy, few cases in Amphibia are described so far, like that resulted from natural hybridisation between the diploid *Phyllomedusa distincta* and the tetraploid *Phyllomedusa tetraploidea* (BATISTIC, 1989; HADDAD et al., 1994; KASAHARA et al., 2007).

In the current paper, we presented, for the first time, chromosomal data of *H. luederwaldti* based on standard Giemsa staining, Ag-NOR, C banding, base-specific fluorochrome staining and FISH techniques. The karyotypic variation related to heteromorphism observed in the chromosomes pair 8 and the occurrence of natural triploidy are discussed.

Material and Methods

We carried out cytogenetic analyses in five males and two females of *Holoaden luederwaldti* collected in the Atlantic Forest, municipality of Campos do Jordão, SP, altitude ca. 1600 m (22°44'20"S 45°35'27"). All the voucher specimens were deposited in the Coleção de Anfíbios, Departamento de Zoologia (CFBH), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

Chromosome spreads were obtained from direct cytological preparations from bone marrow, liver, and testes, according to Baldissera Jr et al. (1993), or from intestinal epithelium, following Schmid (1978), with adaptations. Conventional staining was performed with Giemsa diluted in phosphate-buffered saline, pH 6.8. Ag-NOR and C-banding techniques were obtained according to the procedures of Howell and Black (1980) and Sumner (1972), respectively. Fluorochrome staining using AT-specific 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and GC-specific chromomycin A₃ (CMA₃), followed the method described by Christian et al. (1998). Fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) was performed according to Viegas-Péquignot (1992), using the rDNA probe HM123 (MEUNIER-ROTIVAL et al. 1979); and following to Pinkel (1986), with some adaptations, using a telomeric probe obtained by PCR using the primers TLF (TTAGGG)₅ and TLR (CCCTAA)₅. The bi-armed chromosomes were classified as metacentric, submetacentric, and subtelocentric, and the uni-armed as telocentric according to the nomenclature suggested by Green and Sessions (1991, 2007).

Results

All specimens of *H. luederwaldti*, except one, showed $2n=18$ chromosomes and $FN=34$ (Fig 1a and 1b). The karyotype is formed by seven large and medium-sized pairs and two pairs of small size, with gradual size variation from 2 to 7 and 8 and 9. Pairs 1 and 9 are metacentric, pairs 2-4 and 7, submetacentric, pair 5 subtelocentric, and pair 6 telocentric. The chromosomes 8 are found with two distinct morphologies, both of the subtelocentric type in three diploid species, whereas in the remainder three specimens, the pair 8 is heteromorphic with subtelocentric/submetacentric combination. Meiotic cells showed nine bivalents in diplotene/metaphase I and nine chromosomes in metaphase II (Fig 2a and 2b).

One male in the sample exhibited $2n=3x=27$ karyotype (Fig 3), in which the chromosome morphologies are the same to that found in diploid specimens. In the triploid, the chromosomes 8 are two subtelocentrics and one submetacentric. Cytological preparations from testes showed some not identified meiotic phases, besides spermatids and spermatozoa (Fig 4).

Prominent secondary constriction was visualised in the submetacentric 8, at the proximal long arms. In the subtelocentric type it was generally lacking, but a subtle secondary constriction could be noticed in some metaphases at interstitial long arms. In all specimens of *H. luederwaldti*, Ag-NOR was located on chromosomes 8, in the site coincident to the secondary constriction. In the subtelocentric 8, the Ag-NOR is tiny, smaller than that observed in the submetacentric (Fig 5a, 5b, and 5c). The FISH technique with the rDNA probe confirm this region as a true NOR sites in both chromosomes types (Fig 5d).

The C banding showed heterochromatin distribution predominantly at the centromeric region; the Ag-NOR site was C-positive banded (Fig 6). After DAPI staining the centromere of all chromosomes showed bright fluorescence (Fig 7a) and after CMA₃, only the site of the Ag-NOR was labelled, in both morphological types of the chromosome 8 (Fig 7b and 7c). The FISH using telomeric probe labelled exclusively the telomeric regions (Fig 8a and b).

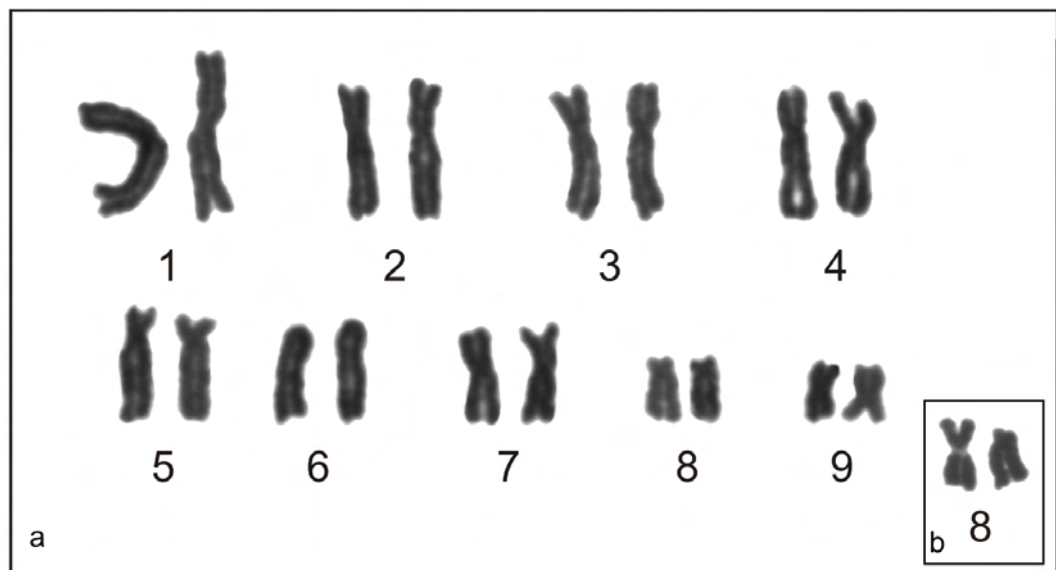


Figure 1. Standard stained karyotype of *Holoaden luederwaldti*, male with $2n=2x=18$. Pair 8 is homomorphic with two subtelocentric chromosomes (a). Inset: heteromorphic pair 8 from female with submetacentric and subtelocentric chromosomes (b). Secondary constriction is noticed at proximal long arms of submetacentric 8

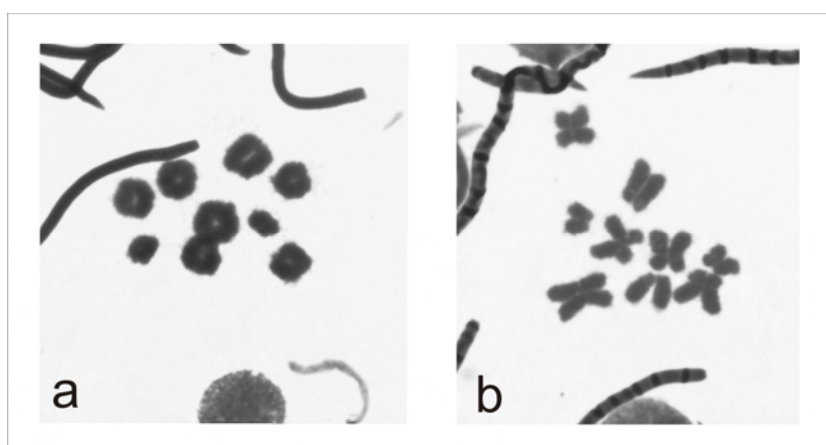


Figure 2. Standard staining meiotic cells of *Holoaden luederwaldti*, male with $2n=2x=18$. (a) diplotene/metaphase I with 9 bivalents, and (b) metaphase II with 9 chromosomes

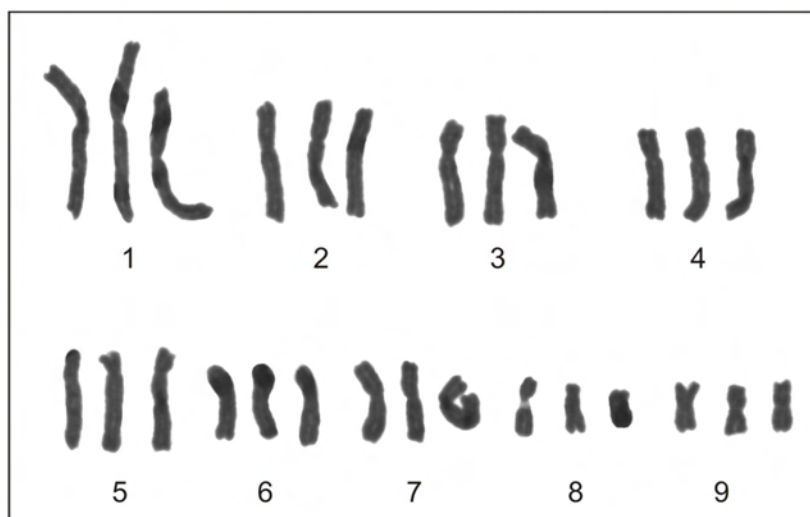


Figure 3. Standard stained karyotype of *Holoaden luederwaldti*, male with $2n=3x=27$. One chromosome 8 is submetacentric and two, subtelocentrics. Secondary constriction is noticed at proximal long arms of submetacentric 8

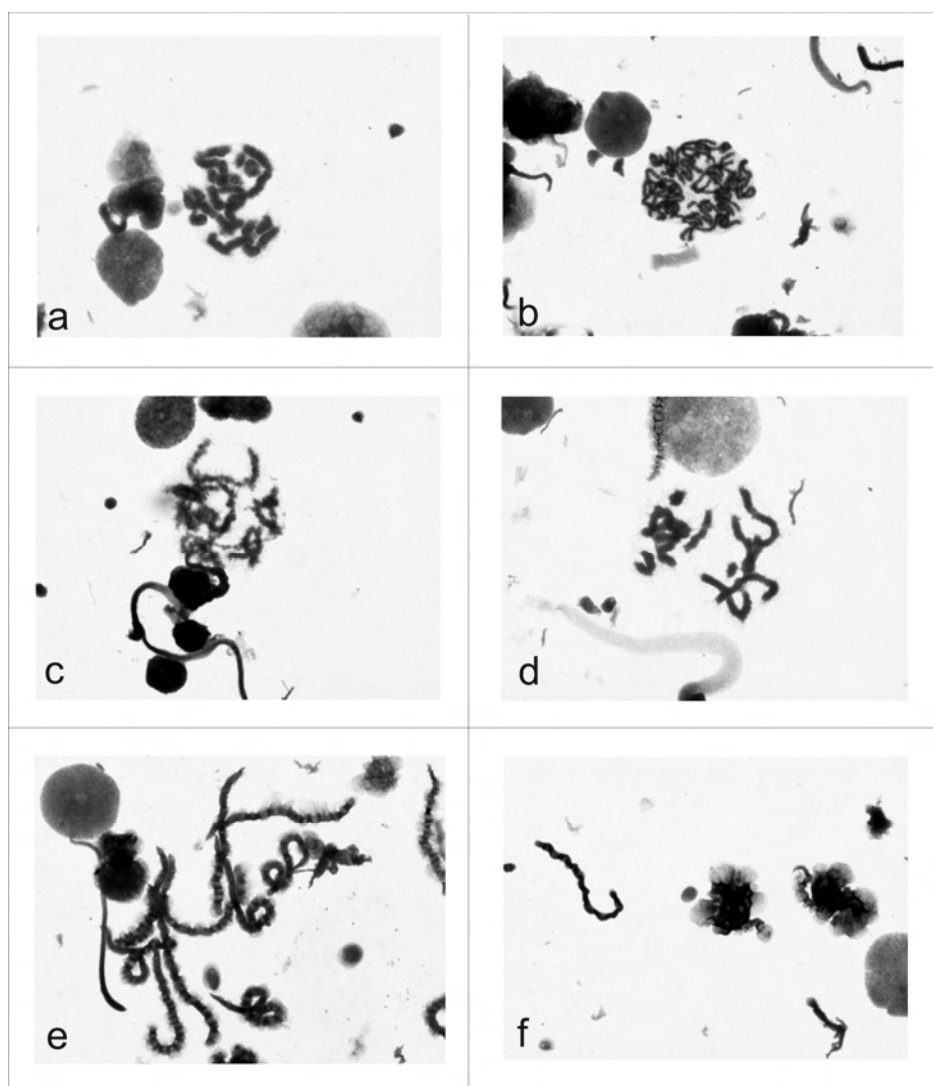


Figure 4. Standard stained testicular cells of the triploid *Holaden luederwaldti*, male with $2n=3x=27$. (a) to (d) atypical meiotic phases and (e) and (f) spermatozoa

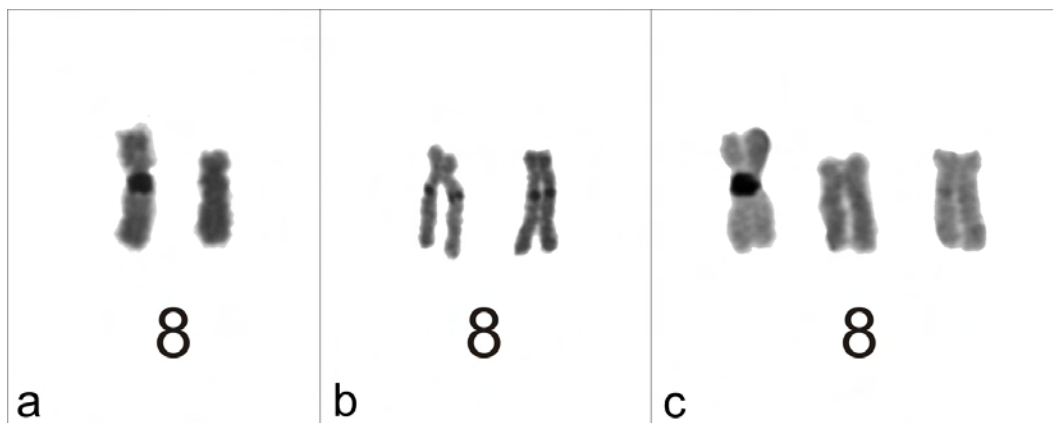


Figure 5. Chromosomes 8 of *Holoaden luederwaldti*: (a), (b), and (c) silver impregnation; (d) FISH with an rDNA probe. Note that the submetacentric 8 showed large Ag-NOR (a, c) and fluorescent hybridisation signal (d), whereas the labellings in the subtelocentric are tiny (a, b, c, and d)

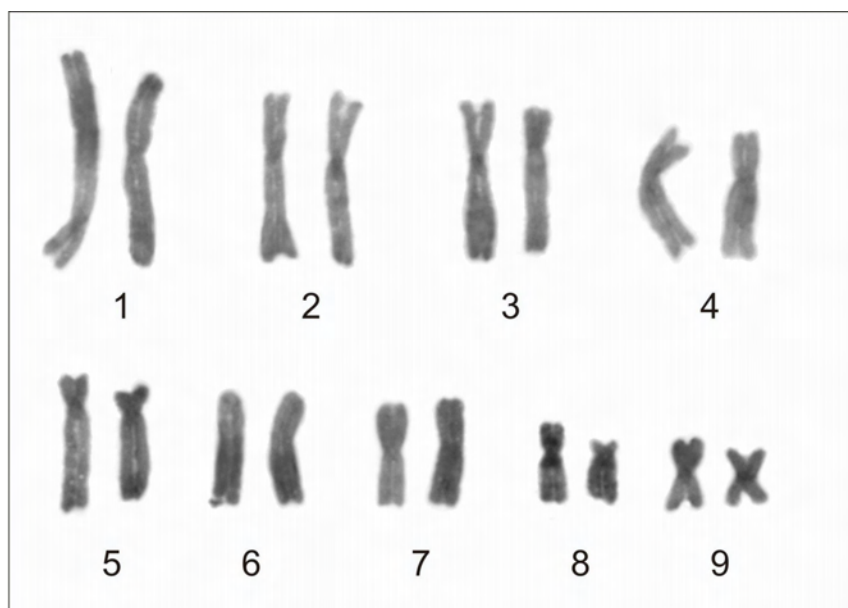


Figure 6. C banded metaphase of *Holoaden luederwaldti* with $2n=2x=18$. Note the heteromorphic pair 8 showing C banding in both chromosomes at the same site of Ag-NOR

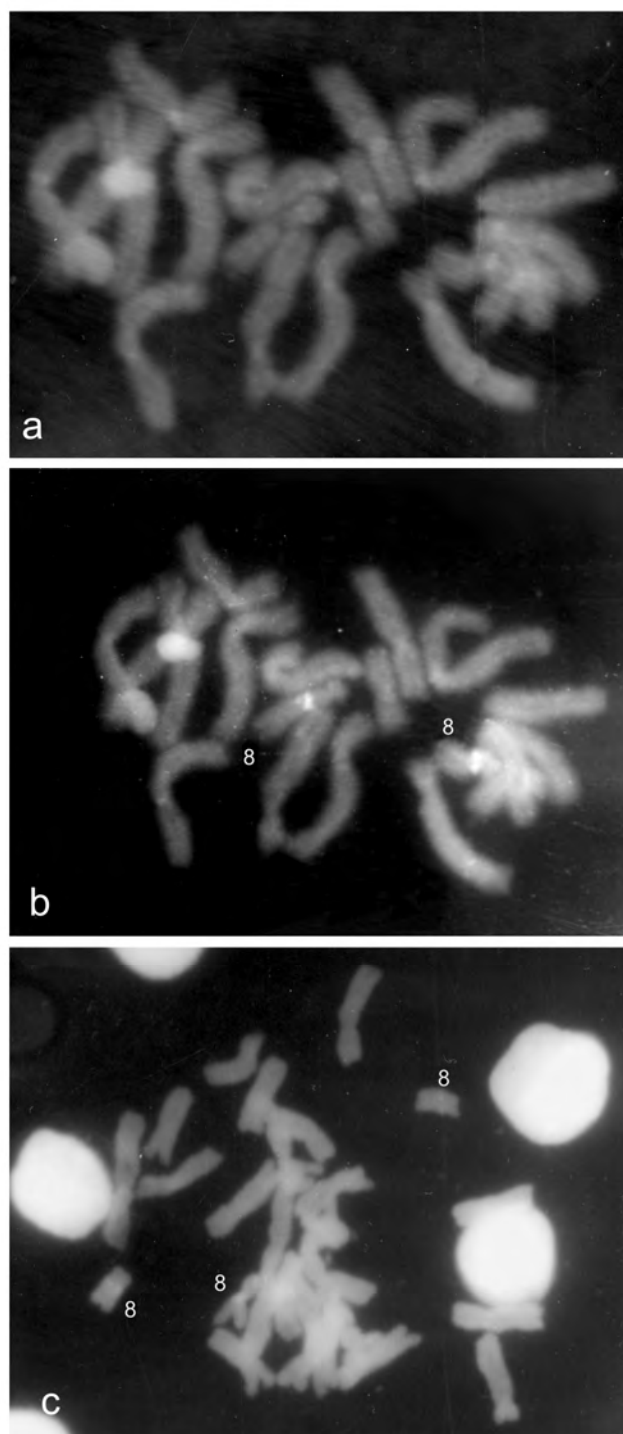


Figure 7. Metaphases of *Holoaden luederwaldti* with fluorochrome staining: (a) DAPI showing centromeric bright region. (b) and (c) CMA₃ with fluorescent Ag-NOR site in the diploid and triploid specimens, respectively

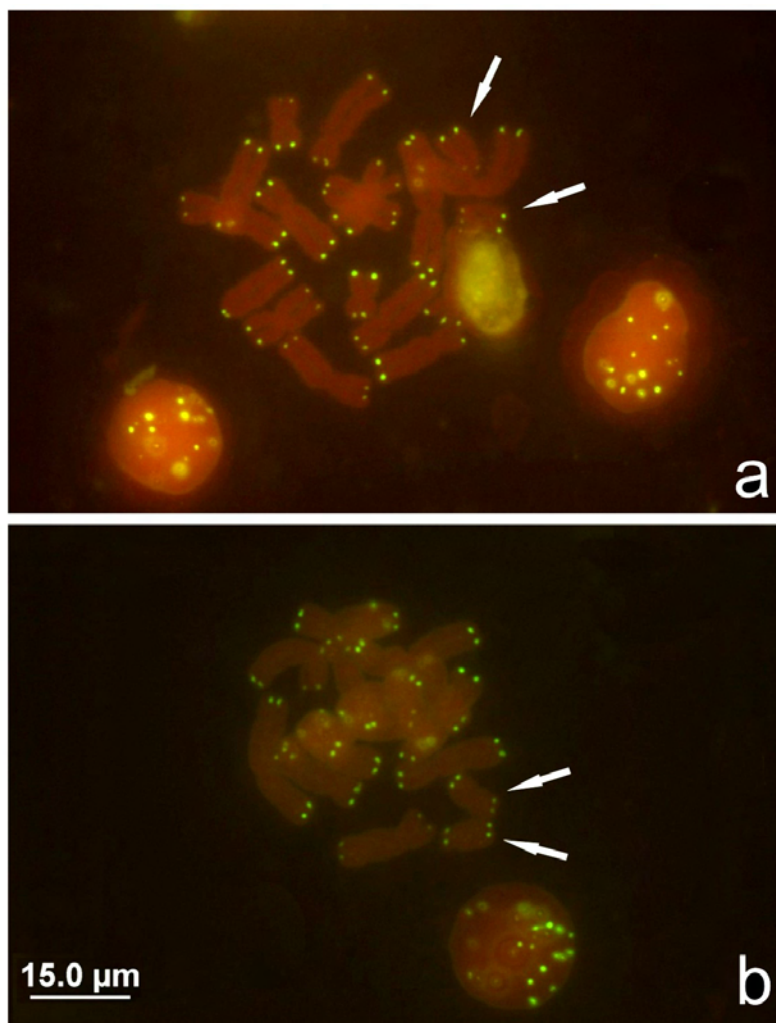


Figure 8. Metaphases of *Holoaden luederwaldti* with $2n=2x=18$ after FISH with telomeric probe: (a) homomorphic pair 8 (arrows); (b) heteromorphic pair 8 (arrows)

Discussion

Contrarily to that observed in the majority of the anurans, in general exhibiting very conservative karyotypes, the small sample of *H. luederwaldti* analysed here showed karyotypic variations. One of them involved the chromosomes of pair 8, which have two distinct morphologies, most probably ascribed to a structural rearrangement, like a pericentric inversion. This heteromorphism is not related to the occurrence of cytologically differentiated sex-chromosomes, because it was observed in both sexes. The two chromosome types also differ as regard to their length, the submetacentric being longer than the subtelocentric one, probably due to the extent of the nucleolar organiser regions, which was confirmed by the sizes of the secondary constriction, Ag-NOR and rDNA fluorescent labelling. As expected, telomeric probe hybridised in the telomere, with no vestige of interstitial bands that could suggest the occurrence of pericentric inversion in one of the chromosomes 8.

Holoaden luederwaldti and *H. bradei* (LUCCA et al., 1974) share the same $2n=18$ diploid number, and very similar karyotypes, although in this latter species all the chromosomes have been described as metacentric type, differently to that observed in *H. luederwaldti*. Part of the differences seems to be due to nomenclature adopted, as well as in the ordering of the chromosomes pairs in the karyograms, but small differences in the arm ratio of some chromosome pairs are not ruled out. Nevertheless, some discrepancies may be pointed out in the karyotypes of both species. One of them concerns to the pair 6, which is undoubtedly telocentric in *H. luederwaldti* and of bi-armed type in *H. bradei*; this morphological difference ascribed, most probably, to a pericentric inversion. Another relevant difference

between both karyotypes is the size of the pairs 8 and 9, which are clearly smaller than pair 7 in *H. luederwaldti*, whereas in *H. bradei* this distinct demarcation is not observed.

Chromosome marker bearing secondary constriction was not described in *H. bradei*, but in the karyogram presented by Lucca et al. (1974) possibly a secondary constriction is seen at interstitial long arms of the one homologues of the pair 9. In this case, this pair would be homeologous to those of the pair 8 of *H. luederwaldti*.

Certainly, analyses of more specimens of *H. luederwaldti* are necessary in order to better evaluate the variability with regard to the morphology of the pair 8, since the combination submetacentric/submetacentric was not observed in the present sample, as result of crossings between individuals bearing heteromorphic pair. Furthermore, the BrdU treatment for replication banding patterns would be useful to confirm the pericentric inversion as mechanism of the chromosome rearrangement. This technique also would be of relevance to verify if the morphological difference between the chromosomes 6 of *H. luederwaldti* and *H. bradei* is, in fact, due to pericentric inversion. Nevertheless, karyotype comparisons could not be carried out because *H. bradei* has not been found in the nature since 1976, and for that reason it was included as a critically endangered species in the “Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção”.

As usually observed in anurans, in *H. luederwaldti* the Ag-NOR was in a single chromosome pair, with a marked difference in the labelling sizes, when the chromosomes 8 presented distinct morphologies. Heteromorphism in the Ag-NOR sizes is a common feature of this marker, and have been explained by differential gene activity or amount of the repetitive rDNA sequences. In the case of *H. luederwaldti* this latter alternative was confirmed, since after FISH technique with the HM123 probe, the fluorescent signal was greater in the chromosome bearing large Ag-NOR. An intriguing fact is the large NOR always be found in submetacentrics 8, whereas the small one is associated to the subtelocentric type. This finding seems not to be fortuitous, although our sample is not very large. In this case, the difference in the amount of rDNA might be result of the chromosome rearrangement, which altered their morphologies. At first sight, the NOR is not included in the inverted segment, since it is located at the same site in the long arms of both chromosome types. To increase the sample of the karyotyped specimens is necessary, in order to evaluate the possibility of the variation in the NOR size be independent or not of the

chromosomal rearrangement, since the loss or gain of repetitive sequences may also occur by other mechanisms.

Holoaden luederwaldti has relatively few amount of heterochromatin, exhibiting slightly stained C-bands, predominantly in the centromeric region of all chromosomes. This heterochromatin is clearly AT-rich, because it appeared with brilliant fluorescence after DAPI staining. With CMA₃ only the site of the NOR appeared with fluorescent labelling due to their GC-richness.

The subfamily Holoadenine comprises 45 species distributed in six genera, one of them *Holoaden* (FROST, 2010). Nevertheless, only *Barycholos ternetzi* was hitherto karyotyped so far, showing $2n=22$ and $FN=38$ (CAMPOS et al., 2008, SIQUEIRA Jr et al., 2009). Despite of *H. luederwaldti* has a smaller diploid number than *B. ternetzi*, it is important to noticed that the first five chromosome pairs of these two species are morphologically very similar, probable homeologous. The marked karyotype difference is ascribed to the remaining four pairs of *H. luederwaldti* and the six in *B. ternetzi*, so that, with exception of the pair 9 of both species, all other chromosomes have discrepant morphologies. Most probably, structural rearrangement like chromosome fusions might be responsible for the reduction of the $2n$ in *H. luederwaldti*, while inversions would have changed the morphologies of some chromosome pairs. The pair 11 of *B. ternetzi*, which includes Ag-NOR bearing chromosomes, might be homeologous of the chromosomes pair 8 of *H. luederwaldti* assuming the possibility of a pericentric inversion, altering the rDNA site. Certainly, cytogenetic data of other representatives of Holoadeninae provide a better comprehension of the chromosome evolution in this group. It is also important to determine the karyotype constitution of the new species *H. pholeter* (POMBAL JR et al., 2008), as well as, of a presumptive unknown species collected in Salesópolis, SP, according to these last authors and identified as *H. luederwaldti* by Heyer et al. (1990).

In our sample of seven individuals, one of the male showed polyploidy, with $2n=3x=27$ chromosomes. Several mechanisms are responsible for the origin of a triploid individual, such as the fusion of a diploid female gamete with normal haploid spermatozoa. Non-reduced oocytes may be formed, among others mechanisms, by meiotic non-disjunction, by retention of the secondary polar body, occurring spontaneously or under diverse factors, such as shock of temperature. The triploidy in the specimen of *H. luederwaldti* might be originated by one of these mechanisms,

similarly to what has been reported in fishes collected in the same geographical region of the animals of our sample. According to Garcia et al. (2003), the origin of the triploidy in the fish *Rhamdia* sp. was explained by drastic temperature decrease, due to hailstorm, very frequent in that locality. The triploidy in *H. luederwaldti* could also be a result of natural hybridisation between specimens with diploid and tetraploid constitution. For this reason, analyses of more specimens of *H. luederwaldti* are indicated in order to verify the occurrence of other triploid individuals in the same locality or, eventually, specimens with tetraploid karyotype.

Acknowledgements

We are grateful to Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, and to Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, for doctoral and researcher fellowships and for the grant (proc 2008/50928-1). We are also indebted to Cristiane M. Miléo for helping us with the figures, Prof. Dra. Luciana B. Lourenço from Departamento de Biologia, UNICAMP, for the assistance in the rDNA FISH, and Prof. Dr Fausto Fosresti and Dra. Cristiane K. Shimabukuro-Dias from Departamento de Morfologia, UNESP - Botucatu for helping in the telomeric FISH.

References

- 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. *Rev Brasil Genet* 16:335-345.
- Batistic RF (1989) Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura - Amphibia). Tese de Doutorado – USP, 1-203.
- Beçak ML, Beçak W, Rabello MN (1966) Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frogs *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma* 19:188-93.
- Bogart JP (1967) Chromosomes of the South American amphibian family Ceratophryidae with a reconsideration of the taxonomic status of *Odontophrynus americanus*. *Can J Genet Cytol* 9:531-542.
- Bogart JP, Wasserman AO (1972) Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics* 11:7-24.
- Campos JRC, Ananias F, Haddad CFB, Kasahara S (2008) Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae). *Micron* 39:151-159.
- Christian A, McNiel E, Robinson J, Drabek J, LaRue C, Waldren C, Bedford J (1998) A versatile image analyses approach for simultaneous chromosome identification and localisation of FISH probes. *Cytogenet Cell Genet* 82:172-179.

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

Frost DR (2010) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, New York, USA>.

Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, De 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, (2006) The amphibian tree of life. *Bull of the Am Museum of Nat Hist* 297:1-370.

Garcia C, Moreira-Filho O, Bertollo LAC, Centofante L (2003) B chromosomes and natural triploidy in *Rhamdia* sp. (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae). *Cytologia* 68:403-411.

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

Green DM, Sessions SK (1991) Nomenclature for chromosomes. In: Green DM and Sessions SK (Eds), *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, pp. 431-432.

Green DM, Sessions SK (2007) Karyology and Cytogenetics. In: *Amphibian Biology, Volume 7. Systematics*. Heatwole H, Tyler M (Eds). Surrey Beatty and Sons, pp. 2756-2841.

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

Heyer WR, Rand AS, Cruz CAG, Peixoto OL, Nelson CE (1990) Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia* 31:237–410.

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

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

Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (2008) Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP (Eds). Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade 19. vol II, Brasília, DF.

Lucca JE, Jim J, Foresti F (1974) Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia* 27:183-192.

Kasahara S, Haddad CFB (1996) Karyotypes of two Brazilian microhylid frogs of the genus *Chiasmocleis*, including a new case of polyploidy. *J of Herpetol* 31:139-142.

Kasahara S, Catroli GF, Campos JRC, Haddad CFB (2007) Cytogenetics of *Phyllomedusa distincta* ($2n=2x=26$), *Phyllomedusa tetraploidea* ($2n=4x=52$) and their triploid hybrids ($2n=3x=39$). In: 16th International Chromosome Conference. Chromosome Research, p. 10.

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

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

Pombal Jr JP, Siqueira CC, Dorigo TA, Vrcibradic D, Rocha CFD (2008) A third species of the rare frog genus *Holoaden* (Terrarana, Strabomantidae) from a montane rainforest area of southeastern Brazil. *Zootaxa* 1938:61–68.

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

Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Visbal Garcia R, Fernández Badillo A (2003) Chromosome Banding in Amphibia. XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet Genome Res* 101:62-73.

Siqueira Jr S, Aguiar Jr O, Souza MB, Lima AP, Recco-Pimentel SM (2009) Unusual intra-individual karyotypical variation and evidence of cryptic species in Amazonian populations of *Pristimantis* (Anura, Terrarana). *Hereditas* 146:141–151.

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

Tymovska J (1991) Polyploidy and Cytogenetic Variation in Frog of the Genus *Xenopus*. In: Green DM, Sessions SK (Eds) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. San Diego, Academic Press, pp. 259-298.

Viegas-Péquignot E (1992) *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson D (ED) *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford University Press, IRL press, pp. 137-158.

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

Considerações Finais

Há várias décadas que a família Leptodactylidae tem sido alvo de inúmeros questionamentos sobre a sua taxonomia e sistemática, tem sido a monofilia testada sob diversos aspectos desde o início dos anos 1970. Nas dezenas de trabalhos publicados sobre o assunto, Leptodactylidae sempre se mostrava polifilética, mas nenhum grande arranjo foi introduzido para as espécies, a não ser divisões entre subfamílias ou grupo de espécies. Após o ano de 2006, graças aos avanços na tecnologia de sequenciamento de genes, grandes revisões foram realizadas e resultaram em mudanças significativas na taxonomia e sistemática dos anfíbios em geral. Leptodactylidae, em particular, passou por uma drástica redução no número de gêneros, de modo que apenas quatro dos 57 descritos até então, permaneceram na família. É importante ressaltar que nenhuma dessas revisões levou em conta dados citogenéticos. Mesmo considerando os representantes que pertenciam à antiga família Leptodactylidae, o número de espécies cariotipadas é relativamente pequeno, isto é, cerca de 270 entre mais de 1000 descritas. Além disso, a grande maioria dos estudos foi baseada apenas em informações obtidas com coloração convencional ou até mesmo em análises de células meióticas, em que somente o número de cromossomos foi determinado.

Nesse contexto, analisamos os cariótipos de 28 espécies, 14 delas pela primeira vez, pertencentes a 13 gêneros alocados em oito diferentes famílias, sendo elas Brachycephalidae, Centrolenidae, Cycloramphidae, Eleutherodactylidae, Hemiphractidae, Leiuperidae, Leptodactylidae e Strabomantidae. Com exceção de duas espécies de centrolenídeos e *Brachycephalus ephippium*, todas as demais

estavam incluídas em Leptodactylidae antes das revisões ocorridas em 2006 e 2008. Foram encontrados em nossa amostra números diploides de $2n=18$ para *Holoaden luederwaldti*; $2n=20$ para *Vitreorana eurygnatha* e *V. uranoscopa*; $2n=22$ para *Adelophryne baturitensis*, *Brachycephalus ephippium*, *Ischnocnema guentheri*, *I. manezinho*, *I. parva*, *Leptodactylus furnarius*, *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. mystaceus*, *L. podicipinus*, *L. syphax*, *Odontophrynus americanus*, *Physalaemus barrioi*, *P. cuvieri* e *P. moreirae*; $2n=23$ para *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*); $2n=24$ para *L. marmoratus*; e $2n=26$ em *Cycloramphus boraceiensis*, *C. brasiliensis*, *C. ryakonastes*, *Flectonotus* sp., *Gastrotheca microdiscus*, *L. hylaedactylus*, *Thoropa miliaris* e *Zachaenus parvulus*.

Quando os dados cromossômicos aqui obtidos, juntamente com os disponíveis na literatura, são sobrepostos às árvores filogenéticas aceitas atualmente, é possível observar sobreposição entre as relações de proximidade estabelecidas a partir de análises moleculares e citogenéticas. Sem dúvida, as informações sobre o cariótipo podem corroborar ou refutar filogenias realizadas com base em estudos de sequenciamento de genes, de morfologia ou de outros caracteres. No caso das alterações ocorridas na composição da antiga família Leptodactylidae os dados cromossômicos corroboram as sugestões propostas, fortalecendo a redistribuição da maioria de suas espécies em outras famílias.

Algumas das mudanças ocorridas em Leptodactylidae necessitam ainda de revisões, como é o caso da sinonimização de *Adenomera*, *Lithodytes* e *Vanzolinius* à *Leptodactylus*. Os dois primeiros gêneros são muito relacionados entre si também do ponto de vista cromossômico, mas apresentam algumas particularidades cariotípicas, como $2n$ discrepantes, que os diferenciam cariologicamente dos demais representantes do gênero. Entre as espécies pertencentes ao antigo gênero *Adenomera* que foram analisadas na presente Tese, algumas variações foram observadas, como um caso de fusão entre dois cromossomos telocêntricos em um único macho amostrado de *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), bem como alteração na morfologia do par 12 e diferenças no número e localização de Ag-RON entre populações de *L. cf. marmoratus*. Tais fatos mostram a necessidade de cariotipar novos exemplares de *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) para verificar se a fusão ocorrida no exemplar amostrado é um fato fortuito ou se está presente em outros representantes. Além disso, é interessante a coleta de novos exemplares para que seja feita uma identificação mais precisa da espécie com base em um maior número

de representantes e, se for o caso de uma espécie nova, descrevê-la. Quanto a *L. cf. marmoratus*, a análise de diferentes populações pode, sem dúvida, auxiliar nas questões de taxonomia da espécie, que tem sido considerada por vários herpetologistas como um complexo de espécies. O uso de técnicas mais precisas, como FISH com sonda de DNAr, pode ajudar na verificação da ocorrência de RON múltiplas e de variação interpopulacional no número e localização de sítios portadores de RON. Indubitavelmente, a citogenética comparativa pode ser uma importante ferramenta na busca de relações de filogenia entre as espécies que foram sinonimizadas à *Leptodactylus* e aquelas que já estavam alocadas no gênero. Seria interessante incluir nessas análises exemplares de *L. discodactylus*, antigamente *Vanzolinius discodactylus*, ainda que a espécie, aparentemente, não apresente problemas de taxonomia.

Em *Holoaden luederwaldti* (Strabomantidae), além de uma variação na morfologia do par 8 e no tamanho e posição do sítio portador de RON, foi descrito um caso de triploidia natural, evento relativamente incomum em anuros. Tal indivíduo triploide deve ter sido formado pela junção de gameta não reduzido, provavelmente o da fêmea. É relevante considerar que a região de coleta de *H. luederwaldti* da nossa amostra é passível de tempestades com rápida queda de temperatura, o que pode levar a não eliminação do corpúsculo polar, como já sugerido para alguns casos de peixes naturalmente triploides. O aumento do número de representantes cariotipados da espécie pode indicar a extensão da ocorrência das variações encontradas nos cromossomos 8 e no padrão de RON e, também, o quão frequente é a formação de triploides na população.

É, portanto, altamente interessante que estudos citogenéticos sejam realizados em novos exemplares das famílias aqui amostradas, assim como, na medida do possível, sejam utilizadas técnicas mais refinadas, incluindo as de citogenética molecular, principalmente a de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com uso de sondas marcadoras de regiões específicas dos cromossomos. A obtenção de sondas de cromossomos inteiros para FISH *cross-species* seria muito relevante para auxiliar no entendimento dos mecanismos responsáveis pela diferenciação cariotípica entre esses anuros e para estabelecer relações cariotípicas mais efetivas entre as espécies.

Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations

JOÃO REINALDO CRUZ CAMPOS¹, FERNANDO ANANIAS², CINTHIA AGUIRRE BRASILEIRO³, MARCOS YAMAMOTO⁴, CÉLIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD¹ and SANAÉ KASAHARA¹

¹Instituto de Biociências, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil

²Univ. São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brasil

³Museu de História Natural, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

⁴Depto do Meio Ambiente, Votorantim Celulose e Papel S/A, Santa Branca, SP, Brasil

Campos, J. R. C., Ananias, F., Brasileiro, C. A., Yamamoto, M., Haddad, C. F. B. and Kasahara, S. 2009. Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. — *Hereditas* 0146: 104–111. Lund, Sweden. eISSN 1601-5223. Received September 29, 2008. Accepted December 22, 2008

Karyotypic analyses on three species of the *Leptodactylus* from Brazil showed $2n=24$ in *L. cf. marmoratus*, $2n=23$ in *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*), and $2n=26$ in *L. hylaedactylus*, with distinct numbers of bi and uni-armed chromosomes. *Leptodactylus* cf. *marmoratus* presented a variation as regard to the morphology of pair 12. All specimens of *L. cf. marmoratus* had Ag-NOR in pair 6, confirmed by FISH, but the sample from one of the localities presented additional Ag-NOR, in one of the chromosomes 8. In *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) and *L. hylaedactylus* the chromosome pairs bearing Ag-NOR are 11 and 7, respectively. The C banding patterns are predominantly centromeric, but only in *L. marmoratus* this heterochromatin appeared very brilliant with DAPI. On the other hand, bright labelling was noticed with CMA₃ in the three species, on the Ag-NOR site. The data obtained here are in accordance with the proposed phylogeny to the genus, and the chromosomal analyses in these *Leptodactylus* showed that the karyotype evolution was based mainly in centric fusion and pericentric inversion.

João Reinaldo Cruz Campos, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil. E-mail: aoreinaldo@yahoo.com.br

The species previously identified as belonging to the genus *Adenomera* were allocated in *Leptodactylus* after the revision of FROST et al. (2006), but the relationships of both genera have long been a target of many discussions. Firstly, the species *A. marmorata* was renamed *L. marmoratus* by HEYER (1973), due to its geographic distribution and several morphological characteristics shared with some *Leptodactylus*, as size, shape, texture and colour pattern. Soon after, HEYER (1974) carried out an extensive revision on the relationships within the subfamily Leptodactylinae, using primitive and derived states for 50 morphological characters. The study showed that the relationships in the *marmoratus* group were better explained by placing the species in a distinct genus, so the name *Adenomera* was revalidated. Several other papers have dealt with this question using distinct parameters (HEYER 1975, 1977, 1998; HEYER and MAXSON 1982; ANGULO et al. 2003; KOKUBUM and GIARETTA 2005), and in all of them the genera *Adenomera* and *Leptodactylus* were accepted, although their separation was not very clear. HEYER (1998) and KOKUBUM and GIARETTA (2005) presented evidence that *Adenomera* renders *Leptodactylus* paraphyletic, and that the genus *Lithodytes* was the sister-taxon of *Adenomera*.

The revision of FROST et al. (2006), based predominantly on molecular data, introduced great changes in all the Amphibia class, and according to it, the number of genera in the family Leptodactylidae, was reduced from 57 to 11, and soon after, to four, by GRANT et al. (2006). *Leptodactylus*, the most speciose of them with 85 species, includes currently the former *Leptodactylus* and the representatives of *Adenomera*, *Lithodytes* and *Vanzolinius* (FROST 2008). Some of the remainder genera were distributed into other families, some of them already recognised and others revalidated or created. Nevertheless, many questions about the new taxonomy still exist.

Leptodactylus marmoratus is a species-complex and the correct identification of the specimens probably is hindered by the very similar morphology (ANGULO et al. 2003). In fact, KWET (2006) suggested that populations of *L. marmoratus* from southern Brazil belong to, at least, four distinct species, so that these specimens must be treated as *L. cf. marmoratus*.

Relatively few species of *Leptodactylus* have hitherto been karyotyped and almost all of them are characterised by $2n=22$ chromosomes (revisions in KING 1990; KURAMOTO 1990; AMARO-GHILARDI 2005). The exceptions are *L. andreae* and *L. hylaedactylus* with $2n=26$, *L. marmoratus* and *L. silvanimbus* with



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14434-1	Data da Emissão: 18/01/2008 14:50	Data de Validade: 17/01/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2372266	Nome: João Reinaldo da Cruz de Campos	CPF: 268.775.638-59
Título do Projeto: "Mecanismos de variação cromossômica no gênero Leptodactylus e em espécies de famílias relacionadas a Leptodactylidae (Amphibia, Anura)"		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA		CNPJ: 48.031.918/0018-72

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Thiago Gazoni	Iniciação Científica	321.565.288-96	32794800-0 SSP-SP	Brasileira
2	Glaucele Ferreira Catroli	Mestranda	302.336.698-50	322351297 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SALESOPOLIS	SP	Represa de Ponte Nova	Fora de UC
2	SANTA BRANCA	SP	Fazenda Taboão	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Microhylidae (*Qtde: 10), Leptodactylidae (*Qtde: 10), Hylidae (*Qtde: 10), Brachycephalidae (*Qtde: 10)
2	Observação e gravação de imagem ou som	Microhylidae, Leptodactylidae, Hylidae, Brachycephalidae

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Armadilha de queda "pit fall", Captura manual, Bioacústica
---	-------------------------------------	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 87695816





Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14434-1	Data da Emissão: 18/01/2008 14:50	Data de Validade: 17/01/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2372266	Nome: João Reinaldo da Cruz de Campos	CPF: 268.775.638-59
Título do Projeto: "Mecanismos de variação cromossômica no gênero Leptodactylus e em espécies de famílias relacionadas a Leptodactylidae (Amphibia, Anura)"		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA		CNPJ: 48.031.918/0018-72

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007. , a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 87695816



Página 2/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 18681-1	Data da Emissão: 03/02/2009 16:03	Data de Validade: 03/02/2010
-----------------	-----------------------------------	------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2372266	Nome: João Reinaldo da Cruz de Campos	CPF: 268.775.638-59
Título do Projeto: "Mecanismos de variação cromossômica no gênero Leptodactylus e em famílias relacionadas a Leptodactylidae (Amphibia, Anura)"		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA		CNPJ: 48.031.918/0018-72

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Simone Lilian Gruber	Doutoranda	213.065.498-33	268467250 SSP-SP	Brasileira
2	Célio Fernando Batista Haddad	Colaborador	064.348.668-28	10.946.838 SSP/SP-SP	Brasileira
3	Hideki Narimatsu	Iniciação Científica	255.419.248-04	272674497 ssp-SP	Brasileira
4	Thiago Gazoni	Mestrando	321.565.288-96	32794800-0 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		SP	Estado de São Paulo	Fora de UC
2		MG	Estado de Minas Gerais	Fora de UC
3		RJ	Estado do Rio de Janeiro	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Bufo, Centrolenidae, Brachycephalidae, Ranidae, Microhylidae, Leptodactylidae, Leiopelmatidae, Hylidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Ranidae, Bufo, Centrolenidae, Hylidae, Leiopelmatidae, Leptodactylidae, Microhylidae, Brachycephalidae
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Brachycephalidae (*Qtde: 10), Bufo (*Qtde: 10), Centrolenidae (*Qtde: 10), Hylidae (*Qtde: 10), Leiopelmatidae (*Qtde: 10), Leptodactylidae (*Qtde: 10), Ranidae (*Qtde: 10), Microhylidae (*Qtde: 10)
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Ranidae, Microhylidae, Brachycephalidae, Bufo, Centrolenidae, Hylidae, Leiopelmatidae, Leptodactylidae

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36154976





Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 18681-1	Data da Emissão: 03/02/2009 16:03	Data de Validade: 03/02/2010
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2372266	Nome: João Reinaldo da Cruz de Campos	CPF: 268.775.638-59
Título do Projeto: "Mecanismos de variação cromossômica no gênero <i>Leptodactylus</i> e em famílias relacionadas a <i>Lepidodactylidae</i> (Amphibia, Anura)"		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA		CNPJ: 48.031.918/0018-72

5	Observação e gravação de imagem ou som	Ranidae, Bufonidae, Centrolenidae, Hylidae, Leiopelmatidae, Leptodactylidae, Microhylidae, Brachycephalidae
---	--	---

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Bioacústica, Armadilha de queda "pit fall", Captura manual
---	-------------------------------------	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36154976





Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 18681-1	Data da Emissão: 03/02/2009 16:03	Data de Validade: 03/02/2010
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2372266	Nome: João Reinaldo da Cruz de Campos	CPF: 268.775.638-59
Título do Projeto: "Mecanismos de variação cromossômica no gênero <i>Leptodactylus</i> e em famílias relacionadas a <i>Lepidodactylidae</i> (Amphibia, Anura)"		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA		CNPJ: 48.031.918/0018-72

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36154976



Página 3/3