



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

**CARIÓTIPO DE SEIS ESPÉCIES DE *Bokermannohyla* DOS
GRUPOS DE *B. circumdata* E *B. pseudopseudis* (ANURA,
HYLIDAE)**

GLAUCILENE FERREIRA CATROLI

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista,
UNESP, Câmpus de Rio Claro, para a obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular)**

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro de 2008**

**CARIÓTIPO DE SEIS ESPÉCIES DE *Bokermannohyla* DOS
GRUPOS DE *B. circumdata* E *B. pseudopseudis* (ANURA,
HYLIDAE)**

GLAUCILENE FERREIRA CATROLI

Orientadora: Profa. Dra. SANAÉ KASAHARA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista,
UNESP, Campus de Rio Claro, para a obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular)**

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro de 2008**

Agradecimentos

À Dra. Sanae Kasahara pela orientação e apoio durante a realização deste trabalho, bem como pelos bons momentos de descontração que, algumas vezes, nos pudemos permitir.

À Dra. Doralice Maria Cella e à Dra. Patrícia P. P. Maltempi do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, pelas importantes sugestões para a elaboração da Dissertação.

Ao Dr. Célio F. B. Haddad do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, pela coleta e identificação de grande parte dos exemplares estudados e, sobretudo, pelo auxílio proporcionado pelo Projeto BIOTA da FAPESP.

Ao Dr. Julián Faivovich do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, pela busca exaustiva de várias espécies, pelos esclarecimentos das questões de taxonomia e sistemática da família Hylidae. Ao amigo Julián, pelo constante incentivo, paciência e grande ajuda durante todo o trabalho.

Ao Dr. Fernando Ananias da Universidade São Francisco, USF, Bragança Paulista, SP, pela iniciação à Citogenética de Anuros, pela confiança e grande incentivo.

Ao Dr. Denis Andrade do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, pela coleta dos exemplares de *Bokermannohyla alvarengai*.

Ao Msc. Luis O. M. Giasson do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, pelas fotografias cedidas de exemplares das espécies de *B. circumdata* e *B. hylax*.

À Rogilene Aparecida Prado, pelo auxílio técnico na rotina de trabalho e pela amizade; e a todos os demais funcionários do Departamento de Biologia pelas boas horas compartilhadas.

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, São Paulo, SP, que propiciou condições para que o trabalho fosse desenvolvido.

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, pelos esclarecimentos quanto às questões burocráticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio destinado ao projeto sobre citogenética de anfíbios da Dra. Sanae Kasahara; ao

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo suporte financeiro à referida pesquisadora.

Aos colegas de orientação e amigos de todos os momentos, principalmente os de diversão, João Reinaldo da Cruz de Campos (Rei) e Thiago Gazoni (Jabinha), os quais tornaram as horas de trabalho e de tensão, as mais divertidas que já tive. Obrigada aos dois pelas festas, jantares e melhores gargalhadas que alguém pode dar.

Aos demais amigos do Departamento de Biologia, Akio Miyoshi, Cintya Christofolletti, Dânia Mazzeo, Daniela Leme, Davi Gomes, Marielle Schneider, Eduardo Murakami, Frederico Arnoldi, Jaqueline Bianchi, Janaína Pedro, José Augusto David, Livia Loureiro, Luciano Martins, Matheus Roberto, Milena de Julio, Renata Caritá, Tatiana Souza e Thaís Fernandes, pelos excelentes momentos de descontração e boas risadas.

Aos meus pais, Elmo Catroli e Doralice Ferreira, pela constante ajuda e, principalmente, pelo incentivo frente aos obstáculos. À minha mãezinha querida pela paciência, puxões de orelha e por todo o cuidado quando a saúde enfraquecia.

Ao querido Air Alberto (Coisinha) pela paciência e carinho que sempre teve comigo nos melhores e nos piores momentos.

À minha querida irmã e afilhada Mayara Araújo pelos momentos felizes e divertidos durante os finais de semana e pelo carinho com que sempre me recebe.

Aos amigos, Cláudia (Claudinha), Daniel (Aqua), Marcelo (Pancho), César (Cesinha), Caroline (Carol), Djalma (Vavá), Gustavo (Gegê), Edison Pinheiro, Ivan Barros, Dna. Luzia, entre outros que, de uma forma ou de outra, me incentivaram e torceram sempre por mim.

Enfim, a todos que fizeram parte desta importante caminhada.

Sumário

	Página
I. Resumo.....	1
II. Abstract.....	3
III. Introdução.....	5
Considerações sobre a taxonomia e sistemática da família Hylidae.....	7
Considerações sobre o gênero <i>Bokermannohyla</i>	10
Citogenética da família Hylidae.....	12
Citogenética do gênero <i>Bokermannohyla</i>	14
IV. Objetivos.....	16
V. Material.....	17
VI. Métodos e Técnicas.....	20
VII. Resultados.....	27
Grupo de <i>Bokermannohyla circumdata</i>	27
Descrição dos cariótipos.....	27
Análise da Ag-RON.....	27
Análise do bandamento C.....	27
Análise meiótica.....	28
Análise com fluorocromos base-específicos.....	28
Análise das bandas de replicação.....	29
Análise da hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	29
Grupo de <i>Bokermannohyla pseudopseudis</i>	34
Descrição dos cariótipos.....	34
Análise da Ag-RON.....	34
Análise do bandamento C.....	34
Análise meiótica.....	35
Análise com fluorocromos base-específicos.....	35
Análise das bandas de replicação.....	35
VIII. Discussão.....	40
Considerações sobre o cariótipo convencional das espécies de <i>Bokermannohyla</i> e de outros Hylinae.....	40
O emprego da coloração diferencial para a caracterização cariotípica das espécies de <i>Bokermannohyla</i>	43

IX. Conclusões.....	51
X. Referências Bibliográficas.....	54
XI. Apêndice.....	64

I. Resumo

A família Hylidae passou nos últimos anos por extensas modificações na taxonomia e sistemática, realizadas com base principalmente em dados moleculares e com pouca ou nenhuma contribuição de informações citogenéticas. Como consequência, alguns novos gêneros de Hylidae foram criados, sendo esse o caso de *Bokermannohyla*, atualmente o terceiro mais abundante dentro de Cophomantini, uma das quatro tribos da subfamília Hyalinae. Levando-se em conta que os dados citogenéticos no gênero são muito escassos, limitados a apenas três das 27 espécies, análises cariotípicas foram realizadas em *B. circumdata*, *B. hylax* e *Bokermannohyla* sp., do grupo de *B. circumdata*, e em *B. alvarengai*, *B. ibitiguara* e *B. saxicola*, do grupo de *B. pseudopseudis*. As seis espécies compartilham um cariótipo similar com $2n=24$ e $NF=48$. Nas espécies do grupo de *B. circumdata*, as Ag-RON estão localizadas nos braços longos dos cromossomos do par 11, enquanto nas espécies do grupo de *B. pseudopseudis*, esse marcador citológico está nos braços curtos dos cromossomos do par 4 de *B. alvarengai* e nos braços longos dos cromossomos dos pares 1 e 11 de *B. ibitiguara* e *B. saxicola*, respectivamente. O padrão de bandamento C obtido em todas as espécies, com exceção de *B. hylax*, é predominantemente centromérico, mas algumas delas mostraram bandas pericentromérica, intersticial ou terminal, assim como banda C coincidente com o sítio da Ag-RON. Os cromossomos de *Bokermannohyla* sp., *B. ibitiguara* e *B. saxicola* não mostraram nenhuma região repetitiva rica em bases AT com a coloração pelo DAPI, mas a banda C telomérica dos cromossomos do par 10 de *B. circumdata* eram brilhantes. Com o fluorocromo GC-específico CMA₃, a região centromérica dos cromossomos das quatro espécies aparece fluorescente, assim como os

sítios da RON. Padrões de bandas de replicação foram obtidos em *B. alvarengai* e *B. circumdata*, mas na última espécie os cromossomos estavam pouco diferenciados, provavelmente devido à incorporação incompleta do BrdU. Os resultados ora obtidos são muito promissores para os estudos citogenéticos comparativos no gênero *Bokermannohyla* e, num sentido mais amplo, permitirão um melhor conhecimento da diferenciação cariotípica e evolução cromossômica em Cophomantini.

II. Abstract

In the last years, the family Hylidae went through extensive taxonomic and systematic revisions, based mostly on molecular data with few or no contribution of cytogenetic information. As a result, some new hylid genera were erected, and this is the case of *Bokermannohyla*, now the third most speciose genus within Cophomantini, one of the four tribes of the subfamily Hyliinae. Taking into account that cytogenetic data on the genus are very scanty, restricted to only three of its 27 species, karyotypic analyses were carried out in *B. circumdata*, *B. hylax* and *Bokermannohyla* sp., assigned to the *B. circumdata* group, and in *B. alvarengai*, *B. ibitiguara* and *B. saxicola*, assigned to the *B. pseudopseudis* group. The six species share a similar karyotype with $2n=24$ and $FN=48$. In the species of the *B. circumdata* group, Ag-NOR are located in the long arms of the chromosome pair 11, whereas in species of the *B. pseudopseudis* group, this cytological marker is in the long arms of the chromosome pairs 1 and 11 of *B. ibitiguara* and *B. saxicola*, respectively, and in the short arms of the chromosome pair 4 of *B. alvarengai*. The C banding pattern obtained in all species, except for *B. hylax*, is mostly centromeric, but some of them showed pericentromeric, interstitial or terminal bands, as well as C band coincident to the Ag-NOR site. The chromosomes of *Bokermannohyla* sp., *B. ibitiguara* and *B. saxicola* showed no special AT-rich repetitive regions with DAPI staining, but the telomeric C band of the chromosome pair 10 of *B. circumdata* exhibited brilliant fluorescence. With the GC-specific CMA₃ fluorochrome, the centromeric region of the chromosomes of the four species appeared brightly stained, as well as the NOR sites. Replication banding patterns were obtained in *B.*

alvarengai and *B. circumdata*, but in the later species the chromosomes were poorly differentiated, probably due to incomplete BrdU incorporation. The results obtained so far are quite promising for comparative cytogenetic studies on the genus *Bokermannohyla*, and in a wider sense, will allow a better understanding of karyotype differentiation and chromosomal evolution in Cophomantini.

III. Introdução

Dentre as três ordens que compõem a classe Amphibia, a Anura, o grupo dos sapos, rãs e pererecas, compreende 88% do total das espécies. De acordo com a recente estimativa de Frost (2007), são 5453 espécies distribuídas por todo o planeta exceto na Antártida, altas latitudes do Ártico, algumas ilhas oceânicas mais remotas e regiões extremamente secas (Frost *et al.*, 2006). No hemisfério Sul, os anuros são os anfíbios mais representativos, sendo que no Brasil há uma grande variedade de formas, que ocupam os mais diferentes habitats. Segundo a avaliação realizada pela Sociedade Brasileira de Herpetologia em 2007 (SBH, 2007), há registro aproximado de 789 espécies, mas esse número é, certamente, bem maior, visto que, a cada ano, muitas espécies novas têm sido descritas.

Em um grupo tão diversificado como é a ordem Anura, não são incomuns questões relativas à taxonomia e sistemática, o que tem motivado a realização de extensas revisões, com a utilização não só dos tradicionais critérios morfológicos, osteológicos e bioacústicos, entre outros, como também daqueles obtidos em análises de seqüenciamento de DNA, aliados ou não a dados citogenéticos (Faivovich, 2002; Faivovich *et al.*, 2004; Faivovich *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006; Aguiar Jr *et al.*, 2007; Heinicke *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007a).

Devido à sua abundância, ampla distribuição e diversidade cariotípica, os anuros constituem um grupo de grande interesse para as pesquisas sobre os mecanismos de evolução cromossômica. É, então, evidente que a citogenética representa uma ferramenta auxiliar na taxonomia e no esclarecimento das relações filogenéticas entre as espécies de anuros e esse papel é tanto mais relevante, na medida que os métodos e

técnicas empregados nas análises dos cromossomos foram se aperfeiçoando ao longo do tempo.

Os primeiros dados citogenéticos em anuros datam da década de 1930, quando as análises eram baseadas apenas na observação de células meióticas, obtidas principalmente por técnicas de esmagamento. A partir da década de 1960, o uso da colchicina e do tratamento hipotônico melhoraram substancialmente a qualidade das preparações cromossômicas, mas, os trabalhos pioneiros em anuros da fauna brasileira foram baseados na observação de cromossomos mitóticos ou meióticos corados apenas de modo convencional (Beçak, 1968; Rabello, 1970; Rabello *et al.*, 1971; Denaro, 1972; Foresti, 1972; Bogart, 1973; Lucca *et al.*, 1974). Apesar das informações se restringirem praticamente ao número e à morfologia cromossômica, com raras menções sobre a presença de constrições secundárias e satélites, os mecanismos mais prováveis de evolução cariotípica foram sugeridos, como sendo as fusões/fissões cêntricas e a poliploidia.

Na década de 1970, as técnicas de coloração diferencial desenvolvidas primariamente para a análise dos cromossomos humanos, como as de bandas Q, G, R e C e de marcação de regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON), começaram a ser aplicadas com sucesso em vertebrados, incluindo os anfíbios. Em anuros, têm sido empregadas rotineiramente pelos citogeneticistas, as técnicas de identificação de heterocromatina pelo bandamento C e a de localização da Ag-RON, pois fornecem de modo rápido e relativamente simples informações mais detalhadas sobre os cariótipos (comentários em Batistic, 1984; King, 1990; Schmid *et al.*, 1990).

Subseqüentemente, dezenas de outros procedimentos que promovem a diferenciação dos cromossomos foram padronizados (Verma e Babu, 1995) como aqueles que empregam a incorporação do análogo de base 5-bromodeoxiuridina (BrdU) na molécula de DNA no momento de sua replicação, as enzimas de restrição e a coloração com fluorocromos AT ou GC-específicos. Destaque especial é dado à hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com o uso de sondas, principalmente, de DNAr e teloméricas. Esses métodos, aplicados com sucesso nos estudos citogenéticos de anuros (Schmid *et al.*, 1990), inclusive em representantes de nossa fauna, permitem entender, adicionalmente, a natureza e organização molecular de regiões cromossômicas específicas e mesmo o funcionamento de certos genes, como os ribossomais.

A caracterização mais detalhada dos cromossomos dos anuros tem evidenciado a ocorrência de rearranjos estruturais, cromossomos supernumerários e mecanismos cromossômicos de determinação do sexo, simples ou múltiplos. Isso tem contribuído para se esclarecer os mecanismos envolvidos na diferenciação dos cariótipos, o que é de fundamental importância para a compreensão da evolução cromossômica e das relações de parentesco entre diferentes grupos taxonômicos; ao mesmo tempo, têm fornecido dados relevantes para se conhecer a estrutura dos cromossomos, bem como para a citotaxonomia e identificação de novas espécies, principalmente nos casos de complexo de espécies e das chamadas espécies crípticas (Ruiz *et al.*, 1981; Kasahara *et al.*, 1996; Kasahara *et al.*, 1998; Lourenço *et al.*, 1998; Baldissera Jr *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000; Aguiar Jr *et al.*, 2002; Lourenço *et al.*, 2003; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Campos *et al.*, no prelo; Ananias *et al.*, 2007a; Ananias *et al.*, 2007b; Amaro-Ghilardi *et al.*, no prelo; Lourenço *et al.*, no prelo, entre inúmeros outros trabalhos realizados por pesquisadores brasileiros).

Considerações sobre a taxonomia e sistemática da família Hylidae

A família Hylidae, atualmente com 44 gêneros e 844 espécies, constitui-se em uma das mais diversificadas entre os anuros e apresenta ampla distribuição com ocorrência nas Américas, Austrália/Papua-Nova Guiné e Eurásia, incluindo o extremo norte da África e os arquipélagos japoneses (Frost, 2007). No Brasil, os hílideos têm alta representatividade e correspondem à cerca de 40% do total de espécies de anuros aqui descritas (SBH, 2007).

Uma característica comum aos hílideos, comumente chamados de pererecas, é a presença de ventosas nas pontas dos dedos, as quais são essenciais para a adesão do animal aos ramos de vegetação. A maioria das espécies é arbórea, porém, alguns representantes são aquáticos e outros fossoriais (Duellman e Trueb, 1994).

As espécies pertencentes à família estiveram até recentemente agrupadas nas subfamílias Hemiphractinae, Hylinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae, porém, com muitos questionamentos sobre a taxonomia e sistemática (Faivovich *et al.*, 2005). Nos últimos anos, grupos de Hylidae têm sido reavaliados com o uso de técnicas de biologia molecular (Chek *et al.*, 2001; Faivovich, 2002; Donnellan e Mahony, 2004; Faivovich *et al.*, 2004; Burns e Crayn, 2006; Recuero *et al.*, 2006; Garda e Cannatella, 2007,

Aguiar Jr *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007a entre outros) e, embora muitos trabalhos tenham fornecido informações relevantes para a compreensão das relações em determinados grupos de espécies, uma hipótese filogenética ampla para toda a família foi proposta (Fig. 1) no trabalho de Faivovich *et al.* (2005). Além de uma revisão da sistemática da família Hylidae, com ênfase na subfamília Hylinae, os autores estabeleceram as relações de parentesco com base principalmente em dados de seqüenciamento de 9 genes mitocondriais e nucleares de 228 hílídeos, representantes de 40 dos 41 gêneros reconhecidos até então. Dentre as principais conclusões, o número de subfamílias foi reduzido a três, isto é, Hylinae, Pelodryadinae e Phyllomedusinae com a remoção de Hemiphractinae, mais distantemente relacionada. Os representantes de Hemiphractinae, que estavam alocados tentativamente na família Leptodactylidae (Faivovich *et al.*, 2005), foram posteriormente distribuídos nas famílias Amphignatodontidae, Cryptobatrachidae e Hemiphractidae na classificação proposta por Frost *et al.* (2006).

A subfamília Hylinae é a mais abundante com 606 espécies distribuídas em 36 gêneros. Incluído, até 2005, em Hylinae encontrava-se o gênero *Hyla*, de maior representatividade da família Hylidae, o qual foi amplamente modificado por Faivovich *et al.* (2005). Das 353 espécies pertencentes anteriormente ao gênero, 297 foram alocadas em 17 gêneros, dos quais quatro, *Aplastodiscus*, *Plectrohyla*, *Ptychohyla* e *Scinax*, já eram reconhecidos, quatro são nomes revalidados e nove são novas descrições. O gênero *Hyla* ficou, então, restrito aos grupos de *Hyla arborea*, *Hyla cinerea*, *Hyla eximia*, *Hyla femoralis* e *Hyla versicolor*, cujos representantes não ocorrem em território brasileiro. As espécies de *Hyla* com $2n=30$ ou presumivelmente com tal número diplóide foram incluídas no gênero revalidado *Dendropsophus*, enquanto outras espécies foram alocadas nos gêneros *Exerodonta*, *Hyloscirtus* e *Hypsiboas*, que foram também revalidados. Os nomes genéricos novos para as espécies de *Hyla* correspondem a *Bokermannohyla*, *Bromeliahyla*, *Charadrahyla*, *Ecnomiohyla*, *Isthmohyla*, *Itapotihyla*, *Megastomahyla*, *Myersiohyla* e *Tlalocohyla*.

A subfamília Hylinae aparece agora dividida em 4 tribos (Fig. 1), isto é, Cophomantini, Dendropsophini, Hylini e Lophiohylini (Faivovich *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 2006). Segundo as duas revisões, pertencem à tribo Cophomantini os gêneros *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus*, *Hypsiboas* e *Myersiohyla*, enquanto a

tribo Dendropsophini abriga os gêneros *Dendropsophus*, *Lysapsus*, *Pseudis*, *Scarthyla*, *Scinax*, *Sphaenorhynchus* e *Xenohyla*. Contudo, em estudo recente sobre a relação filogenética dos gêneros *Lysapsus* e *Pseudis*, com base também em dados de seqüenciamento de genes, Aguiar Jr *et al.* (2007) concluíram que *Pseudis* não é um grupo monofilético em relação a *Lysapsus* e que as espécies desse último, portanto, devem ser sinonimizadas a *Pseudis*.

Na tribo Hylini, estavam incluídos inicialmente os gêneros *Acris*, *Anotheca*, *Duellmanohyla*, *Exerodonta*, *Hyla*, *Plectrohyla*, *Pseudacris*, *Ptychohyla*, *Smilisca*, *Triprrion*, *Bromeliahyla*, *Charadrahyla*, *Ecnomihyla*, *Isthmohyla*, *Megastomatohyla* e *Tlalocohyla*, mas, tendo sido a única espécie de *Anotheca* recentemente alocada em *Triprrion* por Smith *et al.* (2007b), essa tribo passa a contar 15 dos 16 gêneros anteriormente estabelecidos nas revisões de Faivovich *et al.* (2005) e Frost *et al.* (2006); por fim, na tribo Lophiohylini, estão os gêneros *Aparasphenodon*, *Argenteohyla*, *Corythomantis*, *Itapotihyla*, *Nyctimantis*, *Osteopilus*, *Phyllodytes*, *Tepuihyla*, *Osteocephalus* e *Trachycephalus*.

A extensa revisão sistemática de toda a classe Amphibia, realizada em 2006 por Frost *et al.*, tendo por base principalmente dados de seqüenciamento de DNA combinados com caracteres anatômicos, corroborou integralmente a taxonomia proposta por Faivovich *et al.* (2005) para a família Hylidae. No entanto, para sustentar uma taxonomia monofilética na subfamília Pelodyadinae, foi sugerido um arranjo pelo qual *Cyclorana* passa a ser considerado subgênero de *Litoria* e *Nyctimystes* é sinonimizado a ele. Pelodyadinae abriga, a partir de então, apenas o gênero *Litoria*.

A subfamília Phyllomedusinae é o grupo-irmão de Pelodyadinae e, juntas, as duas subfamílias formam o táxon-irmão de Hyalinae. Phyllomedusinae abriga atualmente 57 espécies distribuídas por sete gêneros, *Agalychnis*, *Cruziohyla*, *Hylomantis*, *Pachymedusa*, *Phasmahyla*, *Phrynomedusa* e *Phyllomedusa*. Desses, apenas *Cruziohyla* é um nome genérico novo criado por Faivovich *et al.* (2005) para receber duas espécies anteriormente alocadas em *Agalychnis*, enquanto todos os demais gêneros já eram reconhecidos. Em outra modificação feita pelos autores, seis espécies anteriormente incluídas no gênero *Phyllomedusa*, o maior da subfamília, foram alocadas em *Hylomantis*.

Considerações sobre o gênero *Bokermannohyla*

A tribo Cophomantini, a mais basal da subfamília Hyalinae, inclui os gêneros *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus*, *Hypsiboas* e *Myersiohyla*. O maior gênero da tribo é *Hypsiboas*, o qual foi revalidado para receber seis dos antigos grupos do gênero *Hyla*, mais o complexo de *H. albomarginata*, totalizando, agora, 71 espécies divididas em sete grupos e mais duas sem grupo definido (Faivovich *et al.*, 2005; Frost, 2007).

O gênero *Bokermannohyla*, com 27 espécies, é o terceiro maior da tribo Cophomantini, precedido de *Hypsiboas* e *Hyloscirtus* (Fig. 2). Suas espécies estão distribuídas em 4 grupos que ocorrem exclusivamente em regiões da Mata Atlântica e Cerrado brasileiros (Faivovich *et al.*, 2005). Trata-se de um novo gênero criado com base nos dados obtidos por seqüenciamento de genes para receber todas as espécies anteriormente alocadas nos grupos de *Hyla circumdata*, *H. martinsi*, *H. pseudopseudis* e *H. claresignata*, esse último, incluído em *Bokermannohyla* por Faivovich *et al.* (2005) porque alguns autores (Bokermann, 1972; Jim e Caramaschi, 1979) o associaram ao grupo de *B. circumdata*. A monofilia do gênero *Bokermannohyla*, porém, ainda deverá ser testada. É importante destacar que nenhuma sinapomorfia pôde ser estabelecida entre as espécies alocadas no gênero (Faivovich *et al.*, 2005).

São incluídas 17 espécies no grupo de *Bokermannohyla circumdata*, isto é, *B. ahenea*, *B. astartea*, *B. caramaschii*, *B. carvalhoi*, *B. circumdata*, *B. diamantina*, *B. feioi*, *B. gouveai*, *B. hylax*, *B. ibitipoca*, *B. izeckshoni*, *B. lucianae*, *B. luctuosa*, *B. nanuzae*, *B. ravida*, *B. sazimai* e *B. vulcaniae*. O grupo de *B. claresignata* compreende apenas *B. claresignata* e *B. clepsydra*, enquanto no grupo de *B. martinsi* estão alocadas *B. langei* e *B. martinsi*; por fim, no grupo de *B. pseudopseudis* estão *B. alvarengai*, *B. ibitiguara*, *B. itapoty*, *B. oxente*, *B. pseudopseudis* e *B. saxicola* (Vasconcelos e Giaretta, 2003; Faivovich *et al.*, 2005; Napoli e Juncá, 2006; Lugli e Haddad, 2006a; Lugli e Haddad, 2006b).

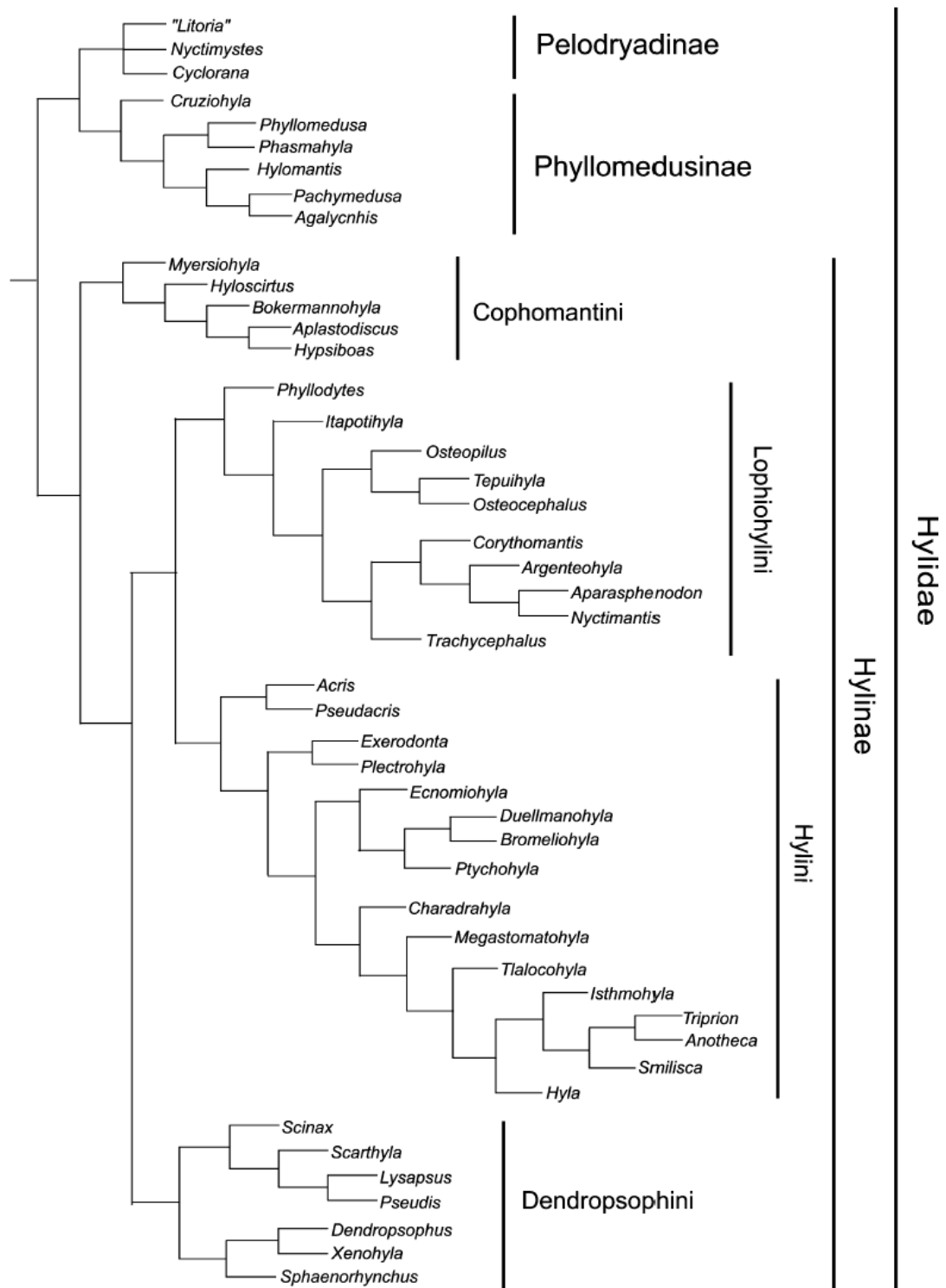


Fig. 1. Nova taxonomia da família Hylidae, segundo Faivovich *et al.* (2005)

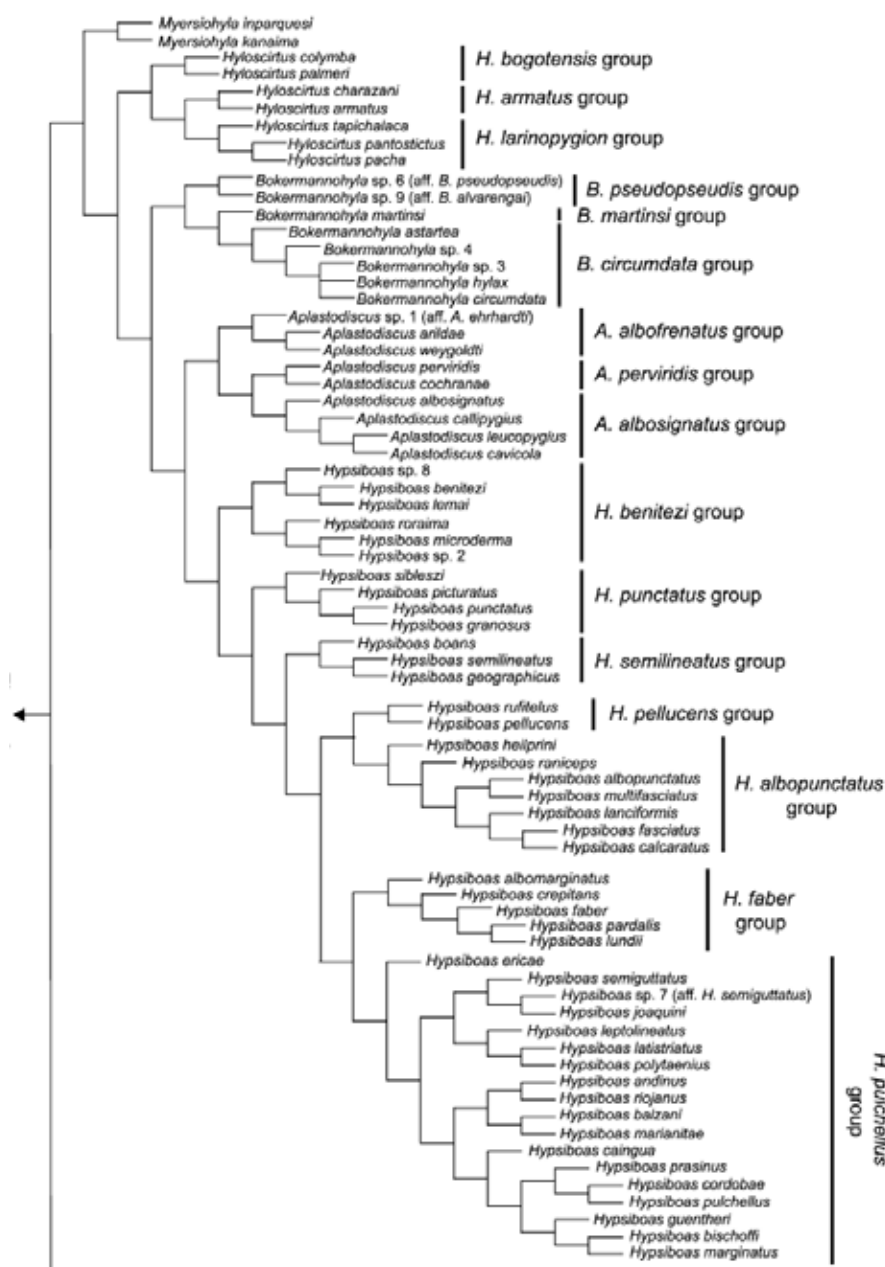


Fig. 2. Vista parcial da nova taxonomia da tribo Cophomantini, segundo Faivovich *et al.* (2005)

Citogenética da família Hylidae

Uma das principais características citogenéticas da família Hylidae é o cariótipo com 24 cromossomos, porém, na família ocorrem números menores, isto é, $2n=18$, 20 e 22, ou maiores, como $2n=26$, 30, 34, 48 e 52, os dois últimos resultantes de poliploidização (Tabela 1 – Apêndice). Desde Bogart (1973) acredita-se que o cariótipo da maioria das espécies com $2n$ menor que 24, senão todos, sejam derivados de um

ancestral com $2n=24$, o que também é sugerido nos resultados filogenéticos de Faivovich *et al.* (2005).

De acordo com os dados levantados até as revisões de King (1990) e Kuramoto (1990), a família Hylidae correspondia, entre os anuros, aquela com maior número de espécies até então cariotipadas, e a subfamília Hyliinae, e o gênero *Hyla*, em particular, tinha a maior representatividade em espécies analisadas. Apesar disso, a maioria das espécies alocadas na família não tem cariótipo conhecido, restando muitas lacunas quanto à caracterização cromossômica de seus representantes.

A maior parte das informações citogenéticas nos hilídeos foi baseada em estudos feitos apenas com coloração convencional. Com o aprimoramento das técnicas de bandamento, foram realizados trabalhos com enfoques mais resolutivos, revelando a ocorrência de alterações cariotípicas em muitas espécies da família, tais como presença de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, supernumerários ou cromossomos B, variação na quantidade e distribuição de heterocromatina, bem como diferenças em relação ao número e localização da Ag-RON. É importante destacar os trabalhos que empregam técnicas mais avançadas, tais como a coloração com os fluorocromos base-específicos, FISH e a incorporação pelo análogo de base, BrdU, em análises cromossômicas de espécies da família Hylidae. Tais estudos, realizados principalmente por muitos pesquisadores brasileiros, têm fornecido dados relevantes para a compreensão da evolução cariotípica nos hilídeos (Beçak *et al.*, 1970; Wiley, 1982 e 2003; Wiley *et al.*, 1992; Baldissera Jr *et al.*, 1993; Miura, 1995; Schmid *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1996; Kasahara *et al.*, 1998; Wiley e Little, 2000; Busin *et al.*, 2001; Kasahara *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2003; Schmid e Steinlein, 2003; Ananias *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2005 e 2007; Berset-Brändli *et al.*, 2006; Busin *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2006; Busin *et al.*, no prelo).

De acordo com os levantamentos realizados por Morescalchi (1973, 1979), King (1990), Kuramoto (1990) e complementados no presente trabalho (Tabela 1 – Apêndice), o número diplóide de $2n=24$ é comum a grande parte das espécies pertencentes à subfamília Hyliinae, embora seja interessante ressaltar que maior variabilidade do número cromossômico está presente em representantes dessa subfamília. Segundo se pode observar na referida tabela, os casos com $2n$ discrepantes foram descritos no gênero *Aplastodiscus*, no qual são relatados $2n=18$, 20 e 22, em

Acris com $2n=22$, em *Dendropsophus* com $2n=30$, em *Hypsiboas* com uma espécie com $2n=22$, em *Osteopilus* com uma espécie com $2n=34$ e outra com $2n=28$ e em *Pseudis* com uma espécie com $2n=28$. No gênero *Hyla*, foi descrita uma espécie poliplóide, *Hyla versicolor*, com $2n=4x=48$. Ainda na subfamília Hyalinae, variantes numéricas decorrentes da presença de cromossomos supernumerários foram observadas em *Acris crepitans*, com $2n=22+1$ a 4B, *Dendropsophus nanus*, com $2n=31$, em *Hypsiboas albopunctatus* com $2n=23$, em *Bokermannohyla luctuosa*, com $2n=25$ e *Scinax trachitorax*, agora sinonimizado a *Scinax fuscovarius*, com $2n=25$ (Rabello, 1970; Baldissera Jr *et al.*, 1993; Medeiros *et al.*, 2006; Gruber *et al.*, 2007).

Até a revisão de Faivovich *et al.* (2005), que reduziu drasticamente o número de representantes do gênero *Hyla*, eram reconhecidos para as espécies neotropicais do gênero *Hyla*, dois grandes grupamentos, um com espécies portadoras de $2n=24$ e outro incluindo espécies com $2n=30$. Bogart (1973) tinha sugerido que ambos derivaram, independentemente, de um cariótipo ancestral comum com $2n=26$, sendo que a fissão cêntrica seria o principal rearranjo responsável pelo aumento do número de cromossomos no grupamento com $2n=30$, porém, inversões pericêntricas teriam promovido alteração na morfologia de alguns pares. A redução de $2n=26$ para $2n=24$ poderia ser devida a um mecanismo de fusão, do tipo fusão cêntrica ou do tipo fusão em *tandem*. Faivovich *et al.* (2005) mencionam a possibilidade de que $2n=24$ seja uma característica sinapomórfica em Hyalinae, e isso significa que esse número cariotípico deva estar presente nos gêneros mais basais das tribos Cophomantini e Lophiohylini, informação que é ainda desconhecida.

Nas outras duas subfamílias, o número cromossômico predominante nas poucas espécies analisadas é de 26 cromossomos (revisão em King, 1990 e Kuramoto, 1990). Em Phyllomedusinae, porém, foi descrito um caso de poliploidia em *Phyllomedusa tetraploidea*, com $2n=4x=52$ cromossomos (Beçak, *et al.*, 1970; Barrio, 1976; Batistic, 1989; Pombal Jr e Haddad, 1992). Phyllomedusinae e Pelodyadinae têm uma relação filogenética próxima (grupos-irmãos), o que pode ser constatado, não só pelo fato de compartilharem o mesmo $2n$, como também um padrão cariotípico altamente similar.

Citogenética do gênero *Bokermannohyla*

As 27 espécies até agora descritas para o gênero *Bokermannohyla* ocorrem

exclusivamente no sudeste e centro-oeste brasileiros, na Mata Atlântica propriamente dita e em formações de campos rupestres associados a ela ou ao Cerrado. Apesar de sua ocorrência em nosso território, existem poucas informações sobre a citogenética do gênero com dados restritos a apenas três das 27 espécies conhecidas (Foresti, 1972; Baldissera Jr *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 2004).

Uma única fêmea de *Bokermannohyla izecksohni* proveniente de Botucatu, SP, considerada como *Hyla circumdata* em Foresti (1972), mas reconhecida como sendo *H. izecksohni* em Jim e Caramaschi (1979), foi analisada com coloração convencional e as informações obtidas relatam apenas o número diplóide de $2n=24$ e morfologia dos cromossomos da espécie.

Quatro exemplares de *B. luctuosa* provenientes de Jundiaí, SP, referidos como *Hyla* aff. *circumdata* foram cariotipados por Baldissera Jr *et al.* (1993) com o uso de coloração convencional e das técnicas de Ag-RON e bandamento C. O número cromossômico encontrado foi de $2n=24$, mas um macho e uma fêmea apresentaram $2n=25$ devido à ocorrência de um cromossomo B no cariótipo. A posição taxonômica de *Hyla* aff. *circumdata* foi determinada posteriormente com base em caracteres morfológicos e a espécie recebeu o nome de *Hyla luctuosa*, sendo alocada no grupo de *Hyla circumdata* (Pombal Jr e Haddad, 1993).

Apesar da abundância da família Hylidae em número de espécies e da frequência relativamente alta com que têm sido cariotipadas, a maior parte dos hílideos ainda é desconhecida do ponto de vista cariológico. Na tribo Cophomantini, os estudos citogenéticos estão restritos aos gêneros *Hypsiboas* e *Aplastodiscus* (Duellman e Cole, 1965; Duellman, 1967; Beçak, 1968; Rabello, 1970; Rabello *et al.*, 1971; Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973; Anderson, 1991; Baldissera Jr *et al.*, 1993; Ananias *et al.*, 2004; Raber *et al.*, 2004; Carvalho, 2005; Gruber *et al.*, 2007), enquanto para *Myersiohyla* e *Hyloscirtus*, grupos irmãos-sucessivos de todos os demais gêneros da tribo, não há descrição cariotípica de nenhuma de suas espécies. Considerando que existem entre as 27 espécies de *Bokermannohyla* apenas três com descrição cariológica, a análise cromossômica de seus representantes é relevante para se compreender como teria ocorrido a diferenciação cariotípica no gênero. Esses dados, juntamente com os obtidos nos demais gêneros de Cophomantini, permitirão ampliar o conhecimento da evolução cromossômica em toda a tribo.

IV. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi a realização de estudos citogenéticos em 6 espécies da tribo Cophomantini, *Bokermannohyla circumdata*, *B. hylax*, *Bokermannohyla* sp., *B. alvarengai*, *B. ibitiguara* e *B. saxicola*, com vistas à compreensão da diferenciação cariotípica, buscando de tal forma a obtenção de subsídios para o entendimento da evolução cromossômica na tribo.

Tais estudos consistiram na:

- ✓ descrição do cariótipo das espécies com o uso da coloração convencional em cromossomos mitóticos;
- ✓ localização da Região Organizadora do Nucléolo pela impregnação pelo nitrato de prata (Ag-RON) e pela hibridação *in situ* fluorescente (FISH);
- ✓ caracterização do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva pela técnica do bandamento C;
- ✓ análise dos cromossomos meióticos dos machos da amostra, com coloração convencional;
- ✓ caracterização das regiões cromossômicas repetitivas, se ricas em AT ou CG, pela coloração com fluorocromos base-específicos DAPI e CMA₃, respectivamente;
- ✓ obtenção do padrão de bandas de replicação, pela incorporação do análogo de base BrdU no DNA.

V. Material

Foram analisados 24 exemplares pertencentes a seis espécies, das quais três estão alocadas no grupo de *Bokermannohyla circumdata* e três no grupo de *Bokermannohyla pseudopseudis* (Tabela 2). A amostra de *B. circumdata* é constituída de 15 exemplares, sendo dois de Salesópolis, SP, um de Campos do Jordão, SP e 12 de Camanducaia, MG, enquanto a de *B. hylax* inclui dois exemplares coletados em Salesópolis, SP. Da espécie *Bokermannohyla* sp., apenas um exemplar de Furnas, MG, foi cariotipado. A amostra de *B. alvarengai* é de dois exemplares de Congonhas do Norte, MG, a de *B. ibitiguara* é de dois exemplares de Furnas, MG, enquanto a de *B. saxicola* é de dois exemplares coletados na Serra do Cipó, MG.

Os espécimens foram coletados pelo Dr. Célio F. B. Haddad e equipe, do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, e pelo Dr. Julián Faivovich, Jovem Pesquisador FAPESP junto ao mesmo Departamento, os quais foram responsáveis pela identificação dos animais. Após o sacrifício, os exemplares foram fixados em formol 10%, conservados em álcool 70% e depositados na Coleção de Anfíbios (CFBH) do referido Departamento, com os seus respectivos números de tombo, exceto para três deles, para os quais constam os números de registro da citogenética.

Tabela 2. Número, sexo, identificação e local de coleta dos exemplares de *Bokermannohyla* do presente trabalho

Espécie	Sexo	Identificação	Local de coleta
Grupo <i>B. circumdata</i>			
<i>Bokermannohyla circumdata</i>	1F, 1J	CFBH 16700-01	Salesópolis, SP
	1F	CFBH16702	Campos do Jordão, SP
	3F, 9M	CFBH16705-13, A670, A671, A683	Camanducaia, MG
<i>Bokermannohyla hylax</i>	1J, 1F	CFBH16698-99	Salesópolis, SP
<i>Bokermannohyla</i> sp.	1F	CFBH16721	Furnas, MG
Grupo <i>B. pseudopseudis</i>			
<i>Bokermannohyla alvarengai</i>	2J	CFBH16716-17	Congonhas do Norte, MG
<i>Bokermannohyla ibitiguara</i>	2M	CFBH16718-19	Furnas, MG
<i>Bokermannohyla saxicola</i>	2M	CFBH16714-15	Serra do Cipó, MG

J-Jovem F-Fêmea M-Macho

CFBH – Coleção de Anfíbios do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP



Fig. 3. Exemplares de espécies de *Bokermannohyla* do grupo de *B. circumdata*. **A.** *B. circumdata* (CRC=55.5-71.5 mm). **B.** *B. hylax* (CRC=45.9-62.9 mm). **C.** *Bokermannohyla* sp (CRC=50-55 mm). Fotos cedidas por Msc. Luis O. M. Giasson (A e B) e Dr. Célio F. B. Haddad (C)



Fig. 4. Exemplares de espécies de *Bokermannohyla* do grupo de *B. pseudopseudis*. **D.** *B. alvarengai* (CRC=90-110 mm). **E.** *B. ibitiguara* (CRC=37-42 mm). **F.** *B. saxicola* (CRC=44-55 mm). Fotos cedidas pelo Dr. Célio F. B. Haddad

CRC = Comprimento Rostro-Cloacal do adulto

VI. Métodos e Técnicas

Os métodos e técnicas empregados foram aqueles adotados no laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, descritos a seguir.

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

Preparações citológicas são obtidas dos animais previamente injetados com fitohemaglutinina na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso do animal, para aumentar o índice mitótico. É injetada também solução de colchicina 0,01%, na mesma proporção da fitohemaglutinina cerca de 12 horas antes do sacrifício e, eventualmente, solução de BrdU+FudR, seguindo-se os procedimentos descritos em Baldissera Jr *et al.* (1993) e Silva *et al.* (2000). Os animais são sacrificados com clorofórmio e, em seguida, os fêmures e as tíbias dissecados, as epífises cortadas e procedidas sucessivas lavagens com cloreto de potássio a 0,075M para a remoção total da medula. Para a retirada das células do baço e fígado, solução de KCl 0,075M é injetada no tecido. Já os túbulos seminíferos são removidos com uma pinça, em solução hipotônica, e pipetados para auxiliar no processo de dissociação das células. As suspensões são, então, mantidas em estufa a 37°C por cerca de 45 minutos e, em seguida, procedida a pré-fixação em duas etapas, com a adição, em cada uma delas, de seis gotas de fixador Carnoy 3:1 (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético) gelado, recém preparado, e o material homogeneizado levemente. A suspensão é centrifugada entre 900 e 1000 rpm por cerca

de 9 minutos e o sobrenadante descartado. Acrescenta-se novo fixador, o material é pipetado e o processo repetido por, pelo menos, mais uma vez. Após a última centrifugação, as suspensões são mantidas em geladeira por aproximadamente 24 horas para uma boa fixação das células antes da confecção das lâminas ou armazenadas em *freezer* para a preparação posterior das lâminas.

Obtenção das preparações cromossômicas a partir de epitélio intestinal

De alguns animais, foi feita preparação citológica de células do epitélio intestinal, segundo a técnica de Schmid (1978), com modificações. Os animais são submetidos à injeção intraperitoneal de colchicina 1% na proporção de 0,1mL/10g de peso, e cerca de 4 horas depois sacrificados com clorofórmio. O intestino é retirado e cortado longitudinalmente para expor o epitélio. O material é hipotonizado em solução de citrato de sódio a 0,09% por 25 minutos. Decorrido esse tempo, o intestino é colocado em fixador Carnoy 3:1 (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético) recém preparado, gelado, e o epitélio raspado com uma espátula para a remoção das células. A suspensão é centrifugada entre 900 e 1000 rpm por cerca de 9 minutos, o sobrenadante descartado e adicionado novo fixador. O material é pipetado para a lavagem das células e o processo é repetido por pelo menos mais uma vez. Após a última centrifugação, as suspensões são mantidas em geladeira por aproximadamente 24 horas para uma boa fixação das células antes da confecção das lâminas ou armazenadas em *freezer* para a preparação posterior das lâminas.

Obtenção das preparações cromossômicas a partir de cultura de linfócitos

Para obtenção das preparações cromossômicas a partir de cultura de linfócitos, foram empregados os procedimentos descritos por Kasahara *et al.* (1998). O animal é anestesiado com clorofórmio e a superfície do tórax e abdômen limpa com álcool 70%. O coração é exposto e procede-se a punção no ventrículo com uma seringa heparinizada (Heparina Liquémine Roche, 5000 UI/mL). O sangue é inoculado no frasco de cultura, na proporção aproximada de 5 gotas para 5mL do meio Amphibian Culture Medium da GIBCO, suplementado com fitohemaglutinina. Pode-se empregar também o Meio Cariótipo da Cultilab (Meio MEM). Caso a amostra sanguínea retirada seja grande, a seringa deve ser mantida em posição vertical para esperar a deposição das hemácias. O

plasma com os leucócitos é inoculado no frasco de cultura na proporção de 5 gotas para 5mL de meio. O material é incubado em estufa a 26° ou 30°C, por no mínimo 3 e no máximo 7 dias. Cerca de 1 hora e meia antes do término do tempo de incubação, pinga-se duas gotas de colchicina (4×10^{-5} M) em cada frasco. Em caso de tratamento *in vitro* com o BrdU, é adicionada solução estoque de BrdU/FudR (10 mg de BrdU e 0,5 mg de FudR em 2mL de solução de cloreto de sódio 0,9%) de modo que a concentração final do BrdU seja de 100µg/mL, de 8 a 15 horas antes do término da cultura. Nesse caso, a duração do tratamento pela colchicina é de apenas 1 hora. Decorrido o tempo, o material é centrifugado entre 900 e 1000 rpm por 9 minutos e o sobrenadante descartado. Adiciona-se 3mL de solução hipotônica de cloreto de potássio a 0,075M, previamente aquecida, pipeta-se o material que, posteriormente, é incubado em estufa a 37°C por 30 a 45 minutos. Os demais passos são os mesmo descritos para a preparação direta a partir da primeira etapa de pré-fixação.

Coloração convencional pelo Giemsa

A lâmina é submetida a uma hidrólise em solução 1N de ácido clorídrico, a 60°C, durante cinco minutos. Após a lavagem em água destilada, é corada em solução de Giemsa (1mL da solução comercial da Merck acrescida de 29mL de tampão fosfato, pH 6,8) durante sete minutos. Uma nova lavagem é feita com água destilada e a lâmina posta a secar à temperatura ambiente.

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

A localização da Ag-RON foi feita seguindo-se a metodologia descrita por Howell e Black (1980), com pequenas modificações. A lâmina é incubada em solução de ácido clorídrico 1N, a 60°C, durante três minutos. Em seguida, deixa-se secá-la à temperatura ambiente e pinga-se sobre o material uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50mL de água destilada e 0,5mL de ácido fórmico) e duas gotas de solução a 50% de nitrato de prata. Cobre-se o material com laminula e incuba-se a lâmina em câmara úmida, a 60°C, durante cerca de três minutos. Após a lavagem com água destilada, é feita uma coloração com solução de Giemsa, a mesma utilizada na coloração convencional, por 30 segundos. Segue-se a lavagem em

água destilada e secagem à temperatura ambiente.

Marcação de regiões heterocromáticas (banda C)

Para essa técnica foram seguidos os procedimentos descritos por Sumner (1972), com algumas modificações. A lâmina é submetida à hidrólise com solução 0,2N de ácido clorídrico, à temperatura ambiente, durante 30 a 45 minutos e lavada em água destilada. Em seguida, é mergulhada em solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, a 60°C, durante 30 a 40 segundos, lavada em água destilada e passada rapidamente em solução 1N de ácido clorídrico a 60°C, para retirada de resíduos de bário. Após nova lavagem em água destilada, é incubada em solução de 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos. A coloração é feita com solução de Giemsa (1mL da solução comercial da Merck acrescida de 29mL de tampão fosfato, pH 6,8), durante 20 a 30 minutos. Uma nova lavagem em água destilada é feita, seguida de secagem à temperatura ambiente.

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

O procedimento foi realizado segundo Dutrillaux e Couturier (1981), com modificações. A lâmina é corada com solução de Hoechst 33258 (10µg/mL), durante 20 minutos, à temperatura ambiente, lavada em água destilada e passada rapidamente em solução de 2xSSC. Sobre o material, pingam-se duas a três gotas de solução 2xSSC e cobre-se com lamínula. A lâmina é colocada em câmara úmida, preparada com uma placa de Petri forrada com papel-filtro umedecido com solução de 2xSSC e fechada com filme plástico. A lâmina é exposta à luz negra e após 2 horas a lamínula é retirada. Em sequência, a lâmina é lavada e incubada em solução de 2xSSC, a 60°C, durante 20 minutos. Após a lavagem em água destilada, a lâmina é corada em solução de Giemsa, a mesma utilizada na coloração convencional, durante 7 minutos. Segue-se nova lavagem em água destilada e secagem à temperatura ambiente.

Coloração por fluorocromos AT e GC-específicos

Para a obtenção de bandas fluorescentes foi empregada a técnica modificada de Christian *et al.* (1998), de acordo com a qual, é dispensado o uso do contracorante DA. As lâminas são incubadas em solução de formamida 70% 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, as lâminas são passadas em bateria de álcool 70%, 85% e 100%, gelada, por 2 minutos em cada banho. Depois de bem secas, sobre cada uma delas são colocados 80µL de CMA₃ (CMA₃ 20 µg/mL em 32mM Cl₂Mg). O material é coberto com lamínula e deve permanecer em câmara escura na geladeira por cerca de 30 minutos. Passar por três banhos de PBS 1X à temperatura ambiente por 2 minutos cada. Sem que as lâminas sequem completamente são, em seguida, montadas com 80µL de DAPI (2µL/mL) em 1mL de *antifading*. Deixar atuar por no mínimo 10 minutos, retirar o excesso com papel filtro e observar em microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

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

Sonda: foi utilizada sonda HM123 contendo segmento do gene ribossômico do anfíbio anuro *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival *et al.*, 1979).

Marcação da sonda: a metodologia utilizada tem por base a técnica, com modificações, descrita por Martins e Galetti (1999) e por Wasko e Galetti (2000). A sonda é marcada com biotina 11-dATP, através de *nick translation*, utilizando-se o kit BionickTM Labeling System (GIBCO.BRL). Para a confecção de 4 lâminas, é preparado um *mix* contendo 18µL de água estéril, 3µL de dNTP 10x, 3µL do *mix* de enzimas e 3µL da sonda (os três primeiros constam no kit). O material é centrifugado por cerca de 5 segundos e incubado em Termociclador a 16°C por 1 hora. Adiciona-se 3µL de *Stop Buffer*. Em seguida, são adicionados 3µL de acetato de sódio 3M e 60µL de etanol absoluto gelado. Misturar invertendo o tubo. O material é mantido em *freezer* a -20°C por, no mínimo 2 horas. Decorrido esse tempo, o material é centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado cuidadosamente e o tubo colocado em estufa a 37°C para secagem. Depois, a sonda é ressuspensa em cerca de 80µL de água Milli Q. Para a preparação das lâminas contendo material cromossômico, cada uma delas é tratada com 100µL de solução de RNase 40µg/mL (0,4µL de RNase 10mg/mL e 99,6 µL de 2xSSC – para cada lâmina) durante 1 hora e 30 minutos, em câmara úmida com 2xSSC, a 37°C. As lâminas são lavadas por duas vezes em série de 2xSSC durante 10 minutos cada. Depois são, então, desidratadas em série alcoólica (etanol gelado 70%, 85% e 100%) durante 10 minutos cada, e desnaturadas em formamida 70% diluída em

2xSSC durante 5 minutos a 70°C. As lâminas são novamente desidratadas em série alcoólica (etanol gelado 70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada banho. Após o tratamento, as lâminas são secas à temperatura ambiente.

Hibridação: são colocados em um *epENDORF* 12µL da sonda, 6µL de 20xSSC (concentração final de 2xSSC), 12µL de sulfato de dextrano (concentração final de 10%) e 30µL de formamida pura (concentração final de 50%). Essa quantidade é suficiente para uma lâmina. A solução de hibridação é desnaturada em banho fervente ou no Termociclador a 90 ou 95°C durante 10 minutos e, deste, vai direto para um recipiente com gelo. É colocado 50µL da solução de hibridação sobre uma lamínula, a qual deve ser invertida sobre a lâmina. As lâminas são mantidas, com material voltado para baixo, em câmara úmida com 2xSSC, a 37°C entre 12 a 14 horas. Ao final desse tempo, são lavadas em 2xSSC à temperatura ambiente para a retirada das lamínulas. As lâminas são incubadas em solução de formamida 50% diluída em 2xSSC por 15 minutos a 37°C e, em seguida, lavadas em 2xSSC por 15 minutos a 37°C, depois em 2xSSC por 15 minutos à temperatura ambiente e, ao fim, em 4xSSC por 15 minutos à temperatura ambiente.

Deteção: é colocado sobre cada lâmina 70µL de FITC 0,07% (Fluoresceína Isotil Cianato – Avidina conjugada) diluída em tampão C - bicarbonato de sódio 0,1M pH 8,5 e NaCl 0,15M - (usar 0,1µL da solução estoque de FITC 250µg/100µL e 70µL de tampão C). O material é coberto com uma lamínula e permanece por cerca de 1 hora em câmara úmida com 2xSSC a 37°C. As lâminas são lavadas no mínimo 3 vezes em tampão Bloqueio (NaHCO_3 1,26%, citrato de sódio 0,018%, triton 0,038% e leite desnatado 1% - pH entre 8,0 e 10,8), recém preparado, a 42°C durante 5 minutos, com agitação. Sem que as lâminas sequem, é colocado sobre cada uma, 80µL de anticorpo anti-avidina biotina conjugada (2µL de anti-avidina estoque e 78µL de tampão Bloqueio). Cobrir novamente com lamínula e deixar em câmara úmida com 2xSSC a 37°C durante 30 minutos. Proceda-se mais três lavagens em tampão Bloqueio a 42°C por 5 minutos com agitação. O FITC deve ser aplicado novamente bem como as seguidas lavagens com tampão Bloqueio. Em seqüência, as lâminas são lavadas, por pelo menos duas vezes, em 4xSSC e triton 2% à temperatura ambiente durante 3 minutos cada lavagem, com agitação. Lavar por pelo menos duas vezes em 4xSSC e triton 0,2% à temperatura ambiente durante 3 minutos cada lavagem, com agitação. As

lâminas são secas ao ar.

Montagem: é aplicado iodeto de propídeo nas lâminas para fazer a contra-coloração do material - 25µL de *antifading* (Vectashield Antifade-Vector) e 1µL da solução de iodeto de propídeo a 50µg/mL para cada lâmina.

Observação: as preparações de hibridação *in situ* fluorescente são observadas em fotomicroscópio de fluorescência, com filtro 450-490nm.

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.

A montagem dos cariogramas e a classificação morfológica dos pares foram baseadas em inspeção visual. Os cromossomos foram emparelhados de acordo com a morfologia e em ordem decrescente de tamanho. Para a nomenclatura morfológica, seguiu-se o estabelecido por Green e Sessions (1991), isto é, cromossomos metacêntricos e submetacêntricos para elementos com dois braços, e subtelocêntricos e telocêntricos para aqueles com apenas um braço cromossômico.

VII. Resultados

Grupo de *Bokermannohyla circumdata*

Descrição dos cariótipos

Os exemplares pertencentes às três espécies do grupo de *Bokermannohyla circumdata*, *B. circumdata*, *B. hylax* e *Bokermannohyla* sp., têm cariótipo com $2n=24$ e $NF=48$ (Fig. 5A, 5B e 5C). Os cinco primeiros pares são grandes, o sexto é de tamanho médio e os demais seis pares são pequenos. Os cromossomos do par 1 são do tipo metacêntrico, cujo tamanho é maior do que o dos pares 2, 3, 4 e 5, os quais são submetacêntricos, com variação gradativa de tamanho. Os cromossomos dos pares 7 ao 12 são do tipo metacêntrico ou submetacêntrico.

Não foi notada diferença nos cariótipos, sejam esses de exemplares machos ou fêmeas.

Análise da Ag-RON

A técnica de impregnação pela prata revelou, com o uso de coloração sequencial, apenas um par de Ag-RON nas três espécies do grupo (Fig. 5A, 5B e 5C). A marcação foi detectada na região terminal dos braços longos do par 11 em todos os exemplares analisados. De *B. circumdata*, foi analisado material citológico proveniente de um macho de Camanducaia, MG e uma fêmea de Campos do Jordão, SP, enquanto das demais espécies, todos os exemplares amostrados foram submetidos à técnica de Ag-RON. Foi observado ligeiro heteromorfismo no tamanho da Ag-RON em relação aos homólogos marcadores em *Bokermannohyla* sp.

Análise do bandamento C

Bandamento C foi obtido em quatro exemplares de *B. circumdata*, sendo dois machos e duas fêmeas de Camanducaia, MG (Fig. 6A). Regiões heterocromáticas foram marcadas nos centrômeros dos cromossomos dos pares 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, enquanto nos pares 4, 11 e 12, não foi visualizada banda C; contudo, a ausência dessas marcações nem sempre se confirmou em todas as metáfases analisadas. Nos pares 1 e 2, a heterocromatina se estende também pela região pericentromérica dos cromossomos. Foi observada leve marcação na região terminal dos braços longos dos cromossomos do par 10.

Em *B. hylax*, o bandamento não forneceu resultados satisfatórios em nenhum dos dois exemplares, não sendo possível diferenciar banda C nas metáfases analisadas. Em *Bokermannohyla* sp., apesar da técnica ter sido aplicada em diversas lâminas do único exemplar, os resultados não foram conclusivos, mas em algumas metáfases, pôde-se observar blocos heterocromáticos localizados, predominantemente, na região centromérica dos cromossomos e, em alguns pares, a marcação se estende também pela região pericentromérica (Fig. 6B). Em um dos homólogos do par 11, foi observada banda C na região terminal dos braços longos, coincidentes com a localização da Ag-RON. Devido à sobreposição, o outro elemento do par não pôde ser visualizado na referida figura.

Análise meiótica

As células provenientes de testículo de três machos de *B. circumdata* de Camanducaia, MG, coradas convencionalmente mostraram 12 bivalentes em diplóteno e metáfase I e 12 cromossomos em metáfase II (Fig. 7A e 7B).

Análise com fluorocromos base-específicos

A técnica de coloração pelos fluorocromos foi aplicada em *B. circumdata* e em *Bokermannohyla* sp.

Em *B. circumdata*, foi observada marcação brilhante pelo DAPI na região terminal de um par metacêntrico pequeno, provavelmente o 10^o (Fig. 8A). Região DAPI-negativa aparece na região terminal dos braços longos de outro par submetacêntrico pequeno, provavelmente o 11^o. Com o uso do CMA₃, marcações fluorescentes foram detectadas nos centrômeros de todos os cromossomos e na região terminal dos braços longos de um pequeno par (Fig. 8B), o mesmo que se mostrou

negativo pelo DAPI.

A coloração pelo DAPI não revelou marcação brilhante em nenhum dos cromossomos de *Bokermannohyla* sp. Com CMA₃, marcações fluorescentes foram observadas nos centrômeros de todos os cromossomos e na região terminal dos braços longos de um pequeno par, coincidente com o sítio da Ag-RON, porém, nessa espécie não foi possível documentar os resultados.

Análise das bandas de replicação

A técnica para diferenciação das bandas de replicação (FPG) foi aplicada em vários exemplares de *B. circumdata*, nos quais havia sido previamente injetada solução de BrdU/FudR, mas não foram obtidos resultados satisfatórios. No entanto, é possível observar em algumas metáfases, vestígios da incorporação do BrdU (Fig. 9).

Análise da hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

O uso da sonda de DNAr em um exemplar macho de *B. circumdata* confirmou o número e a posição da RON na região terminal dos braços longos do par 11 (Fig. 10), com localização ligeiramente acima da região telomérica.

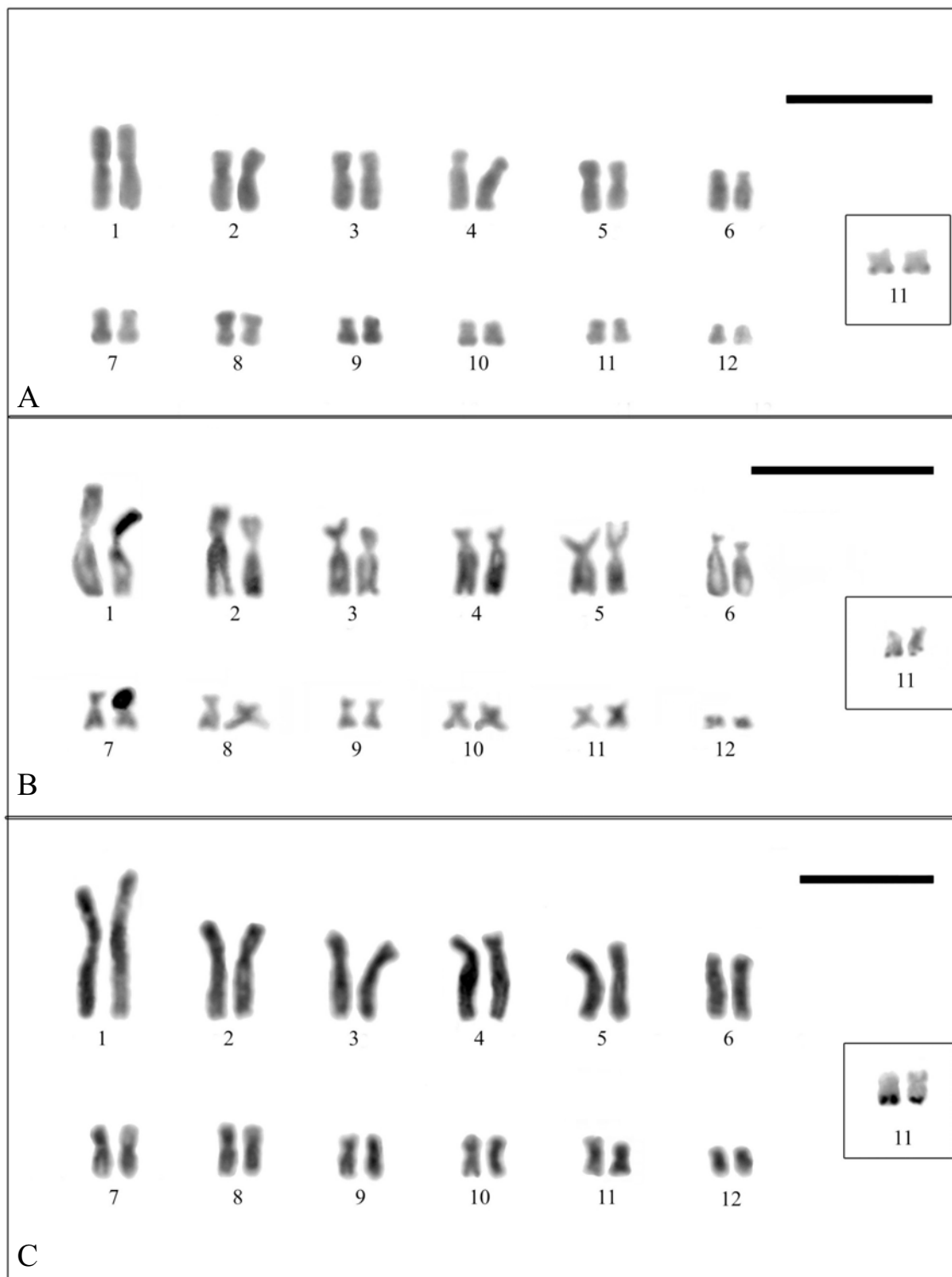


Fig. 5. Cariótipo com coloração convencional em espécies de *Bokermannohyla* do grupo de *B. circumdata*, 2n=24; em destaque, par 11 de outra metáfase mostrando Ag-RON. A. Macho de *B. circumdata*. B. Jovem de *B. hylax*. C. Fêmea de *Bokermannohyla* sp. Barra=10µm

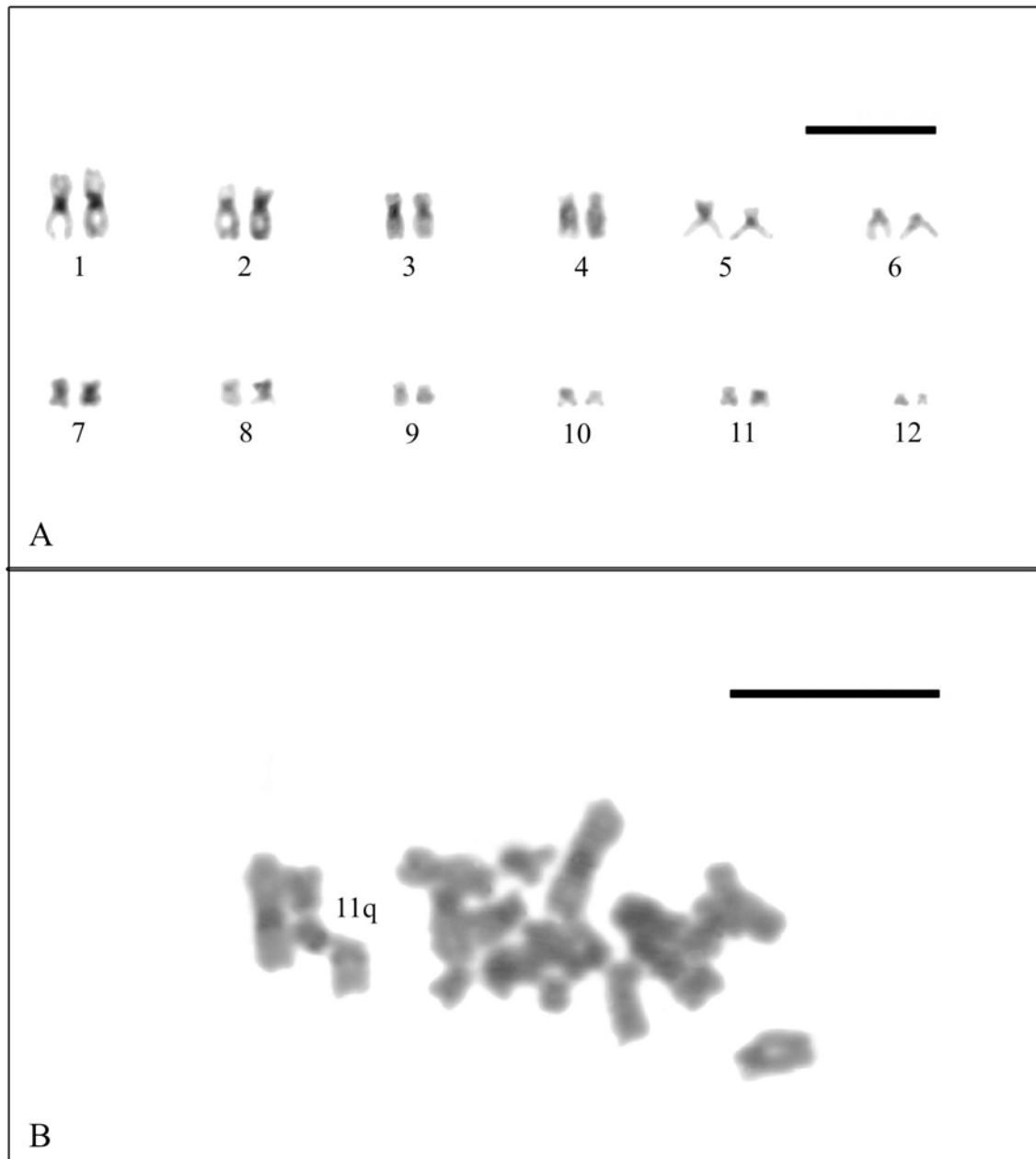


Fig. 6. Padrão de banda C em duas espécies do grupo de *B. circumdata*. **A.** Cariótipo de macho de *B. circumdata*. **B.** Metáfase total de fêmea de *Bokermannohyla* sp. Barra=10µm

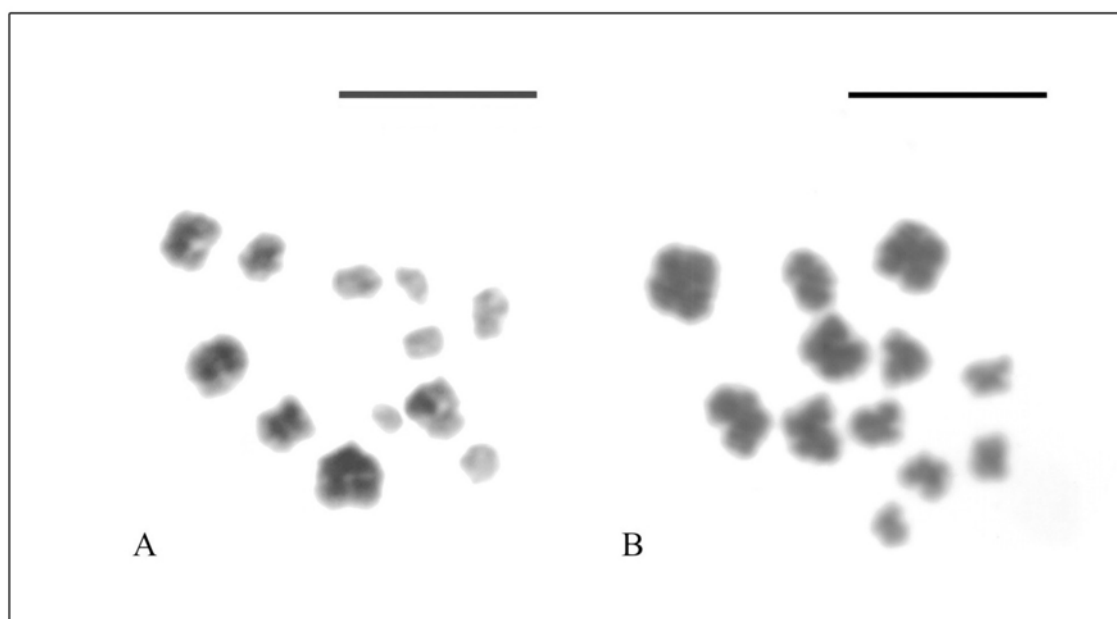


Fig. 7. Células meióticas em macho de *B. circumdata* com coloração convencional. **A.** Metáfase I com 12 bivalentes. **B.** Metáfase II com 12 cromossomos. Barra=10µm

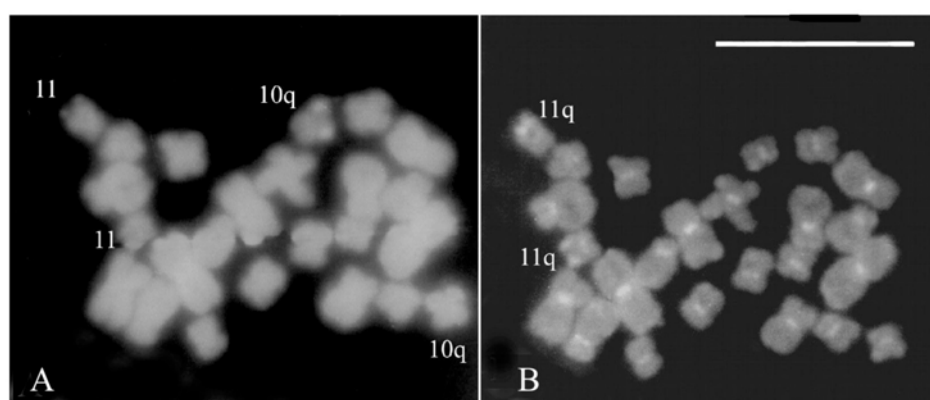


Fig. 8. Coloração com fluorocromos base-específicos em *B. circumdata*. **A.** DAPI, mostrando marcação brilhante no par 10. **B.** CMA₃, mostrando cromossomos 11 com o sítio da RON fluorescente e marcações centroméricas brilhantes em todos os cromossomos. Barra=10µm

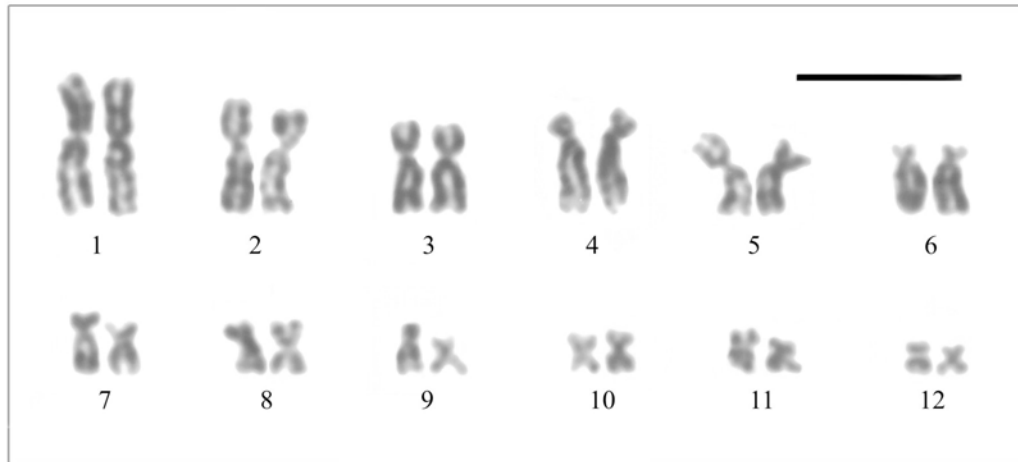


Fig. 9. Cariotipo de macho de *B. circumdata* após coloração FPG, mostrando sinais de diferenciação em alguns cromossomos. Barra=10µm

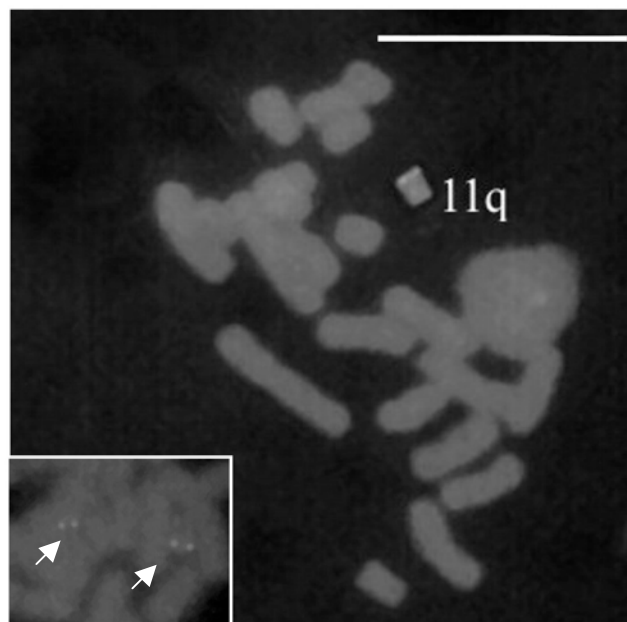


Fig. 10. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em *B. circumdata*. Notar marcação em um dos homólogos do par 11; o outro homólogo não pôde ser visualizado. Em destaque, metáfase parcial, mostrando marcação em ambos os homólogos do par 11, seta. Barra=10µm

Grupo de *Bokermannohyla pseudopseudis*

Descrição dos cariótipos

Os exemplares pertencentes às três espécies do grupo de *Bokermannohyla pseudopseudis*, *B. alvarengai*, *B. ibitiguara* e *B. saxicola*, têm cariótipo com $2n=24$ e $NF=48$ (Fig. 11A, 11B e 11C). Os cinco primeiros pares são grandes, o sexto é de tamanho médio e os demais seis pares são pequenos. Os cromossomos do par 1 são do tipo metacêntrico cujo tamanho é maior do que o dos pares 2, 3, 4 e 5, os quais são submetacêntricos, com variação gradativa de tamanho. Os cromossomos dos pares 7 ao 12 são do tipo metacêntrico ou submetacêntrico.

Constrição secundária foi observada em *B. alvarengai*, localizada na região terminal dos braços curtos dos homólogos do par 4 (Fig. 11A).

Não foi notada diferença nos cariótipos, seja de exemplar macho ou de fêmea.

Análise da Ag-RON

A técnica de impregnação pela prata revelou apenas um par de Ag-RON nos exemplares das três espécies (Fig. 11A, 11B e 11C). Com o uso de coloração sequencial convencional-Ag-RON, observou-se que em *B. alvarengai* a marcação está localizada na região terminal dos braços curtos dos cromossomos 4, coincidente com a constrição secundária; em *B. ibitiguara*, a Ag-RON foi observada na região terminal dos braços longos do par 1, enquanto em *B. saxicola*, a marcação está na região terminal dos braços longos do 11. Foi observado heteromorfismo no tamanho da Ag-RON em relação aos homólogos marcadores em *B. saxicola*.

Em algumas das metáfases de *B. alvarengai*, a região centromérica do par portador da RON e de alguns outros pares aparecia corada pelo nitrato de prata. O mesmo foi observado em metáfases de *B. saxicola*, porém, as marcações estavam presentes na região centromérica de todos os cromossomos (Fig. 13).

Análise do bandamento C

Foi observado padrão centromérico de banda C em todos os cromossomos de *B. alvarengai*, *B. ibitiguara* e *B. saxicola* (Fig. 12A, 12B e 12C). Em *B. alvarengai*, foi observado um grande bloco pericentromérico nos braços curtos dos cromossomos do par 3 e marcações intersticiais proeminentes nos braços curtos do 8 e nos longos do par 7. *Bokermannohyla ibitiguara* tem leve marcação de banda C na região terminal dos braços longos do par 1, coincidente com o sítio da Ag-RON. Em *B. saxicola* bandas

pericentroméricas aparecem nos braços longos e curtos do par 1 e nos braços curtos do 3, par que tem um bloco maior e mais evidente. Nessa espécie, marcação intersticial foi observada nos braços longos de ambos os homólogos do par 7 e nos braços curtos de apenas um dos elementos do par 1.

Análise meiótica

As células provenientes de testículo dos machos de *B. ibitiguara* (Fig. 14A e 14B) e de um dos machos de *B. saxicola* (Fig. 14C e 14D), coradas convencionalmente, mostraram 12 bivalentes em diplóteno e metáfase I e 12 cromossomos em metáfase II.

Análise com fluorocromos base-específicos

A técnica de coloração pelos fluorocromos base-específicos não forneceu resultados satisfatórios nos exemplares de *B. alvarengai*. Em *B. ibitiguara* e *B. saxicola*, a coloração pelo DAPI não revelou marcação brilhante em nenhum dos cromossomos (Fig. 15A), enquanto com o CMA₃, marcações fluorescentes foram observadas nos centrômeros de todos os cromossomos e na região terminal dos braços longos do maior par de *B. ibitiguara* e na região terminal dos braços longos de um par pequeno em *B. saxicola*, em ambas as espécies coincidentes com o sítio da Ag-RON (Fig. 15B). Em *B. ibitiguara* não foi possível documentar os resultados.

Análise das bandas de replicação

A técnica para diferenciação das bandas de replicação (FPG) foi aplicada em apenas um dos exemplares de *B. alvarengai*, no qual havia sido previamente injetada solução de BrdU/FudR. Embora o resultado não esteja totalmente satisfatório, é possível observar diferenciação longitudinal na maioria dos pares (Fig. 16).

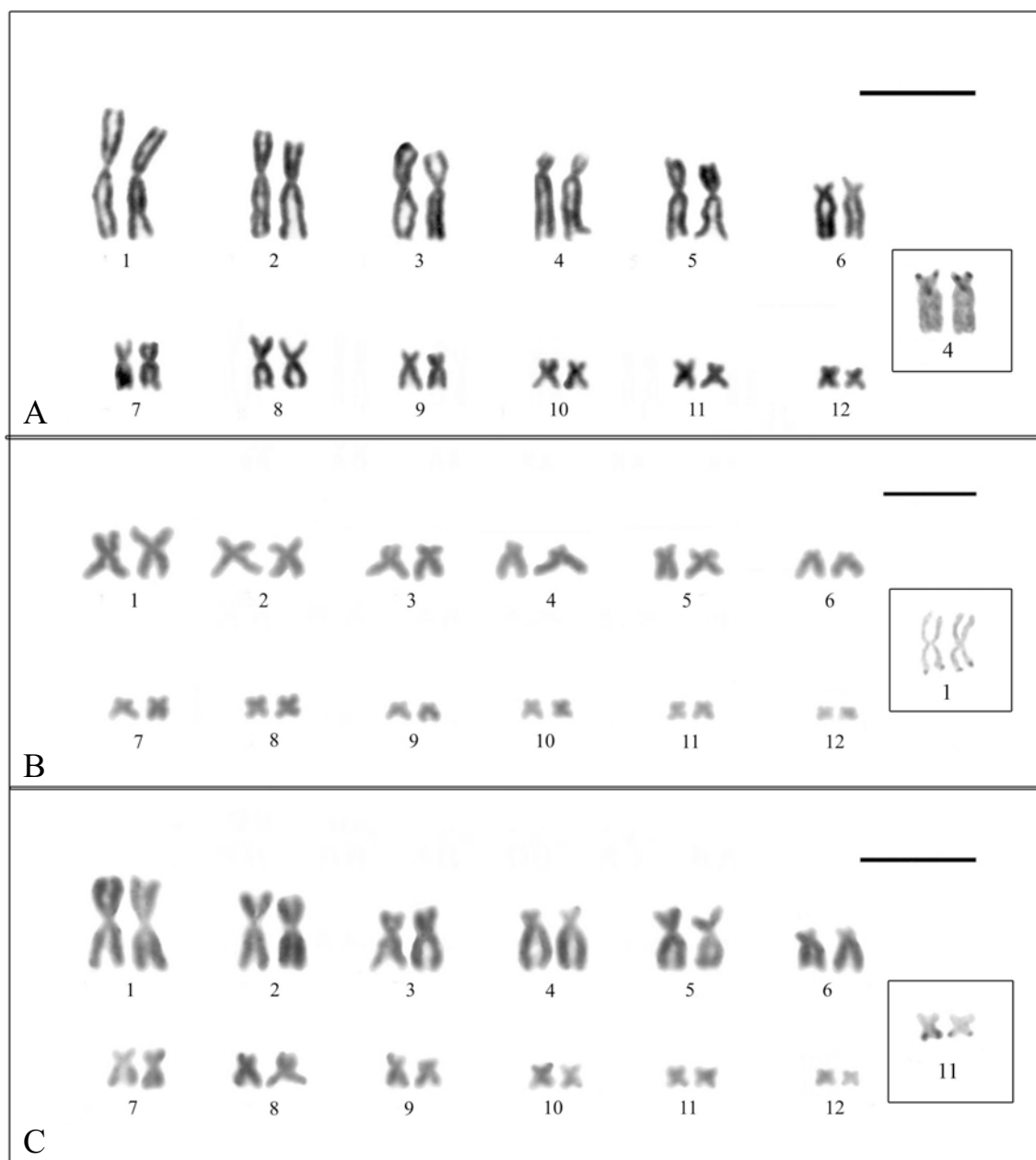


Fig. 11. Cariótipo com coloração convencional em espécies de *Bokermannohyla* do grupo de *B. pseudopseudis*, $2n=24$. **A.** Jovem de *B. alvarengai*; em destaque, par 4 de outra metáfase mostrando a Ag-RON. **B.** Macho de *B. ibitiguara*; em destaque, par 1 de outra metáfase mostrando a Ag-RON. **C.** Macho de *B. saxicola*; em destaque, par 11 da mesma metáfase mostrando a Ag-RON. Barra=10 μ m

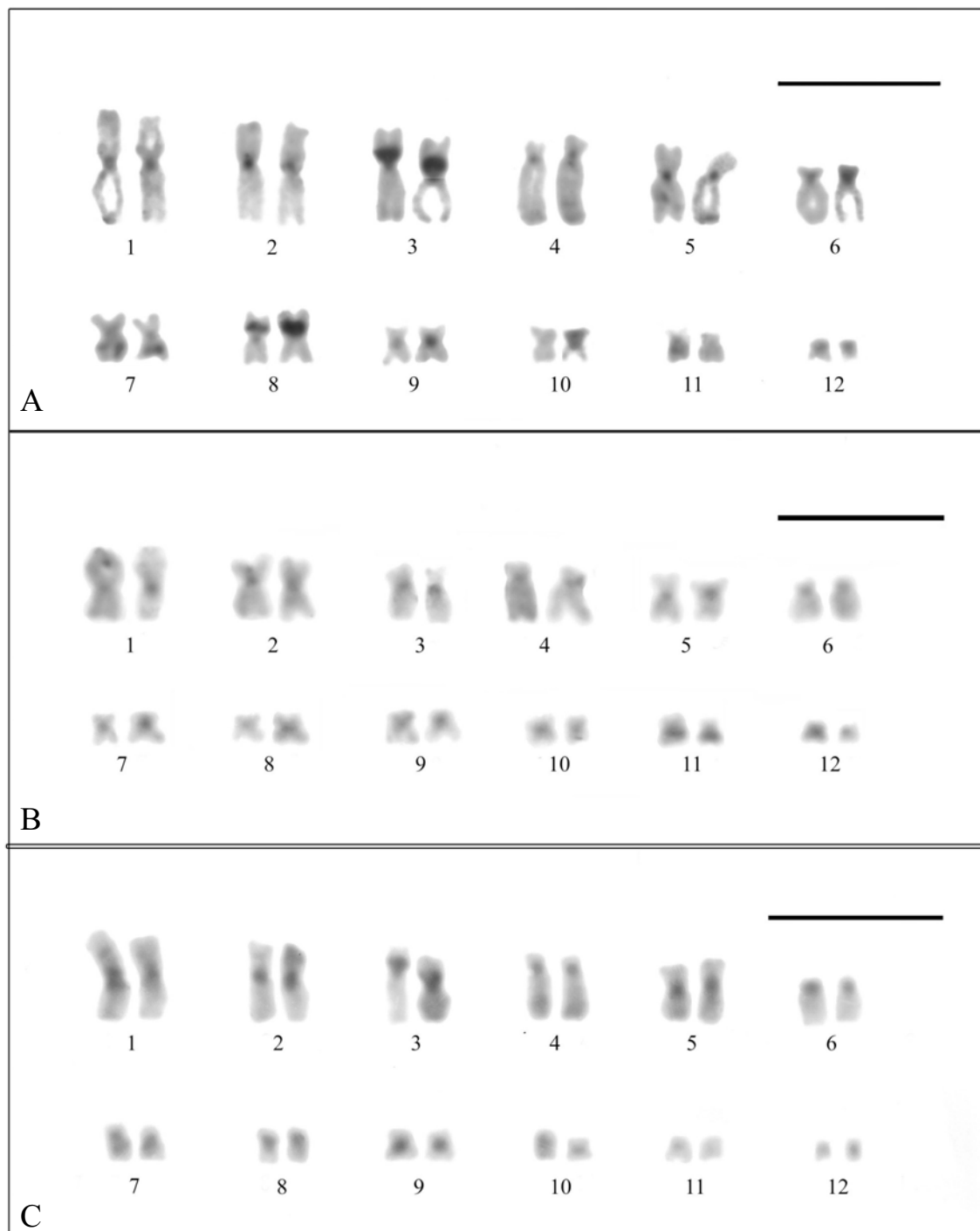


Fig. 12. Padrão de banda C em três espécies do grupo de *B. pseudopseudis*. **A.** Cariótipo de jovem de *B. alvarengai*. **B.** Cariótipo de macho de *B. ibitiguara*. **C.** Cariótipo de macho de *B. saxicola*. Barra=10µm

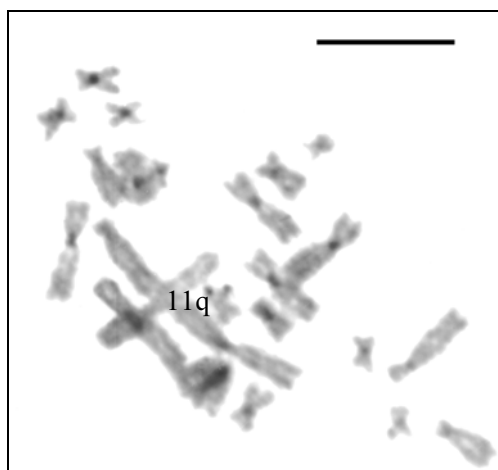


Fig. 13. Metáfase de macho de *B. saxicola*, $2n=24$, após impregnação pelo nitrato prata. Notar Ag-RON em um dos homólogos do par 11 e marcações Ag-positivas na região centromérica dos cromossomos. Barra=10 μ m

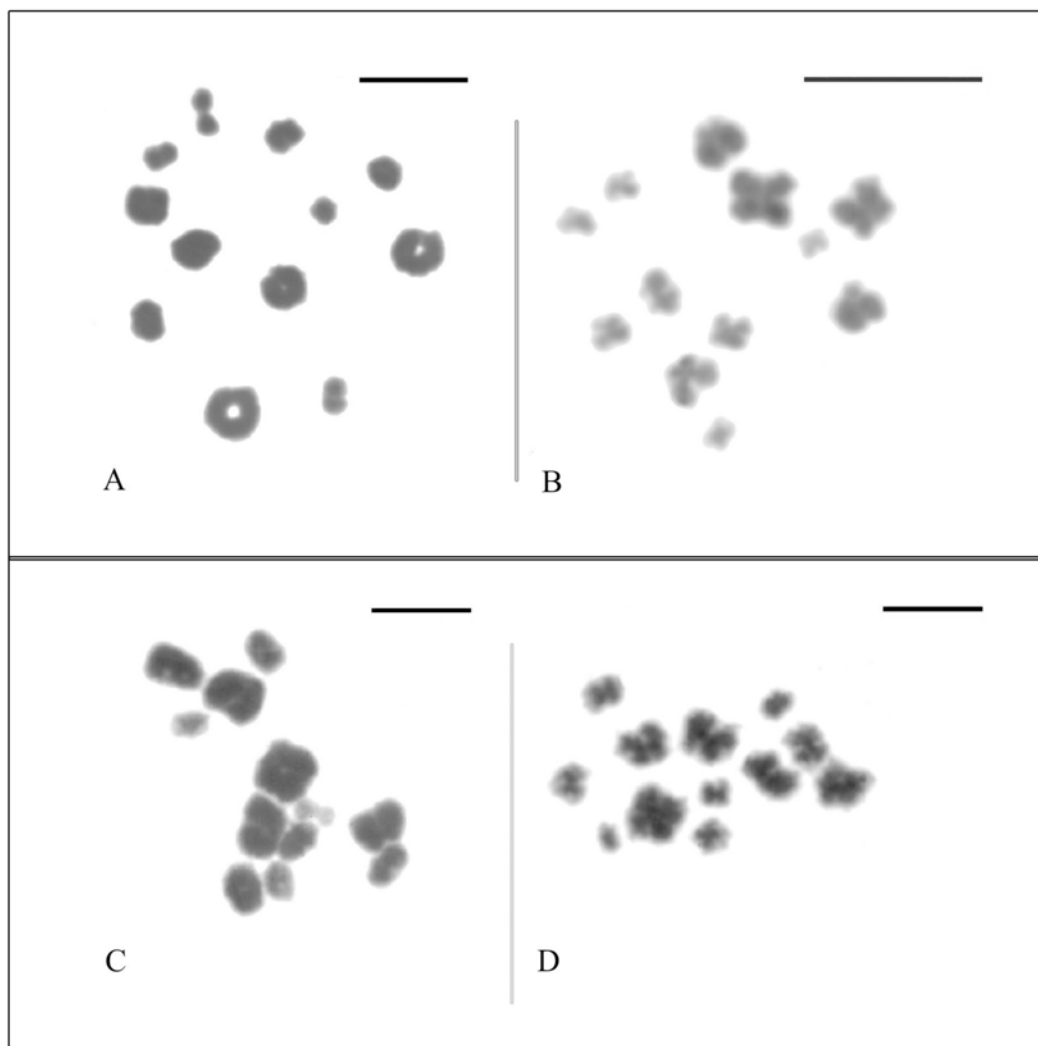


Fig. 14. Células meióticas em macho de *B. ibitiguara* (A e B) e *B. saxicola* (C e D) com coloração convencional. **A e C.** Metáfase I com 12 bivalentes; **B e D.** Metáfase II com 12 cromossomos. Barra=10 μ m

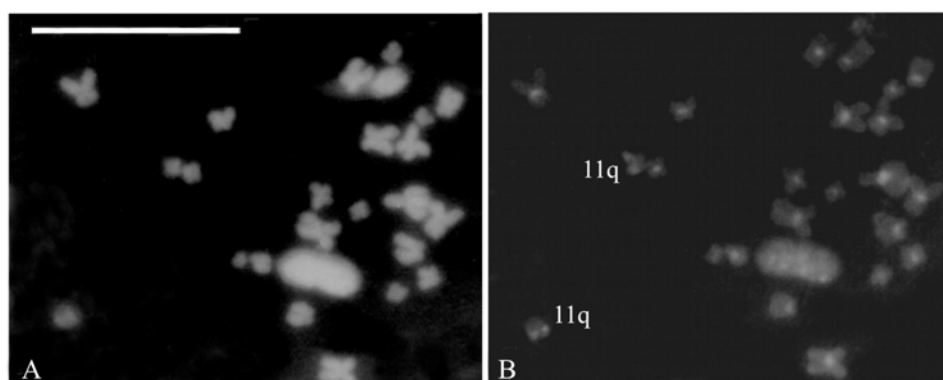


Fig. 15. Coloração com fluorocromos base-específicos em *B. saxicola*. **A.** DAPI. **B.** CMA₃, mostrando cromossomos 11 com o sítio da RON fluorescente e marcações centroméricas brilhantes em todos os cromossomos. Barra=10µm

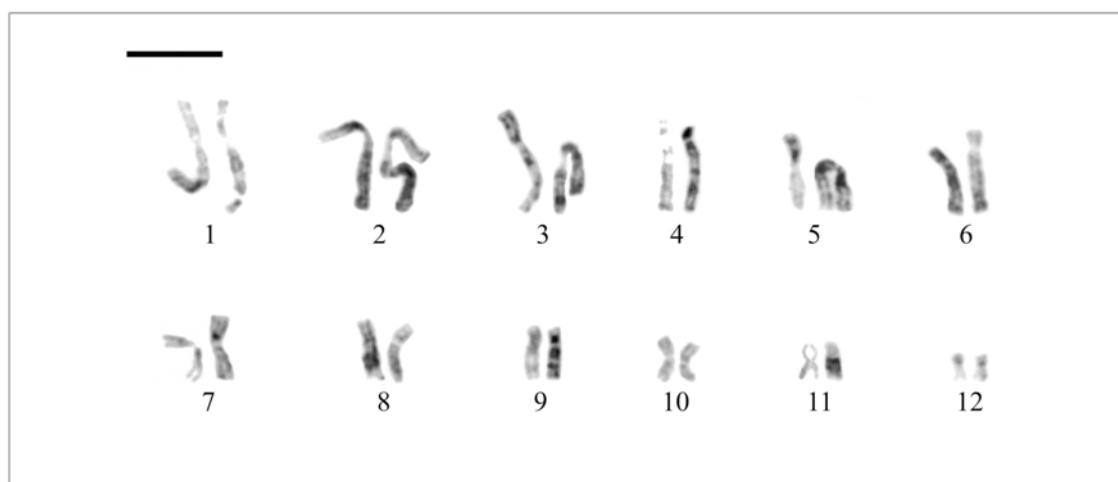


Fig. 16. Cariótipo de jovem de *B. alvarengai* após coloração FPG. Barra=10µm

VIII. Discussão

Considerações sobre o cariótipo convencional das espécies de *Bokermannohyla* e de outros Hyalinae

Bokermannohyla é um novo gênero criado para alocar todas as espécies anteriormente pertencentes aos grupos de *Hyla circumdata*, *H. martinsi*, *H. pseudopseudis* e *H. claresignata* (Faivovich *et al.*, 2005) e, por essa razão, é ainda passível de modificações, na medida que novas espécies sejam reconhecidas no gênero. No presente trabalho, uma das espécies não foi ainda descrita, mas *Bokermannohyla* sp. foi reconhecida, tentativamente, como sendo do grupo de *B. circumdata* (Faivovich, J., comunicação pessoal).

As seis espécies de *Bokermannohyla* do presente trabalho compartilham o mesmo cariótipo com $2n=24$ cromossomos. Todos são metacêntricos ou submetacêntricos, mas a identificação é inequívoca para os pares de 1 a 6, que são os maiores em tamanho. Apesar dos cromossomos 6 mostrarem braços curtos muito pequenos em algumas metáfases, foi considerado do tipo submetacêntrico, de modo que o NF é igual a 48 em todas as espécies. Para os demais cromossomos, a definição da morfologia de cada par é dificultada, mas os pares 7, 9 e 11 tendem a ser submetacêntricos, enquanto os pares 10 e 12, metacêntricos. É importante enfatizar que os cromossomos do par 3 de *B. alvarengai* e *B. saxicola*, apesar de submetacêntricos, mostram braços curtos relativamente maiores do que o observado das demais espécies. Isso se deve ao fato de, nas referidas espécies, haver um grande bloco de heterocromatina nos braços curtos dos cromossomos 3, como foi visualizado após o

bandamento C.

Quanto ao tamanho, nota-se que o par 1 de todas as espécies é claramente maior do que os demais, que decrescem progressivamente de tamanho do segundo ao sexto, sem uma demarcação nítida entre grandes e médios. A partir do sétimo, todos os pares são pequenos, praticamente sem diferença de tamanho entre seus cromossomos.

De todas as espécies analisadas, apenas de *B. circumdata* havia amostra de localidades diferentes. Para essa espécie, não há qualquer indicação da ocorrência de diferenças cariológicas geográficas intraespecíficas, já que todos os exemplares têm cariótipo idêntico com coloração convencional e, em certa extensão, em relação àquele analisado com técnicas de coloração diferencial. Ainda que o número de exemplares cariotipados seja relativamente pequeno, restrito a apenas um dos sexos no caso das cinco outras espécies, os dados citogenéticos ora apresentados são altamente relevantes, pois são inéditos na literatura.

O gênero *Bokermannohyla* é pouco estudado sob o ponto de vista citogenético, existindo informações para apenas três outras espécies, *B. izecksohni* de Botucatu, SP (Foresti, 1972), *B. luctuosa* de Jundiaí, SP (Baldissera Jr *et al.*, 1993) e *B. hylax* coletada na Serra do Itapety, SP (Campos *et al.*, 2004). Para os exemplares dessa última espécie, os dados se resumem a uma descrição cariotípica, já que se trata de um relato apresentado em reunião científica.

O conjunto cromossômico de *B. izecksohni* e *B. luctuosa* não difere do observado no presente trabalho, ainda que, no caso da segunda espécie, haja algumas diferenças de ordenamento dos pares. Em dois dos exemplares de *B. luctuosa*, com $2n=25$, foi identificado um cromossomo supernumerário.

Com base nos dados citogenéticos disponíveis para a subfamília Hyalinae, levantados por King (1990), Kuramoto (1990) e complementados na Tabela 1 – Apêndice, pode-se dizer que o número cromossômico de $2n=24$ e a constituição cariotípica, tal como observada nas espécies do gênero *Bokermannohyla*, são altamente conservados na tribo Cophomantini.

De fato, a comparação dos cariótipos conhecidos em espécies de três dos cinco gêneros de Cophomantini, *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla* e *Hypsiboas*, corrobora a grande semelhança entre eles. No gênero *Hypsiboas*, que juntamente com *Aplastodiscus* forma o grupo-irmão de *Bokermannohyla*, o número cromossômico encontrado é,

majoritariamente, de $2n=24$ e a morfologia dos pares homeólogos é muito similar, sendo impossível identificá-las individualmente pela simples observação dos cariótipos. A única espécie com número cromossômico discrepante é *H. albopunctatus* com $2n=22$ e tal diferença é atribuída a rearranjos envolvendo os menores pares do seu conjunto cromossômico, com redução de um par (Bogart, 1973; Gruber *et al.*, 2007).

Nas espécies de *Aplastodiscus* analisadas até o presente, por outro lado, ocorre uma ampla variação no número cromossômico, as quais mostraram $2n=18$, 20, 22 e 24 (Bogart, 1973; Carvalho, 2005). O cariótipo com $2n=24$ encontrado em *A. cochrae* e *A. perviridis*, no entanto, não só são praticamente idênticos entre si (Carvalho, 2005) como também nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao cariótipo das espécies de *Bokermannohyla* ora analisadas.

É importante enfatizar que os sete primeiros pares de todas as espécies de *Aplastodiscus* seguem o mesmo padrão cariotípico, indicando que, a partir de um cariótipo com $2n=24$ no ancestral comum, deve ter ocorrido diversos eventos de redução, principalmente as fusões, e que rearranjos cromossômicos tenham promovido a diferenciação desses cariótipos (Carvalho, 2005).

Em certa extensão, o número e a homogênea morfologia cromossômica observados nas espécies de *Bokermannohyla* são comuns também a gêneros pertencentes a outra tribo da subfamília Hyalinae, tal como pôde ser observado em relação ao cariótipo de três gêneros de Lophiophylini analisados por Kasahara *et al.* (2003). É imprescindível, no entanto, que, visando a compreensão da evolução cromossômica e das relações de parentesco dentro da tribo Cophomantini, sejam analisados maior número de representantes do grupo de *B. circumdata* e de *B. pseudopseudis*, assim como dos dois outros grupos de *Bokermannohyla*; adicionalmente, nos dois demais gêneros de Cophomantini, *Hyloscirtus* e *Myersiohyla*, dos quais nada se conhece acerca de sua constituição cariotípica, é fundamental a análise citogenética dos mesmos.

As espécies de *Bokermannohyla* cariotipadas até o presente não evidenciaram par heteromórfico sugestivo de par sexual morfologicamente diferenciado embora, em várias delas, não tenha sido obtido material citológico de ambos os sexos; além disso, há casos em que todos os exemplares eram jovens. As análises meióticas, tampouco, indicaram a ocorrência de cromossomos sexuais diferenciados em machos de *B.*

circumdata, *B. ibitiguara*, *B. luctuosa* e *B. saxicola*, as quais apresentaram todos os 12 bivalentes com configuração em forma de anel indicativo de quiasmas terminais.

A ausência de par sexual heteromórfico no gênero *Bokermannohyla* é o que acontece com a maioria dos anuros, incluindo os da família Hylidae, nos quais os cromossomos sexuais, em geral, não são diferenciados morfologicamente (Schmid *et al.*, 1991). Apesar de existirem poucos relatos, isso não implica necessariamente na ausência de par sexual geneticamente diferenciado. Na família Hylidae, a ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos é pequena frente ao número de espécies descritas, porém, existem relatos de mecanismos do tipo ZZ:ZW em *Hyla squirella* e *Pseudis tocantins*, XX:XY em *Hyla japonica* e *Hyla femoralis* (King, 1990; Kuramoto, 1990; Anderson, 1991; Wiley, 2003; Schmid e Steinlein, 2003; Busin *et al.*, no prelo).

O emprego da coloração diferencial para a caracterização cariotípica das espécies de *Bokermannohyla*

Como ocorre na maioria dos anuros (Schmid *et al.*, 1990), as espécies do gênero *Bokermannohyla* apresentaram um único par de Ag-RON. É interessante notar que no grupo de *B. circumdata*, que inclui as espécies *B. circumdata*, *B. hylax* e *Bokermannohyla* sp. do presente trabalho, bem como, *B. luctuosa*, anteriormente analisada, a localização da Ag-RON é altamente conservada. Seria interessante estender análises citogenéticas a outras espécies do grupo de *B. circumdata* para se confirmar ou não a localização invariável da Ag-RON nos braços longos dos cromossomos 11.

Nas demais três espécies, todas do grupo de *B. pseudopseudis*, a localização da Ag-RON é variável e espécie-específica, estando localizadas em cromossomos distintos, isto é, nos homólogos do par 1, 4 e 11. Uma possível explicação para tais diferenças é a ocorrência de rearranjos cromossômicos nos pares portadores da Ag-RON (Schmid *et al.*, 1990) durante a diferenciação cariológica das espécies. Nesse caso, é também indicada a análise das demais espécies do grupo, isto é, *B. pseudopseudis*, *B. itapoty* e *B. oxente*, para verificar se a Ag-RON é ou não um marcador característico de cada espécie. Embora *B. saxicola* esteja alocada no grupo de *B. pseudopseudis*, sua relação com as demais espécies do grupo é ainda incerta, havendo indícios de que esteja filogeneticamente mais próxima dos representantes do grupo de *B. circumdata* (J.

Faivovich, comunicação pessoal). A localização da Ag-RON de *B. saxicola* também nos braços longos do par 11 como nas espécies do grupo de *B. circumdata* é, sem dúvida, uma informação importante a ser considerada, quando da reavaliação de sua posição taxonômica.

Embora Schmid *et al.* (1990) tenham afirmado que espécies do mesmo grupo ou pertencentes a grupos relacionados têm quase sempre a Ag-RON localizada no mesmo par cromossômico e até em sítios coincidentes, podem ocorrer muitas variações na localização e na posição desse marcador, mesmo em espécies muito próximas. Tanto em uma situação, como em outra, fica evidente a relevância da análise da Ag-RON para a citotaxonomia e a cariosistemática.

A maior parte das espécies cariotipadas do gênero *Hypsiboas* não apresenta dados de Ag-RON e raramente existe menção à constrição secundária, marcador esse que pode ser indicativo da localização da RON. Nas que foram analisadas com o uso da impregnação pelo nitrato de prata, não há um padrão uniforme na localização da Ag-RON, mas é possível notar que, entre as espécies cariotipadas até então, a marcação está majoritariamente presente em um dos três últimos pares, ou seja, o 10, o 11 ou o 12 (Baldissera *et al.*, 1993; Gruber, 2002; Ananias *et al.*, 2004; Raber *et al.*, 2004; Carvalho, 2005; Gruber *et al.*, 2007). Os únicos casos discrepantes são *H. semiguttatus*, *H. albomarginatus*, e *H. albopunctatus*, com a Ag-RON nos pares 1, 2 e 8, respectivamente. Para esse último caso, cuja espécie tem cariótipo com $2n=22$ ou $22+B$, o par 8 foi considerado como sendo homeólogo ao par 11, o que foi confirmado pelo uso de técnicas mais refinadas de bandamento (Gruber *et al.*, 2007).

Em *Aplastodiscus*, não há uniformidade aparente no padrão da Ag-RON. Na maior parte das espécies a marcação ocorre nos menores pares do cariótipo, entre os de número 9 a 12, tendo Carvalho (2005) sugerido que os cromossomos organizadores nucleolares são homeólogos nas espécies de *Aplastodiscus* e também em relação aos de algumas espécies de *Hypsiboas*.

A localização da Ag-RON predominantemente nos menores pares do cariótipo de *Aplastodiscus*, *Hypsiboas* e *Bokermannohyla* e a dificuldade de se estabelecer a exata posição desses pares permite sugerir que nesses três gêneros os cromossomos portadores dos organizadores de nucléolo são homeólogos. Por sua vez, em espécies de outras tribos da subfamília Hyliinae com dados de Ag-RON (Wiley, 1982; King *et al.*,

1990; Anderson, 1991; Kasahara *et al.*, 2003), a exemplo do que ocorre na tribo Cophomantini, a Ag-RON situada no par 11 é altamente freqüente.

O que chama atenção no presente trabalho é que as marcações de Ag-RON na maioria das espécies são pequenas, do tipo puntiforme, exceto em *Bokermannohyla* sp., na qual parecem ser de tamanho maior. Além disso, nessa espécie foi notada uma acentuada diferença no tamanho da Ag-RON na maioria das metáfases. No caso de *B. saxicola*, que tem marcação puntiforme, supõe-se que o heteromorfismo é de tal ordem que, em algumas metáfases, a Ag-RON em um dos homólogos não é sequer visualizada.

Heteromorfismo de Ag-RON é um relato freqüente em anuros (Schmid *et al.*, 1990), tendo sido descrito também em *B. luctuosa* (Baldissera Jr *et al.*, 1993). Diferenças no tamanho da Ag-RON podem ser explicadas pela ocorrência de duplicações ou deleções das seqüências de DNAr, como resultado de permuta desigual em caso de emparelhamento meiótico não-homólogo ou trocas desiguais entre cromátides-irmãs, não estando descartados outros mecanismos como as amplificações gênicas, fenômeno comum às regiões de DNA ribossômico (Schmid *et al.*, 1990). Sobre a questão de heteromorfismo, Schmid (1982) constatou que esse ocorria no cariótipo de 67% dos 260 exemplares de anuros pertencentes a 23 gêneros, que mostravam uma das Ag-RON duplicada ou triplicada; o fato intrigante é que em nenhum dos indivíduos analisados, Ag-RON com duplicação ou triplicação ocorriam em combinação homomórfica, como se tal condição fosse aparentemente inviável nas populações silvestres dos animais (Schmid *et al.*, 1990).

O emprego da técnica de FISH com sondas de DNAr em casos de heteromorfismos e de marcações puntiformes, é interessante para averiguar se existe uma diminuição no número de unidades de transcrição ou uma atividade gênica reduzida. Diferença de tamanho de Ag-RON tem sido muito discutida, na medida em que o nitrato de prata não cora as seqüências de DNAr, mas as proteínas não-histônicas associadas às moléculas recém-transcritas de RNAr. Em muitos dos casos, é inquestionável uma relação entre número de unidades de transcrição e tamanho da Ag-RON. Esse parece ser o caso observado em *B. circumdata*, na qual a técnica de FISH em um dos exemplares revelou que o sinal de hibridação é também puntiforme; a referida técnica mostrou, além disso, a localização precisa da RON. Em outros exemplos, é evidente que uma determinada RON mostra uma atividade transcricional

mais intensa do que aquela situada no cromossomo homólogo, ambas apresentando sinais de hibridação equivalentes (Amaro-Ghilardi *et al.*, no prelo).

Em nosso material, marcação de Ag-RON no mesmo local de constrição secundária, foi observada somente em *B. alvarengai*. Nas demais espécies analisadas, esse marcador citológico nunca foi visualizado, fato esse não muito comum. Na medida que nas espécies de *Bokermannohyla* cariotipadas a constrição secundária correspondente aos organizadores de nucléolo não é observada, a sequência de DNAr pode ser realmente curta.

A marcação das regiões heterocromáticas pelo nitrato de prata em *B. saxicola* e *B. alvarengai* não constitui um caso isolado em anuros. Tal achado havia sido relatado anteriormente em *Rhinella schneideri* (*Bufo paracnemis* em ambas as publicações) por Kasahara *et al.* (1996) e Azevedo *et al.*, (2003), os quais observaram um padrão de impregnação coincidente com o de bandamento C. Às vezes, marcações inespecíficas da heterocromatina ocorrem de tal maneira que, equivocadamente, sugerem a ocorrência de RONs múltiplas, como já relatado em anfíbios anuros (Silva *et al.*, 2006; Ananias *et al.*, 2007), assim como em mamíferos e peixes (Sánchez *et al.*, 1995; Dobigny *et al.*, 2002; Gromicho *et al.*, 2005). Nesses trabalhos, a possibilidade de RON verdadeira foi afastada pelo uso de técnicas mais resolutivas, como por exemplo o FISH com sondas de DNAr.

Bandamento C foi obtido pela primeira vez em *Bokermannohyla* sp., *B. circumdata*, *B. alvarengai*, *B. ibitiguara* e *B. saxicola*, com exceção de *B. hylax*, indicando padrão predominantemente centromérico, porém, com alguns poucos cromossomos com marcação na região pericentromérica. Embora no único exemplar de *Bokermannohyla* sp., a qualidade das metáfases não tenha sido adequada, o padrão de marcação pôde ser estabelecido com certa segurança, indicando bandas C relativamente maiores do que aparecem na outra espécie do grupo, *B. circumdata*, a qual revelou pouca quantidade de heterocromatina. Em *B. luctuosa*, também do grupo de *B. circumdata*, Baldissera Jr *et al.* (1993) descreveram leve banda C no cariótipo, sendo a marcação positiva restrita ao cromossomo B, quando presente em alguns exemplares.

Nos exemplares de *B. circumdata*, além da região centromérica, uma banda C inequívoca foi observada na região terminal dos braços longos do par 10. Embora a princípio tenha sido levantada a hipótese de que se tratasse também do mesmo par da

Ag-RON, a coloração sequencial BC/Ag-RON evidenciou que os pares não são os mesmos, isto é, as bandas C aparecem no par 10, enquanto a Ag-RON, no par 11. Tal heterocromatina, subseqüentemente, foi caracterizada como sendo rica em bases AT.

Com relação às três espécies do grupo de *B. pseudopseudis*, parece que ocorre também variação na quantidade e distribuição da heterocromatina, bem como, marcações na região pericentromérica, que foram observadas em alguns cromossomos, exceto nos de *B. ibitiguara*. Enquanto o cariótipo de *B. alvarengai* e *B. saxicola* tem bandas C nitidamente maiores, incluindo pares com bandas marcantes, *B. ibitiguara* apresenta marcações centroméricas sutis.

Em *B. alvarengai*, os pares 3, 7 e 8 podem ser considerados importantes marcadores para essa espécie uma vez que um grande bloco heterocromático pericentromérico ocorre nos braços curtos do 3 e outro, menor, na região intersticial dos braços longos do 7 e nos curtos do 8. Como em *B. alvarengai*, *B. saxicola* tem também como marcadores os pares 3 e 7, de modo que os dados de bandas C assim como os de Ag-RON, devem ser considerados quando da determinação do grupo no qual *B. saxicola* deve ser alocado.

Foram observadas marcações sutis de banda C, coincidentes com a Ag-RON, em *B. ibitiguara* e, mais fortemente coradas, em *Bokermannohyla* sp., embora não visualizadas em todas as metáfases nos dois casos. De acordo com Schmid (1982), o segmento cromossômico adjacente a RON é de natureza heterocromática, sendo fortemente corado pela banda C. No entanto, nas duas espécies é possível observar que a banda C não parece estar restrita apenas à região adjacente, mas a própria RON aparece marcada, a exemplo do que havia sido previamente observado em *Rhinella schneideri* (Kasahara *et al.*, 1996).

No gênero *Hypsiboas*, o bandamento C foi uma ferramenta importante para a caracterização cariotípica de certas espécies. No grupo de *H. pulchellus*, de acordo com Ananias *et al.* (2004) e Raber *et al.* (2004), a heterocromatina confirma o relacionamento próximo entre as espécies analisadas, pois há grande semelhança no padrão das bandas C. Para espécies pertencentes a outros grupos não é possível estabelecer um padrão característico, ainda que a marcação centromérica seja comum a quase todas elas (Gruber *et al.*, 2007).

Entre algumas espécies de *Aplastodiscus*, a quantidade e o padrão de

distribuição das bandas C são praticamente idênticos, mas a exemplo do que ocorre no grupo de *B. circumdata* e no grupo de *B. pseudopseudis*, há espécies que podem ser caracterizadas pelo bandamento C, visto que, o padrão observado é típico em cada uma delas (Carvalho, 2005).

Nas cinco espécies de *Bokermannohyla*, bandas C em outras regiões parecem existir, mas não puderam ser claramente estabelecidas, com exceção das marcações inequívocas na região da Ag-RON em duas das espécies. Sem dúvida, é imprescindível que a técnica de banda C seja estendida a todos os representantes do gênero *Bokermannohyla*, para se avaliar a relevância citotaxonômica desse marcador e, conseqüentemente para o entendimento das relações de parentesco das espécies dentro de determinados grupos. Esse tipo de abordagem tem sido importante em anuros, pois embora espécies dos mais diversos gêneros compartilhem de similaridade na morfologia e número cromossômico, podem mostrar grandes variações na distribuição e quantidade de heterocromatina (Matsui *et al.*, 1985; Schmid *et al.*, 1990).

Os resultados obtidos com o uso da coloração pelos fluorocromos AT e GC-específicos em quatro espécies, não apontam diferenças no padrão de marcação encontrado em *B. circumdata*, *B. ibitiguara*, *Bokermannohyla* sp. e *B. saxicola*. Com o uso do CMA₃, além do sítio da RON com marcações brilhantes, foi observada também fluorescência nos centrômeros dos cromossomos das espécies, indicando a ocorrência de heterocromatina rica em GC nessa região. Esse tipo de marcação pode ser útil para a caracterização cromossômica do gênero, tendo em vista a ausência de sinapomorfias não moleculares (Faivovich *et al.*, 2005). É importante destacar que as marcações centroméricas brilhantes observadas com o CMA₃ não coincidem com o padrão obtido pelo bandamento C, pois, enquanto em alguns pares é possível visualizar bandas C pericentroméricas, apenas a região do centrômero aparece fluorescente nas quatro espécies.

Com o uso do DAPI, um sítio particularmente rico em AT foi observado na região terminal dos braços longos de ambos os homólogos do par 10 de *B. circumdata*, o mesmo que se mostrou C-positivo. A observação da metáfase corada seqüencialmente com os dois fluorocromos em *B. circumdata* confirmou que o par cromossômico marcado ora pelo DAPI, ora pelo CMA₃, não é o mesmo, apesar do padrão de marcação ser similar. Há indicações de que o par DAPI-positivo é o mesmo evidenciado pelo

bandamento C (par 10), enquanto o par 11, é o portador da RON. Fica evidente, então, que no sítio repetitivo do braço longo do par 10, há predominância de bases AT, enquanto naquele do par 11, que é o da própria RON, há riqueza de bases GC, como já é conhecido.

Existem poucos relatos na literatura de dados obtidos com o uso de fluorocromos base-específicos em espécies da família Hylidae. Em *Hypsiboas albopunctatus*, foram observadas apenas marcações fluorescentes coincidentes com a Ag-RON e no cromossomo B encontrado em alguns exemplares (Gruber *et al.*, 2007). Região centromérica CMA₃-positiva foi também observada em outros representantes da família Hylidae, como é o caso de *Aparasphenodon brunoi*, cujos centrômeros aparecem fortemente brilhantes e em duas outras espécies, *Corythomantis greeningi* e *Itapotihyla langsdorffii*, nas quais somente há indícios de fluorescência na região centromérica de alguns pares (Kasahara *et al.*, 2003). Nessas duas últimas espécies, assim como em *Scinax fuscovarius*, o sítio da RON é fluorescente com CMA₃, o que inexplicavelmente não foi observado em *Aparasphenodon brunoi*.

Na subfamília Phyllomedusinae, o uso de fluorocromos em *Agalychnis callidryas* mostrou diferenças entre o conteúdo de bases da heterocromatina centromérica e da pericentromérica, identificadas pelo bandamento C. Enquanto a região centromérica tem marcações ricas em GC, a pericentromérica mostra marcações sutis ou mais fortes, dependendo se o fluorocromo AT-específico é combinado, ou não, com contracorante (Schmid *et al.*, 1995). De fato, é sabido que a coloração por fluorocromos pode fornecer resultados diversos, dependendo se utilizados de forma isolada ou combinada com contracorantes (Verma e Babu, 1995). No caso das espécies de *Bokermannohyla* analisadas no presente trabalho, embora o DAPI não tenha evidenciado região AT-rica, exceto no caso de *B. circumdata*, há a possibilidade de que diferenças sejam encontradas com o uso desse fluorocromo contracorado com distamicina A (DA), ou com o contracorante actinomicina D, com afinidade por bases AT e GC, respectivamente.

A técnica de incorporação do análogo de base BrdU na molécula de DNA foi aplicada em *B. circumdata* e em *B. alvarengai*. Trata-se de uma técnica refinada que permite a análise do padrão das bandas de replicação dos cromossomos e pela qual os pares cromossômicos podem ser, inequivocamente, identificados e comparados. Em

ambas as espécies, porém, o grau de diferenciação obtido não permitiu uma análise mais detalhada dos cromossomos, ainda que seja possível notar sinais claros de incorporação do BrdU. Será desejável um estudo comparativo interespecífico dos padrões das bandas de replicação ainda que alto grau de conservação cariotípica tenha sido observado nas espécies de *Bokermannohyla* estudadas. É possível que as pequenas diferenças que possam eventualmente existir não possam ser detectadas, a menos que cromossomos prometafásicos apresentem múltiplas bandas de boa qualidade (Miura, 1995; Schmid e Steinlein, 1991).

Embora seja uma técnica importante, ainda são poucas as espécies da família Hylidae, cujos cromossomos foram bandados com incorporação de BrdU (Wiley, 1982 e 2003; Miura, 1995; Wiley e Little, 2000; Kasahara *et al.*, 2003). Na tribo Cophomantini, os dados são ainda mais restritos, sendo que, apenas três espécies pertencentes ao gênero *Hypsiboas* foram submetidas a essa técnica (Gruber *et al.*, 2007). Com a comparação das bandas dos cariótipos de *H. albopunctatus*, *H. crepitans* e *H. raniceps*, pôde-se confirmar o alto grau de conservação cariotípica das espécies e estabelecer grande homeologia entre os pares, principalmente os de tamanho grande. Uma hipótese para a redução do número cromossômico e aparecimento de um cromossomo B em *H. albopunctatus* foi também proposta pelos autores, com base na análise comparativa das bandas de replicação dos cromossomos dessa espécie, com outras pertencentes a grupos próximos (Gruber *et al.*, 2007). Para outros representantes da subfamília Hyalinae, a conservação do padrão de bandas de replicação foi também amplamente confirmada (Kasahara *et al.*, 2003).

Como se pode ver, nas três espécies do grupo de *B. circumdata*, o padrão dos marcadores cromossômicos tende a ser mais conservado, enquanto nas espécies do grupo de *B. pseudopseudis*, cada marcador parece ser espécie-específico. Os dados citogenéticos ora obtidos, ainda que baseados em um número pequeno de espécies, são muito promissores para estudos comparativos em *Bokermannohyla* e, num sentido mais amplo, para se compreender a diferenciação cariotípica e evolução cromossômica na tribo Cophomantini.

IX. Conclusões

- *Bokermannohyla circumdata*, *B. hylax* e *Bokermannohyla* sp., do grupo de *B. circumdata*, e *B. alvarengai*, *B. ibitiguara* e *B. saxicola*, do grupo de *B. pseudopseudis*, apresentam o mesmo cariótipo com $2n=24$ e $NF=48$, embora exista uma pequena diferença na morfologia do par 3 das espécies *B. alvarengai* e *B. saxicola*, decorrente de um bloco adicional de heterocromatina nos braços curtos.
- A constituição cariotípica, tal como observada nas espécies de *Bokermannohyla*, é compartilhada por representantes de *Aplastodiscus* e *Hypsiboas*, dois outros dos cinco gêneros de Cophomantini, indicando que, ao menos para esses três gêneros, o cariótipo é altamente conservado.
- As espécies do gênero *Bokermannohyla* apresentaram apenas um único par de Ag-RON; enquanto nas três espécies do grupo de *B. circumdata*, a localização da Ag-RON está invariavelmente localizada na mesma região dos cromossomos do par 11, nas três espécies do grupo de *B. pseudopseudis*, a Ag-RON é observada em diferentes cromossomos, isto é, nos homólogos dos pares 1, 4 e 11.
- A localização da Ag-RON predominantemente nos menores pares do cariótipo leva à suposição de que os pares portadores dos organizadores de nucléolo em *Aplastodiscus*, *Hypsiboas* e *Bokermannohyla*, principalmente em relação às espécies alocadas no grupo de *B. circumdata*, são homeólogos.

- As marcações de Ag-RON na maioria das espécies estudadas são pequenas, do tipo puntiforme, sugerindo uma diminuição no número de unidades de transcrição ou uma atividade gênica reduzida. Na medida em que a constrição secundária coincidente com a RON foi raramente observada, as seqüências de DNAr podem ser realmente curtas, fato esse confirmado pela técnica de FISH com sondas de DNAr em *B. circumdata*, que mostrou sinal de hibridação também puntiforme.
- A marcação Ag-positiva nos centrômeros dos cromossomos de *B. saxicola* e *B. alvarengai*, com padrão semelhante ao do bandamento C, indicam a presença de proteínas acídicas com afinidade pela prata na heterocromatina centromérica.
- O padrão de banda C em cinco espécies de *Bokermannohyla* é predominantemente centromérico, mas existem pequenas diferenças na quantidade de heterocromatina. Alguns cromossomos mostram bandas adicionais na região pericentromérica, intersticial e terminal e podem ser considerados marcadores específicos, ainda que não exclusivos, como é o caso dos cromossomos dos pares 3, com grande bloco de heterocromatina e 7, com banda intersticial, que ocorrem tanto em *B. alvarengai*, como em *B. saxicola*.
- A posição de *B. saxicola* é ainda incerta, havendo indícios de que seja filogeneticamente mais próxima dos representantes do grupo de *B. circumdata*. Embora os dados de Ag-RON confirmem essa proximidade pela coincidência de sua localização nos cromossomos do par 11, os pares marcadores 3 e 7 têm padrão de banda C que é compartilhado com uma das espécies do grupo de *B. pseudopseudis*, no qual está alocada.
- A coloração pelo DAPI revelou um sítio fluorescente nos cromossomos do par 10 de *B. circumdata*, o mesmo que se mostrou C-positivo, evidenciando a predominância de bases AT na região heterocromática terminal nele localizado. Com CMA₃, além do sítio da RON, marcações brilhantes foram observadas nos centrômeros dos cromossomos de *B. circumdata*, *Bokermannohyla* sp., *B. ibitiguara* e *B. saxicola*, indicando a ocorrência de heterocromatina centromérica rica em GC. Essa marcação pode ser útil para a caracterização cromossômica do gênero, considerando a ausência de sinapomorfias não

moleculares para as espécies de *Bokermannohyla*.

- Em *B. circumdata* e *B. alvarengai*, o grau de diferenciação das bandas de replicação obtido com o BrdU não permitiu uma análise mais detalhada dos cromossomos, ainda que seja possível notar sinais claros de incorporação. Devido ao alto grau de conservação cariotípica observado nas espécies de *Bokermannohyla* é possível que as pequenas diferenças que possam eventualmente existir não sejam detectadas, a menos que cromossomos prometafásicos apresentem múltiplas bandas de boa qualidade.

- Os dados obtidos nas seis espécies de *Bokermannohyla* são ainda escassos frente ao número de representantes do gênero. Certamente, análises citogenéticas devem ser estendidas a outras espécies, já que há fortes indicações de sua relevância para a citotaxonomia.

X. Referências Bibliográficas

- AGUIAR Jr, O., LIMA, A. P., GIARETTA, A. A., RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of four dart-poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura, Dendrobatidae). **Herpetologica** **58**: 293-303, 2002.
- AGUIAR Jr, O., BACCI Jr., M., LIMA, A. P., ROSSA-FERES, D. C. , HADDAD, C. F. B., RECCO-PIMENTEL, S. M. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics** **23**: 455–463, 2007.
- AMARO-GHILARDI, R. C., RODRIGUES, M. T., YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia** **57**: 53-65, 2004.
- AMARO-GHILARDI, R. C., SILVA, M. J. J., RODRIGUES, M. T., YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetica**. versão on-line, 2007.
- ANANIAS, F., GARCIA, P. C. A., RECCO-PIMENTEL, S. M. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas** **140**: 42-48, 2004.
- ANANIAS, F., BOMBEIRO, A. L., SILVA, C. D. B., SILVA, A. P. Z., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Cytogenetics of *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Anura: Leiuperidae) and karyotypic similarity with species of related genera: taxonomic implications. **Acta Zool. Sin.** **53**: 285-293, 2007a.
- ANANIAS, F., MODESTO, A. D. S., MENDES, S. C., NAPOLI, M. F. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura,

- Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-band interpopulational polymorphism. **Hereditas**. versão on-line 2007b.
- ANDERSON, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. In: D. M. Green e S. K. Sessions eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego, p. 299–331, 1991.
- AZEVEDO, M. F. C., FORESTI, F., RAMOS, P. R. R., JIM, J. Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. **Genet. Mol. Biol.** **26**: 289-294, 2003.
- BALDISSERA Jr., F. A., OLIVEIRA, P. S. L., KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Bras. Genet.** **16**: 335-345, 1993.
- BALDISSERA Jr., F. A., BATISTIC, R. F., HADDAD, C. F. B. Cytotaxonomic considerations with the description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo* (Anura: Bufonidae). **Amphibia-Reptilia** **20**: 413-420, 1999.
- BARRIO, A. Estudio cariotipico y analisis audioespectrografico de los cantos de las especies de *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae) que habitan en la Argentina. **Physis** **35**: 65-74, 1976.
- BATISTIC, R. F. Citogenética e evolução em anfíbios anuros. **Cienc. Cult.** **36**: 45-51, 1984.
- BATISTIC, R. F. **Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura – Amphibia)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 203 p., 1989.
- BEČAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia** **21**: 191-208, 1968.
- BEČAK, M. L., DENARO, L., BEČAK, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. **Cytogenetics** **9**: 225-238, 1970.
- BERSET-BRÄNDLI, L., JAQUIÉRY, J., DUBEY, S., PERRIN, N. A Sex-specific marker reveals male heterogamety in European tree frogs. **Mol. Biol. Evol.** **23**: 1104–1106, 2006.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. In: J. L. Vial ed. **Evolutionary Biology of Anurans**. Univ. Missouri Press, Columbia, p. 337-349, 1973.

- BOKERMANN, W. C. A. Notas sobre *Hyla clepsydra* A. Lutz (Anura, Hylidae). **Rev. Bras. Biol.** **32**: 291-295, 1972.
- BURNS, E. L., CRAYN, D. M. Phylogenetics and evolution of bell frogs (*Litoria aurea* species-group, Anura: Hylidae) based on mitochondrial *ND4* sequences. **Mol. Phylogenetics Evol.** **39**: 573–579, 2006.
- BUSIN, C. S., VINCIPROVA, G., RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica** **110**: 131-141, 2001.
- BUSIN, C. S., LIMA, A. P., PRADO, C. P. A., STRÜSSMANN, C., SIQUEIRA Jr., S., RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). **Micron** **37**: 355–362, 2006.
- BUSIN, C. S., ANDRADE, G. V., BERTOLDO, J. DEL GRANDE, M. L., UETANABARO, M., RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. **Genetica**. versão on-line, 2007.
- CAMPOS, J. R. C., BRUNAIKOVICS, C. D., YAMAMOTO, M. A. M., SILVA, A. P. Z., ANANIAS, F. Estudos citogenéticos da anurofauna do Parque Natural Municipal da Serra do Itapety. In: **25º Congresso Brasileiro de Zoologia**, Brasília, DF, Livro Resumos, p. 203, 2004.
- CAMPOS, J. R. C., ANANIAS, F., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern (Anura, Brachycephalidae). **Micron**. versão on-line, 2006.
- CARVALHO, K. A. **Citogenética comparativa de espécies de *Aplastodiscus* e do grupo de *Hyla albomarginata* (Hylidae, Anura)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 80 p., 2005.
- CHEK, A. A., LOUGHEED, J. P., BOGART, J. P., BOAG, P. T., Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of Neotropical frogs, the 30-chromosomes *Hyla* (Anura, Hylidae). **Mol. Phylogenetics Evol.** **19**: 370-385, 2001.
- CHRISTIAN, A., McNIEL, E., ROBINSON, J., DRABEK, J., LaRUE, C., WALDREN, C., BEDFORD, J. A versatile image analyses approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. **Cytogenet. Cell Genet.** **82**: 172-179, 1998.

- DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. **J. Herpetol.** **1**: 71-74, 1972.
- DOBIGNY, G., OZOUF-COSTAZ, C., BONILLO, C., VOLOBOUEV, V. "Ag-NORs" are not always true NORs: new evidence in mammals. **Cytogenet. Genome Res.** **98**: 75-77, 2002.
- DONNELLAN, S. C., MAHONY, M. J. Allozyme, chromosomal and morphological variability in the *Litoria lesueuri* species group (Anura: Hylidae), including a description of a new species. **Aust. J. Zool.** **52**: 1-28, 2004.
- DUELLMAN, W. E. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. **Syst. Zool.** **16**: 38-43, 1967.
- DUELLMAN, W. E., COLE, C. J. Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). **Syst. Zool.** **14**: 139-143, 1965.
- DUELLMAN, W. E., TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill, New York, 1994.
- DUTRILLAUX, B., COUTURIER, J. **La Pratique de l'Analyse Chromosomique**, Masson, Paris, 1981.
- FAIVOVICH, J. A cladistic analysis of *Scinax* Anura: (Hylidae). **Cladistics** **18**: 367-393, 2002.
- FAIVOVICH, J., GARCIA, P. C. A., ANANIAS, F., LANARI, L., BASSO, N. G., WHEELER, W. C. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Mol. Phylogenetics Evol.** **32**: 938-950, 2004.
- FAIVOVICH, J., HADDAD, C. F. B., GARCIA, P. C. A., FROST, D. R., CAMPBELL, J. A., WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyalinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bull. Am. Museum Nat. Hist.** **294**: 1-240, 2005.
- FORESTI, F. **Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura)**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, 80 p., 1972.
- FROST, D. R. Amphibians of the world: an on-line reference. V5.1, 2007. Electronic database available at <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> (Acesso outubro/2007).

- FROST, D. R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R. H., HAAS, A., HADDAD, C. F. B., SÁ, R. O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S. C., RAXWORTHY, C. J., CAMPBELL, J. A., BLOTTO, B. L., MOLER, P., DREWES, R. C., NUSSBAUM, R. A., LYNCH, J. D., GREEN, D. M., WHEELER, W. C. The amphibian tree of life. **Bull. Am. Museum Nat. Hist.** **297**: 1-370, 2006.
- GARDA, A. A., CANNATELLA, D. C. Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. **Mol. Phylogenetics Evol.** **44**: 104–114, 2007.
- GRANT, T., FROST, D. R., CALDWELL, J. P., GAGLIARDO, R., HADDAD, C. F. B., KOK, P. J. R., MEANS, D. B., NOONAN, B. P., SCHARGEL, W. E., WHEELER, W. C. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bull. Am. Museum Nat. Hist.** **269**: 1-262, 2006.
- GREEN, D. M., SESSIONS, S. K. Nomenclature for chromosomes. In: D. M. Green e S. K. Sessions eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego, p. 393-430, 1991.
- GROMICHO, M., OZOUF-COSTAZ, C., COLLARES-PEREIRA, M. J. Lack of correspondence between CMA₃ – Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei: Cyprinidae) evidenced by sequential banding. **Cytogenet. Genome Res.** **109**: 507-511, 2005.
- GRUBER S. L. **Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (Anura, Hylidae) dos grupos com 2n=24 e 2n=30, com técnicas de coloração diferencial**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, 132 p., 2002.
- GRUBER, S. L., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Evaluating the diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with 2n = 30 chromosomes based on the analysis of ten species. **Folia Biologica** **51**: 68-75, 2005.
- GRUBER, S. L., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hyalinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of 2n=24 to 2n=22 in the genus. **Genetica** **130**: 281-291, 2007.
- HEINICKE, M. P., DUELLMAN, W. E., HEDGES, S. B. Major caribbean and central American frog faunas originated by ancient oceanic dispersal. **PNAS** **104**: 10092-10097, 2007.
- HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia** **36**: 1014-

1015, 1980.

JIM, J., CARAMASCHI, U. Uma nova espécie de *Hyla* da região de Botucatu, São Paulo, Brasil (Amphibia, Anura). **Rev. Bras. Genet.** **39**: 717-719, 1979.

KAISER, H., MAIS, C., BOLAÑOS, F., STEINLEIN, C., FEICHTINGER, W., SCHMID, M. Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica** **98**: 95-102, 1996.

KASAHARA, S., SILVA, A. P. Z., HADDAD, C. F. B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). **Braz. J. Genet.** **19**: 237-242, 1996.

KASAHARA, S., SILVA, A. P. Z., GRUBER, S. L. Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). **Genet. Mol. Biol.** **21**: 471-467, 1998.

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

KING, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** **80**: 191-217, 1980.

KING, M. Amphibia. In: B. John e C. Gwent eds. **Animal Cytogenetics**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, v. 4, p. 1-241, 1990.

KING, M., CONTRERAS, N., HONEYCUTT, R. L. Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. **Genetica** **80**: 17-29, 1990.

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

KURAMOTO, M., ALLISON, A. Karyotypes of five hylid frogs from Papua New Guinea, with a discussion on their systematic implications. **Japan. J. Herpet.** **14**: 6-11, 1991.

LOURENÇO, L. B., RECCO-PIMENTEL, S. M., CARDOSO, A. J. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescent *in situ* hybridization. **Chromosome Res.** **6**: 621-628, 1998.

- LOURENÇO, L. B., GARCIA, P. C. A., RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetics of a new species of *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae), with the description of an apparent case of pericentric inversion. **Amphibia-Reptilia** **24**: 47-55, 2003.
- LOURENÇO, L. B., BACCI Jr, M., MARTINS, V. G., RECCO-PIMENTEL, S. M., HADDAD, C. F. B. Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). **Genetica**. versão on-line, 2007.
- LUCCA, E. J., JIM, J. Os cromossomos de alguns Leptodactylidae (Amphibia-Anura). **Rev. Bras. Biol.** **34**: 407-410, 1974.
- LUCCA, E. J., JIM, J., FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia** **27**: 183-92, 1974.
- LUGLI, L., HADDAD, C. F. B. New species of *Bokermannohyla* (Anura, Hylidae) from Central Bahia, Brazil. **J. Herpet.** **40**: 7-15, 2006a.
- LUGLI, L., HADDAD, C. F. B. A new species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* group from Central Bahia. **Herpetologica** **62**: 453-465, 2006b.
- MARTINS, C., GALETTI Jr, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiforms). **Chromosome Res.** **7**: 363-367, 1999.
- MATSUI, M., SETO, T., KOHSAKA, Y., BORKIN, L. Bearing of chromosome C-banding patterns on the classification of Eurasian toads of the *Bufo Bufo* complex. **Amphibia-Reptilia** **6**: 23-33, 1985.
- MEDEIROS, L. R., ROSSA-FERES, D. C. E., RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with description of NOR polymorphism in *H. nana*. **J. Hered.** **94**: 149-154, 2003.
- MEDEIROS, L. R., ROSSA-FERES, D. C., JIM, J., RECCO-PIMENTEL, S. M. B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). **Genet. Mol. Biol.** **29**: 257-262, 2006.
- MEUNIER-ROTIVAL, M., CORTADAS, J., MACAYA, G., BERNARDI, G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucleic Acids Res.** **6**: 2109-2123, 1979.
- MIURA, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). **Chromosoma** **103**: 567-574, 1995.

- MORESCALCHI, A. Amphibia. In: A. B. Chiarelli e G. Capanna eds. **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution**. Academic Press, London e New York, p. 233-348, 1973.
- MORESCALCHI, A. New developments in vertebrates cytotaxonomy. **Genetica** **50**: 179-193, 1979.
- NAPOLI, M. F. JUNCÁ, F. A. A new species of the *Bokermannohyla circumdata* group (Amphibia: Anura: Hylidae) from Chapada Diamantina, State of Bahia, Brazil. **Zootaxa** **1244**: 57-68, 2006.
- POMBAL Jr., J. P., HADDAD, C. F. B. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia: Hylidae). **Rev. Bras. Biol.** **52**: 217-229, 1992.
- POMBAL Jr., J. P., HADDAD, C. F. B. *Hyla luctuosa*, a new treefrog from southeastern Brazil (Amphibia: Hylidae). **Herpetologica** **49**: 16-21, 1993.
- RABELLO, M. N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia** **23**: 45-59, 1970.
- RABELLO, M. N., BEÇAK, M. L., BEÇAK, W. Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. **Arq. Mus. Nac.** **54**: 285-286, 1971.
- RABER, S. C., CARVALHO, K. A., GARCIA, P. C. A., VINCIPROVA, G., RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). **Phyllomedusa** **3**: 43-49, 2004.
- RECUERO, E., SOLANO, I. M., OLEA, G. P., PARÍS, M. G. Phylogeography of *Pseudacris regilla* (Anura: Hylidae) in western North America, with a proposal for a new taxonomic rearrangement. **Mol. Phylogenetics Evol.** **39**: 293-304, 2006.
- RUIZ, I. R. G., SOMA, M., BEÇAK, W. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). **Cytogenet. Cell Genet.** **29**: 84-98, 1981.
- SÁNCHEZ, A., JIMÉNEZ, M., BURGOS, S., STITOU, F., ZURITA, F., DE LA GUARDIA, R. D. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. **Heredity** **75**: 10-16, 1995.
- SBH. 2007. Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>> (Acesso Janeiro/2008).

- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** **66**: 361-388, 1978.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Amphibia. **Chromosoma** **87**: 327-344, 1982.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C. Chromosome banding in Amphibia XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. **Chromosoma** **101**: 123-132, 1991.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C. Chromosome banding in Amphibia XXIX. The primitive XY/XX sex chromosomes of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Genome Res.** **101**: 74-79, 2003.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., NANDA, I., EPPLEN J. T. Chromosome banding in Amphibia. In: E. Olmo ed. **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**. Birkhauser Verlag, Basel, p. 21-45, 1990.
- SCHMID, M., NANDA, I., STEINLEIN, C., KAUSCH, K., EPPLEN, J. T., HAAF, T. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. In: D. M. Green e S. K. Sessions eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego, p. 393-430, 1991.
- SCHMID, M., FEICHTINGER, W., WEIMER, R., MAIS, C., BOLAÑOS, F., LEÓN, P. Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** **69**: 18-26, 1995.
- SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma** **58**: 307-324, 1980.
- SILVA, A. P. Z., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Nucleolus organizer region in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. **Hereditas** **131**: 135-141, 1999.
- SILVA, A. P. Z., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. **Cytobios** **103**: 25-38, 2000.
- SILVA, A. P. Z., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Chromosome banding in *Macrogenioglottus alipioi* Carvalho, 1946 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), with comments on its taxonomic position. **Bol. Mus. Nac., UFRJ, Zool.** **499**: 1-9, 2001.
- SILVA, A. P. Z., GARCIA, P. C. A., MARTINS, V. G., BACCI Jr., M., KASAHARA,

- S. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. **Amphibia-Reptilia** **25**: 185-196, 2004.
- SILVA, A. P. Z., HADDAD, C. F. B., GALASSI, G. G., KASAHARA, S. Multiple organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. **Genetica** **27**: 35-44, 2006.
- SMITH, S. A., OCA, A. N. M., REEDER, T. W., WIENS, J. J. A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in middle American treefrogs: Why so few species in lowland tropical rainforests? **Evolution** **61**: 1188-1207, 2007a.
- SMITH, S. A., ARIF, S., OCA, A. N. M., WIENS, J. J. A phylogenetic hotspot for evolutionary novelty in middle American treefrogs. **Evolution** **61**: 2075-2085, 2007b.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** **75**: 304-306, 1972.
- VASCONCELOS, E. G., GIARETTA, A. A. A new species of *Hyla* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil. **Rev. Espan. Herpet.** **17**: 21-27, 2003.
- VERMA, R. S., BABU, A. **Human Chromosomes. Principles and Techniques**, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1995.
- WASKO, A. P., GALETTI Jr, P. M. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genet. Mol. Biol** **23**: 135-138, 2000.
- WILEY, J. E. Chromosome banding patterns of treefrogs (Hylidae) of the eastern United States. **Herpetologica** **38**: 507-520, 1982.
- WILEY, J. E. Replication banding and FISH analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. **Cytogenet. Genome Res.** **101**: 80-83, 2003.
- WILEY, J. E., MEYNE, J., LITTLE, M. L., STOUT, J. C. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs. **Cytogenet. Cell Genet.** **61**: 55-57, 1992.
- WILEY, J. E., LITTLE, M. L. Replication banding patterns of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Cytogenet. Cell Genet.** **88**: 11-14, 2000.

XI. Apêndice

Tabela 1. Revisão sobre dados citogenéticos da família Hylidae

SUBFAMÍLIA HYLINAE
Tribo Cophomantini – Gênero *Aplastodiscus*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
Grupo <i>A. albofrenatus</i>			
<i>Hyla albofrenata</i>	<i>A. albofrenatus</i>	24	Carvalho, 2005
<i>Hyla albofrenata</i>	<i>A. arildae</i>	22	Bogart, 1973
<i>Hyla arildae</i>	<i>A. arildae</i>	22	Carvalho, 2005
<i>Hyla ehrhardti</i>	<i>A. ehrhardti</i>	22	Carvalho, 2005
<i>Hyla eugenioi</i>	<i>A. eugenioi</i>	22	Carvalho, 2005
Grupo <i>A. albosignatus</i>			
<i>Hyla albosignata</i>	<i>A. albosignatus</i>	20	Bogart, 1973; Carvalho, 2005
<i>Hyla albosignata</i>	<i>A. leucopygius</i>	18	Bogart, 1973
<i>Hyla leucopygia</i>	<i>A. leucopygius</i>	18	Carvalho, 2005
Grupo <i>A. perviridis</i>			
<i>Aplastodiscus cochranae</i>	<i>A. cochranae</i>	24	Carvalho, 2005
<i>Aplastodiscus perviridis</i>	<i>A. perviridis</i>	24	Carvalho, 2005

Continuação

Tribo Cophomantini – Gênero *Bokermannohyla*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
Grupo <i>B. circumdata</i>			
<i>Hyla hylax</i>	<i>B. hylax</i>	24	Campos <i>et al.</i> , 2004; Catroli <i>et al.</i> , 2007; Presente trabalho
<i>Hyla circumdata</i>	<i>B. izecksohni</i>	24	Foresti, 1972
<i>Hyla luctuosa</i>	<i>B. luctuosa</i>	24	Baldissera Jr <i>et al.</i> , 1993
		24 + 1B	
<i>Bokermannohyla</i> sp.	<i>Bokermannohyla</i> sp.	24	Catroli <i>et al.</i> , 2007; Presente trabalho
<i>Bokermannohyla circumdata</i>	<i>B. circumdata</i>	24	Catroli <i>et al.</i> , 2007; Presente trabalho
Grupo <i>B. pseudopseudis</i>			
<i>Bokermannohyla alvarengai</i>	<i>B. alvarengai</i>	24	Catroli <i>et al.</i> , 2007; Presente trabalho
<i>Bokermannohyla ibitiguara</i>	<i>B. ibitiguara</i>	24	Catroli <i>et al.</i> , 2007; Presente trabalho
<i>Bokermannohyla saxicola</i>	<i>B. saxicola</i>	24	Catroli <i>et al.</i> , 2007; Presente trabalho
Tribo Cophomantini – Gênero <i>Hypsiboas</i>			
Grupo <i>H. albopunctatus</i>			
<i>Hyla albopunctata</i>	<i>H. albopunctatus</i>	22	Beçak, 1968; Bogart, 1973; Baldissera Jr e Batistic, 1992; Insaurrealde <i>et al.</i> , 1999;
		22+1B	Gruber <i>et al.</i> , 2007
<i>Hyla multifasciata</i>	<i>H. multifasciatus</i>	24	Beçak, 1968
<i>Hyla raniceps</i>	<i>H. raniceps</i>	24	Rabello, 1970; Rabello <i>et al.</i> , 1971; Insaurrealde <i>et al.</i> , 1999; Gruber <i>et al.</i> , 2007; Souza <i>et al.</i> , 2007

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
	Grupo <i>H. faber</i>		
<i>Hyla albomarginata</i>	<i>H. albomarginatus</i>	24	Beçak, 1968; Baldissera Jr e Batistic, 1992; Gruber, 2002; Carvalho, 2005
<i>Hyla crepitans</i>	<i>H. crepitans</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Rabello, 1970; Bogart, 1973; Gruber <i>et al.</i> , 2007
<i>Hyla faber</i>	<i>H. faber</i>	24	Beçak, 1968; Carvalho, 2005; Catroli <i>et al.</i> , 2006
<i>Hypsiboas lundii</i>	<i>H. lundii</i>		Catroli <i>et al.</i> , 2006; Souza <i>et al.</i> , 2007
<i>Hyla pardalis</i>	<i>H. pardalis</i>	24	Bogart, 1973; Campos <i>et al.</i> , 2004; Catroli <i>et al.</i> , 2006
<i>Hyla rosenbergi</i>	<i>H. rosenbergi</i>	24	León, 1970
	Grupo <i>H. pellucens</i>		
<i>Hyla rufitela</i>	<i>H. rufitelus</i>	24	Duellman, 1967
	Grupo <i>H. pulchellus</i>		
<i>Hyla bischoffi</i>	<i>H. bischoffi</i>	24	Foresti, 1972; Raber <i>et al.</i> , 2004
<i>Hyla bischoffi multilineata</i>	<i>H. bischoffi</i>	24	Beçak, 1968

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Hyla caingua</i>	<i>H. caingua</i>	24	Ananias, 1996
<i>Hyla goiana</i>	<i>H. goianus</i>	24	Neves <i>et al.</i> , 2006
<i>Hyla guentheri</i>	<i>H. guentheri</i>	24	Raber <i>et al.</i> , 2004
<i>Hyla marginata</i>	<i>H. marginatus</i>	24	Ananias <i>et al.</i> , 2004
<i>Hyla polytaenia</i>	<i>H. polytaenius</i>	24	Rabello, 1970; Rabello <i>et al.</i> , 1971; Bogart, 1973
<i>Hyla prasina</i>	<i>H. prasinus</i>	24	Beçak, 1968; Baldissera Jr <i>et al.</i> , 1993; Ananias, 1996
<i>Hyla pulchella</i>	<i>H. pulchellus</i>	24	Beçak, 1968; Bogart, 1973
<i>Hyla pulchella joaquina</i>	<i>H. joaquina</i>	24	Ananias, 1996
<i>Hyla pulchella pulchella</i>	<i>H. pulchellus</i>	24	Saez e Brum, 1960; Bogart, 1973; Ananias, 1996; Insaurralde <i>et al.</i> , 1999
<i>Hyla semiguttata</i>	<i>H. semiguttatus</i>	24	Foresti, 1972; Ananias <i>et al.</i> , 2004
Grupo <i>H. punctatus</i>			
<i>Hyla granosa</i>	<i>H. granosus</i>	24	Bogart, 1973
<i>Hyla punctata</i>	<i>H. punctatus</i>	24	Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973; Foresti, 1972; Anderson, 1991
Grupo <i>H. semilineatus</i>			
<i>Hyla geographica</i>	<i>H. geographicus</i>	24	Foresti, 1972
<i>Hyla gr. geographica</i>	<i>H. gr. geographicus</i>	24	Bogart e Bogart, 1971

Continuação

Tribo Dendropsophini – Gênero *Dendropsophus*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Hyla carnifex</i>	Grupo <i>Dendropsophus columbianus</i> <i>D. carnifex</i>	30	Duellman e Trueb, 1983
<i>Hyla labialis</i>	Grupo <i>Dendropsophus labialis</i> <i>D. labialis</i>	30	Bogart, 1973
<i>Hyla anceps</i>	Grupo <i>Dendropsophus leucophyllatus</i> <i>D. anceps</i>	30	Foresti, 1972; Bogart, 1973
<i>Hyla ebraccata</i>	<i>D. ebraccatus</i>	30	Duellman e Cole, 1965; Kaiser <i>et al.</i> , 1996
<i>Hyla elegans</i>	<i>D. elegans</i>	30	Campos <i>et al.</i> , 2004; Gruber <i>et al.</i> , 2005
<i>Hyla leucophyllata</i>	<i>D. leucophyllatus</i>	30	Bogart, 1970b+ e 1973; Bogart e Bogart, 1971; Foresti, 1972
<i>Hyla gr. leucophyllata</i>	<i>D. gr. leucophyllatus</i>	30	Bogart e Bogart, 1971
<i>Hyla marmorata</i>	Grupo <i>Dendropsophus marmoratus</i> <i>D. marmoratus</i>	30	Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973
<i>Hyla nahdereri</i>	<i>D. nahdereri</i>	30	Gruber <i>et al.</i> , 2005
<i>Dendropsophus soaresi</i>	<i>D. soaresi</i>	30	Neves <i>et al.</i> , 2006
<i>Hyla berthaltutae</i>	Grupo <i>Dendropsophus microcephalus</i> <i>D. berthaltutae</i>	30	Foresti, 1972; Skuk e Langone, 1992; Gruber <i>et al.</i> , 2005

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Hyla bipunctata</i>	<i>D. bipunctatus</i>	30	Foresti, 1972; Bogart, 1973
<i>Hyla branneri</i>	<i>D. branneri</i>	30	Foresti, 1972; Bonfim <i>et al.</i> , 2007
<i>Hyla decipiens</i>	<i>D. decipiens</i>	30	Foresti, 1972; Bogart, 1973
<i>Hyla cruzi</i>	<i>D. cruzi</i>	30	Gruber <i>et al.</i> , 2005
<i>Hyla elianeae</i>	<i>D. elianeae</i>	30	Gruber <i>et al.</i> , 2005
<i>Hyla leali</i>	<i>D. leali</i>	30	Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973
<i>Hyla meridiana</i>	<i>D. meridianus</i>	30	Foresti, 1972
<i>Hyla microcephala</i>	<i>D. microcephalus</i>	30	Duellman e Cole, 1965; Bogart, 1973; Anderson, 1991; Kaiser <i>et al.</i> , 1996
<i>Hyla microcephala microcephala</i>	<i>D. microcephalus</i>	30	Duellman e Cole, 1965; León, 1970; Bogart, 1973
<i>Hyla microcephala martini</i>	<i>D. microcephalus</i>	30	Duellman e Cole, 1965
<i>Hyla microcephala meridiana</i>	<i>D. meridianus</i>	30	Skuk e Langone, 1986+
<i>Hyla nana</i>	<i>D. nanus</i>	30	Rabello, 1970; Rabello <i>et al.</i> , 1971; Bogart, 1973; Skuk e Langone, 1992; Medeiros <i>et al.</i> , 2003; Gruber <i>et al.</i> , 2005; Medeiros <i>et al.</i> , 2006
<i>Hyla oliveirai</i>	<i>D. oliveirai</i>	30+1B	Foresti, 1972
<i>Hyla phlebodes</i>	<i>D. phlebodes</i>	30	Duellman e Cole, 1965; Duellman, 1967; Kaiser <i>et al.</i> , 1996
<i>Hyla rubicundula</i>	<i>D. rubicundulus</i>	30	Rabello, 1970; Bogart, 1973; Gruber <i>et al.</i> , 2005
<i>Hyla sanborni</i>	<i>D. sanborni</i>	30	Skuk e Langone, 1992; Medeiros <i>et al.</i> , 2003; Gruber <i>et al.</i> , 2005

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
Grupo <i>Dendropsophus minutus</i>			
<i>Hyla minuta</i>	<i>D. minutus</i>	30	Rabello, 1970; Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973, Gruber <i>et al.</i> , 2005
Grupo <i>Dendropsophus parviceps</i>			
<i>Hyla microps</i>	<i>D. microps</i>	30	Beçak, 1968; Bogart, 1973; Gruber <i>et al.</i> , 2005
<i>Hyla parviceps</i>	<i>D. parviceps</i>	30	Duellman e Cole, 1965; Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973
<i>Hyla subocularis</i>	<i>D. subocularis</i>	30	Duellman, 1970+
Tribo Dendropsophini – Gênero <i>Pseudis</i>			
<i>Lysapsus caraya</i>	<i>P. caraya</i>	24	Busin <i>et al.</i> , 2006
<i>Lysapsus limellum</i>	<i>P. limellum</i>	24	Barrio e Pistol del Rubel, 1970
<i>Lysapsus limellum limellum</i>	<i>P. limellum limellus</i>	24	Busin <i>et al.</i> , 2006
<i>Lysapsus limellum bolivianus</i>	<i>P. bolivianus</i>	24	Busin <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudis bolbodactyla</i>	<i>P. bolbodactyla</i>	24	Busin <i>et al.</i> , no prelo
<i>Pseudis fusca</i>	<i>P. fusca</i>	24	Busin <i>et al.</i> , no prelo
<i>Pseudis minuta</i>	<i>P. minuta</i>	24	Busin <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudis aff. minuta</i>	<i>P. cardosoi</i>	28	Busin <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudis paradoxa</i>	<i>P. paradoxa</i>	24	Barrio e Pistol del Rubel, 1970
<i>Pseudis paradoxa paradoxa</i>	<i>P. platensis</i>	24	Busin <i>et al.</i> , no prelo
<i>Pseudis paradoxa platensis</i>	<i>P. platensis</i>	24	Busin <i>et al.</i> , no prelo
<i>Pseudis tocantins</i>	<i>P. tocantins</i>	24•	Busin <i>et al.</i> , no prelo

Continuação

Tribo Dendropsophini – Gênero *Scinax*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
Grupo <i>Scinax catharinae</i>			
<i>Hyla catharinae</i>	<i>S. catharinae</i>	24	Bogart, 1973
<i>Scinax centralis</i>	<i>S. centralis</i>	24	Ribeiro <i>et al.</i> , 2006
<i>Hyla brieri</i>	<i>S. brieri</i>	24	Bogart, 1973
<i>Scinax rizibilis</i>	<i>S. rizibilis</i>	24	Leme <i>et al.</i> , 2004
<i>Scinax trapicheiroi</i>	<i>S. trapicheiroi</i>	24	Leme <i>et al.</i> , 2004
Grupo <i>Scinax perpusillus</i>			
<i>Hyla perpusilla</i>	<i>S. perpusillus</i>	24	Bogart, 1973
Clado <i>Scinax ruber</i>			
Grupo <i>Scinax rostratus</i>			
<i>Hyla boulengeri</i>	<i>S. boulengeri</i>	24	Duellman, 1967
<i>Hyla garbei</i>	<i>S. garbei</i>	24	Bogart e Bogart, 1971
<i>Hyla rostrata</i>	<i>S. rostratus</i>	24	Bogart, 1973
Espécies do clado <i>Scinax ruber</i> não incluídas em nenhum grupo			
<i>Scinax acuminatus</i>	<i>S. acuminatus</i>	24	Cardozo e Baldo, 2006
<i>Scinax alter</i>	<i>S. alter</i>	24	Leme <i>et al.</i> , 2004
<i>Scinax aff. alter</i>	<i>S. alter</i>	24	Leme <i>et al.</i> , 2004

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Hyla cuspidata</i>	<i>S. cuspidatus</i>	24	Foresti, 1972
<i>Hyla duartei</i>	<i>S. duartei</i>	24	Foresti, 1972
<i>Hyla elaeochroa</i>	<i>S. elaeochrous</i>	24	Duellman, 1967; Anderson, 1991
<i>Scinax eurydice</i>	<i>S. eurydice</i>	24	Leme <i>et al.</i> , 2004
<i>Hyla finerea</i>	<i>S. finereus</i>	24	Bogart e Bogart, 1971
<i>Hyla fuscomarginata</i>	<i>S. fuscomarginatus</i>	24	Rabello, 1970; Rabello <i>et al.</i> , 1971
<i>Scinax granulatus</i>	<i>S. granulatus</i>	24	Cardozo e Baldo, 2006
<i>Hyla trachythorax</i>	<i>S. fuscovarius</i>	24	Rabello, 1970
<i>Scinax fuscovarius</i>	<i>S. fuscovarius</i>	24+1B 24	Anderson, 1991; Baldissera Jr e Batistic, 1992; Leme <i>et al.</i> , 2004; Baldissera Jr <i>et al.</i> , 1993; Kasahara <i>et al.</i> , 2003; Cardozo e Baldo, 2006; Trentin <i>et al.</i> , 2007
<i>Hyla hayii</i>	<i>S. hayii</i>	24	Beçak, 1968; Baldissera Jr <i>et al.</i> , 1993; Leme <i>et al.</i> , 2004
<i>Scinax nasicus</i>	<i>S. nasicus</i>	24	Cardozo e Baldo, 2006
<i>Scinax perereca</i>	<i>S. perereca</i>	24	Leme <i>et al.</i> , 2004; Cardozo e Baldo, 2006
<i>Scinax cf. similis</i>	<i>S. similis</i>	24	Leme <i>et al.</i> , 2004
<i>Hyla squalirostris</i>	<i>S. squalirostris</i>	24	Barrio e Pistol de Rubel, 1970; Foresti, 1972; Trentin <i>et al.</i> , 2007
<i>Hyla staufferi</i>	<i>S. staufferi</i>	24	Duellman, 1967; Anderson, 1991
Tribo Dendropsophini – Gênero <i>Sphaenorhynchus</i>			
<i>Sphaenorhynchus planicola</i>	<i>S. planicola</i>	24	Foresti, 1972
Tribo Hylini – Gênero <i>Acris</i>			
<i>Acris crepitans</i>	<i>A. crepitans</i>	22	Bushnell <i>et al.</i> , 1939; Duellman e Cole, 1965; Cole, 1966; Nur e Nuevo, 1969§; Bogart, 1970b§ e1973

Nome utilizado em publicação	Nome Atual	2n	Referência
<i>Acris gryllus</i>	<i>A. gryllus</i>	22	Bushnell <i>et al.</i> , 1939; Anderson, 1991
Tribo Hylini – Gênero <i>Tripriion</i>			
<i>Anothea spinosa</i>	<i>T. spinosa</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Sessions, 1978
<i>Anothea coronata</i>	<i>T. spinosa</i>	24	Duellman e Cole, 1965
<i>Tripriion petasatus</i>	<i>T. petasatus</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Cole, 1974
<i>Tripriion spatulatus</i>	<i>T. spatulatus</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Duellman, 1970+
<i>Tripriion spatulatus reticulatus</i>	<i>T. s. reticulatus</i>	24	Duellman e Cole, 1965
Tribo Hylini – Gênero <i>Charadrahyla</i>			
<i>Hyla chaneque</i>	<i>C. chaneque</i>	24	Duellman, 1970+
Tribo Hylini – Gênero <i>Duellmanohyla</i>			
<i>Duellmanohyla ignicolor</i>	<i>D. ignicolor</i>	24	Duellman e Cole, 1965
<i>Duellmanohyla rufioculis</i>	<i>D. rufioculis</i>	24	Duellman, 1967
<i>Duellmanohyla uranochroa</i>	<i>D. uranochroa</i>	24	León, 1970
Tribo Hylini – Gênero <i>Exerodonta</i>			
Grupo <i>Exerodonta sumichrasti</i>			
<i>Hyla smaragdina</i>	<i>E. smaragdina</i>	24	Duellman, 1970+

Continuação

Tribo Hylini – Gênero *Hyla*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
Grupo <i>Hyla arborea</i>			
<i>Hyla annectans</i>	<i>H. annectans</i>	24	Li <i>et al.</i> , 1981#
<i>Hyla arborea</i>	<i>H. arborea</i>	24	Seto, 1964 §; Morescalchi, 1965#; Ullerich, 1970# ; Schmid 1978; Bogart, 1973; Anderson, 1991; Berset-Brändli <i>et al.</i> , 2006
<i>Hyla. arborea immaculata</i>	<i>H. immaculata</i>	24	Tang <i>et al.</i> , 1984 +
<i>Hyla chinensis</i>	<i>H. chinensis</i>	24	Anderson, 1991
<i>Hyla hallowellii</i>	<i>H. hallowellii</i>	24	Kuramoto <i>et al.</i> , 1974#; Anderson, 1991
<i>Hyla meridionalis</i>	<i>H. meridionalis</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Anderson, 1991
<i>Hyla savignyi</i>	<i>H. savignyi</i>	24	Bogart, 1973; Anderson, 1991
Grupo <i>Hyla cinerea</i>			
<i>Hyla cinerea</i>	<i>H. cinerea</i>	24	Bushnell <i>et al.</i> , 1939; Schmid, 1978 e 1980; Wiley, 1982; Anderson e Moler, 1986; Anderson, 1991; Wiley, 1992
<i>Hyla gratioiosa</i>	<i>H. gratioiosa</i>	24	Bogart, 1973, Wiley, 1982, Anderson, 1991
<i>Hyla squirella</i>	<i>H. squirella</i>	24●	Bogart, 1973; Wiley, 1982; Anderson, 1991; Wiley, 1992
Grupo <i>Hyla eximia</i>			
<i>Hyla andersonii</i>	<i>H. andersonii</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Wasserman, 1970; Wiley, 1982; Anderson e Moler, 1986; Anderson, 1991
<i>Hyla arenicolor</i>	<i>H. arenicolor</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Wasserman, 1970; Anderson, 1991

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Hyla euphorbiacea</i>	<i>H. euphorbiacea</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Anderson, 1991
<i>Hyla eximia</i>	<i>H. eximia</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Anderson, 1991
<i>Hyla japonica</i>	<i>H. japonica</i>	24♦	Yoshida, 1957+; Matsuda, 1963+; Seto, 1964+; Seto e Makino, 1964+; Kuramoto <i>et al.</i> , 1974+; Anderson, 1991; Miura, 1995
<i>Hyla plicata</i>	<i>H. plicata</i>	24	Duellman e Cole, 1965
<i>Hyla suweonensis</i>	<i>H. suweonensis</i>	24	Kuramoto, 1980#
Grupo <i>Hyla versicolor</i>			
<i>Hyla avivoca</i>	<i>H. avivoca</i>	24	Bushnell <i>et al.</i> , 1939; Wiley, 1982; Anderson, 1991
<i>Hyla chrysoscelis</i>	<i>H. chrysoscelis</i>	24	Bogart e Wasserman, 1972#; Bogart, 1973; Wiley, 1982 e 1983+; Wiley <i>et al.</i> , 1989; Anderson, 1991; Wiley, 1992; Wiley e Little, 2000; Wiley, 2003
<i>Hyla versicolor</i>	<i>H. versicolor</i>	2n=4x=48	Bushnell <i>et al.</i> , 1939; Wasserman, 1970; León, 1970; Bogart e Wasserman, 1972#; Wiley, 1982; Wiley <i>et al.</i> , 1989; Anderson, 1991; Wiley, 1992; Wiley e Little, 2000
<i>Hyla femoralis</i>	Espécies de <i>Hyla</i> não incluídas em nenhum grupo <i>Hyla femoralis</i>	24♦	Wiley, 1982; Anderson e Moler, 1986; Anderson, 1991; Wiley, 1992; Wiley, 2003; Schmid e Steinlein, 2003
Tribo Hylini – Gênero <i>Isthmohyla</i>			
Grupo <i>Isthmohyla pictipes</i>			
<i>Hyla lancasteri</i>	<i>I. lancasteri</i>	24	Anderson, 1991

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Hyla pictipes</i>	<i>I. pictipes</i>	24	Duellman, 1970+
<i>Hyla rivularis</i>	<i>I. rivularis</i>	24	León, 1970
<i>Hyla tica</i>	<i>I. tica</i>	24	León, 1970
	Grupo <i>Isthmohyla pseudopuma</i>		
<i>Hyla angustilineata</i>	<i>I. angustilineata</i>	24	León, 1970
<i>Hyla pseudopuma</i>	<i>I. pseudopuma</i>	24	León, 1970
Tribo Hylini – Gênero <i>Plectrohyla</i>			
	Grupo <i>Plectrohyla bistincta</i>		
<i>Hyla arborescens</i>	<i>P. arborescens</i>	24	Duellman e Cole, 1965
<i>Hyla bistincta</i>	<i>P. bistincta</i>	24	Duellman e Cole, 1965
<i>Hyla hazelae</i>	<i>P. hazelae</i>	24	Duellman e Cole, 1965
<i>Hyla pentheter</i>	<i>P. pentheter</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Duellman, 1967
<i>Hyla robertsororum</i>	<i>P. robertsororum</i>	24	Duellman e Cole, 1965
	Grupo <i>Plectrohyla guatemalensis</i>		
<i>Plectrohyla ixil</i>	<i>P. ixil</i>	24	Duellman, 1970+
<i>Plectrohyla sagorum</i>	<i>P. sagorum</i>	24	Duellman, 1970+

Continuação

Tribo Hylini – Gênero <i>Pseudacris</i>			
Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
Clado <i>Pseudacris crucifer</i>			
Grupo <i>Pseudacris crucifer</i>			
<i>Pseudacris crucifer</i>	<i>P. crucifer</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Wiley, 1982
Clado <i>Pseudacris ornata</i>			
<i>Pseudacris ornata</i>	<i>P. ornata</i>	24	Schmid, 1978; Wiley, 1982; Anderson, 1991
<i>Pseudacris streckeri</i>	<i>P. streckeri</i>	24	Bogart, 1973
Clado <i>Pseudacris nigrita</i>			
<i>Pseudacris brachyphona</i>	<i>P. brachyphona</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Anderson, 1991
<i>Pseudacris brimleyi</i>	<i>P. brimleyi</i>	24	Wiley, 1982; Anderson, 1991; Wiley, 1992
<i>Pseudacris clarkii</i>	<i>P. clarkii</i>	24	Bogart, 1973
<i>Pseudacris nigrita</i>	<i>P. nigrita</i>	24	Anderson, 1991; Wiley, 1992
<i>Pseudacris triseriata</i>	<i>P. triseriata</i>	24	Anderson, 1991
<i>Pseudacris triseriata triseriata</i>	<i>P. triseriata</i>	24	Duellman e Cole, 1965
<i>Pseudacris triseriata feriarum</i>	<i>P. feriarum</i>	24	Wiley, 1982
<i>Pseudacris triseriata kalmi</i>	<i>P. kalmi</i>	24	Duellman e Cole, 1965
Clado <i>Pseudacris regilla</i>			
<i>Pseudacris cadaverina</i>	<i>P. cadaverina</i>	24	Maxson e Jameson, 1968
<i>Pseudacris regilla</i>	<i>P. regilla</i>	24	Morescalchi, 1965#; Maxson e Jameson, 1968; Bogart, 1970b+

Continuação

Tribo Hylini – Gênero *Psychohyla*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Psychohyla erythromma</i>	<i>P. erythromma</i>	24	Duellman, 1967
<i>Psychohyla legleri</i>	<i>P. legleri</i>	24	Duellman, 1967
<i>Psychohyla leonhardschultzei</i>	<i>P. leonhardschultzei</i>	24	Duellman, 1970+

Tribo Hylini – Gênero *Smilisca*

<i>Smilisca baudinii</i>	<i>S. baudinii</i>	24	Duellman e Cole, 1965; León, 1970; Bogart, 1973; Cole, 1974; Anderson, 1991
<i>Smilisca cyanosticta</i>	<i>S. cyanosticta</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Duellman e Trueb, 1966+
<i>Pternohyla fodiens</i>	<i>S. fodiens</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Cole, 1974
<i>Smilisca phaeota</i>	<i>S. phaeota</i>	24	Duellman e Trueb, 1966+
<i>Smilisca puma</i>	<i>S. puma</i>	24	Duellman e Trueb, 1966+
<i>Smilisca sila</i>	<i>S. sila</i>	24	Duellman e Trueb, 1966+
<i>Smilisca sordida</i>	<i>S. sordida</i>	24	Duellman e Trueb, 1966+; Bogart, 1973

Tribo Hylini – Gênero *Tlalocohyla*

<i>Hyla loquax</i>	<i>T. loquax</i>	24	Duellman, 1970+
<i>Hyla smithii</i>	<i>T. smithii</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Anderson, 1991

Tribo Lophiohylini - Gênero *Aparasphenodon*

<i>Aparasphenodon brunoi</i>	<i>A. brunoi</i>	24	Foresti, 1972; Bogart, 1973; Kasahara <i>et al.</i> , 2003
------------------------------	------------------	----	--

Continuação

Tribo Lophiohylini - Gênero *Corythomantis*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Corythomantis greeningi</i>	<i>C. greeningi</i>	24	Kasahara <i>et al.</i> , 2003
Tribo Lophiohylini – Gênero <i>Itapoitihyla</i>			
<i>Osteocephalus langsdorffii</i>	<i>I. langsdorffii</i>	24	Foresti, 1972; Kasahara <i>et al.</i> , 2003
Tribo Lophiohylini – Gênero <i>Osteocephalus</i>			
<i>Osteocephalus taurinus</i>	<i>O. taurinus</i>	24	Anderson, 1996
Tribo Lophiohylini – Gênero <i>Osteopilus</i>			
<i>Hyla brunnea</i>	<i>O. brunneus</i>	34	Cole, 1974; Anderson, 1996
<i>Osteopilus dominicensis</i>	<i>O. dominicensis</i>	24	Anderson, 1996
<i>Hyla marianae</i>	<i>O. marianae</i>	24	Anderson, 1996
<i>Hyla septentrionalis</i>	<i>O. septentrionalis</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Bogart, 1973; Cole, 1974; Schmid, 1978 e 1980; Anderson, 1996
<i>Hyla wilderi</i>	<i>O. wilderi</i>	28	Anderson, 1996
Tribo Lophiohylini – Gênero <i>Trachycephalus</i>			
<i>Trachycephalus</i> sp.	<i>Trachycephalus</i> sp.	24	Bogart, 1973
<i>Phrynohyas mesophaea</i>	<i>T. mesophaeus</i>	24	Foresti, 1972
<i>Phrynohyas venulosa</i>	<i>T. venulosus</i>	24	Duellman e Cole, 1965; Rabello, 1970; Bogart e Bogart, 1971; Bogart, 1973; Insaurralde <i>et al.</i> , 1999; Souza <i>et al.</i> , 2007

Continuação

Tribo Lophiohylini - Gênero *Argenteohyla*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Argenteohyla siemersi pederseni</i>	<i>A. siemersi pederseni</i>	24	Morand e Hernando, 1996

Continuação

SUBFAMÍLIA PHYLLOMEDUSINAE

Gênero *Agalychnis*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Agalychnis annae</i>	<i>A. annae</i>	26	León, 1970
<i>Agalychnis callidryas</i>	<i>A. callidryas</i>	26	Duellman e Cole, 1965; León, 1970; Schmid <i>et al.</i> , 1995

Gênero *Cruziohyla*

26 Duellman e Cole, 1965

Gênero *Hylomanitis*

26 León, 1970

Gênero *Pachymedusa*

26 Duellman e Cole, 1965; Cole, 1971#; Schmid, 1980

Gênero *Phyllomedusa*

Grupo *Phyllomedusa burmeisteri*

<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	<i>P. burmeisteri</i>	26	Batistic, 1989
<i>Phyllomedusa distincta</i>	<i>P. distincta</i>	26	Batistic, 1989; Kasahara <i>et al.</i> , 2007
<i>Phyllomedusa iheringii</i>	<i>P. iheringii</i>	26	Batistic, 1989
<i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	<i>P. tetraploidea</i>	2n=4x=52	Beçak <i>et al.</i> , 1970; Barrio, 1976; Batistic, 1989; Kasahara <i>et al.</i> , 2007; Batistic <i>et al.</i> , 1975

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
Grupo <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>			
<i>Phyllomedusa ayeaye</i>	<i>P. ayeaye</i>	26	Batistic, 1989
<i>Phyllomedusa azurea</i>	<i>Phyllomedusa azurea</i>	26	Barrio, 1976; Souza <i>et al.</i> , 2007
<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	<i>P. hypochondrialis</i>	26	Foresti, 1972; Batistic, 1989
<i>Phyllomedusa nordestina</i>	<i>P. nordestina</i>	26	Barth <i>et al.</i> , 2007
<i>Phyllomedusa palliata</i>	<i>P. palliata</i>	26	Bogart, 1970a e 1970b+; Bogart, 1973
<i>Phyllomedusa rohdei</i>	<i>P. rohdei</i>	26	Batistic, 1989
Grupo <i>Phyllomedusa tarsius</i>			
<i>Phyllomedusa tarsius</i>	<i>P. tarsius</i>	26	Bogart, 1973
<i>Phyllomedusa venusta</i>	<i>P. venusta</i>	26	Duellman, 1970§
Especies de <i>Phyllomedusa</i> não incluídas em nenhum grupo			
<i>Phyllomedusa tomoderna</i>	<i>P. tomoderna</i>	26	Batistic, 1989
<i>Phyllomedusa pailona</i>	<i>P. boliviana</i>	26	Barrio, 1976
<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	<i>P. sauvagii</i>	26	Barrio, 1976

Continuação

SUBFAMÍLIA PELODRYADINAE

Gênero *Litoria*

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Litoria adelaidensis</i>	<i>L. adelaidensis</i>	26	King, 1980
<i>Litoria amboinensis</i>	<i>L. amboinensis</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria angiana</i>	<i>L. angiana</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria arfakiana</i>	<i>L. arfakiana</i>	26	Menzies e Tippet, 1976; Kuramoto e Allison, 1991
<i>Litoria aurea</i>	<i>L. aurea</i>	26	King, 1980
<i>Litoria bicolor</i>	<i>L. bicolor</i>	26	Morescalchi, 1968§; Menzies e Tippet, 1976; King, 1980
<i>L. booroolongensis</i>	<i>L. booroolongensis</i>	26	Donnellan e Mahony, 2004
<i>Litoria caerulea</i>	<i>L. caerulea</i>	26	Stephenson e Stephenson, 1970§; Menzies e Tippet, 1976; King, 1980; King <i>et al.</i> , 1979§; King, 1990
<i>Litoria chloris</i>	<i>L. chloris</i>	26	Morescalchi e Ingram, 1974§; King, 1980
<i>Litoria citropa</i>	<i>L. citropa</i>	26	King, 1980; King, 1990§
<i>Litoria congenita</i>	<i>L. congenita</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria contrastens</i>	<i>L. contrastens</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria cooloolensis</i>	<i>L. cooloolensis</i>	26	King, 1980
<i>Litoria coplandi</i>	<i>L. coplandi</i>	26	King, 1980; King, 1990§
<i>Litoria cyclorhynchus</i>	<i>L. cyclorhynchus</i>	26	King, 1980
<i>Litoria dahlui</i>	<i>L. dahlui</i>	26	Tyler <i>et al.</i> , 1978§; King, 1980

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Litoria darlingtoni</i>	<i>L. darlingtoni</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria dentata</i>	<i>L. dentata</i>	26	Morescalchi, 1979; King, 1980; King, 1990§
<i>Litoria eucnemis</i>	<i>L. eucnemis</i>	26	King, 1980; King, 1990§
<i>Litoria ewingii</i>	<i>L. ewingii</i>	26	King, 1980
<i>Litoria fallax</i>	<i>L. fallax</i>	26	King, 1980
<i>Litoria freycineti</i>	<i>L. freycineti</i>	26	King, 1980
<i>Litoria genimaculata</i>	<i>L. genimaculata</i>	24	Menzies e Tippet, 1976; King, 1980
<i>Litoria gracilentia</i>	<i>L. gracilentia</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria impura</i>	<i>L. impura</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria inermis</i>	<i>L. inermis</i>	26	King, 1980
<i>Litoria infrafenata</i>	<i>L. infrafenata</i>	24	Menzies e Tippet, 1976; King, 1980
<i>Litoria jervisiensis</i>	<i>L. jervisiensis</i>	26	King, 1980
<i>Litoria jungguy</i>	<i>L. jungguy</i>	26	Donnellan e Mahony, 2004
<i>Litoria latopalmata</i>	<i>L. latopalmata</i>	26	Bogart, 1973; King, 1980
<i>Litoria lesueurii</i>	<i>L. lesueurii</i>	26	King, 1980; Donnellan e Mahony, 2004
<i>Litoria meiriana</i>	<i>L. meiriana</i>	26	King, 1980
<i>Litoria microbelos</i>	<i>L. microbelos</i>	26	King, 1980
<i>Litoria modica</i>	<i>L. modica</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria moorei</i>	<i>L. moorei</i>	26	King, 1980

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Litoria nannotis</i>	<i>L. nannotis</i>	26	King, 1987
<i>Litoria nasuta</i>	<i>L. nasuta</i>	26	Morescalchi e Ingram, 1974§; Menzies e Tippet, 1976; King, 1980
<i>Litoria nigrofrenata</i>	<i>L. nigrofrenata</i>	26	King, 1980
<i>Litoria nigropunctata</i>	<i>L. nigropunctata</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria olongburensis</i>	<i>L. olongburensis</i>	26	King, 1980
<i>Litoria pearsoniana</i>	<i>L. pearsoniana</i>	26	King, 1980
<i>Litoria peronii</i>	<i>L. peronii</i>	26	King, 1980
<i>Litoria phyllochroa</i>	<i>L. phyllochroa</i>	26	King, 1980
<i>Litoria pygmaea</i>	<i>L. pygmaea</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria raniformis</i>	<i>L. raniformis</i>	26	King, 1980
<i>Litoria rheocola</i>	<i>L. rheocola</i>	26	King, 1980
<i>Litoria rothii</i>	<i>L. rothii</i>	26	King, 1980
<i>Litoria rubella</i>	<i>L. rubella</i>	26	Menzies e Tippet, 1976; King, 1980
<i>Litoria splendida</i>	<i>L. splendida</i>	26	King, 1980
<i>Litoria thesaurensis</i>	<i>L. thesaurensis</i>	26	Menzies e Tippet, 1976; Kuramoto e Allison, 1991
<i>Litoria timida</i>	<i>L. timida</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Litoria tornieri</i>	<i>L. tornieri</i>	26	King, 1980
<i>Litoria verreauxii</i>	<i>L. verreauxii</i>	26	King, 1980

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Litoria vocivincens</i>	<i>L. vocivincens</i>	26	Menzies e Tippet, 1976§
<i>Litoria wilcoxii</i>	<i>L. wilcoxii</i>	26	Donnellan e Mahony, 2004
<i>Litoria woljulumensis</i>	<i>L. woljulumensis</i>	26	King, 1980§
<i>Litoria wollastoni</i>	<i>L. wollastoni</i>	26	Menzies e Tippet, 1976§; Kuramoto e Allison, 1991
<i>Litoria alboguttata</i>	<i>L. alboguttata</i>	26	Morescalchi e Ingram, 1974+; King, 1980
<i>Cyclorana australis</i>	<i>L. australis</i>	26	Morescalchi, 1979; King <i>et al.</i> , 1979#
<i>Cyclorana brevipes</i>	<i>L. brevipes</i>	26	Morescalchi, 1979; King <i>et al.</i> , 1979#
<i>Cyclorana cryptotis</i>	<i>L. cryptotis</i>	26	King <i>et al.</i> , 1979#
<i>Cyclorana longipes</i>	<i>L. longipes</i>	26	King <i>et al.</i> , 1979#
<i>Cyclorana maini</i>	<i>L. maini</i>	26	King <i>et al.</i> , 1979#
<i>Cyclorana novaehollandiae</i>	<i>L. novaehollandiae</i>	26	King <i>et al.</i> , 1979; King, 1990
<i>Cyclorana platycephalus</i>	<i>L. platycephala</i>	26	King <i>et al.</i> , 1979#; King, 1985§
<i>Cyclorana verrucosus</i>	<i>L. verrucosa</i>	26	King <i>et al.</i> , 1979#
<i>Nyctimystes cheesmani</i>	<i>L. cheesmanae</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Nyctimystes daymani</i>	<i>L. daymani</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Nyctimystes foricula</i>	<i>L. foricula</i>	26	Duellman, 1967; Kuramoto e Allison, 1991
<i>Nyctimystes humeralis</i>	<i>L. humeralis</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Nyctimystes kubori</i>	<i>L. kubori</i>	26	Duellman, 1967; Menzies e Tippet, 1976
<i>Nyctimystes montana</i>	<i>L. montana</i>	26	Menzies e Tippet, 1976
<i>Nyctimystes gr. montana</i>	<i>L. gr. montana</i>	26	Menzies e Tippet, 1976

Continuação

Nome utilizado em publicação	Nome atual	2n	Referência
<i>Nyctimystes papua</i>	<i>L. papua</i>	26	Duellman, 1967; Menzies e Tippet, 1976
<i>Nyctimystes pulchra</i>	<i>L. pulchra</i>	26	Kuramoto e Allison, 1991
<i>Nyctimystes semipalmata</i>	<i>L. semipalmata</i>	26	Duellman, 1967

Símbolos

- Relato de cromossomos sexuais do tipo ZZ:ZW
- ♦Relato de cromossomos sexuais do tipo XX:XY
- §Revisão em King, 1990
- +Revisão em Kuramoto, 1990
- #Revisão em King (1990) e Kuramoto (1990)

Referências Bibliográficas

- ANANIAS, F. **Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 101 p., 1996.
- ANANIAS, F., GARCIA, P. C. A., RECCO-PIMENTEL, S. M. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas** **140**: 42-48, 2004.
- ANDERSON, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. In: D. M. Green and S. K. Sessions eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego, p. 299-331, 1991.
- ANDERSON, K. A karyological perspective on the monophyly of the hylid genus *Osteopilus*. In: R. Powell and R. W. Henderson eds. **Contributions to West Indian Herpetology: A Tribute to Albert Schwartz**. Society for the study of amphibians and reptiles, Ithaka, NY, 157-168. 1996.
- ANDERSON, K., MOLER P. E. Natural hybrids of the pine barrens treefrog, *Hyla andersonii* with *H. cinerea* and *H. femoralis* (Anura, Hylidae): morphological and chromosomal evidence. **Copeia** **1**: 70-76, 1986.
- BALDISSERA Jr., F. A., BATISTIC, R. F. Estudos citogenéticos em banda C e RON de algumas espécies de anuros brasileiros. In: **5º Congresso Latinoamericano de Genética**. Rev. Bras. Genet. v. 15, p. 78 (supl.), 1992.
- BALDISSERA, Jr F. A, OLIVEIRA, P. S. L., KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Bras. Genet.** **16**: 335-345, 1993.
- BARRIO, A. Estudio cariotipico y analisis audioespectrografico de los cantos de las especies de *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae) que habitan en la Argentina. **Physis** **35**: 65-74, 1976.

- BARRIO, A. D., PISTOL DE RUBEL, D. Características del cariotipo de los pseudidos. **Physis** **29**: 505-510, 1970.
- BARTH, A., SOLÉ, M., COSTA, M. A. Polimorfismos cromossômicos em uma população de *Phyllomedusa nordestina* (Anura, Hylidae). In: **53º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, SP, CD-ROM, P. 55, 2007.
- BATISTIC, R. F. Citogenética e evolução em anfíbios anuros. **Cienc. Cult.** **36**: 45-51, 1984.
- BATISTIC, R. F. **Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura – Amphibia)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 203 p., 1989.
- BATISTIC, R. F., SOMA, M., BEÇAK, M. L., BEÇAK, W. Further studies on polyploid amphibians. A diploid population of *Phyllomedusa burmeisteri*. **J. Hered.** **66**: 160-162, 1975.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia** **21**: 191-208, 1968.
- BEÇAK, M. L., DENARO, L., BEÇAK, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. **Cytogenetics** **9**: 225-238, 1970.
- BERSET-BRÄNDLI, L., JAQUIÉRY, J., DUBEY, S., PERRIN, N. A sex-specific marker reveals male heterogamety in European tree frogs. **Mol. Biol. Evol.** **23**: 1104–1106, 2006.
- BOGART, J. P., BOGART, J. E. Genetic compatibility experiments between some south american anuran amphibians. **Herpetologica** **27**: 229-235, 1971.
- BOGART, J. Los cromosomas de anifíbios anuros del género *Eleutherodactylus*. **Act. IV Congr. Latin. Zool.** **1**: 65-78, 1970a.
- BOGART, J. Cromosomas en algunos géneros de anuros. **Act. IV Congr. Latin. Zool.** **1**: 79-86, 1970b.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. In: J. L. Vial ed. **Evolutionary Biology of Anurans**. Univ. Missouri Press, Columbia, p. 337-349, 1973.
- BOGART, J. P., WASSERMAN, A. O. Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. **Cytogenetics** **11**: 7-24, 1972.
- BONFIM, C. G. L., CORREIA, P. S., PEREIRA, R. A., ANDRADE, J. M., ANDRADE, K.

- A. O., AGUILAR, L. A. In: **53º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, SP, CD-ROM, p. 374, 2007.
- BUSHNELL, R. J., BUSHNELL, E. P., PARKER, M. V. A chromosome study of five members of the famliy Hylidae. **J. Tennes. Acad. Science** **14**: 209-215, 1939.
- BUSIN, C. S., VINCIPROVA, G., RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica** **110**: 131-141, 2001.
- BUSIN, C. S., LIMA, A. P., PRADO, C. P. A., STRÜSSMANN, C., SIQUEIRA Jr., S., RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). **Micron** **37**: 355–362, 2006.
- BUSIN, C. S., ANDRADE, G. V., BERTOLDO, J. DEL GRANDE, M. L., UETANABARO, M., RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. **Genetica**. versão on-line, 2007.
- CAMPOS, J. R. C., BRUNAIKOVICS, C. D., YAMAMOTO, M. A. M., SILVA, A. P. Z., ANANIAS, F. Estudos citogenéticos da anurofauna do Parque Natural Municipal da Serra do Itapety. In: **25º Congresso Brasileiro de Zoologia**, Brasília, DF, Livro Resumos, p. 203, 2004.
- CARDOZO, D, BALDO, D. Cariología de 5 especies de *Scinax* Wagler, 1830 del clado *Scinax ruber*. In: **52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética**, Foz de Iguaçu, PR, CD-ROM, p.319, 2006.
- CARVALHO, K. A. **Citogenética comparativa de espécies de *Aplastodiscus* e do grupo de *Hyla albomarginata* (Hylidae, Anura)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 80 p., 2005.
- CATROLI, G. F.; CAMPOS, J.R.C, HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Análise comparativa dos cariótipos de três espécies de anfíbios do grupo de *Hypsiboas faber* (Anura, Hylidae), com o uso de técnicas de marcação cromossômica. In: **52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética**, Foz de Iguaçu, PR, CD-ROM, p.333, 2006.
- CATROLI, G. F., FAIVOVICH, J., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Diferenças cariotípicas em espécies do grupo morfológico de *Bokermannohyla circumdata* e *Bokermannohyla pseudopseudis* (Anura, Hylidae). In **53º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, SP, CD-ROM, p.169, 2007.
- COLE, C. J. The chromosomes of *Acris crepitans blachardi* Harper (Anura: Hylidae). **Copeia**

- 1966: 578-580, 1966.
- COLE, C. J. Chromosomes of the hylid frog, *Phyllomedusa dacnicolor* Cope. **Herpet. Rev.** **3**: 37-38, 1971.
- COLE, C. J. Chromosome evolution in selected treefrogs, including casque-headed species (*Pternohyla*, *Tripurion*, *Hyla*, and *Smilisca*). **Am. Mus. Novitates** **2541**: 1-10, 1974.
- DONNELLAN, S. C., MAHONY, M. J. Allozyme, chromosomal and morphological variability in the *Litoria lesueuri* species group (Anura: Hylidae), including a description of a new species. **Aust. J. Zool.** **52**: 1-28, 2004.
- DUELLMAN, W. E. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. **Syst. Zool.** **16**: 38-43, 1967.
- DUELLMAN, W. E. The hylid frogs of Middle America. **Monogr. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas** **1**, 753 p., 1970.
- DUELLMAN, W. E., COLE, C. J. Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). **Syst. Zool.** **14**: 139-143, 1965.
- DUELLMAN, W. E., TRUEB, L. Neotropical hylid frogs, genus *Smilisca*. **Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. Publ.** **17**: 281-375, 1966.
- DUELLMAN, W. E., TRUEB, L. Frogs of the *Hyla columbiana* group: taxonomy and phylogenetic relationships. In: A. G. J. Rhodin and K. Miyata eds. **Advances in Herpetology and Evolutionary Biology**. Harvard University, Cambridge, p. 33-51, 1983.
- FORESTI, F. **Aspectos cromossômicos da família Hylidae** (Amphibia-Anura). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, 80 p., 1972.
- GRUBER S. L. **Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (Anura, Hylidae) dos grupos com 2n=24 e 2n=30, com técnicas de coloração diferencial**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, 132 p., 2002.
- GRUBER, S. L., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Evaluating the diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with 2n = 30 chromosomes based on the analysis of ten species. **Folia Biologica** **51**: 68-75, 2005.
- GRUBER, S. L., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of 2n=24 to 2n=22 in the genus. **Genetica** **130**: 281-291, 2007.

- INSAURRALDE, D. R., BALDO, J. D., FENOCCHIO, A. S., PASTORI, M. C. Relevamiento cariotípico de la herpetofauna de la provincia de Misiones. Argentina. **Genet. Mol. Biol.** v. 22, p. 76 (supl.), 1999.
- KAISER, H., MAIS, C., BOLAÑOS, F., STEINLEIN, C., FEICHTINGER, W., SCHMID, M. Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica** 98: 95-102, 1996.
- KASAHARA, S., SILVA, A. P. Z., HADDAD, C. F. B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). **Braz. J. Genet.** 19: 237-242, 1996.
- KASAHARA, S., SILVA, A. P. Z., GRUBER, S. L., HADDAD, C. F. B. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. **Cytogenet. Genome Res.** 103: 155-162, 2003.
- KASAHARA, S., CAMPOS, J. R. C., CATROLI, G. F., HADDAD, C. F. B. Cytogenetics of *Phyllomedusa distincta* ($2n=2x=26$), *Phyllomedusa tetraploidea* ($2n=4x=52$) and their triploid hybrids ($2n=3x=39$). In: **16th International Chromosome Conference**, Amsterdam, Netherlands, Chromosome research, v. 15, p. 10 (Supl.2), 2007.
- KING, M., TYLER, M. J., DAVIES, M., KING, D. Karyotypic studies on *Cyclorana* and associated genera of australian frogs. **Aust. J. Zool.** 27: 699-708, 1979.
- KING, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** 80: 191-217, 1980.
- KING, M. A cytotaxonomic analysis of Australian hylid frogs of the genus *Litoria*. In: C. B. Banks and A. A. Martin eds. **A cytotaxonomic analysis of australian hylid frogs of the genus Litoria**, Melbourne, Australia, p. 169-175, 1980.
- KING, M. Chromosome markers and their use in phylogeny and systematic. In: G. Grigg, R. Shine e H. Ehmann eds. **Biology of Australasian Frogs and Reptiles**. Surrey, Beatty and Sons, Sydney, p. 165-175, 1985.
- KING, M. Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. **Heredity** 59: 1-6, 1987.
- KING, M. Amphibia. In: B. John and C. Gwent eds. **Animal Cytogenetics**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, v. 4, p. 1-241, 1990.
- KURAMOTO, M., FURUYA, M., TAKEGAMI, M., YANO, K. Karyotypes of several species of frogs from Japan and Taiwan. **Bul. Fukuoka Univ. Ed.** 23: 67-78, 1974.
- KURAMOTO, M. Mating calls of treefrogs (genus *Hyla*) in the far east, with description of a

- new species from Korea. **Copeia** **1980**: 100-108, 1980.
- KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. **Bul. Fukuoka Univ. Ed.** **39**: 83-127, 1990.
- KURAMOTO, M., ALLISON, A. Karyotypes of five hylid frogs from Papua New Guinea, with a discussion on their systematic implications. **Japan. J. Herpet.** **14**: 6-11, 1991.
- LEME, D. M., BORTOLETO, J. F., GRUBER, S. L., HADDAD, C. F. B., KASAHARA, S. Avaliação dos padrões cariotípicos no gênero *Scinax* (Hylidae, Anura), baseada na análise de nove espécies. In: **XXV Congresso Brasileiro de Zoologia**, Brasília, DF, Livro de Resumos, p. 203, 2004.
- LEÓN, P. E. Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. **Rev. Biol. Trop.** **17**: 119-124, 1970.
- MATSUDA, K. Culture techniques with some amphibian tissues and a chromosome study of the tree frog, *Hyla arborea japonica*. **Zool. Mag.** **72**: 105-109, 1963.
- MAXSON, L. R., JAMESON, D. L. A comparison of the chromosomes of *Hyla regilla* and *Hyla californiae*. **Copeia** **1968**: 704-707, 1968.
- MEDEIROS, L. R., ROSSA-FERES, D. C. E., RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with description of NOR polymorphism in *H. nana*. **J. Hered.** **94**: 149-154, 2003.
- MEDEIROS, L. R., ROSSA-FERES, D. C., JIM, J., RECCO-PIMENTEL, S. M. B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). **Genet. Mol. Biol.** **29**: 257-262, 2006.
- MENZIES, J. I., TIPPETT, J. Chromosome numbers of Papuan hylid frogs and the karyotype of *Litoria infrafrenata* (Amphibia, Anura, Hylidae). **J. Herpet.** **10**: 167-173, 1976.
- MIURA, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). **Chromosoma** **103**: 567-574, 1995.
- MORESCALCHI, A. Amphibia. In: A. B. Chiarelli and G. Capanna eds. **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution**. Academic Press, London e New York, p. 233-348, 1973.
- MORESCALCHI, A. Il corredo cromosomico di *Hyla arborea arborea* (L.) e di *Hyla regilla* Baird and Girard: il problema dei cromosomi sessuali e l'evoluzione del cariotipo di *Hyla*. **Caryologia** **18**: 193-206, 1965.
- MORESCALCHI, A. Hypotheses on the phylogeny of the Salientia, based on karyological data. **Experientia** **24**: 964-966, 1968.

- MORESCALCHI, A., INGRAM, G. J. New chromosome numbers in Australian Leptodactylidae (Amphibia, Salienta). **Experientia** **30**: 1134-1136, 1974.
- MORESCALCHI, A. New developments in vertebrates cytotaxonomy. **Genetica** **50**: 179-193, 1979.
- MORAND, M., HERNANDO, A. Cariotipo y region organizadora del nucleolo en *Argenteohyla siemersi pedersenii* (Anura: Hylidae). **FACENA** **12**: 141-144, 1996.
- NEVES, F. J., SILVA, D. M., RIBEIRO, M. S., SILVA, D. M., RONCATO, R. P., SILVA, W. V., BASTOS, R. P., DA CRUZ, A. D. Caracterização citogenética das espécies *Hypsiboas goianus* e *Dendropsophus soaresi* (Anura, Hylidae), do Brasil Central. In: **52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congresso de la Asociación Latinoamericana de Genética**, Foz de Iguaçu, PR, CD-ROM, p.112, 2006.
- NUR, U., E. NEVO. Supernumerary chromosomes in the cricket frog *Acris crepitans*. **Caryologia** **22**: 97-102, 1969.
- POMBAL Jr., J. P., HADDAD, C. F. B. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia: Hylidae). **Rev. Bras. Biol.** **52**: 217-229, 1992.
- RABELLO, M. N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia** **23**: 45-59, 1970.
- RABELLO, M. N., BEÇAK, M. L., BEÇAK, W. Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. **Arq. Mus. Nac.** **54**: 285-286, 1971.
- RABER, S. C., CARVALHO, K. A., GARCIA, P. C. A., VINCIPROVA, G., RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). **Phyllomedusa** **3**: 43-49, 2004.
- RIBEIRO, M. S., SILVA, D. M., SILVA, D. M., NEVES, F. J., PEREIRA, R. R., BASTOS, R. P., SILVA, W. V., DA CRUZ, A. D. Caracterização citogenética de *Scinax centralis*. In: **52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congresso de la Asociación Latinoamericana de Genética**, Foz de Iguaçu, PR, CD-ROM, p. 204, 2006.
- SAEZ, F. A., BRUM. N. Chromosomes of South American amphibians. **Nature** **185**: 945, 1960.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** **66**: 361-388, 1978.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia IV. Differentiation of GC- e AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** **77**: 83-103, 1980.

- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Amphibia. **Chromosoma** **87**: 327-344, 1982.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C. Chromosome banding in Amphibia XXIX. The primitive XY/XX sex chromosomes of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Genome Res.** **101**: 74-79, 2003.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., NANDA, I., EPPLEN J. T. In: E. Olmo ed. Chromosome banding in Amphibia. **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**, Birkhauser Verlag, Basel, p. 21-45, 1990.
- SCHMID, M., NANDA, I., STEINLEIN, C., KAUSCH, K., EPPLEN, J. T., HAAF, T. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. In: D. M. Green and S. K. Sessions eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego, p. 393-430, 1991.
- SCHMID, M., FEICHTINGER, W., WEIMER, R., MAIS, C., BOLAÑOS, F., LEÓN, P. Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** **69**: 18-26, 1995.
- SESSIONS, S. K. The chromosomes of *Anotheca spinosa* (Stejneger), family Hylidae. **Herpetologica** **34**: 70-73, 1978.
- SETO, T. The karyotype of *Hyla arborea japonica* with some remarks on heteromorphism of the sex chromosome. **J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI**, **15**: 366-373, 1964.
- SETO, T., MAKINO, S. On the heteromorphism in an autosomal pair in the Japanese tree frog. **Proc. Jap. Acad.** **40**: 862-865, 1964.
- SKUK, G., LANGONE, J. A. Comunicación preliminar sobre la citogenetica de *Hyla microcephala meridiana* B. Lutz, 1954 (Anura: Hylidae). In: **XIII Congresso Brasileiro de Zoologia**, Livro de Resumos, p.165, 1986.
- SKUK, G., LANGONE, J. A. Los cromosomas de cuatro especies del género *Hyla* (Anura, Hylidae) con un número diploide de $2n = 30$. **Acta Zool. Lill.** **41**: 165-171, 1992.
- SOUZA, I. M. C., PEREIRA, N. P., VAZ-SILVA, W., BASTOS, R. P., SILVA, D. M., PELLEGRINO, K. C. M. Cariótipo e regiões organizadoras de nucléolo em seis espécies de anuros do cerrado do estado de Goiás. In: **53º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, SP, CD-ROM, p. 143, 2007.
- STEPHENSON, E. M., STEPHENSON, N. G. Karyotypes of two Australian hylids. **Chromosoma** **30**: 38-50, 1970.
- TANG, X., WANG, X., FANG, J. Preliminary observations on karyotype of *Hyla arborea*

- immaculata*. **Acta Zool. Sin.** **3**: 37-40, 1984.
- TRENTIN, L. A., TAFURI, R., ZANELLA, N., BUSIN, C. S. Caracterização cromossômica de duas espécies do gênero *Scinax* do grupo *Scinax ruber* (Anura, Hylidae). In: **53º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, SP, CD-ROM, p. 322, 2007.
- TYLER, M. J., DAVIES, M., KING, M. The Australian frog, *Chiroleptes dahlii* Boulenger: its systematic position, morphology, chromosomes and distribution. **Trans. Roy. Soc. S. Aust.** **102**: 17-23, 1978.
- ULLERICH, F. H. DNS-Gehalt and Chromosomenstruktur bei Amphibien. **Chromosoma** **30**: 1-37, 1970.
- WASSERMAN, A. O. Polyploidy in the common tree toad *Hyla versicolor* Le Conte. **Science**, **167**: 385-386, 1970.
- WILEY, J. E. Chromosome banding patterns of treefrogs (Hylidae) of the eastern United States. **Herpetologica** **38**: 507-520, 1982.
- WILEY, J. E. Chromosomes polymorphism in *Hyla chrysoscelis*. **Copeia** **1983**: 273-275, 1983.
- WILEY, J. E. Replication banding and FISH analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. **Cytogenet. Genome Res.** **101**: 80-83, 2003.
- WILEY, J. E., LITTLE, M. L., ROMANO, M. A., BLOUNT, D. A., CLINE, G. R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. **Chromosoma** **97**: 481-487, 1989.
- WILEY, J. E., LITTLE, M. L. Replication banding patterns of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Cytogenet. Cell Genet.** **88**: 11-14, 2000.
- YOSHIDA, T. H. Sex chromosomes of the tree frog, *Hyla arborea japonica*. **J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI**, **13**: 352-358, 1957.