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

Diversidade cariotípica e molecular de *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) e obtenção de sondas cromossomo-específicas de anfíbio por citometria de fluxo

THIAGO GAZONI

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

Agosto - 2015

Diversidade cariotípica e molecular de *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) e obtenção de sondas cromossomo-específicas de anfíbio por citometria de fluxo

Thiago Gazoni

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

Co-orientador: Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad

Agosto – 2015

597.8 Gazoni, Thiago
G291d Diversidade cariotípica e molecular de Leptodactylus (Anura,
Leptodactylidae) e obtenção de sondas cromossomo-específicas de anfíbio
por citometria de fluxo / Thiago Gazoni. - Rio Claro, 2015
85 f. : il., figs., tabs., fots., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Patricia Pasquali Parise Maltempi
Coorientador: Célio Fernando Baptista Haddad

1. Anuro. 2. Citogenética. 3. Genética animal. 4. Cromossomos
sexuais múltiplos. 5. Cadeia meiótica. 6. Xenopus tropicalis. I. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

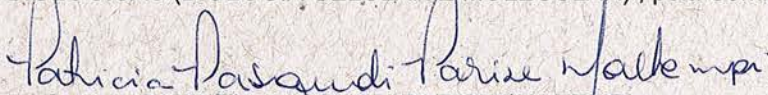
TÍTULO: Diversidade cariotípica e dados moleculares de *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) e obtenção de sondas cromossomo-específicas de anfíbio por citometria de fluxo

AUTOR: THIAGO GAZONI

ORIENTADORA: Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CÉLIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD

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



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



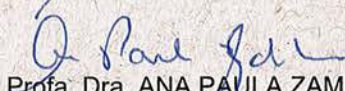
Profa. Dra. LUCIANA BOLSONI LOURENÇO

Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. MATEUS MONDIN

Departamento de Genética / Universidade de São Paulo



Profa. Dra. ANA PAULA ZAMPIERI SILVA DE PIETRI

Pós Doutoranda do Departamento de Metodologia do ensino e educação comparada /
Universidade de São Paulo



Profa. Dra. CARLA SANTANA CASSINI

Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Estadual de Santa Cruz

Data da realização: 13 de agosto de 2015.

***A curiosidade científica é o que nos move, em meio a um universo de
desilusões.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi, pela oportunidade, apoio e incentivo constantes, amizade, compreensão e paciência.

Ao Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad, pela co-orientação, amizade, confiança, e todo apoio prestado.

Ao Instituto de Biociências e aos Departamentos de Biologia e de Zoologia, pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos, sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

À Capes, pela bolsa de Doutorado concedida.

Ao CNPq e ao Programa Ciência Sem Fronteiras, pelo suporte financeiro concedido para a realização de Doutorado Sanduíche na Universidade de Cambridge, na Inglaterra.

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

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

Ao Prof. Dr. Malcolm Andrew Ferguson-Smith e ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge, pela oportunidade e pela estrutura laboratorial oferecida para a realização de parte dos experimentos.

Ao colaborador técnico do Professor Malcolm, Jorge Pereira, pelo imprescindível auxílio.

À Dra. Mariana Lyra, pela amizade, entusiasmo e boa vontade ao ajudar com seus conhecimentos, o que só poderia resultar em uma produtiva parceria.

À Profa. Dra. Christine Strüssmann, pela amizade e colaboração, e por suas valiosas sugestões de investigação.

À Profa. Dra Sanae Kasahara e ao Dr. João Reinaldo da Cruz Campos, pela amizade, e pela minha iniciação na citogenética de anfíbios anuros, continuando seu apoio durante a realização deste trabalho.

À Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri, responsável por minha introdução nos estudos do gênero *Leptodactylus*.

A todos que ajudaram em algum momento com as coletas de espécimes em campo: Carl, Juliano, Natália Sales, Maurício Arruda, Fábio Maffei, Willian Costa, e principalmente, ao Hideki Narimatsu, “japonês arretado,” pela parceria na maioria dos trabalhos de campo e por sua amizade.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Biologia, Gerson Mello Souza e Mônica Lamonte, e do Departamento de Zoologia, Nádia Carolina Pupin, por toda ajuda prestada e simpatia.

Aos professores do Departamento de Biologia, pela amizade e pelas ótimas aulas, especialmente aos Professores Dr. Diogo C. Cabral-de-Mello, Dra. Karen, Dra. Maria A. Marin Morales, Dra. Maria Izabel de Souza, Dra. Ana Maria Costa Leonardo e Dra. Carmem Christofolletti, pela amizade e gentileza ao cederem suas estruturas laboratoriais para a realização de alguns dos experimentos, e à Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, da Universidade de São Paulo, pela ajuda com alguns testes em cultura de células.

À coordenadora do Programa de Biologia Celular e Molecular Maria Izabel de Souza, e à Seção de Pós-Graduação, em especial à Rosemary Cardoso e ao Felipe, pela constante atenção e ajuda ao resolver questões burocráticas.

À secretária do Departamento de Biologia, Cristiane Miléo, pela simpatia, amizade e boa vontade ao ajudar.

Aos colegas Pós-Graduandos e de Iniciação Científica do Departamento, pelo agradável convívio e troca de experiências, com especial agradecimento à Nathália Dorigon, aluna de Iniciação Científica, pela ajuda em algumas das análises.

Aos alunos, ex-alunos e colaboradores do Laboratório de Herpetologia, especialmente ao Daniel, Victor, Carla, Francisco, Julián, Délio, Ariadne, Fábio, Thaís, Eli, Lucas, Paulo, Pedro pela ajuda, dicas e identificação de espécimes.

À minha primeira e melhor professora de Ciências, minha mãe, Célia ao meu pai, Roberto, e aos meus irmãos, Thaís e Juliano, pelo amor, pela confiança e apoio em minhas decisões.

À Weilan Gomes da Paixão Melo, pelo companheirismo, até mesmo em várias das coletas de espécimes, e compreensão nos momentos em que estive ausente.

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

Aos meus queridos amigos de graduação, que estão sempre por perto, apoiando: Ives, Edmara, Dani, especialmente ao José Roberto, ao Sérgio e à Amarílis, por toda ajuda prestada, incluindo apoio em algumas das coletas, e às amizades construídas ao longo dos últimos anos.

A todo o grupo de citogeneticistas de anfíbios anuros da UNICAMP, pela amizade, conversas produtivas, troca de protocolos, etc.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade, principalmente aos revisores anônimos dos projetos propostos.

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

Carl Sagan

Resumo

O gênero *Leptodactylus* compreende, atualmente, 74 espécies distribuídas na Região Neotropical, das quais 57 foram relatadas no Brasil. Fatores como a alta similaridade morfológica, bem como a carência de dados diversificados de diferentes populações, refletem no status taxonômico confuso para alguns dos representantes do gênero. Avanços nessa questão foram obtidos através do aumento de estudos, principalmente aqueles envolvendo comparação de dados moleculares mas, muitas vezes, não foram analisados espécimes coletados em localidade tipo, fundamental para a avaliação da real diversidade de espécies, considerada subestimada para os anfíbios anuros em geral. Além da importância da citogenética em diferentes aspectos referentes à organização genômica, bem como na identificação de sistemas de determinação cromossômica do sexo, diferentes dados citogenéticos têm se mostrado uma importante ferramenta para o estudo de anuros, permitindo, pela comparação das variações cromossômicas, a identificação de espécies crípticas, principalmente quando aliados a informações moleculares, zoológicas e ecológicas. Entre os objetivos do presente trabalho destacam-se a busca por variações cariotípicas que auxiliem na elucidação de problemas de taxonomia e sistemática no gênero *Leptodactylus*, pelo emprego de técnicas de citogenética clássica e molecular, bem como a obtenção de sondas cromossomo-específicas para procedimentos de pintura cromossômica em anfíbios anuros. Entre os resultados obtidos, são destacados: a identificação de um extraordinário sistema cromossômico de determinação do sexo em *L. pentadactylus* (X1X2X3X4X5X6:Y1Y2Y3Y4Y5Y6), considerado o maior já relatado para vertebrados; a revisão citogenética e molecular de espécimes do grupo de *L. melanonotus*, o qual apresenta complexo de espécies pendente de resolução. Os dados obtidos indicam a revalidação das espécies *L. brevipes* e *L. intermedius*, antes em sinonímia com *L. petersii*. Além disso, foram obtidas sondas de DNA de cromossomos inteiros de anfíbios, separados por citometria de fluxo, para pintura cromossômica, a partir de células de *Xenopus tropicalis*, um organismo modelo para os estudos de genética e desenvolvimento, levantando a possibilidade de aplicação destas sondas em estudos de evolução cromossômica de outras espécies de anuros, mesmo que distantes filogeneticamente.

Abstract

The genus *Leptodactylus* currently has 74 recognized species in the Neotropical Region, of which 57 were reported in Brazil. Factors such as high morphological similarity, as well as the lack of diverse data from different populations, result in the confusing taxonomic status of some species in the genus. Advances in this matter were obtained by increasing studies involving mainly comparison of molecular data, but often are not examined specimens collected in the type localities, fundamental for assessing the real diversity of species, considered underestimated for amphibians in general. Besides the importance of cytogenetics in describing the genomic organization, such as the presence of chromosomal sex determination systems, different cytogenetic data has been an important tool for studying frogs, allowing comparison of chromosomal variations, inferring / identifying through these the suggestion of taxa, especially when combined with zoological and ecological information. Here we studied cytogenetically species currently in the genus *Leptodactylus*. Among the results are outstanding: the identification of an extraordinary chromosome system of sex determining in *L. pentadactylus* (X1X2X3X4X5X6: Y1Y2Y3Y4Y5Y6), considered the highest reported for vertebrates; Cytogenetic and molecular review of specimens in the *Leptodactylus melanonotus* group, which are in a complex of species pending resolution. With our data, it was possible to revalidate the species *L. brevipes* and *L. intermedius* as they were in synonymy with *L. petersii*. Additionally we showed the first construction of DNA probes from whole chromosomes of amphibian, obtained by flow cytometry from *Xenopus tropicalis*, a model organism for genetic and developmental studies, and the possibility of application in the studies on chromosome evolution of other species of frogs, even those phylogenetically distant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Família Leptodactylidae.....	11
1.2 O Gênero <i>Leptodactylus</i> : Informações gerais, taxonomia, sistemática e citogenética.....	13
2 OBJETIVOS.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Material.....	21
3.2 Métodos.....	21
3.2.1 Obtenção das preparações cromossômicas e preparação das lâminas.....	21
3.2.2 Coloração convencional com Giemsa.....	22
3.2.3 Marcação de Ag-RONs, segundo Howell e Black (1980) com modificações.....	22
3.2.4 Cultivo de células.....	22
3.2.5 Citometria de fluxo e construção de sondas de cromossomos inteiros para pintura cromossômica.....	23
3.2.6 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH), segundo Martins e Galetti (1999) com modificações.....	24
3.2.7 FISH com sondas teloméricas de PNA.....	24
3.2.8 Hibridação Genômica Comparativa (CGH)	24
3.2.9 Análise cromossômica.....	25
3.2.10 Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e análise filogenética	25
4 RESULTADOS.....	26
5 Capítulo 1 - Cytogenetic and molecular data from species in the <i>Leptodactylus melanonotus</i> group (Anura, Leptodactylidae), with revalidation of <i>L. brevipes</i> Cope, 1887 and <i>L. intermedius</i> Lutz, 1930	28
Abstract.....	28
Introduction	29
Material and Methods.....	30
Results.....	34
Discussion.....	43

References.....	46
 6 Capítulo 2 - More sex chromosomes than autosomes: twelve XY chromosomes in the Amazonian frog <i>Leptodactylus pentadactylus</i> (Leptodactylidae)	48
Abstract.....	48
Introduction	49
Material and Methods.....	51
Results	52
Discussion	57
References.....	59
 7 Capítulo 3 - Flow-sorted chromosomes of <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i> (Pipidae) and its potential use to chromosome evolution studies in <i>Amphibia</i>	63
Abstract.....	63
Introduction	64
Material and Methods.....	65
Results	67
Discussion	71
References.....	73
 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	76
 REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

Atualmente são descritas para a ordem Anura 6200 representantes com distribuição em quase todos os continentes, exceto na Antártida (FROST, 2015), sendo que no Brasil é registrada a ocorrência de 988 espécies, segundo a Lista de Anfíbios Brasileiros (SEGALLA et al., 2014). Esses números têm aumentado substancialmente pois, somente nos últimos anos, foram descritas cerca de 15% do total das espécies brasileiras. A grande similaridade morfológica observada entre os representantes de alguns grupos de anuros faz com que muitas dúvidas sejam geradas com relação à taxonomia e sistemática desse grupo. Na tentativa de resolver tais questionamentos, estudos têm sido realizados baseados, frequentemente, em caracteres de morfologia externa, osteologia, bioacústica, biologia reprodutiva, ecologia, distribuição geográfica e, atualmente, em dados de sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear.

Extensas revisões, baseadas principalmente em dados moleculares, foram realizadas a partir de 2005, como as de Faivovich et al. (2005), Frost et al. (2006), Grant et al. (2006), Hedges et al. (2008) e Pyron e Wiens (2011), resultando em grandes modificações na taxonomia e sistemática de toda a classe Amphibia. Embora dados cromossômicos não tenham sido considerados na maioria desses trabalhos, é importante enfatizar que informações cariotípicas associadas a dados de sequenciamento de DNA têm resultado em relevantes trabalhos envolvendo grupos da anurofauna brasileira (SILVA et al. 2004; AGUIAR JR. et al., 2007; LOURENÇO et al., 2008; TARGUETA et al., 2010; LOURENÇO et al., 2015), reforçando que a citogenética pode, efetivamente, contribuir no esclarecimento de questões de taxonomia e sistemática.

1.1 Família Leptodactylidae

Dentre as mudanças taxonômicas propostas recentemente, ainda objeto de muitas discussões, cabe destacar a redução do número de representantes de Leptodactylidae, anteriormente a família mais numerosa da ordem Anura. Nos anos 1970, Lynch (1971) havia distribuído as espécies nas subfamílias Ceratophryinae, Hylodinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae, mas, logo em seguida, Heyer (1975)

organizou as espécies em cinco unidades, subsequentemente, reconhecidas como Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae. Com algumas pequenas variações, tal divisão em cinco subfamílias foi mantida nos trabalhos de Frost, até 2006, quando os leptodactílideos passaram por extensas modificações taxonômicas (FROST et al., 2006).

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

Extensas alterações na família Leptodactylidae ocorreram primeiro com Frost et al. (2006) e, logo em seguida, com Grant et al. (2006). As subfamílias Ceratophryinae, Cycloramphinae, Eleutherodactylinae, Leptodactylinae e Telmatobiinae, até então aceitas, sofreram grandes modificações, já que famílias, subfamílias, gêneros e espécies foram criadas, revalidadas ou mesmo suprimidas. Inicialmente, Frost et al. (2006) mantiveram em Leptodactylidae a quase totalidade dos antigos gêneros de Leptodactylinae (*Edalorhina*, *Engystomops*, *Eupemphix*, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Adenomera*, *Lithodytes*, *Vanzolinius*, *Physalaemus*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola*, com exceção de *Limnomedusa*), dois gêneros de Cycloramphinae (*Paratelmatobius* e *Scythrophrys*) e um de Telmatobiinae (*Somuncuria*). Porém, *Adenomera*, *Vanzolinius* e *Lythodytes* foram sinonimizados com *Leptodactylus*, de modo que os 57 gêneros da família Leptodactylidae foram reduzidos a 11. Grant et al. (2006), entre outras mudanças, reduziu ainda mais o número de representantes da família Leptodactylidae que passou a englobar apenas quatro gêneros, isto é, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus*, *Paratelmatobius* e *Scythrophrys*. Os demais sete gêneros passaram a compor a família Leiuperidae, mas existia

ainda alguma restrição quanto à posição taxonômica do gênero *Hydrolaetare*. As últimas revisões filogenéticas na família Leptodactylidae (PYRON e WIENS, 2011; FOUQUET et al., 2013) redefiniram ou corroboraram a composição da família Leptodactylidae, atualmente formada pelas subfamílias Leiuperinae, Leptodactylinae e Paratelmatoibiinae. Pyron e Wiens (2011) consideraram a subfamília Leptodactylinae como táxon irmão dos Leiuperinae e Paratelmatoibiinae, e abrangendo os gêneros *Adenomera*, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus* e *Lithodytes*.

1.2 O gênero *Leptodactylus*: informações gerais, taxonomia, sistemática e citogenética

Os anfíbios do gênero *Leptodactylus* (sensu De Sá et al., 2014) apresentam oviposição em ninhos de espuma e variação quanto ao modo de reprodução, sendo esse pouco ou bastante dependente do ambiente aquático, além de grande variação de tamanho, desde pequeno a médio porte e, alguns deles, gigantes, com cerca de 20cm de comprimento rostro-cloacal (DUELLMAN e TRUEB, 1994; ZUG, 1993; PRADO et al., 2002). Atualmente, totalizam 74 espécies, com ocorrência desde o sul dos Estados Unidos, na América do Norte, América Central, Antilhas, até a Argentina na América do Sul, nas regiões tropicais e subtropicais (DUELLMAN e TRUEB, 1994; FROST, 2015). No Brasil, o número de espécies registradas é de 57 (SEGALLA et al., 2014), com tendência a aumentar, já que novos representantes têm sido descritos (GIARETTA e COSTA, 2007; BERNECK et al., 2008; CARAMASCHI, 2008; CARAMASCHI et al., 2008; HEYER e DE SÁ, 2011; CARVALHO et al., 2013).

Grande parte dos estudos relacionados à taxonomia e sistemática dos *Leptodactylus* foi, tradicionalmente, baseada em caracteres morfológicos seguindo o critério utilizado por Heyer (1969) para arranjar as espécies nos grupos fenéticos de *L. fuscus*, *L. melanonotus*, *L. ocellatus* e *L. pentadactylus*. Mais tarde, o mesmo autor (HEYER, 1973) renomeou o leptodactilíneo *Adenomera marmorata* como *Leptodactylus marmoratus*, devido à sua distribuição geográfica e por compartilhar com alguns representantes desse último gênero várias características morfológicas, como tamanho, forma, textura e padrão de coloração, justificando a criação do grupo de *L. marmoratus*. Tal proposta foi logo abandonada, tendo sido revalidado o gênero

Adenomera, uma vez que na revisão realizada subsequentemente por Heyer (1974), ficou evidente que a relação na subfamília Leptodactylinae era melhor explicada com os representantes do grupo *L. marmoratus* em um gênero distinto. Muitos outros autores abordaram essa questão, com base em diferentes caracteres (HEYER, 1975, 1977, 1998; HEYER e MAXSON, 1982; ANGULO et al., 2003; KOKUBUM e GIARETTA, 2005) e, embora os gêneros *Adenomera* e *Leptodactylus* fossem aceitos, a separação de ambos não era muito evidente. Heyer (1998) e Kokubum e Giaretta (2005) enfatizaram a relação filogenética próxima entre *Adenomera* e alguns *Leptodactylus*, o que reforçou a natureza parafilética do gênero *Leptodactylus*.

Na revisão de Frost et al. (2006), as espécies dos gêneros *Adenomera*, *Lithodytes* e *Vanzolinius* foram incluídas em *Leptodactylus*, com base em análises de dados de sequenciamento de DNA associados a outros caracteres como morfologia e aspectos ecológicos, de modo a torná-lo monofilético, sugestão essa que já tinha suporte na literatura (DE SÁ et al., 2005; KOKUBUM e GIARETTA, 2005). A divisão do gênero *Leptodactylus* nos respectivos grupos de *L. fuscus*, *L. ocellatus*, *L. marmoratus*, *L. melanonotus* e *L. pentadactylus*, reconhecida por Heyer (1973) e mantida nos trabalhos de Maxson e Heyer (1988), Frost et al., (2006) e Ponssa et al., (2011), no entanto, foi questionada nos trabalhos de Kwet et al. (2009) e Zaracho e Hernando (2011). Após a mudança taxonômica da espécie que originou seu nome, por Lavilla et al. (2010), o grupo de *L. ocellatus* passou a ser designado grupo de *L. latrans*. Na mais recente filogenia de anfíbios de Pyron e Wiens (2011), baseada em análises de sequências de DNA obtidas do GenBank, excluindo dados morfológicos, a sinonimização de *Adenomera* e *Lithodytes* a *Leptodactylus* proposta anteriormente, não foi revalidada.

Recentemente, o gênero *Leptodactylus* foi revisado (DE SÁ et al., 2014), com base em sequenciamento de DNA associado a múltiplos caracteres, principalmente morfologia, ecologia e bioacústica. Os autores enfatizaram a importância de dados não moleculares para definir as relações filogenéticas do gênero. Nesta filogenia de *Leptodactylus*, foram mantidos os grupos de *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. melanonotus* e *L. pentadactylus*. Mudanças referentes à realocação de espécies dentre estes grupos foram realizadas, a fim de torná-los monofiléticos, tendo a realocação das espécies *L. laticeps* e *L. syphax*, tradicionalmente pertencentes ao grupo de *L. pentadactylus*, para o grupo de *L. fuscus*, como uma das mudanças mais

proeminentes. No entanto, ainda que informações citogenéticas tenham sido comentadas para algumas das espécies, não foi atribuída importância taxonômica a estes dados. No entanto, Miranda et al. (2015) sugerem, com base em análises morfológicas de larvas, que os representantes do gênero *Leptodactylus* podem ser agrupados em dois clados principais, um deles abrangendo representantes dos grupos *L. fuscus*, *L. latrans*, *L. melanonotus*, e o segundo, com espécies do grupo de *L. pentadactylus*. No presente trabalho foi considerada a proposta de Frost (2015).

Até o presente, o número de espécies cariotipadas de *Leptodactylus* (sensu Frost, 2015) totaliza cerca de 34 (revisões em KING, 1990, KURAMOTO, 1990, AMARO-GHILARDI, 2005 e GREEN e SESSIONS, 2007, complementadas com os estudos de AMARO-GHILARDI et al., 2006; GAZONI et al., 2012). Observa-se que $2n = 22$ está presente em grande parte dos *Leptodactylus*, com exceção de *L. silvanimbus* com $2n = 24$ (AMARO-GHILARDI et al., 2006) e *Leptodactylus* sp. (aff. *podicipinus*) com $2n = 20$ (GAZONI et al., 2012). Estes números diploides diferem majoritariamente das espécies de *Lithodytes* ou *Adenomera* que anteriormente estavam incluídas no gênero *Leptodactylus*: *Lithodytes lineatus* ($2n = 18$), *Adenomera andreae*, *A. diptyx* e *A. hylaedactylus* ($2n = 26$), *A. marmoratus* ($2n = 24$) e *A. sp.* (referida como *Leptodactylus* sp. aff. *bokermanni*), com $2n = 23$ (BOGART, 1970, 1973, 1974; CAMPOS et al., 2009; ZARACHO e HERNANDO, 2011; GAZONI et al., 2012). A espécie *Leptodactylus discodactylus*, anteriormente *Vanzolinius discodactylus*, apresenta, também, $2n = 22$ (HEYER e DIMENT, 1974).

A grande maioria das análises citogenéticas em *Leptodactylus* foi realizada com coloração convencional, fornecendo apenas a descrição do número e da morfologia cromossômica. Somente a partir do ano de 1990, foram obtidos, também, dados com técnicas de coloração diferencial e de FISH com sondas de DNA e de sequências teloméricas (BARALE et al., 1990; WILEY et al., 1992; SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; SILVA et al., 2006; ARRUDA e MORIELLE-VERSUTE, 2008; GAZONI et al., 2012), embora existam também relatos de análises cromossômicas por método autorradiográfico em *L. latrans* (como *L. ocellatus*) (BIANCHI e MOLINA, 1967; BIANCHI et al., 1973).

De modo geral, os cariótipos com $2n = 22$ das espécies de *Leptodactylus*, quando analisados com coloração convencional, são bastante similares entre si, tendo cromossomos dos tipos metacêntrico, submetacêntrico ou subtelocêntrico.

Ainda que pequenas variações na proporção dos braços de alguns cromossomos presumivelmente homeólogos sejam observadas, tais cariótipos têm sido vistos como conservados.

É importante enfatizar que *L. silvanimbus*, apesar de ter $2n = 24$, possui constituição cariotípica altamente semelhante à das espécies com 22 cromossomos, tendo, porém, um par bi-braqueado adicional, totalizando cinco pares pequenos e não quatro, o que justifica o seu $NF = 48$. Os cariótipos com $2n = 22$ e NF diferentes de 44, como os de *L. latinasus*, *L. natalensis*, *L. podicipinus* e *L. wagneri* apresentam, majoritariamente, cromossomos de dois braços, semelhantes em tamanho e morfologia aos descritos nos *Leptodactylus* com $2n = 22$ e $NF = 44$. Porém, estas espécies apresentam cromossomos telocêntricos em número e posição variáveis (BOGART, 1974; SILVA et al. 2000; ARRUDA e MORIELLE-VERSUTE, 2008; GAZONI et al., 2012). Em contraste, o padrão cariotípico dos gêneros *Adenomera* e *Lithodytes* ($2n = 18, 23, 24$ e 26), anteriormente sinonimizados a *Leptodactylus*, é discrepante, não só em relação ao número, mas, também, na morfologia cromossômica, podendo seus cariótipos ser considerados como pouco conservados, considerando as espécies cariotipadas até o momento.

Entre as espécies de *Leptodactylus*, há uma única sugestão de cromossomos sexuais do tipo XX/XY para espécimes de *L. chaquensis*, provenientes da Argentina, possivelmente em início de diferenciação, pois o par heteromórfico foi reconhecido somente por bandas C (BARALE et al., 1990). No entanto, este heteromorfismo, relatado para o par 1, não foi constatado para espécimes de *L. chaquensis* coletados no Brasil (GAZONI et al., 2012).

O uso de técnicas de coloração diferencial tem demonstrado variações cromossômicas que revelam interessantes variações cariotípicas inter e intraespecíficas em representantes de *Leptodactylus* (SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; SILVA et al., 2006; ARRUDA e MORIELLE-VERSUTE, 2008; GAZONI et al., 2012). Região organizadora de nucléolo (RON) em distintos sítios dos cromossomos 8 ou localizados em outros pares, RONS múltiplas, assim como padrões diferentes de distribuição, quantidade e localização de heterocromatina, visualizada por bandamento C, foram relatados nestes trabalhos. Uma inversão pericêntrica esporádica foi descrita por Silva et al. (2000) em um único exemplar de *L. latrans* (como *L. ocellatus*), rearranjo esse confirmado, também, pelo bandamento C.

Há ainda um grande número de espécies de *Leptodactylus* que não foram estudadas citogeneticamente, principalmente com técnicas de coloração diferencial. O padrão cariotípico com $2n = 22$ é similar sob coloração convencional, tendo a maioria das espécies somente cromossomos do tipo metacêntrico ou submetacêntrico, embora pequenas diferenças não possam ser descartadas entre os pares homeólogos. É importante notar que, embora os cariótipos com $2n = 22$ de *L. latinasus*, *L. natalensis*, *L. podicipinus* e *L. wagneri* tenham majoritariamente cromossomos de dois braços, há um número variável de pares telocêntricos, o que leva a valores de número fundamental de braços (NF) variáveis (BOGART, 1970; SILVA et al. 2000; ARRUDA e MORIELLE-VERSUTE, 2008; GAZONI et al., 2012). Ainda, técnicas de coloração diferencial têm produzido resultados que contrariam, em certa extensão, a idéia de que os cariótipos de *Leptodactylus*, até mesmo aqueles com $2n = 22$, sejam conservados (SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; AMARO-GHILARDI et al., 2006; SILVA et al., 2006; ARRUDA et al., 2008; GAZONI et al., 2012). As regiões organizadoras de nucléolo, ainda que localizadas nos cromossomos 8 da maioria dos *Leptodactylus*, foram identificadas pelo nitrato de prata e com sondas de DNAr pela técnica FISH (Fluorescence in *situ* Hybridization) em outros cromossomos para algumas espécies. Silva et al. 2006 encontraram RONS adicionais nos cromossomos 4 de *L. mystacinus*. Variações como RONS somente nos cromossomos 3 de *L. rhodomystax* (GAZONI et al., 2012) e nos cromossomos 4 de *L. petersii* (AMARO-GHILARDI et al., 2006; GAZONI et al., 2012) e *L. sp. aff. podicipinus* (GAZONI et al., 2012) foram também relatadas.

A quantidade e distribuição das regiões de heterocromatina marcadas pelo bandamento C e com fluorocromos base-específicos podem, também, diferenciar espécies ou populações da mesma espécie. Silva et al. (2000), por exemplo, observaram diferenças no padrão de banda C em populações de *L. fuscus* de diferentes localidades, o que está de acordo com a proposta de Camargo et al. (2006) de que *L. fuscus* seria um complexo de espécies. Esses autores registraram a ocorrência de espécies crípticas, com padrão de vocalização equivalente, mas que se diferenciam nas sequências de genes mitocondriais. Outro caso é o de *L. latrans* (anteriormente *L. ocellatus*) procedente de regiões do litoral ou de planalto no Brasil, em que Silva et al. (2000) constataram que os exemplares diferem pelo padrão de

bandamento C, corroborando dados de morfologia e de bioacústica obtidos em representantes dessas mesmas populações.

Os cromossomos de espécies de *Leptodactylus* têm sido também estudados com base nas bandas de replicação, obtidas por incorporação *in vivo* de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) no DNA (SILVA et al., 2000; AMARO-GHILARDI et al., 2004; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2006; GAZONI et al., 2012). Uma estreita correspondência nos padrões de replicação pôde ser estabelecida, principalmente, entre os cinco maiores pares cromossômicos, e permitindo, no caso de *L. pentadactylus*, a identificação dos cromossomos envolvidos em múltiplas translocações recíprocas (GAZONI et al., 2012). No entanto, na maioria das vezes, o padrão de bandas obtido para os cromossomos de menor tamanho dos anfíbios anuros não é suficiente para o reconhecimento seguro de homeologias entre os cromossomos de diferentes espécies.

Técnicas mais avançadas de citogenética molecular, como a pintura cromossômica, poderão fornecer informações mais precisas quanto à homeologia de cromossomos inteiros ou de segmentos destes, uma vez que as sondas de diferentes segmentos de DNA obtidas de uma espécie podem ser hibridadas, por complementaridade, nos cromossomos de outras espécies, filogeneticamente próximas ou não, indicando a exata localização dos segmentos cromossômicos homeólogos nestas.

Nos últimos anos, tem-se observado cada vez mais os procedimentos de pintura cromossômica serem usados nas análises comparativas dos cariótipos dos diferentes grupos de vertebrados, como mamíferos (YONENAGA-YASSUDA, 2004, PIECZARKA et al., 2005; VENTURA et al., 2009), aves (OLIVEIRA et al., 2005) reptéis (TRIFONOV et al., 2011) e, mais raramente, em peixes (NAGAMACHI et al., 2010) e anfíbios (KRYLOV et al., 2010). Sem dúvida, uma das limitações para se aplicar a pintura cromossômica em espécies de anfíbios pode ser atribuída às dificuldades de obtenção de culturas de fibroblastos bem-sucedidas para fornecerem uma grande quantidade de metáfases, condição fundamental para a realização da citometria de fluxo, técnica pela qual os cromossomos podem ser separados para a preparação de sondas de cromossomos inteiros. Contudo, é importante enfatizar que o trabalho de Krylov et al. (2010) se baseou na microdissecção a laser de

cromossomos de *Xenopus tropicalis* para a construção de sondas empregadas em experimentos de pintura cromossômica, com os quais foi possível confirmar a origem alotetraploide do cariótipo de *X. laevis*, mostrando ser a microdissecção uma alternativa viável para obtenção de sondas de cromossomos inteiros de anfíbios.

A obtenção de sondas por citometria de fluxo poderia gerar sondas cromossomo-específicas com maior qualidade, visto que, em média, 400 cromossomos podem ser separados com menor risco de contaminação e amplificados, frente a um número geralmente drasticamente reduzido, quando se utilizam técnicas de microdissecção cromossômica (em média, 15 cromossomos).

Em suma, o gênero *Leptodactylus* é diverso, com muitos representantes no Brasil, e novas espécies têm sido descritas nos últimos anos; apenas uma pequena parcela destas foi, até o momento, cariotipada, sendo as análises restritas, na maioria das vezes, ao uso de coloração convencional; grandes modificações na taxonomia e sistemática ocorreram, a partir do ano de 2006, na família Leptodactylidae e no gênero *Leptodactylus*, baseadas, principalmente, em sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear, porém, com pouca ênfase dada às informações citogenéticas, e existem questões de taxonomia e sistemática ainda não resolvidas, como aquelas relativas à dificuldade de alocar algumas das espécies no grupo.

Diante do exposto, fica clara a importância da aplicação de diferentes técnicas de citogenética para o melhor entendimento da evolução cariotípica no gênero *Leptodactylus*, as quais poderão, também, contribuir para o esclarecimento da problemática taxonômica e das relações filogenéticas do grupo.

2. OBJETIVOS

Entre os objetivos do presente trabalho destacam-se a busca por variações cariotípicas que auxiliem na elucidação de problemas de taxonomia e sistemática no gênero *Leptodactylus*, pelo emprego de técnicas de citogenética clássica e molecular, bem como a obtenção de sondas cromossomo-específicas de anfíbio para procedimentos de pintura cromossômica.

Para tal, as análises cariotípicas de espécies de *Leptodactylus*, foram realizadas com colorações convencional e diferencial, empregando-se, dentro das possibilidades e necessidades, uso de diversificadas técnicas, como as de coloração convencional com Giemsa, Ag-RON, e FISH com sondas de DNAr 18S+28S (HM123), de sequências microssatélites e teloméricas, bem como a técnica de citometria de fluxo, realizada pela primeira vez para o isolamento de cromossomos de anfíbio, dos quais se pode produzir sondas cromossomo-específicas.

As análises visaram à busca de marcadores cromossômicos que pudessem representar diferenças cariotípicas interespecíficas e/ou interpopulacionais, as quais podem reforçar a sugestão de que o gênero é menos conservado citogeneticamente do que se supunha pouco tempo atrás, bem como possuir valor taxonômico. Com isso espera-se ampliar o entendimento da evolução cromossômica dentro do gênero, o que poderá representar subsídios valiosos que, aliados às filogenias moleculares obtidas com base em diferentes genes, contribuam para a resolução das questões de taxonomia e sistemática pertinentes, incluindo os atuais grupamentos de espécies. Na medida em que os dados citogenéticos podem diferenciar espécies crípticas ou reconhecer entidades específicas em complexos de espécies, o conhecimento acerca da diversidade da anurofauna poderá ser ampliado e, oportunamente, útil ao direcionamento de futuros planejamentos de conservação. Entre os objetivos, foi de particular interesse estudar a população de *L. pentadactylus* de Paranaíta, MT, da qual um indivíduo macho revelou a intrigante presença de múltiplas translocações sequenciais, aparentemente balanceadas (GAZONI et al., 2012), e que poderia estar presente, deste modo, em outros indivíduos simpátricos. Outras investigações visaram à verificação da frequência destas translocações, se presentes em outros indivíduos, e se existe relação destas translocações com um possível sistema cromossômico múltiplo de determinação do sexo.

A obtenção de sondas de cromossomos totais através da técnica de citometria de fluxo, poderá ser útil a diferentes estudos sobre evolução cromossômica no gênero *Leptodactylus*, e, porventura, aos estudos de outros grupos de anuros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os exemplares de *Leptodactylus* foram coletados em diversas regiões do Brasil (Tabelas 1 e 2 do Capítulo 1) e identificados pelos Profs. Dr. Célio F. B. Haddad, do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, e Profa. Dra. Christine Strüssmann, do Departamento de Ciências Básicas e Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMT, Cuiabá, MT. Os animais da amostra serão depositados na Coleção CFBH, Departamento de Zoologia, Rio Claro, SP. Foram estudados representantes de *Leptodactylus* da anurofauna brasileira, com prioridade para espécimes provenientes de suas respectivas localidades tipo, cujos cariótipos eram apenas presumidos. De cada animal, foram obtidas biópsias de tecidos (fígado e músculo), para a extração de DNA, amplificação e sequenciamento de genes mitocondriais, bem como para utilização em experimentos de citogenética molecular.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das preparações cromossômicas e preparação das lâminas

Preparações cromossômicas foram obtidas diretamente de medula óssea, fígado, intestino e testículo, com tratamento prévio dos animais com colchicina a 1%, injetada intraperitonealmente na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso, quatro horas antes do sacrifício, combinando-se os procedimentos descritos por Schmid (1978) e Baldissera Jr et al. (1993), mas sem o uso de fitohemaglutinina como agente mitogênico. Para obtenção de metáfases de *Xenopus tropicalis*, foram cultivadas células fibroblasto-símbios (linhagem celular estabelecida “SPEEDY”)

obtidas por Sinzelle et al. (2012), seguindo-se o protocolo do mesmo autor, no qual colcemid® foi adicionada ao meio de cultura cerca de 4 horas antes da colheita das células.

Qualquer que seja o procedimento de obtenção, as suspensões celulares foram guardadas em geladeira por 24 horas ou armazenadas por mais tempo em *freezer* a -20°C. Antes da confecção das lâminas, foi feita uma troca pelo fixador fresco e a suspensão foi gotejada na superfície de uma lâmina mantida em banho-maria a 60°C, a qual foi, logo em seguida, colocada à temperatura ambiente para a sua secagem completa. As lâminas foram então destinadas às diferentes técnicas, após envelhecimento por pelo menos 24 horas em temperatura ambiente, ou armazenadas em *freezer* a -20°C.

3.2.2 Coloração convencional com Giemsa

As lâminas foram hidrolisadas por cinco minutos em solução de ácido clorídrico 1N a 60°C e, após a lavagem, coradas por sete minutos com Giemsa preparado com 1mL da solução comercial diluído em 29mL de solução tampão de fosfato de sódio, pH6,8.

3.2.3 Marcação de Ag-RONs, segundo Howell e Black (1980) com modificações

As lâminas foram hidrolisadas por três minutos em ácido clorídrico 1N a 60°C. Após a secagem, foram gotejadas em cada lâmina uma gota de solução coloidal reveladora preparada com 1g de gelatina dissolvida em 50mL de água destilada e 0,25mL de ácido fórmico, e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%. A lâmina foi coberta com lamínula e incubada em câmara úmida a 60°C, durante dois a três minutos. Em seguida, foi lavada e corada por 30 segundos com solução de Giemsa.

3.2.4 Cultivo de células

As células SPEEDY foram cultivadas segundo os procedimentos descritos em Sinzelle et al. (2012). As células foram cultivadas em estufa a 28°C, sem injeção de

CO₂, em frascos de cultura de célula com tampas hermeticamente fechadas, sem dispositivo de trocas gasosas. Foi utilizado meio Leibowitz L-15 diluído (2/3 de meio, Gibco, diluído com água ultrapura estéril), a fim de se obter melhor condição osmótica, suplementado com soro bovino fetal (10%) e com adição 1% de antibiótico-antimicótico (Penicilina-Streptomicina 10000U/10mg – Sigma-Aldrich).

O repique/passagem das células, quando confluentes, foi realizado lavando-se as células aderidas aos frascos de cultura com PBS 1x estéril, diluído (também 2/3 de PBS diluído com água ultrapura estéril) e, em seguida, adicionando-se tripsina (0,5 mL para frascos de cultura pequenos, e 1,5 mL para frascos de cultura médios). Após o espalhamento da tripsina, por movimentação manual, em toda a superfície do frasco, contendo as células aderidas, utilizou-se microscópio de luz invertido para acompanhamento do desprendimento da maioria das células. Após o desprendimento das células, a tripsina foi inativada adicionando-se meio de cultura novo.

3.2.5 Citometria de fluxo e construção de sondas de cromossomos inteiros para pintura cromossômica

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados no Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Reino Unido. As sondas cromossomo-específicas foram feitas por PCR com primer degenerado (DOP-PCR) em cromossomos isolados por citometria de fluxo após tratamentos prévios descritos em Telenius et al., (1992), Yang et al. (1995) e Rens et al. (2006). Os cromossomos foram preparados como descrito e corados com Hoechst 33258 (2mg/mL) e Cromomicina A3 (40 mg/mL) na presença de sulfato de magnésio (2.5 mmol/L) por duas horas. Sulfato de sódio (25mmol/L) e citrato de sódio (10 mmol/L) foram adicionados 15 minutos antes da realização da citometria de fluxo. O isolamento dos cromossomos foi realizado utilizando-se um citômetro de duplo laser (MoFlow, Beckman-Coulter). Aproximadamente 400 cromossomos foram isolados a partir de cada pico selecionado no kariograma de fluxo. Os cromossomos foram separados diretamente em tubos de PCR contendo 30 µL de água ultrapura estéril. Estas amostras foram amplificadas por DOP-PCR usando-se o primer 6MW (TELENIUS et al., 1992). Os produtos primários de PCR foram marcados com biotina-16-dUTP (Boehringer Mannheim), adicionando-se 1 µL do produto da amplificação em uma

segunda amplificação de DOP-PCR usando o mesmo primer para a construção das sondas.

3.2.6 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo Martins e Galetti (1999) com modificações

Foi utilizada a técnica de FISH para a localização de sondas de DNAr 18+28S (HM123 – MEUNIER-ROTIVAL et al., 1979), sequências teloméricas (TTAGGG)_n, sondas de sequências microssatélites e de cromossomos totais obtidos por citometria de fluxo (protocolos de KRYLOV et al., 2007, RENS et al., 1999 e RENS et al., 2006). Os procedimentos de FISH foram realizados nas seguintes etapas: **a.** marcação não-isotópica da sonda com biotina ou digoxigenina através da técnica de PCR ou por *nick translation*; **b.** reação de hibridação, empregando-se a solução de hibridação que contém formamida, e procedimentos de desnaturação e renaturação no termociclador; **c.** detecção e amplificação do sinal de hibridação por meio de FITC (fluoresceína isotiocianato-avidina conjugada) ou anti-digoxigenina; **d.** coloração dos cromossomos com iodeto de propídeo ou DAPI e montagem da lâmina com *antifading*; **e.** observação da preparação ao microscópio sob luz ultra-violeta e filtro adequado.

3.2.7 FISH com sondas teloméricas de PNA (*Peptide Nucleic Acid*)

A detecção de sequências teloméricas (TTAGGG)_n repetitivas nos cromossomos foi realizada, com exceção de *L. pentadactylus* de Paranaíba, MT, utilizando-se o PNA FISH kit Telomere/FITC (Dako Cytomation, Dinamarca), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.2.8 Hibridação Genômica Comparativa (CGH)

Experimentos de CGH foram realizados de acordo com o descrito por Abramyan et al. (2009), com modificações: como sondas foram usados 300 ng de

DNA genômico de fêmea marcado com biotina dUTP, detectada com Alexa (espectro verde) após hibridação, enquanto que 300 ng de DNA genômico de macho foi marcado com digoxigenina dUTP, co-precipitado com DNA digerido (100-500 pb) de fêmea e, após hibridação, detectado com anti-digoxigenina-rodamina (espectro vermelho). A marcação das sondas foi realizada por *nick translation*. Ambas sondas foram co-hibridadas em lâminas contendo metáfases por aproximadamente 12 horas a 37°C.

3.2.9 Análise cromossômica

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

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

3.2.10 Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e análise filogenética

O DNA genômico total foi extraído de biópsias de tecidos (fígado ou músculo) preservados em etanol 100%, utilizando métodos de precipitação de acetato de amônio (MANIATIS et al., 1982) ou kits QIA Quick DNEasy (Qiagen Inc.) seguindo as orientações do fabricante.

Para a análise da diversidade genética foi sequenciado um fragmento de ~650 pb do gene citocromo C oxidase subunidade 1 (COI). Também foi amplificado um fragmento do gene 16S para um ou dois indivíduos de cada localidade tipo para comparação filogenética com outras espécies do grupo *L. melanonotus*. As condições de primers e PCR serão descritas em Lyra et al. (em preparação). Os

produtos de PCR foram purificados com reação enzimática e sequenciados com BigDye™ terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 em um sequenciador automático 3730XL pela Macrogen Inc., Seoul, South Korea. As sequências resultantes foram editadas usando o software Geneious V6.1.5 (Biomatters <http://www.geneious.com>). Os números de acesso no Genbank para cada fragmento de gene são dados nas tabelas 1 e 2 do Capítulo 1.

Os fragmentos gênicos foram alinhados utilizando Muscle (EDGAR, 2004) usando as configurações padrões no programa Mega 6 (TAMURA et al., 2013) e estimou-se as distâncias p dentro e entre as espécies ou clados. O programa Mega 6 também foi utilizado para análises Neighbour-joining (NJ) do conjunto de dados de COI, para agrupamento molecular dos espécimes analisados.

Para direcionar as relações entre novos espécimes amostrados e outras espécies do grupo *L. melanonotus*, foram obtidas sequências 16S usadas por de Sá et al. (2014), incluindo alguns grupos externos (Tabela 2 do Capítulo 1) e conduzidas análises de Máxima-parsimônia (MP) usando buscas heurísticas sob parsimônia e reconecção de árvore bi-seção (TBR). Suporte *bootstrap* foi avaliado através de 1000 réplicas.

4. RESULTADOS

Na presente tese, são apresentados dados referentes a três artigos em fase de preparação final para submissão a revistas científicas especializadas:

No capítulo 1, são apresentados dados citogenéticos associados ao sequenciamento de genes mitocondriais que possibilitaram a resolução de problemas taxonômicos de longa data, referentes às espécies pertencentes ao grupo de *L. melanonotus* com maior ocorrência/distribuição no Brasil. Foram revalidadas as espécies *L. brevipes* ($2n = 20$) e *L. intermedius* ($2n = 22$), a partir de indivíduos frequentemente identificados como *L. petersii* ($2n = 22$) coletados em diferentes localidades no Brasil, incluindo as localidades tipo para estas espécies. Ainda, variações cromossômicas morfológicas sugerem a necessidade de revisão taxonômica neste grupo de espécies.

No capítulo 2 é apresentado um raro sistema cromossômico múltiplo de determinação do sexo em *Leptodactylus pentadactylus*. A análise de machos e fêmeas evidenciou 12 cromossomos com rearranjos múltiplos sequenciais balanceados e fixados na população compondo um sistema do tipo X1X2X3X4X5X6:Y1Y2Y3Y4Y5Y6 nos machos, evidenciado por análises de citogenética clássica e molecular em cromossomos mitóticos e meióticos.

O Capítulo 3 trata da obtenção de sondas de DNA de cromossomos inteiros de anfíbios para pintura cromossômica, obtidas de *Xenopus tropicalis* por citometria de fluxo. A sugestão de aplicação destas sondas em diferentes espécies de anfíbios, para estudos de evolução cromossômica, bem como comentários referentes aos cromossomos sete de *Xenopus tropicalis*, recentemente considerados o par sexual para a espécie, são abordados.

5. Capítulo 1

Cytogenetic and molecular data from species in the *Leptodactylus melanonotus* group (Anura, Leptodactylidae), with revalidation of *L. brevipes* Cope, 1887 and *L. intermedius* Lutz, 1930.

Gazoni T¹, Lyra ML³, Strüssmann C², Pansonato A, Narimatsu H¹, Haddad CFB³, Parise-Maltempi PP¹

¹*Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Rio Claro, São Paulo, Brazil*

²*Departamento de Ciências Básicas e Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil*

³*Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Rio Claro, São Paulo, Brazil*

Abstract

The genus *Leptodactylus* comprises 74 species of frogs, distributed in the Neotropics, between Argentina and southern United States, including Antilles. The *Leptodactylus melanonotus* group comprises 16 species, some of them, with confusing taxonomic *status*. Here we conducted a study using cytogenetic and molecular data for species belonging to this group, including samples from type locality of *L. petersii* and the two synonymies, *L. brevipes* and *L. intermedius*. Our cytogenetic analyzes show that *L. petersii* from type locality have a $2n = 22$ karyotype, as almost all of the other *Leptodactylus* species studied so far, whereas all karyotyped species from *L. brevipes* type locality presented $2n = 20$ chromosomes. This lowest chromosome number was confirmed by meiotic analysis. The NOR sites were located in different chromosomes among the studied species. Telomeric sequences were present additionally in the centromere region of several chromosomes of *L. intermedius* and *L. podicipinus*. The molecular data shows high intraspecific genetic variation in *L. petersii* and corroborate cytogenetics results, suggesting that *L. brevipes* and *L. intermedius* are actually valid species.

Introduction

The species in the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Anura) comprises 74 species widespread in the Neotropics, being found between Argentina and southern United States, including Antilles (Frost, 2015). In the last few decades, molecular and detailed morphological studies have greatly contributed for rapid rate of descriptions of new species and taxa reevaluation in this genus (see review in de Sá et al., 2014).

The species are currently allocated in four species groups based in their overall ecological characteristics: *Leptodactylus melanonotus* group, *L. fuscus* group, *L. pentadactylus* group and *L. latrans* group (Heyer, 1969; de Sá et al., 2014). The *L. melanonotus* group includes 17 species, of which some of them have wide distribution in Brazil (*L. petersii* Steindachner, 1864, *L. podicipinus* Cope, 1862, *L. pustulatus* Peters, 1970, *L. natalensis* Lutz, 1930, and *L. riveroi* Heyer and Pyburn, 1983). The high similarity of morphological characters, in addition to the wide distribution of some species, have generated difficulties in taxonomy and systematics of their representatives, reflecting the confusing taxonomic status of some of them. For example, *L. petersii* was removed from the synonymy of *L. podicipinus* by Heyer (1994), after been placed by Rivero (1961). Heyer (1994) also transferred *L. brevipes* Cope, 1887 and *L. intermedius* to the synonymy of *L. petersii*. Since that, there is no detailed revision of the taxonomic status of these synonymies.

While most species in the genus *Leptodactylus* cytogenetically studied so far has generally conserved karyotypes, cytogenetic data available for some representatives of the *L. melanonotus* group indicate that this group has pronounced cytogenetic variations (Gazoni et al., 2012). These variations are evident by diploid number, fundamental number of chromosome arms (FN) values, the presence of different telocentric chromosomes, as the location of the nucleolar organizer region. Different numbers of telocentric chromosomes were found for *L. natalensis* (three pairs), *L. wagneri*, and *L. podicipinus* (four pairs) (Bogart, 1974; Silva et al., 2000; Arruda and Morielle-Versute 2008; Gazoni et al, 2012). Thus, the karyotypic variations found in the group make cytogenetics an important tool in the resolution of taxonomic problems and it could be useful in systematics studies of their representatives.

Here, we combined cytogenetics and molecular analyses of *L. petersii*, including individuals collected in type localities of the species and the synonymies, as

well as for other species in the *L. melanonotus* group aiming to clarify part of these unresolved taxonomic problems.

Material and Methods

Sample

Individuals were collected in the wild under governmental collection permits issued by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio - SISBIO authorizing 30202-2). Euthanasia was performed by dermal absorption of chlorhydrate of lidocaine, in accordance with the Ethical Committee in Animal Use (CEUA – permission 027/2011), UNESP, Rio Claro, Brazil. Tissue samples were obtained after euthanasia and fixed in Etanol 100%. Vouchers will be deposited in the collection Célio F.B. Haddad (CFBH Departamento de Zoologia, I.B., Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho). We also gathered samples from CFBH tissue collection for molecular analyses. Table 1 show individuals analyzed and sample locations.

Table 1: Specimens in the *Leptodactylus melanonotus* group analyzed. Prefix TG in the Collection number column represents karyotyped specimens (* = specimens from type locality). Lat/Lon = Latitude/Longitude; COI = Cytochrome C Oxidase subunit I gene sequence analysed; Cyto. (sex) = Cytogenetic analyses performed and sex: M = Male; F = female; J = juvenile

Sample ID (New ID)	Col. Number	Locality	UF	Lat	Lon	COI	Cyto. (sex)
<i>L. petersii (brevipes)</i> *	TG256	Chapada dos Guimarães	MT	-15.451	-55.843	OK	F
<i>L. petersii (brevipes)</i> *	TG258	Chapada dos Guimarães	MT	-15.451	-55.843	OK	J
<i>L. petersii (brevipes)</i>	CFBHT04739	Acorizal	MT	-15.207	-56.348	OK	
<i>L. petersii (brevipes)</i>	TG171	Brasnorte	MT	-12.102	-57.981	OK	F
<i>L. petersii (brevipes)</i>	TG174	Sinop	MT	-11.866	-55.461		F
<i>L. petersii (brevipes)</i>	TG175	Sinop	MT	-11.866	-55.461		F
<i>L. petersii (brevipes)</i>	TG181	Sinop	MT	-11.866	-55.461	OK	M
<i>L. petersii (brevipes)</i>	TG182	Sinop	MT	-11.866	-55.461		F
<i>L. petersii (brevipes)</i>	TG186	Cuiaba	MT	-15.578	-56.104	OK	M
<i>L. petersii (brevipes)</i>	TG187	Sinop	MT	-11.866	-55.461		F
<i>L. petersii (brevipes)</i>	TG229	Cuiaba	MT	-15.578	-56.104	OK	M
<i>L. petersii (intermedius)</i> *	TG388	Manacapuru	AM	-3.254	-60.578	OK	M
<i>L. petersii (intermedius)</i> *	TG389	Manacapuru	AM	-3.254	-60.578	OK	F
<i>L. petersii (intermedius)</i> *	TG399	Manacapuru	AM	-3.254	-60.578		F
<i>L. petersii (intermedius)</i>	TG222	Urucará	AM	-2.522	-57.754	OK	M
<i>L. petersii (intermedius)</i>	TG223	Urucará	AM	-2.522	-57.754		F

<i>L. petersii (intermedius)</i>	TG295	Belém	PA	-1.447	-48.441	OK	F
<i>L. petersii (intermedius)</i>	TG296	Belém	PA	-1.447	-48.441	OK	M
<i>L. petersii (intermedius)</i>	TG297	Belém	PA	-1.447	-48.441		M
<i>L. petersii (intermedius)</i>	TG298	Belém	PA	-1.447	-48.441		M
<i>L. petersii*</i>	TG384	São Gabriel da Cachoeira	AM	-0.055	-67.094	OK	M
<i>L. petersii*</i>	TG386	São Gabriel da Cachoeira	AM	-0.055	-67.094	OK	F
<i>L. petersii*</i>	TG390	São Gabriel da Cachoeira	AM	-0.055	-67.094	OK	F
<i>L. petersii*</i>	TG391.3	São Gabriel da Cachoeira	AM	-0.055	-67.094	OK	
<i>L. petersii</i>	CFBHT05475	Belém	PA	-1.447	-48.241	OK	
<i>L. petersii</i>	CFBHT05476	Belém	PA	-14.468	-48.241	OK	
<i>L. petersii</i>	CFBHT05728	Presidente Figueiredo	AM	-2.05	-60.03	OK	
<i>L. petersii</i>	CFBHT08292	Alcântara	MA	-23.916	-44.416	OK	
<i>L. petersii</i>	CFBHT10217	Alta Floresta	MT	-9.663	-56.053	OK	
<i>L. petersii</i>	CFBHT10218	Alta Floresta	MT	-9.663	-56.053	OK	
<i>L. petersii</i>	CFBHT10227	Paranaíta	MT	-9.671	-56.481	OK	
<i>L. petersii</i>	CFBHT10228	Paranaíta	MT	-9.671	-56.481	OK	
<i>L. petersii</i>	TG172	Alta Floresta	MT	-9.663	-56.054	OK	J
<i>L. petersii</i>	TG185	Paranaíta	MT	-9.671	-56.482	OK	F
<i>L. petersii</i>	TG226.1	Paranaíta	MT	-9.671	-56.482	OK	
<i>L. petersii</i>	TG314	Paranaíta	MT	-9.671	-56.482		F
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT01978	Porto Franco	MA	-63.503	-47.405	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT02057	Pirapora	MG	-17.338	-44.992	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT02812	Dois Irmãos	TO	-9.264	-49.061	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT03101	Santa Rita do Passa Quatro	SP	-21.675	-47.495	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT03529	Estreito	MA	-65.481	-47.444	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT04783	Poconé	MT	-16.259	-56.604	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT09465	Corumbá	MS	-19.03	-57.545	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT09485	Teodoro Sampaio	SP	-22.511	-52.317	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT11408	Porangatu	GO	-13.487	-49.102	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT11491	Sucupira	TO	-11.979	-48.913	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT11496	Figueirópolis	TO	-12.147	-49.066	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT11580	Três Lagoas	MS	-20.77	-51.71	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT13849	Porto Nacional	TO	-10.938	-48.55	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT14253	Gurupi/Peixe	TO	-11.81	-48.94	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT14452	Porangatu	GO	-13.382	-49.12	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT15105	Porto Murtinho	MS	-21.71	-57.721	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT16291	Três Lagoas	MS	-20.77	-51.71	OK	
<i>L. podicipinus</i>	CFBHT16359	Luis Antônio	SP	-21.586	-47.785	OK	
<i>L. podicipinus</i>	TG007	Estreito	MA	-6.548	-47.444	OK	F
<i>L. podicipinus</i>	TG009	Porto Franco	MA	-6.35	-47.406	OK	M
<i>L. podicipinus</i>	TG020	Porto Franco	MA	-6.35	-47.406		F
<i>L. podicipinus</i>	TG021	Porto Franco	MA	-6.35	-47.406		J
<i>L. podicipinus</i>	TG034	Estreito	MA	-6.548	-47.444		M
<i>L. podicipinus</i>	TG035	Porto Franco	MA	-6.35	-47.406		M
<i>L. podicipinus</i>	TG061	Lençóis Paulista	SP	-22.603	-48.792	OK	M
<i>L. podicipinus</i>	TG062	Lençóis Paulista	SP	-22.603	-48.792		M
<i>L. podicipinus</i>	TG078	Araraquara	SP	-21.737	-48.175		M
<i>L. podicipinus</i>	TG080	Araraquara	SP	-21.737	-48.175		M
<i>L. podicipinus</i>	TG081	Araraquara	SP	-21.737	-48.175		M
<i>L. podicipinus</i>	TG093	Boroborema	SP	-21.627	-49.12	OK	F
<i>L. podicipinus</i>	TG167	Cuiabá	MT	-15.578	-56.084	OK	F
<i>L. podicipinus</i>	TG168	Cuiabá	MT	-15.578	-56.084		F
<i>L. podicipinus</i>	TG191	Cuiabá	MT	-15.578	-56.084		M

<i>L. podicipinus</i>	TG192	Cuiabá	MT	-15.578	-56.084		M
<i>L. podicipinus</i>	TG230	Cuiabá	MT	-15.578	-56.084		M
<i>L. podicipinus</i>	TGA1265	Três Lagoas	MS	-21.035	-51.791	OK	
<i>L. podicipinus</i>	TGA1266	Três Lagoas	MS	-21.035	-51.791	OK	
<i>L. podicipinus</i>	TGA1267	Três Lagoas	MS	-21.035	-51.791	OK	
<i>L. pustulatus</i>	CFBHT11277	Colinas do Tocantins	TO	-8.06	-48.45	OK	
<i>L. pustulatus</i>	CFBHT12456	Barreirinhas	MA	-27.425	-42.798	OK	
<i>L. pustulatus</i>	CFBHT13763	Gurupi	TO	-11.81	-48.969	OK	
<i>L. pustulatus</i>	CFBHT14017	Palmeirante	TO	-8.071	-48.36	OK	
<i>L. pustulatus</i>	CFBHT14239	Brejinho do Nazaré	TO	-11.032	-48.584	OK	
<i>L. pustulatus</i>	CFBHT14260	Gurupi/Peixe	TO	-11.81	-48.969	OK	
<i>L. pustulatus</i>	CFBHT14456	Porangatu	GO	-13.382	-49.12	OK	
<i>L. pustulatus</i>	TG002	Estreito	MA	-6.548	-47.2	OK	M
<i>L. pustulatus</i>	TG023	Estreito	MA	-6.548	-47.2		M
<i>L. natalensis</i> *	TG420	Natal	RN	-5.79	-35.242	OK	M
<i>L. natalensis</i> *	TG424	Natal	RN	-5.79	-35.242	OK	M
<i>L. natalensis</i> *	TG425	Natal	RN	-5.79	-35.242	OK	M
<i>L. natalensis</i>	CFBHT01149	Passo de Camarajibe	AL	-9.235	-35.483	OK	
<i>L. natalensis</i>	CFBHT04224	Linhares	SE	-19.144	-40.057	OK	
<i>L. natalensis</i>	CFBHT11016	Urucuca	BA	-14.59	-39.296	OK	
<i>L. natalensis</i>	CFBHT11459	Campo Alegre	AL	-9.777	-36.329	OK	
<i>L. natalensis</i>	CFBHT13793	Aurora do Tocantins	TO	-12.772	-46.493	OK	
<i>L. natalensis</i>	CFBHT13794	Aurora do Tocantins	TO	-12.772	-46.493	OK	
<i>L. natalensis</i>	CFBHT13839	Guaraí	TO	-8.651	-48.251	OK	
<i>L. natalensis</i>	CFBHT14445	Campo Limpo de Goiás	GO	-16.326	-49.163	OK	
<i>L. natalensis</i>	CFBHT15790	Ilhéus	BA	-13.822	-39.17	OK	
<i>L. natalensis</i>	MTR101P28	Maceió	AL	-9.511	-35.611	OK	
<i>L. natalensis</i>	TG097	Salvador	BA	-13.005	-38.507	OK	
<i>L. riveroi</i>	TG385	São Gabriel da Cachoeira	AM	-0.055	-67.094	OK	M
<i>L. riveroi</i>	TG387	São Gabriel da Cachoeira	AM	-0.055	-67.094	OK	F

Cytogenetics and molecular analyzes

Direct mitotic preparations were obtained from bone marrow, liver, and intestine epithelium, while meiotic cells were obtained from testis, after a four hours *in vivo* treatment (intraperitoneal injection) with 1% colchicine, by combining the procedures described by Baldissera et al. (1993) and Schmid (1978). In addition to convencional staining with Giemsa, chromosomes were analyzed by silver nitrate impregnation (Ag-NOR) (Howell and Black, 1980), and by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) using telomeric probe (PNA FISH kit Telomere / FITC, Dako Cytomation, Denmark) to provide detection of the repetitive TTAGGG_(n) telomeric sequences, according to the protocol supplied by the manufacturer. Microscopic analysis was performed using a fluorescence microscope model BX51 and the images were captured using a cooled DP71 camera (Olympus) coupled. Chromosome morphology was determined according to the classification of Green and Sessions (2007).

The whole genomic DNA was extracted from ethanol-preserved tissues (liver or muscle) using either Ammonium Acetate precipitation methods (Maniatis et al. 1984) or QIA Quick DNEasy kits (Qiagen Inc.) following the manufacturer's guidelines.

A fragment of ~650 bp of the Cytochrome C Oxidase Subunit 1 gene (COI) was sequenced for genetic diversity analyzes. It was also amplified a fragment of 16S rRNA gene for one or two individuals of type localities for phylogenetic comparison with other species of *L. melanonotus* group. The primers and PCR conditions used was how described in Lyra et al. (in preparation). PCR products were purified with enzymatic reaction and sequenced with BigDye™ terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 in an automatic Sequencer 3730XL by Macrogen Inc., Seoul, South Korea. Resulting sequences were edited using Geneious software V6.1.5 (Biomatters <http://www.geneious.com>). Genbank accession numbers for each gene fragment are given in Table 2.

Gene fragments alignment were run with Muscle (Edgar, 2004) using default settings in Mega 6 (Tamura et al., 2013) and estimated the uncorrected p-distance within and between species or clades. We also used Mega 6 to proceed a Neighbour-Joining (NJ) analyses of COI dataset.

To address the relationships between new sampled specimens and other species of *L. melanonotus* group, it was used the 16S mitochondrial rDNA sequences from genbank used by de Sá et al. (2014), including few outgroups (Table 2). A Maximum-Parsimony (MP) analysis was conducted using heuristic searches under parsimony and tree bisection reconnection (TBR). Bootstrap support was evaluated through 500 replicates.

Table 2: 16S rDNA sequences included in phylogenetic analysis. *specimens from type localities (our karyotyped sample). The other sequences were used by de Sá et al. (2014).

Species	Accession number
<i>Leptodactylus melanonotus</i> group	
<i>Leptodactylus colombiensis</i> Heyer, 1994	KM091579
<i>Leptodactylus diedrus</i> Heyer, 1994	AY943230
<i>Leptodactylus discodactylus</i> Boulenger, 1884 "1883"	AY943239
<i>Leptodactylus griseigularis</i> Henle, 1981	KM091588
<i>Leptodactylus leptodactyloides</i> Andersson, 1945	AY943236
<i>Leptodactylus melanonotus</i> Hallowell, 1861 "1860"	AY943237
<i>Leptodactylus natalensis</i> Lutz, 1930	KM091602
<i>Leptodactylus natalensis</i> - Natal, RN*	present study
<i>Leptodactylus nesiotus</i> Heyer, 1994	KM091603
<i>Leptodactylus petersii</i> Steindachner, 1864	KM091608
<i>Leptodactylus petersii</i> - S. Gab. Da Cachoeira, AM*	present study
<i>Leptodactylus 'brevipes'</i> - Chapada dos Guimarães, MT*	present study
<i>Leptodactylus 'intermedius'</i> - Manacapuru, AM*	present study
<i>Leptodactylus podicipinus</i> Cope, 1862	EF632048
<i>Leptodactylus pustulatus</i> (Peters, 1870)	KM091613
<i>Leptodactylus pustulatus</i> **	present study
<i>Leptodactylus riveroi</i> Heyer and Pyburn, 1983	AY943231
<i>Leptodactylus validus</i> Garman, 1888 "1887"	EF632029
<i>Leptodactylus wagneri</i> (Peters, 1862)	EF632053
Outgroups	
<i>Leptodactylus latrans</i>	KM091606
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	KM091607
<i>Leptodactylus fuscus</i>	AY911275
<i>Adenomera lutz</i>	KM091597

Results

Three different karyotypes were found for *L. petersii* analysed. The karyotype of the individuals from Chapada dos Guimarães, Brasnorte, Sinop and Cuiabá identified previously as *L. petersii* (hereafter *L. brevipes*) is composed by 20 chromosomes, with pairs 1, 6, and pairs 7-10 metacentric, pairs 2-4, and 5 submetacentric (Figure 1A). All other analyzed species have $2n = 22$. In the individuals from Manacapuru, Urucará and Belém (hereafter *L. intermedius*), pairs 1, 5, and 6 are metacentric, and pairs 2-4, and 8 are submetacentric (Figure 1B). In *L. natalensis*, chromosomes 1-4 are submetacentric, 5, 6, 8, and 11 are metacentric; chromosomes 7, 9, and 10 are

telocentric (Figure 1C). In *L. petersii* from all localities, the chromosome pairs 1-5, and 7 are submetacentric; pairs 6, and 8-10 are metacentric, and the chromosome pair 11 is telocentric (Figure 1D, E, and F). In *L. podicipinus* the pairs 1-4, and 8 are submetacentric; pairs 5 and 6 metacentric, and pairs 7, and 9-11 are telocentric (Figure 1G). In *L. pustulatus* pairs 1-4, and 7 are submetacentric; pairs 5, 6, and 8-11 metacentric (Figure 1H). In *L. riveroi* pairs 1-4, 7, and 8 are submetacentric, and pairs 5, 6, and 9-11 are metacentric (Figure 1I).

Active NORs were identified by silver impregnation at the proximal regions of the long arms of chromosomes 4 in *L. brevipes* and *L. petersii*, and chromosomes 8 in *L. intermedius* and *L. podicipinus*; at the proximal region of the telocentrics 7 of *L. natalensis*, and at the terminal regions of the short arms of chromosomes 8 in *L. pustulatus* and *L. riveroi*.

No heteromorphic chromosomes were identified in mitotic complements, as confirmed by meiotic analysis, in which were present 10 bivalents in diakinesis and 10 chromosomes in metaphase II cells of *L. brevipes*, and 11 bivalents in diakinesis and 11 chromosomes in metaphase II cells for the other species.

Additional telomeric sequences (TTAGGG)_n were detected as intrachromosomal telomeric sequences (ITS) in centromeric regions of all metacentric and submetacentric chromosomes of *L. intermedius* and in most of the bi-armed chromosomes of *L. podicipinus*, with exception of pairs 5 and 7. All other species showed fluorescence signals only at the expected terminal regions.

The genetic diversity within and between clades are shown in table 3. Figure 7 (map) show distribution of clusters recovered in analyses.

Table 3: P-distances (%) of COI gene within and between Intra species/clades distances are in brackets

Species	intra	1	2	3	4	5	6
[1] <i>L. petersii</i>	(0.08)						
[2] <i>L. brevipes</i>	(0.009)	0.184					
[3] <i>L. intermedius</i>	(0.004)	0.172	0.144				
[4] <i>L. podicipinus</i>	(0.023)	0.172	0.149	0.097			
[5] <i>L. pustulatus</i>	(0.004)	0.177	0.202	0.184	0.189		
[6] <i>L. natalensis</i>	(0.047)	0.18	0.205	0.19	0.191	0.194	
[7] <i>L. riveroi</i>	--	0.191	0.195	0.183	0.186	0.204	0.213

For 16S rRNA gene was recovered one most parsimonious tree (tree length 488). Although *L. brevipes* and *L. intermedius* are currently considered synonyms of *L. petersii*, were recovered *L. intermedius* as sister species of *L. podicipinus*, and *L. brevipes* is sister to the clade composed by *L. podicipinus* and *L. intermedius*.

In addition, using only 16S rRNA, was found that *L. petersii* analyzed by de Sá et al. (2014) is distinct from specimens analyzed from type locality. It were also found differences in *L. natalensis* and *L. pustulatus* position. The obtained sequence of *L. pustulatus* is also distinct from previous analyses.

Figure 1. Species in the *Leptodactylus melanonotus* group analysed. A: *L. brevipes*; B: *L. intermedius*; C: *L. natalensis*; D and E: *L. petersii* from São Gabriel da Cachoeira, AM, and Alta Floresta, MT, respectively; F: *L. podicipinus*; G: *L. pustulatus*; H: *L. riveroi*. Photos: Christine Strussmann (A) and Thiago Gazoni (B-H).

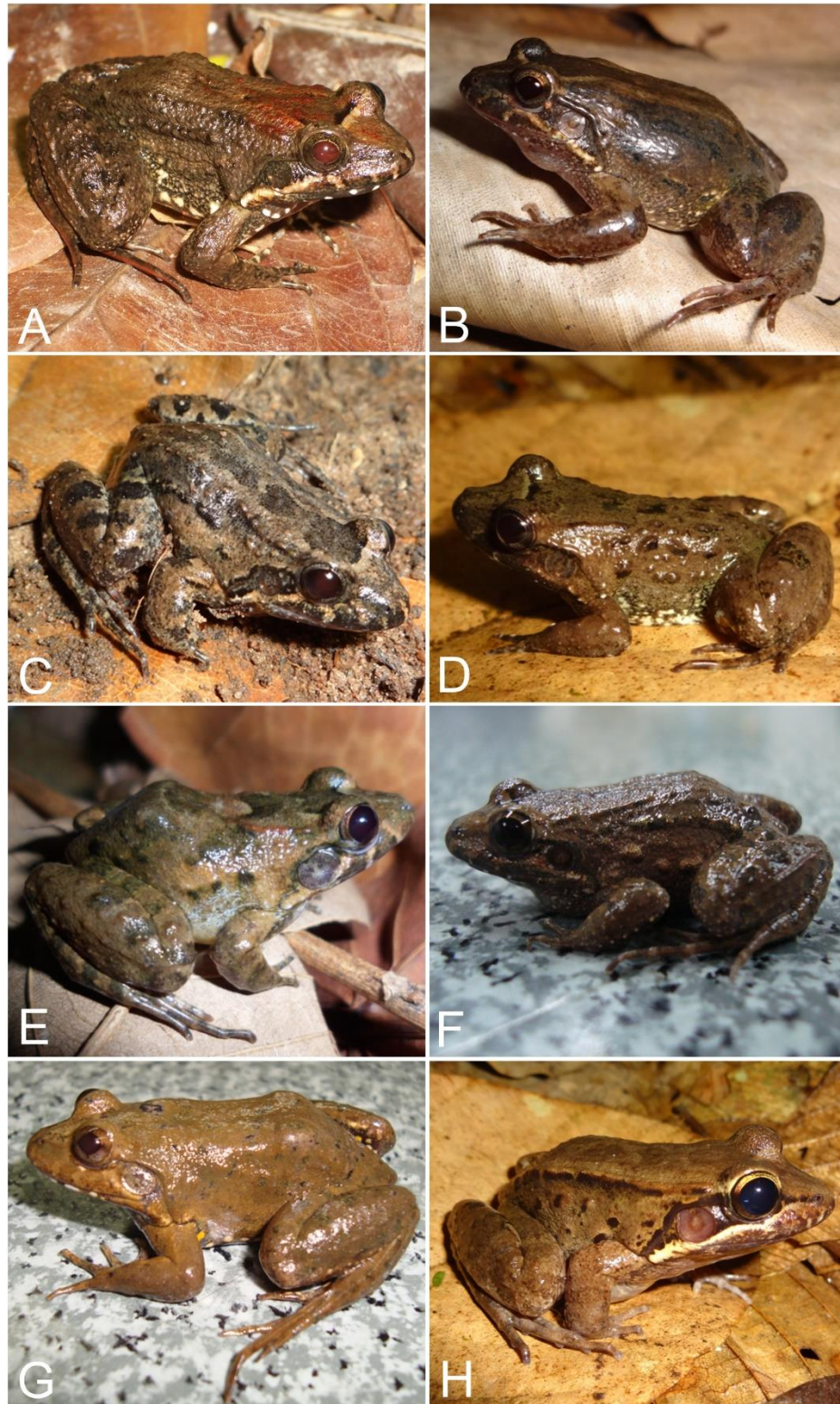


Figure 2. Conventional staining with Giemsa, and Ag-NOR localization on karyograms from species belonging to the *L. melanonotus* group. Bar = 10µm

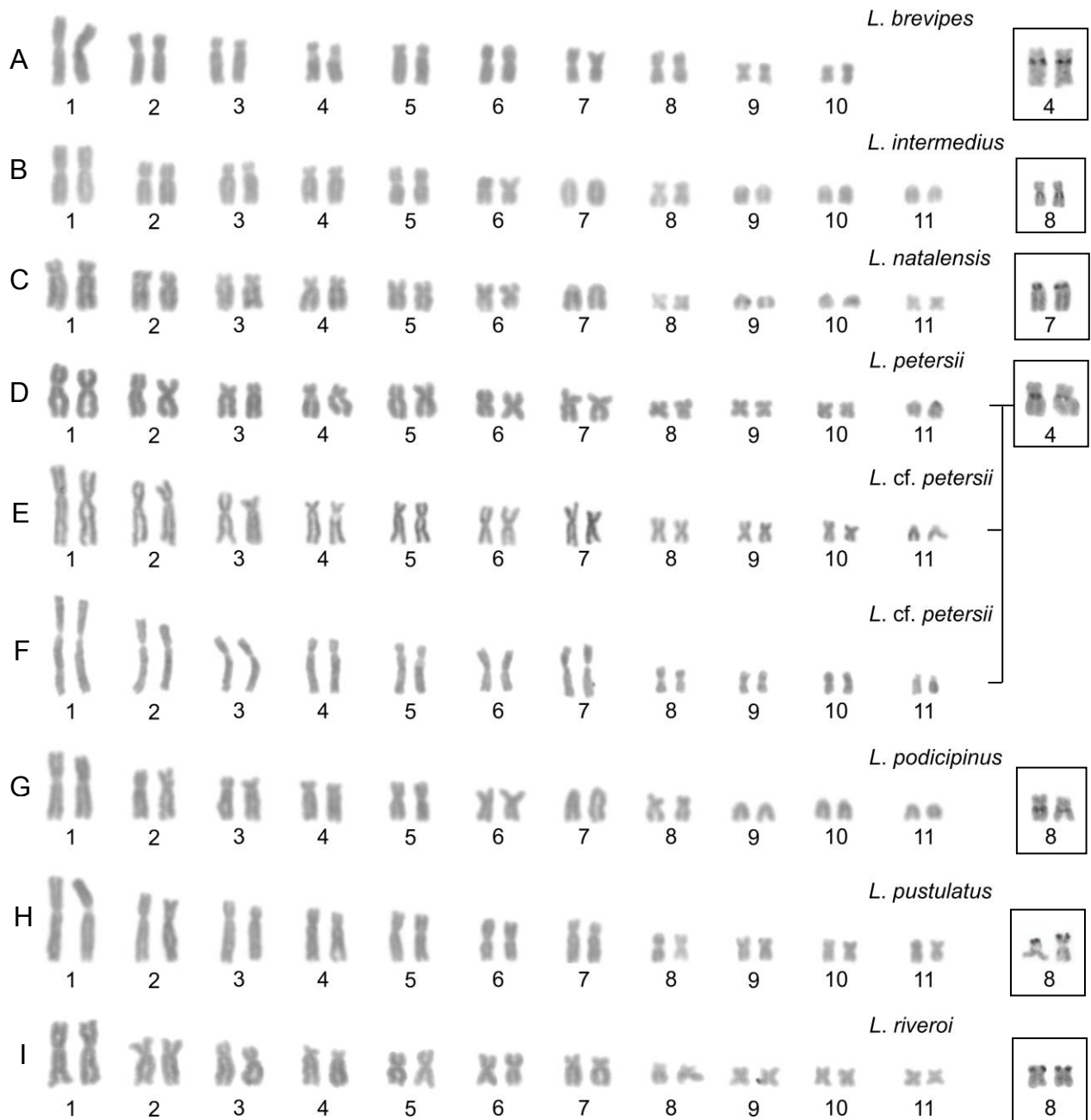


Figure 3. Diakinesis/metaphase I showing bivalentes and metaphase II with chromosomes, respectively, of species in the *L. melanonotus* group. A and B. *L. brevipes*; C and D. *L. intermedius*; E and F. *L. natalensis*; G and H. *L. petersii*; I and J. *L. pustulatus*; K and L. *L. riveroi*. Bar = 10µm

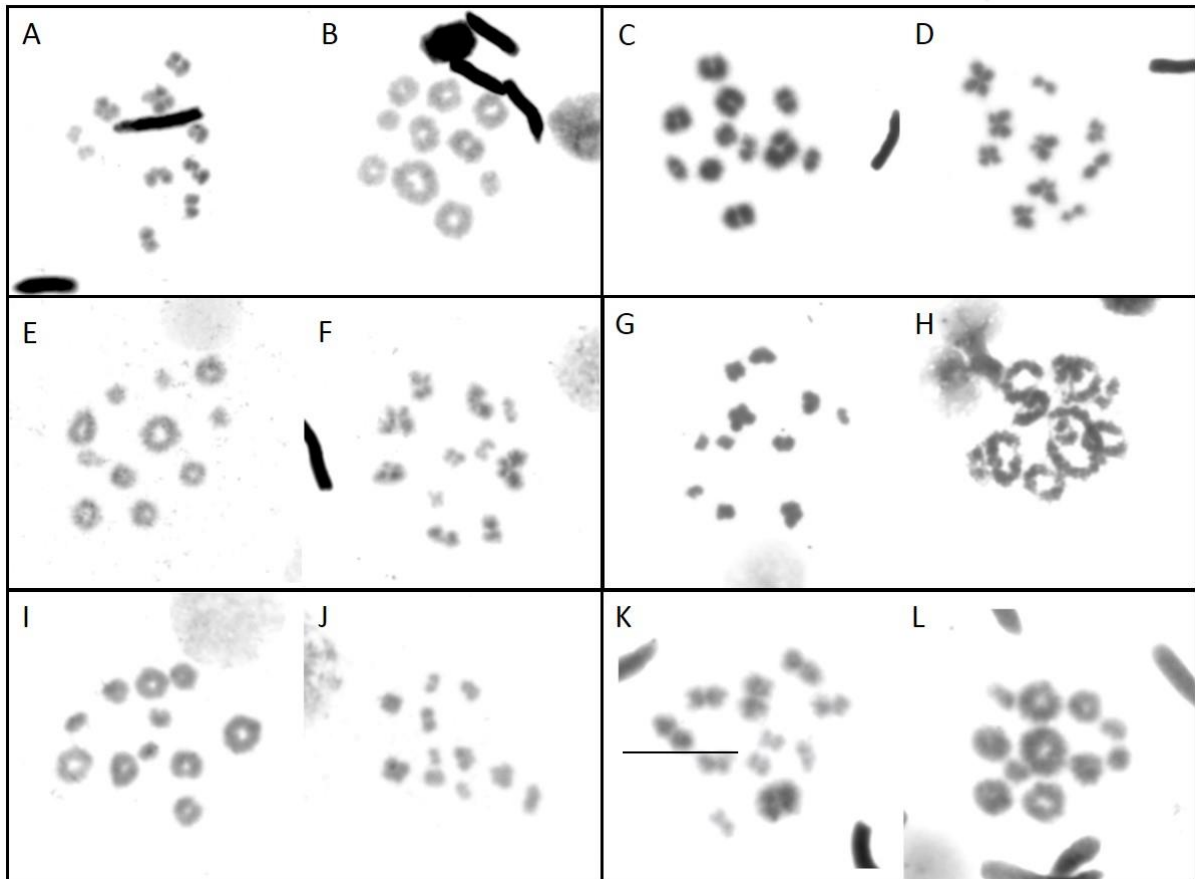


Figure 4. Distribution of repetitive telomeric sequences (TTAGGG_n) in the karyotypes of species in the *Leptodactylus melanonotus* group. A. *L. brevipes*; B. *L. intermedius*; C. *L. natalensis*; D. *L. petersii*; E. *L. podicipinus*; F. *L. pustulatus*; G. *L. riveroi*. Bar = 10µm

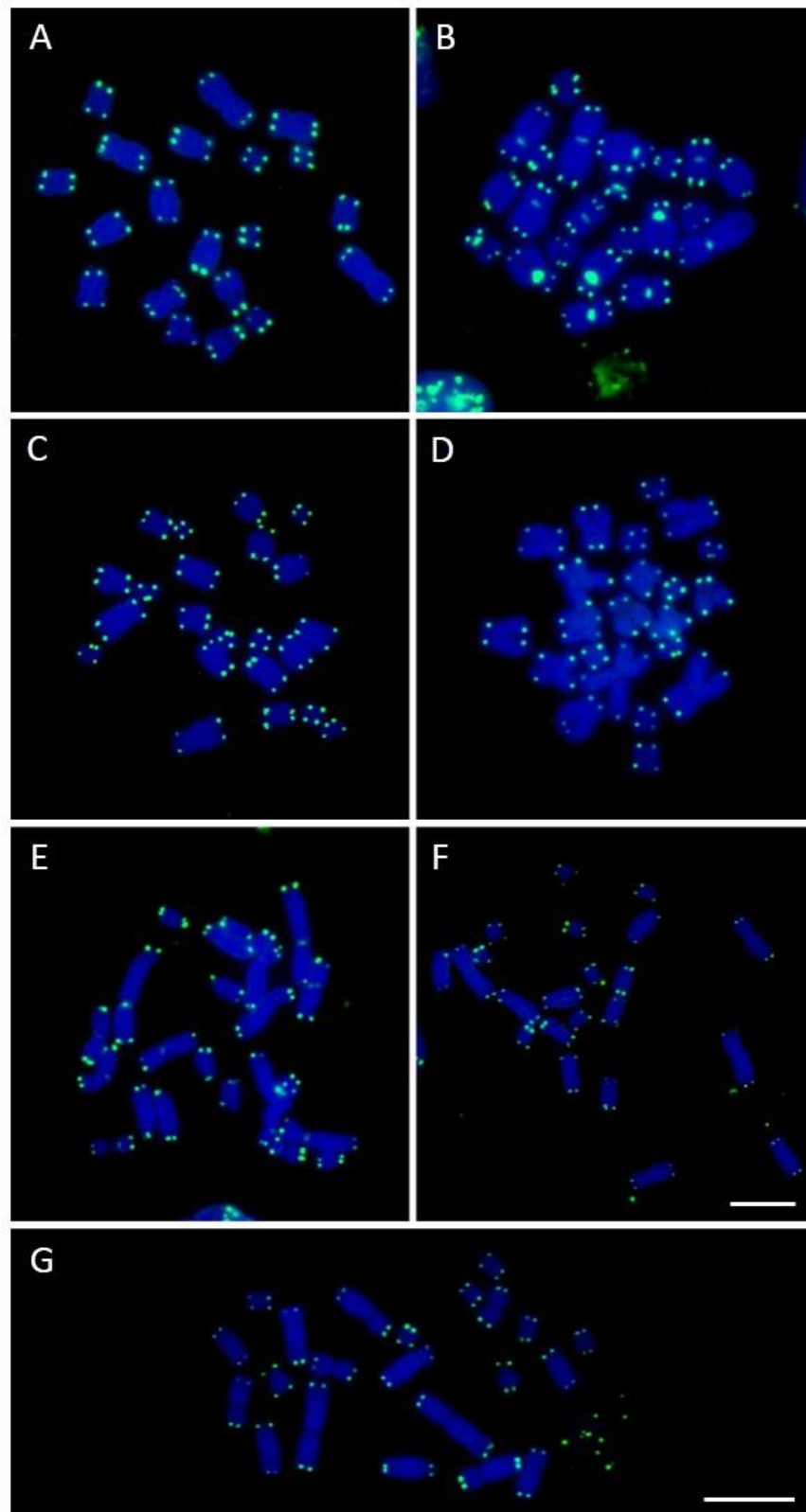


Figure 5. Neighbour-Joining tree obtained for COI dataset from species in the *L. melanonotus* group. 41

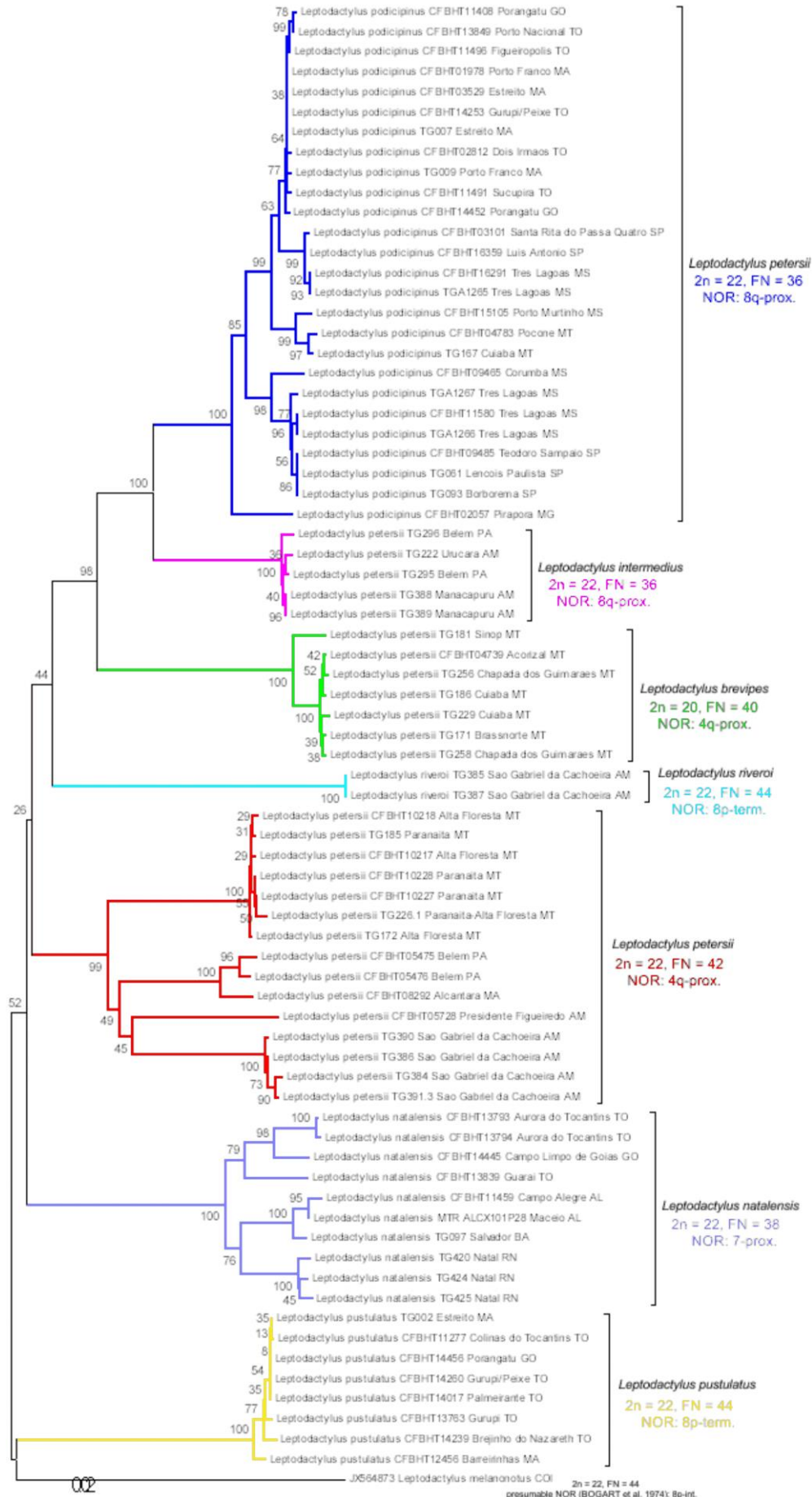


Figure 6. 16S rDNA Parsimony tree of specimens in the *L. melanonotus* group. Colored terminals show specimens analyzed in this study. Outgroup: *L. latrans*, *L. fuscus*, *L. pentadactylus*, and *Adenomera lutzi*.

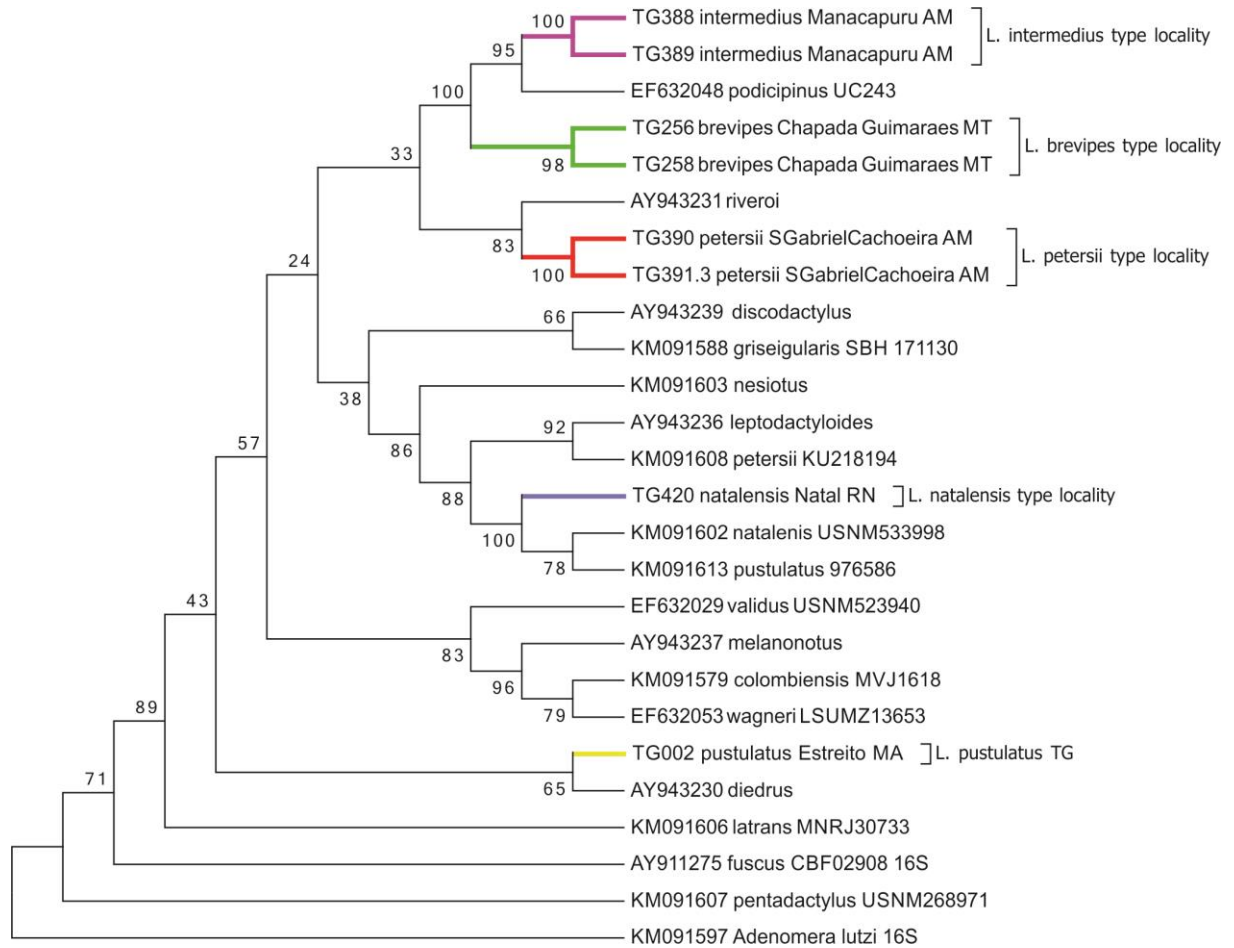
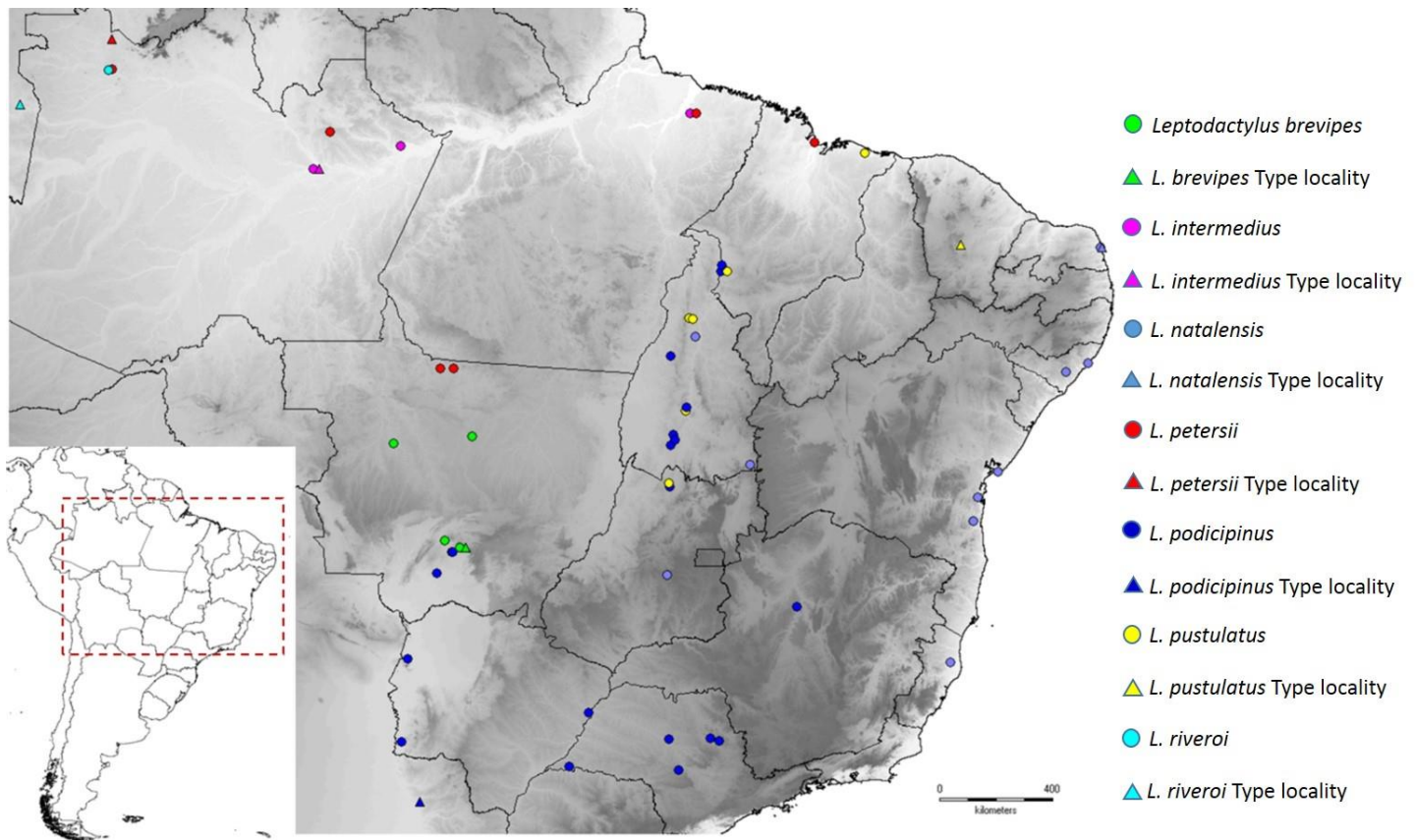


Figure 7. Distribution map of the analyzed species in the *L. melanonotus* group.



Discussion

Based on cytogenetic and molecular differences presented here, we concluded that *Leptodactylus brevipes* Cope 1887 and *Leptodactylus intermedius* Lutz 1930, up till now considered a synonym of *Leptodactylus petersii* Steindachner, 1864 should be considered valid species.

The species *L. intermedius* and *L. riveroi* were karyotyped for the first time. *L. intermedius* have very similar karyotype to that from *L. podicipinus*, at least by the cytogenetic techniques used herein. Also, these species sharing the same four telocentric chromosomes, NOR position, and the presence of telomeric repetitive sequences in the centromeres of all bi-armed chromosomes of *L. intermedius*, while only the pairs 5 and 7 of *L. podicipinus* had no fluorescent signals for telomeric sequences at centromeric regions.

The karyotype found for *L. petersii* in this study differs from those previously described by the morphology of pair 11 described by Amaro-Ghilardi et al. (2006) and Gazoni et al. (2012). These authors showed that this pair was metacentric in individuals collected in Paranaíba, MT, Igarapé Camaipi, and Macapá, in the state of Amapá, Brazil. The latter authors used an alternative chromosomal order relative to the pair 7 of *L. brevipes* (as *L. sp. aff podicipinus*) and *L. petersii*, based on presumed homeology inferred by chromosome replication bands after BrdU incorporation. Here, was opted a more conservative chromosome ordering, naming the chromosome pairs only by decrescent order of size.

The karyotypes of *L. natalensis*, *L. podicipinus*, and *L. pustulatus* are similar to those of specimens studied previously (Bogart, 1974; Silva et al., 2000; Amaro-Ghilardi et al., 2006 Arruda and Morielle-Versutte, 2008; Gazoni et al., 2012).

Further, only conventional staining was used to study the karyotype of *L. natalensis* by Bogart (1974) from specimens collected in Rio de Janeiro, bound south of its geographic distribution. To date, knowledge about the distribution of this species recognize it spreads only on coastal regions of Brazil, from the state of Rio de Janeiro, in the Southeast region to the state of Maranhão, in the Northeast (Frost, 2015). Our data on specimens grouping by similarity of mitochondrial DNA sequences (COI and 16S), reveal expanding the range of this species to central Brazil, in the states of Goiás and Tocantins.

The karyotypes of *L. podicipinus* and *L. pustulatus* are similar to those previously described (Bogart, 1974; Ghilardi-Amaro et al, 2006; Arruda and Morielle-Versutte et al, 2008) and *L. brevipes* for specimens identified as *Leptodactylus sp. aff. podicipinus* by Gazoni et al. (2012). For these species, the karyotypes can be considered similar, even with differences in the nomenclature or ordering adopted in the different articles.

Leptodactylus pustulatus and *L. riveroi* have more conserved karyotypes compared to the majority of the representatives of other species groups of *Leptodactylus* with only bi-armed chromosomes, with the sole exception of *L. latinasus* (*L. fuscus* group), which shows pair 8 telocentric.

The location of the NOR in the telocentric chromosomes 7 of *L. natalensis* is novel to the genus. Bogart, in 1974, reported interstitial secondary constriction in telocentric chromosomes 9 in *L. natalensis* from Rio de Janeiro, RJ, while the specimens from

the type locality showed proximal NORs in telocentric 7. These differences may represent intraspecific variation, but it would be necessary to deepen data for *L. natalensis* from Rio de Janeiro, as well as to the central Brazil populations.

The telocentric morphology of the smallest chromosome pair of *L. petersii* from its type locality (municipality of São Gabriel da Cachoeira, AM) could suggest intraspecific variation, once specimens analyzed earlier, Igarapé Camaipi, AP (Amaro-Ghilardi et al., 2006) and Paranaíta, MT (Gazoni et al., 2012), showed the pair 11 metacentric. Even, the different cytotypes found in sympatry could suggest the possibility of more than one taxon.

The molecular analysis of *L. petersii* also indicates high genetic diversity in the clade (diversity intra 8%). In addition, phylogenetic reconstruction showed that *L. petersii* previous analyzed by De Sá et al. (2014) are different of that from type locality analyzed in our work. Thus, it is fundamental a review of this taxon, with sample expansion, involving studies such as bioacoustics and morphology, as well as analysis of nuclear genes to better interpretation.

Additionally, as the holotype of *L. petersii* was considered lost by Heyer (1970) and the neotype proposed in the same publication was, in fact, a specimen of *L. pallidirostris* (see Heyer 1994), we suggest that one of the specimens of *L. petersii* analysed here, collected in São Gabriel da Cachoeira, AM, should be used to assign a neotype for *L. petersii*, since it is the closest locality from Marabitanas district, the type locality for *L. petersii*, in the municipality of São Gabriel da Cachoeira, AM.

L. pustulatus from Estreito, MA, presented similar karyotype to the specimens from Palmeirante, TO, studied by Amaro-Ghilardi et al. (2006). The fluorescent signals for telomeric sequences detected for *L. brevipes* collected in Lucas do Rio Verde, MT (Gazoni et al. (2012), were not observed for one of the individuals of Chapada dos Guimarães, MT, analyzed here by the same technique. The centromeric signals observed in the chromosomes of *L. intermedius* and *L. podicipinus* were observed in all three specimens from Manacapuru, AM, and in all four specimens from Belém, PA. These sequences could be explained by resultant of pericentric inversions that have not modified significantly the morphology of chromosomes, or even mean the presence of sites with heterochromatin with similar sequences to telomere (TTAGGG)_n. In addition to often interpretations, these sequences could not represent indicative of occurred rearrangements, but an accumulation of telomeric sequences that could act as a prerequisite for chromosomal rearrangement events, generating

stable inheritable chromosomes. It could explain cases in which interstitial telomeric sequences were observed without conspicuous altering karyotypes, as reported for *Xenopus clivii* (Nanda et al., 2008).

The results presented here, which helped to clarify part of the problematic taxonomic status of species in the *L. melanonotus* group, reinforcing the importance of using cytogenetic data associated to molecular analyses to solve taxonomic questions in *Leptodactylus* species, as well as in other groups of anurans pending resolution.

References

- AMARO-GHILARDI, R.C.; SKUK, G.; DE SÁ, R.O.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. **Phyllomedusa** 5:119-133, 2006.
- ARRUDA, M.P.; MORIELLE-VERSUTE, E. Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). **Genetics and Molecular Research** 7:161-176, 2008.
- BALDISSERA JR, F.A.; OLIVEIRA, P.S.L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética** 16:335-345, 1993.
- BOGART, J.P. A karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). **Copeia** 3:728-737, 1974.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research** 32:1792-1797, 2004.
- DE SÁ, R. O. D., GRANT, T., CAMARGO, A., HEYER, W. R., PONSSA, M. L., & STANLEY, E. Systematics of the neotropical genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae): phylogeny, the relevance of non-molecular evidence, and species accounts. **South American Journal of Herpetology** 9(Special Edition 1):S1-S128, 2014.
- FROST, D.R. 2015. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0 (Date of access: 07-20-2015). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA, 2015.

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

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

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

HEYER, W.R. Studies on frogs of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). VI Biosystematics of the Melanonotus group. **Contributions in Science, Los Angeles County Museum of Natural History** 191:1-48, 1970.

HEYER, W. R. Variation within the *Leptodactylus podicipinus-wagneri* complex of frogs (Amphibia: Leptodactylidae). **Smithsonian Contributions to Zoology** 546: 1-124, 1994.

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.

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

RIVERO, J. A. 1961. *Salientia of Venezuela*. Bulletin of the Museum of Comparative Zoology. Cambridge, Massachusetts 126: 1–207.

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

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.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution** 30:2725-2729, 2013.

6. Capítulo 2

More sex chromosomes than autosomes: twelve XY chromosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae)

Gazoni, T¹.; Narimatsu, H. ¹; Cabral-de-Mello, D.C. ¹; Haddad, C. ²; Parise-Maltempi, P.P¹.

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil

² Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil

Abstract

The occurrence of heteromorphic sex chromosomes is common in vertebrates/tetrapods being found characteristically in mammals and birds. However, in amphibians and reptiles the mechanisms of sex determination can vary from environmental sex determination, in some reptiles, to different mechanisms of genetic determination, involving or not differentiated sex chromosomes. Furthermore, there are relatively few amphibian species carrying morphologically distinct sex chromosomes, and when they are present, it is mostly only one pair of XX:XY or ZZ:ZW.

Here we present classical and molecular cytogenetic analyses of 13 specimens of the South American Bullfrog, *Leptodactylus pentadactylus*. Males collected at the Brazilian southern Amazon allowed us to reveal the presence of a meiotic ring-shaped chain composed by twelve XY chromosomes, in view of a $2n = 22$ karyotype. The most similar to this chain record in vertebrates was observed in the monotremes *Platypus* and *Echidna*, which are formed by 10 and 8 sex chromosomes respectively. Classical and Molecular cytogenetic approaches including GATA₍₈₎ microsatellite mapping and comparative genomic hybridization gives us initial directions to understanding this sex chromosome system, expressive to be the largest ever found in vertebrates.

Introduction

The evolution of sex chromosomes had occurred independently numerous times in different lineages, once they show many common features and thus represent a fascinating example of evolutionary convergence (Ellegren 2011). Among these common features there are the restriction of recombination, repetitive DNA accumulation and gene loss in the Y or W chromosomes that are responsible to chromosome degeneration and possible establishment of morphologically distinct elements (heteromorphic). Among vertebrates, heteromorphic sex chromosomes involved with sex determination are common among mammals (X0, XY or complex XY) and birds (Z0, ZW or complex ZW). On the other hand, among fish, amphibians and reptiles morphologically differentiated sex chromosomes are less common (but could involve XX:XY and ZZ:ZW sex systems) and other strategies for sex determination are observed, as well as environmental sex determination, replacing genetic sex determination. It is a testimonial of the high plasticity for sex determination and sex chromosome evolutionary histories (reviewed by Bachtrog et al. 2014).

The widespread homomorphy for sex chromosomes, as observed in amphibians, have been explained by two major hypotheses. The high-turnover model suggests that the chromosomes have not enough time to degenerate, because mutations affecting the sex-determining pathway appears regularly, replacing the ancient/ancestral sex chromosome (Schartl 2004; Volff et al 2007; Sarre et al 2011). This turnovers model has been supported by several systems in amphibians (Hotz et al., 1997; Miura, 2007; Malone and Fontenot, 2008; Stock et al., 2011a, 2013) and fishes (Tanaka et al., 2007; Cnaani et al., 2008; Ross et al., 2009). According to the “fountain-of-youth” model, sex chromosomes homomorphy is kept by eventual recombination. Although X-Y recombination is prevented in males, it could occur between these chromosomes in XY females during occasional sex reversal events, since recombination patterns are expected to rely on phenotype rather than genotypic sex (Perrin, 2009). The fountain of youth model have been recently supported in studies on amphibian species (Stock et al., 2011b, 2013; Guerrero et al. 2012).

Although most amphibians present homomorphic sex chromosomes, heteromorphic conditions were reported in low number of species and they are mainly simple ZZ:ZW or XX:XY sex chromosome mechanisms (review in Schmid,

2010). Cases of multiple sex chromosomes in amphibians were sporadically reported, as for example, in the anuran *Strabomantis biporcatus* (Schmid et al., 1992) (formerly *Eleutherodactylus maussi*) and in *Pristimantis riveroi* (Schmid et al. 2003) both species with an $X_1X_1X_2X_2♀:X_1X_2Y♂$, caused by centric fusion involving the original Y and a large autosome. Among other vertebrates multiple sex chromosome systems were well documented, except in birds, but among amniote it is more common in mammals (Pokorná et al. 2014). The most intriguing and unusual multiple sex chromosome meiotic chains were observed in mammals in the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*) and platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), which presents in males 9 and 10 chromosomes, respectively, probably added sequentially to sex chains through translocations (Grutzner et al. 2006; Rens et al. 2007).

Recently a chromosomal study in the Amazon bullfrog *Leptodactylus pentadactylus* reported an uncommon karyotype with the occurrence a multiple meiotic chromosome chain possibly originated by multiple translocations. This chain is apparently resolved along meiosis with alternate segregation and form balanced gametes (Gazoni et al., 2012), but due to the analysis of one unique male the results could not be conclusive in relation if this chain is well established in the population or species or if it could represent a sex chromosome chain. Here we expanded the chromosomal analysis in the species *L. pentadactylus* using male and female individuals and some classical and molecular cytogenetic approaches to test the hypothesis of the occurrence of a sex related chromosomal chain in the species. Our results provide evidences of an established chromosomal chain restrict to males with 12 chromosomes, which represents the largest sex chromosomal chain among vertebrates so far.

The presence of sex-related chromosome chains is a rare event, being found in plants, invertebrates, and in the famous case of the monotremes platypus and the short-beaked echidna (Grutzner et al., 2006). Meiotic multiples with more than four chromosomes were found for few anurans (Lourenço et al., 2000; Siqueira et al., 2004) and fishes (Gross, 2009), although in these cases, the translocations mentioned as responsible to the terminal chromosome associations are present in both sexes. An alternative hypothesis, for some of these chromosome associations, is non-chiasmatic ectopic pairing due to heterochromatic telomeric sequences,

proposed by (Schmid et al 2010). Nevertheless, heteromorphisms suggesting translocations are evident in most of these cases. The common fact is that in all these organisms, the chains are not well fixed in the studied populations, since the number of elements forming the chains is labile.

Commonly called South American Bullfrog, and even Smoky Jungle Frog, *Leptodactylus pentadactylus* is a species distributed in Amazon Basin, occurring in Colombia, Peru, Bolivia, Brazil, Guyana, Suriname, and French Guyana (Frost et al., 2015). The latest published data on chromosome studies of the Neotropical anuran genus *Leptodactylus* revealed a meiotic ring with twelve chromosomes, in addition of five bivalents as resulting of multiple reciprocal translocations from one single male specimen of *Leptodactylus pentadactylus* collected in the Southern Amazonia. In mitotic metaphases were found cells with $2n = 22$ and $FN = 44$, typical of major *Leptodactylus* species, but not all chromosomes were pareable (Gazoni et al. 2012). Usual karyotypes with $2n = 22$ and $FN = 44$ were described for individuals identified as *L. pentadactylus* from other locations/localities (Bogart et al., 1974 Brum-Zorrilla & Saez, 1968), but without comments in the occurrence of natural translocations. The specimens analysed by Bogart collected in São Paulo state, nevertheless, should represent *L. labyrinthicus* or *L. flavopictus*, the only species recognized for the *L. pentadactylus* group in this Brazilian region according to actual knowledge on species occurrence. Partial comment on this misidentification was reported by Gazoni et al. (2012).

Material and Methods

In this work we studied six females and seven males of *L. pentadactylus* collected actively in the Brazilian southern Amazonia at the municipality of Paranaíta, Mato Grosso state between 2012-2014 (Figure 1). Eight of them, five females and three males, were sampled from the same reproductive site. All animals were caught under collection permission of Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio - SISBIO authorizing 30202-2). The deep sedation euthanasia by dermal absorption of chlorhydrate of lidocaine was in accordance with the Ethical Committee in Animal Use (CEUA – permission 027/2011), UNESP, Rio Claro, Brazil. Direct cytological preparations were obtained from bone marrow, liver, and testis (Baldissera et al. 1993; Schmid, 1978), after a 4 hours *in vivo* colchicine treatment. Conventional analysis were performed using Giemsa staining in all

animals and some chromosomes preparations of distinct males and females were submitted to C-banding according to Sumner et al. (1972) and used in Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) experiments according to Pinkel et al. (1986) using distinct probes, such (GATA)8, telomeric repeat TTAGGG and major rDNA HM123 (Meunier-Rotival et al., 1979). Finally, Comparative Genomic Hybridization (CGH) were performed according to Abramyan et al. (2009) with modifications, as follows: 300ng of female and male genomic DNA labelled with biotin and digoxigenin through nick-translation, respectively, were co-precipitated with female unlabelled digested DNA (100-500 bp). 3 μ L of probe were added in the mixture for hybridization, which was performed separately in male and female chromosome preparations. The probes labelled with biotin were detected with streptavidin-Alexa-488 (green spectrum) and digoxigenin labelled DNA was detected using anti-digoxigenin-rhodamine (red spectrum). Images were captured using the software DP Controller and a cooled camera (DP71) associated to a fluorescence microscope Olympus BX51. Slight uniform adjustments in contrast were carried using DP Manager software. Figures were organized using Corel X6 Suit program.

Results

The karyotype of the analyzed specimens presented $2n = 22$ and $FN = 44$ as previously reported by Gazoni et al. (2012). Some chromosomes differed in morphology between males and females. Here we proposed modifications regarding to karyotypic description of Gazoni et al. (2012) considering the sizes of the chromosomes in the ring. All females had eleven pairs of morphologically homologous chromosomes. Chromosomes 1, 5 (X3), 6, 8, 9, 10 (X5) and 11 (X6) are metacentric, 2, 3 (X1), and 7 (X4) are submetacentric and pair 4 (X2) is subtelocentric. Nevertheless, males presented karyotype with at least one chromosome homologous to that pairs found in females, but in these karyotypes were present 12 translocated chromosomes, six of them characterizing Y chromosomes, in wich three of these Y chromosomes are unpairable. The putative X and Y chromosomes were identified in male (Figure 2 B) and female (Figure 2 A) karyotypes. The analyses of meiotic cells, i.e. diakinesis/metaphase I revealed additional translocated chromosomes forming a ring-shaped chromosomal chain (Figure 3 A and B), harboring 12 elements that corresponds to $X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5X6Y6$ in males (Figure 3 A and B). All meiotic

metaphases from the eight males studied presented the same chromosomal constitution and ordering by size, of the elements in the multivalent ring. FISH using as probe the (GATA)₈ microsatellite revealed signal exclusively in the pericentromeric region of two small chromosomes in both sexe, corresponding in males to a heteromorphic pair included in the meiotic ring (Figure 5 A-D). The telomeric motif was exclusively mapped in the canonical telomeric regions and no ITS (interstitial telomeric sites) were noticed, including the rearranged chromosomes in the chain (Figure 5 D). The chromosomes belonging to meiotic chain are associated by terminal contact, i.e. telomere-telomere (Figure 5 E and F). The 45S (18S + 28S) HM123 rDNA probe was mapped in pair 8, which was out of the chromosomal chain (Figure 5 G), as previously reported (Gazoni et al., 2012). The CGH experiments did not produced differential results between males and females or for the distinct probed used (male and female genomic DNA), being observed faint signals for the two probes along entire euchromatin and strong signals placed in centromeric heterochromatin and terminal regions (Figure 4).

Figure 1. Locality of collection of specimens of *Leptodactylus pentadactylus*, in Paranaíta (9° 39'S ; 56° 28'W), Mato Grosso state, in Brazil.

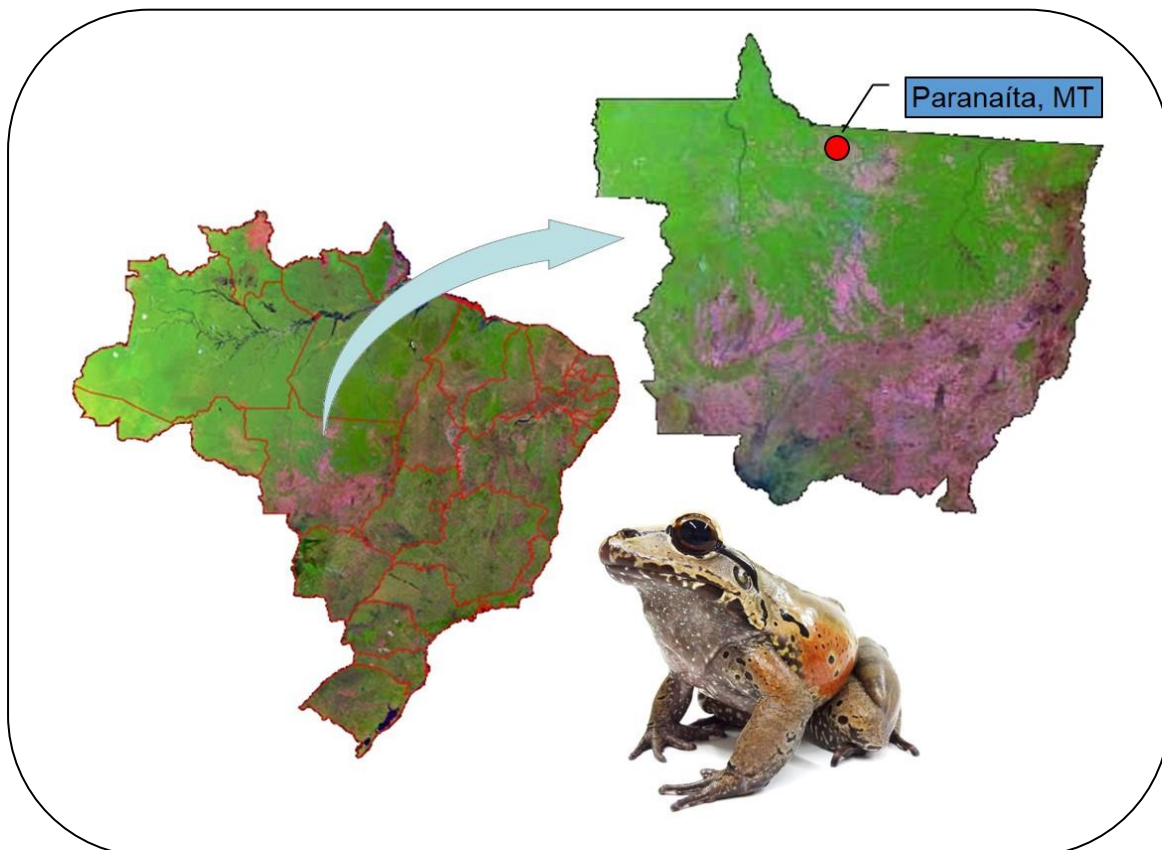


Figure 2. Karyograms of *L. pentadactylus* stained with Giemsa. A. Female, showing no heteromorphic chromosomes. B. Karyogram from male, with heteromorphic chromosome pairs (X and Y chromosomes). Bar = 10 μ m

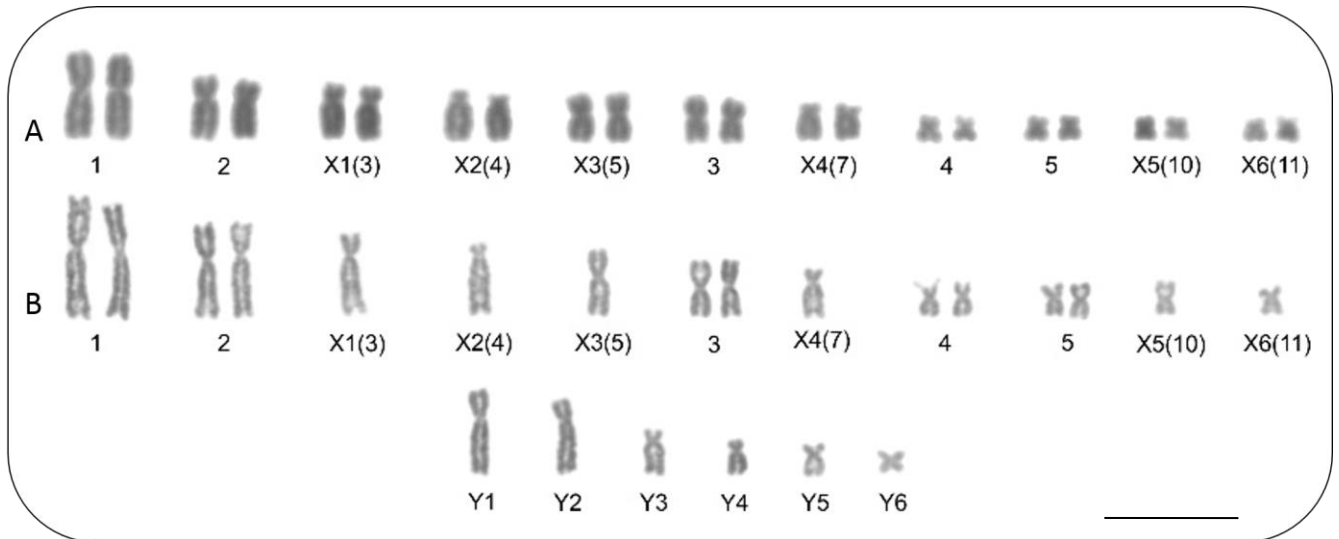


Figure 3. A and B. Diakinesis/metaphase I of different specimens of *L. pentadactylus*. C. Two metaphase II of *L. pentadactylus* from same specimen, showing different chromosome constitution of gametic cells. Bar = 10 μ m

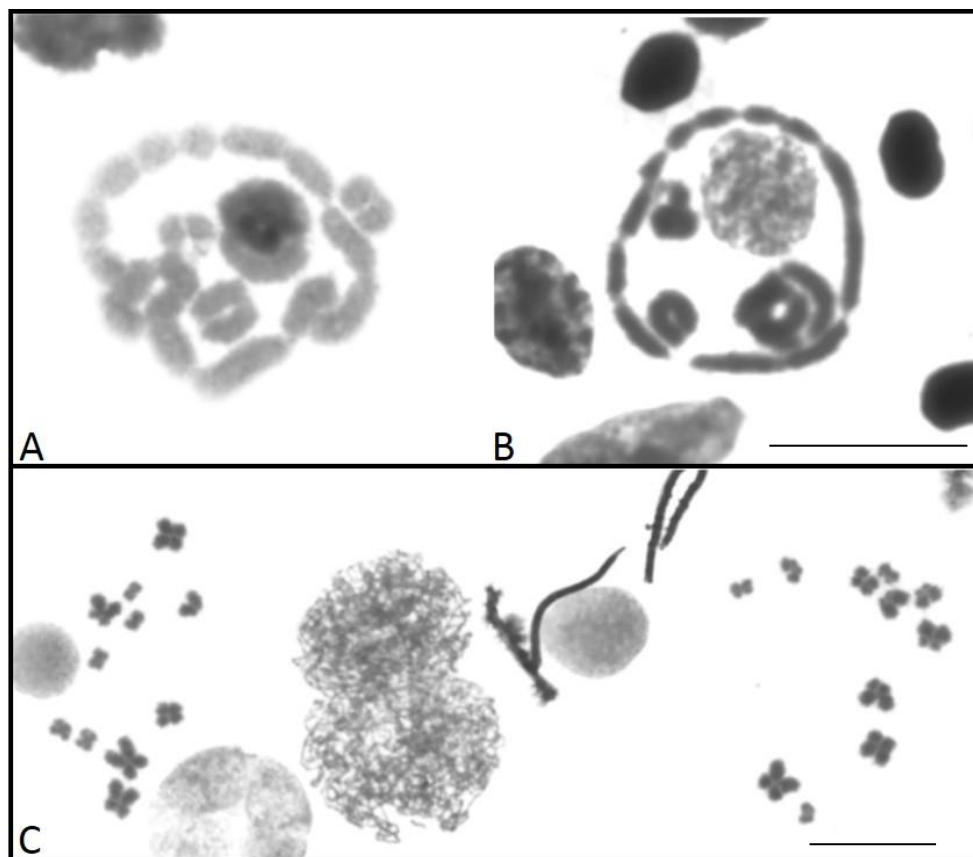


Figure 4. Comparative genome hybridization (CGH) in mitotic metaphases of female and male of *L. pentadactylus*. None sex-specific/differential hybridization was detectable for both sexes. Bar = 10µm

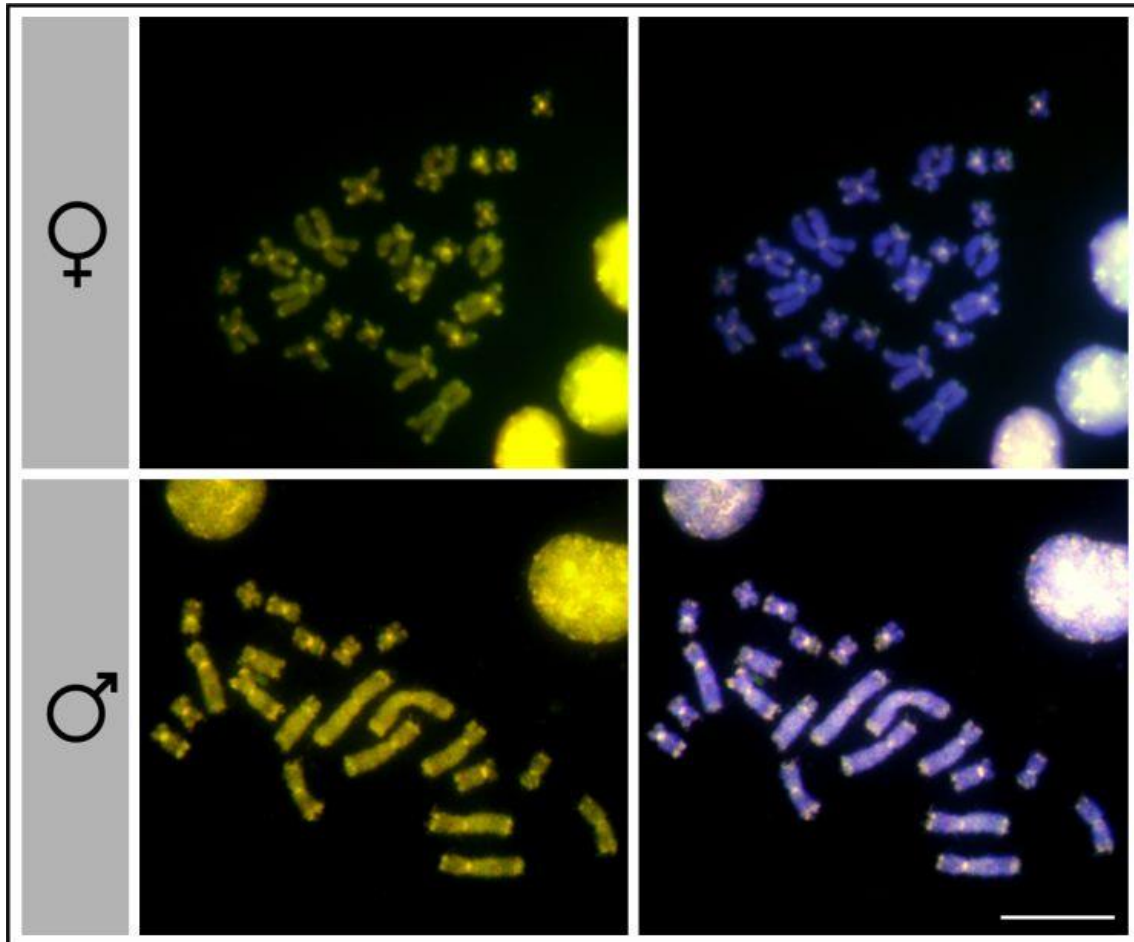
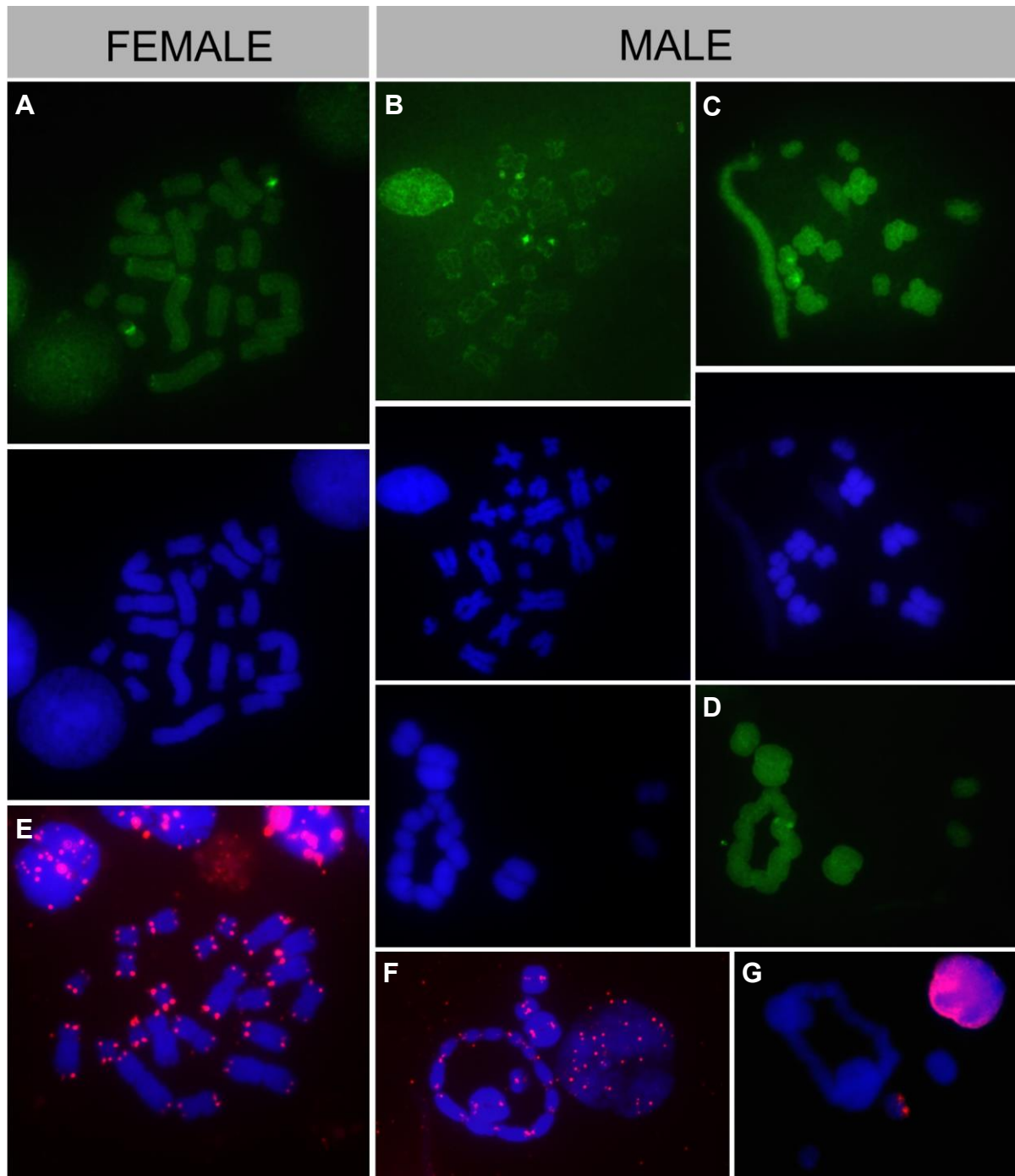


Figure 5. FISH with different probes in *L. pentadactylus*. Microsatellite GATA(8): A. mitotic female chromosomes with signals in a homomorphic pair. B. mitotic male chromosomes with signals in a heteromorphic pair. The same signals from this heteromorphic pair were detected in metaphase II (C), and integrating the chromosome chain in diakinesis (H). Telomeric TTAGGG(n) sequences showing only terminal signals in mitotic metaphase (I), and in diakinesis (J). K. Ribosomal DNA probe (HM123) hybridized in a bivalent. All the metaphases were counterstained with DAPI, as showed unmerged exclusively in D-G.



Discussion

These findings represents a new break of record for vertebrates, since the species holding this position so far was the platypus, with ten XY chromosomes.

Interestingly, the relative number of sex chromosomes originated in *L. pentadactylus* is much bigger in comparison with the platypus, wich has 10 sex chromosomes, in a karyotype with $2n = 52$, while *L. pentadactylus* achieved 12 sex chromosomes in a karyotype with $2n = 22$ chromosomes during its evolution.

From the translocation steps that occurred in several of the chromosomes and isolated them from recombination events with the non-translocated autosomes, they could evolve as sex chromosomes independently during generations.

The results presented here make clear that the sex-linked chromosomes are fixed in this analysed population of *L. pentadactylus* (seven females and six males), reinforcing so far, the occurrence of a seeming balanced proportion of males and females that suggest no interference in male viability.

The detected telomere sequences, as showed before (Gazoni et al., 2012), did not recognize ITS as remaining of the supposed translocations occurred in the karyotype, and confirmed the presence of 12 chromosomes in the rings.

This is the first case of identification of heterologous sex chromosomes in the genus *Leptodactylus*. Barale et al. (1990) suggested a first case of sex chromosomes (XY), identified by heteromorphic C bands at chromosomes 1, for specimens of *Leptodactylus chaquensis* collected in Argentina. Furthermore, the analyses of individuals from Brazil (Gazoni et al., 2012) do not confirmed this observation.

Although meiotic chains with more than four chromosomes has been reported for the anuran species *Haddadus binotatus*, *Aplastodiscus albofrenatus*, and *A. arildae*, for these species the translocated chromosomes were not sex related/specific. These multivalent associations were supposed to be formed by non-chiasmatic ectopic pairing, due to heterocromatic sequences (Schmid, 2010).

The CGH analyses suggest that the absence of sex-specific signal was observed could be suggestive of a relatively early origin to these multiple sex chromosome system or that the pool of sequences hybridized is not specifically enough to show it. CGH on amphibian chromosomes were restricted to *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* (Uno et al., 2008) and to the cane toad (*Bufo marinus*) (Abramyan et al.

2009). In the former study, as for *L. pentadactylus*, both males and females of *Xenopus* species exhibited same hybridization signals, with no detectable sex-specific signals, even between the known homomorphic sex chromosomes. To the latter species, based in specific signals were found only in one of the chromosomes 7 in females, a zz/zw sex chromosome system involving the NOR-bearing chromosomes could be confirmed.

The accumulation of GATA₍₈₎ microsatellite in one chromosome pair participating of the meiotic sex-ring suggest that this pair could have a special relationship with sex chromosome differentiation in *L. pentadactylus*. Microsatellite motifs were common to Y/W chromosomes in diverse sauropsid taxa, suggesting that these repetitive motifs were commonly present on the sauropsid genomes at low copy number and amplifications of these motifs might have a functional role in composing constitutive heterochromatin of sex chromosomes (review in Matsubara et al., 2015). These authors proposed that amplification of microsatellite repeats is tightly associated with the differentiation and heterochromatinization of Y/W chromosomes in sauropsids, as well as in other taxa. GATA and AGAT repeat motifs, considered equal, by same hybridisation patterns (Matsubara et al., 2015), were amplified and hybridised to sex chromosomes of *Mus musculus* (Mammalia, Muridae) (Singh et al., 1994), in the Testudine *Cheludina longicollis* (Chelonidae), and in the Squamata species *Notechis scutatus* (Elapidae), *Bassiana duperreyi* (Scincidae), *Aprasia parapulchella* (Pygopodidae), and four species of *Anolis* (Iguanidae) (O'Meally et al., 2010; Matsubara et al., 2013; Gamble et al. 2014; Matsubara et al., 2015). However, no data regarding to microsattelite on chromosomes of anurans are available so far.

In the *Leptodactylus pentadactylus* phenetic group (Heyer, 1972), most of the species show sex dimorphism, but the specimens here analyzed did not show any conspicuous external morphological feature, as presence os spines in males thumbs, that could represent sex dimorphism. A revision about the taxonomic status of this population of *L. pentadactylus*, face populations from other localities, including that in wich the species was described by Laurenti, in 1768 (Frost, 2015), the type locality, in Surinam, is necessary to verify the presence or absence of this complex sex-determining system, once it can be indicative of the presence of more than one species under synonymy.

Simple cytogenetic approaches as well as standard staining are considered sometimes as lagged, and less important than new and complex techniques, but constitute the first, and more important step, to reveal and understand the complexity and diversity of the genomes organization and evolution.

More technical approaches, as well as chromosome/gene mapping, should be helpful to detail the segregation of the sex chromosomes and to improve knowledge about the origin and evolution of this special sex determining system.

References

Abramyan, J., Ezaz, T., Graves, J. A. M., Koopman, P. Z and W sex chromosomes in the cane toad (*Bufo marinus*). *Chromosome Research* **17**, 1015-1024 (2009).

Bachtrog, D., Mank, J.E., Peichel, C.L., Kirkpatrick, M., Otto, S.P., et al. Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biology* **12**: e1001899. doi:10.1371/journal.pbio.1001899, (2014).

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

Barale GD, Senn EP, Lisanti JA: Polimorfismo de bandas C ligado al sexo en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). *Rev. Univ. Nac. Río Cuarto* **10**, 51–53 (1990).

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

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

Cnaani A, Lee BY, Zilberman N, Ozouf-Costaz C, Hulata G, et al. Genetics of sex determination in Tilapiine species. *Sex. Dev.* **2**, 43-54 (2008).

Ellegren H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nature Reviews* **12**, 157-166 (2011).

Frost DR. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (access on july 20, 2015). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA, (2015).

Gamble T, Geneva AJ, Glor RE, Zarkower D. Anolis sex chromosomes are derived from a single ancestral pair. *Evolution* **68**:1027-1041 (2014).

Gazoni T, Gruber SL, Silva APZ, Araújo OGS, Narimatsu H, Strüssmann C, Haddad CFB, Kasahara S. Cytogenetic analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. *BMC Genetics* **13**, 109 (2012).

Gross MC, Feldberg E, Cella DM, Schneider MC, Schneider CH, Porto JIR, Martins C. Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity* **102**, 435-441 (2009).

Gruetzner F, Ashley T, Rowell DM, Graves JAM. How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. *Chromosoma* **115**, 75-88 (2006).

Grützner, F. *et al.* In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* **432**, 913-917 (2004).

Guerrero R, Kirkpatrick M, Perrin N. Cryptic recombination in the ever-young sex chromosomes of Hylid frogs. *J. Evol. Biol.* **25**, 1947-1954 (2012).

Heyer WR. The status of *Leptodactylus pumilio* Boulenger (Amphibia, Leptodactylidae) and the description of a new species of *Leptodactylus* from Ecuador. *Contributions in Science, Natural History Museum of Los Angeles County* **231**, 1-8 (1972).

Hotz H, Uzzell T, Berger L. Linkage Groups of Protein-Coding Genes in Western Palearctic Water Frogs Reveal Extensive Evolutionary Conservation. *Genetics* **147**, 255-270 (1997).

Laurenti JN. Specimen Medicum, Exhibens Synopsin Reptilium Emendatum cum Experimentis Circa Venena et Antidota Reptilium Austriacorum. *Wien Austria: Joan. Thom. Nob. De Trattner*, 1768.

Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ. A second case of multivalent meiotic configurations in diploid species of Anura. *Genetics and Molecular Biology* **23**, 131-133 (2000).

Malone JH, Fontenot BE. Patterns of reproductive isolation in toads. *PLoS One* **12**, e3900 (2008).

Matsubara K, Knopp T, Sarre SD, Georges A, Ezaz T. Karyotypic analysis and FISH mapping of microsatellite motifs reveal highly differentiated XX/XY sex chromosomes in the pink-tailed wormlizard (*Aprasia parapulchella*, Pygopodidae, Squamata). *Mol Cytogenet* **6**:60 (2013).

Matsubara K, O'Meally D, Azad B, Georges A, Sarre SD, *et al.* Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida. *Chromosoma* doi 10.1007/s00412-015-0531-z, (2015).

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. An evolutionary witness: the frog *Rana rugosa*, underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female. *Sex. Dev.* **1**, 323-331 (2007).

O'Meally D, Patel HR, Stiglec R, Sarre SD, Georges A, Graves JAM, et al. Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. *Chromosome Res* **18**:787-800 (2010).

Perrin N: Sex reversal: a fountain of youth for sex chromosomes? *Evolution* **63**, 3043-3049 (2009).

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

Pokorná M, Altmanová M, Kratochvíl L. Multiple sex chromosomes in the light of female meiotic drive in amniote vertebrates *Chromosome Research* **22**, 35-44 (2014)

Rens W, O'Brien P, Grützner F, Clarke O, Graphodatskaya D, et al. The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. *Genome Biology* **8**, R243 (doi:10.1186/gb-2007-8-11-r243), 2007.

Ross JA, Urton JR, Boland J, Shapiro MD, Peichel CL. Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae). *PLoS Genet.* **5**, e1000391 (2009).

Sarre SD, Ezaz T, Georges A. Transitions between sex-determining systems in reptiles and amphibians. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* **12**, 391-406 (2011).

Schartl M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates *Current Opinion in Genetics & Development* **14**, 634-641 (2004).

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

Schmid M, Steinlein C, Feichtinger W. First demonstration of multiple sex chromosomes in amphibians: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). In Chromosome banding in Amphibia XVII. *Chromosoma* **101**, 284-292 (1992).

Schmid M, Feichtinger W, Steilein C, Visbal García R, Fernandez Badillo A. Chromosome banding in Amphibia XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenet Genome Res.* **101**, 62-73 (2003).

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

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

Singh L, Panicker SG, Nagaraj R, Majumdar KC. Banded krait minor-satellite (Bkm)-associated Y chromosome-specific repetitive DNA in mouse. *Nucleic Acids Res* **22**:2289-2295 (1994).

Stöck M, Croll D, Dumas Z, Biollay S, Wang J, Perrin N. A cryptic heterogametic transition revealed by sex-linked DNA markers in Palearctic green toads. *J. Evol. Biol.* **24**, 1064-1070 (2011a).

Stöck M, Horn A, Grossen C, Lindtke D, Sermier R, et al. Ever-young sex-chromosomes in European tree frogs. *PLoS Biol* **9**, e1001062 (2011b).

Stöck M, Savary R, Zaborowska A, Górecki G, Brelsford A, Rozenblut-Kościsty B, Ogielska M, Perrin N. Maintenance of Ancestral Sex Chromosomes in Palearctic Tree Frogs: Direct Evidence from *Hyla orientalis*. *Sex. Dev.* **7**, 261-266 (2013).

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

Tanaka K, Takehana Y, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M. Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related *Oryzias* fishes: substitution of the master sex-determining gene. *Genetics* **177**, 2075-2081 (2007).

Uno Y, Nishida C, Yoshimoto S, Ito M, Oshima Y, et al. Diversity in the origins of sex chromosomes in anurans inferred from comparative mapping of sexual differentiation genes for three species of the Raninae and Xenopodinae. *Chromosome Res.* **16**, 999-1011 (2008).

Volff JN, Nanda I, Schmid M, Scharl M: Governing sex determination in fish: regulatory putsches and ephemeral dictators. *Sex. Dev.* **2**, 85-99 (2007).

7. Capítulo 3

Flow-sorted chromosomes of *Xenopus (Silurana) tropicalis* (Pipidae) and its potential use to chromosome evolution studies in Amphibia

Thiago Gazoni, Jorge C. Pereira, Nicolas Pollet, Célio F.B. Haddad, Patrícia P. Parise-Maltempi, Malcolm A. Ferguson-Smith

¹Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Rio Claro, São Paulo, Brazil

²University of Cambridge Department of Veterinary Medicine, Cambridge, CB3 0ES, UK

³Cytocell Ltd, Cambridge Technopark, Newmarket Road, Cambridge CB5 8PB, UK

⁴Laboratoire Evolution, Génomes, Comportement et Écologie, CNRS, Université Paris-Sud, 91198 Gif sur Yvette, France

⁵Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Rio Claro, São Paulo, Brazil

Abstract

The African western clawed frog (*Xenopus tropicalis*, *XTR*), also known as tropical clawed frog, is an important model organism for genetic and developmental studies. This unique diploid species in the genus *Xenopus* has 10 chromosome pairs ($2n = 20$) and a small genome, of about 1.7 Gbp, while the majority of other diploid anurans have genomes about two times bigger. These characteristics make *X. tropicalis* a special candidate for obtaining DNA probes from whole chromosomes for cytogenetic studies of amphibians. We generated chromosome-specific painting probes by flow-sorted chromosomes obtained from fibroblast cell cultures of a previously established *Xenopus tropicalis* cell line (SPEEDY cell line). Each chromosome sample was amplified by degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR), and then biotin-labeled by a new round of amplification. We discuss on the potential use of these probes in studies involving comparative painting with other anuran species.

Introduction

There are currently great expectations regarding the FISH technique, with the use of parts or whole chromosomes as probes. Such experiments are termed chromosome painting or FISH paint, when one or all chromosomes of different species are compared with greater accuracy than the other types of banding. The partial or whole-chromosome probes may be obtained by microdissection with microneedles or laser, provided that the chromosomes are precisely recognizable using microscopic observations. An alternative to sort chromosomes by their size and their base composition is flow cytometry. Flow cytometry is a, safe and effective method to produce improved probes for FISH starting from cultured cells. It has been an important tool to obtain isolated chromosomes from plants and animals.

Several research groups used flow cytometry alone or in combination with banding patterns to works has identify chromosomal rearrangements and study the evolution of karyotypes. Probes obtained by flow sorting and chromosome painting are used in the comparative analysis of karyotypes of most vertebrate groups, such as innumerable mammals (Pieczarka et al., 2005; Ventura et al., 2009; Beklemisheva et al., 2011; Romanenko et al., 2015), avian (Oliveira et al., 2005; Nie et al., 2009), reptiles (Trifonov et al., 2011), and fishes (Nagamachi et al., 2010), as well as comparative analyses among different vertebrates groups (Grützner et al., 2004; Pokorná et al., 2011; 2012). However, nobody reported the use of flow sorted chromosomes to study the evolution of amphibian karyotypes.

Xenopus tropicalis has become an important model organism in genetic and development studies of amphibians (Hellsten et al., 2010; Harland and Grainger, 2011). As the unique diploid species in the *Xenopus* genus so far, *X. tropicalis* genome has 10 chromosome pairs ($2n = 20$) (Tymowska, 1973) and one of the smallest genome among amphibians with 1.7×10^9 bp i.e. approximately half size found for most other species diploid amphibians (Gregory, 2015). This feature probably reduces the chances to suffer from of the non-specific hybridization signals in FISH that would be due to conserved repetitive DNA sequences. Thus *X. tropicalis* chromosomes are special candidates to obtaining DNA probes from whole chromosomes and use them for cytogenetic studies in amphibians.

One limitation to obtain sorted chromosomes from amphibian species remains the development of cell cultures to provide enough metaphases, a fundamental condition to isolate chromosomes by flow cytometry.

Sinzele et al. (2012) developed and characterized a new cell line characterized by a short doubling time period of, between 24 to 48h in optimum conditions. This cell line called SPEEDY has a chromosome 10 trisomy, but a stable genome with $2n = 21$ chromosomes compared to the 20 chromosomes typically found in this species.

Thus, we considered SPEEDY cell line as ideal for the isolation for the first flow-sorted amphibian chromosomes.

The obtained data show that flow cytometry was efficient to isolate individual *Xenopus tropicalis* chromosomes. In the future, flow-sorted chromosomes could be sequenced using the approach described by Seifertova et al. (2013), and this can be a powerful strategy to map the problematic genome sequences in this model organism. Moreover the whole chromosomes probes obtained from *X. tropicalis* can be useful in karyotype evolution studies involving other amphibian groups.

Material and Methods

We obtained metaphases for slides preparation for flow sorting from *Xenopus tropicalis* cells (SPEEDY cell line - Sinzele et al., 2012) following the protocols described in that work.

Chromosome preparations

We prepared chromosome as previously described by Krylov et al., 2007 and applied to SPEEDY cells by Sinzelle et al. (2012). Briefly, we added colcemid (Invitrogen) to the culture medium at a final concentration of 0.6 $\mu\text{g/ml}$. We harvested cells by centrifugation after 4-5 h incubation and treated them with a hypotonic solution for 20 min.

We fixed the cell suspension in methanol and acetic acid (3:1 v/v) and dropped it onto microscopic slides to obtain metaphase spread.

Flow sorting

We performed the flow sorting experiments at the Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, UK. We prepared chromosome-specific probes using degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR) on flow-sorted chromosomes after previous treatments and procedures as reported in Telenius et al. (1992), Yang et al. (1995), and Nagamachi et al. (2010). Sorted chromosomes were prepared as described and were stained with Hoechst 33258 (2 mg/mL) and Chromomycin A3 (40 mg/mL) in the presence of magnesium sulphate (2.5 mmol/L) for 2 h. we added sodium sulphate (25 mmol/L) and sodium citrate (10 mmol/L) 15 min prior to flow sorting. We sorted chromosome sorting using a dual-laser cell sorter (FACStar Plus; Becton Dickinson Immuno-Cytometry Systems). We sorted approximately 400 chromosomes were sorted from each selected peak in the flow karyotype. The chromosomes were sorted directly into PCR tubes containing 30 μ L distilled water. These samples were amplified by a first round of DOP-PCR using the primer 6 MW (Telenius et al., 1992). We used one μ L of this primary PCR product for labelling with biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim), in a second round of DOP-PCR using the same primer. We detected the biotin-labelled probes using avidin-Cy3.

Fluorescence *in situ* hybridisation

We performed FISH experiments by combining the techniques described in Krylov et al. (2010) and Rens et al. (1999; 2006). Approximately 10 μ L of metaphase preparation were dropped onto a clean, dry slide. We then dehydrated slides at room temperature by two minutes washes in ethanol 70% - 90% and then in 100% for 4 minutes. We then incubated the preparations in a pre-heated solution of 1% pepsin in 1M HCl at 37°C for five minutes. We washed the slides in 2xSSC twice, for five minutes, and dehydrated them again in the same ethanol series for 5 minutes each. We dried the slides for approximately 1 hour at 65°C in a oven before chromosomal DNA denaturation in 70% formamide in 2xSSC at 70°C for two minutes. Immediately, slides were immersed in ice-cold 70% ethanol for 4 minutes followed by new dehydration in the same ethanol series. Hybridisation mixture contained 1.5 μ L of biotinylated probe and 7.5 μ L of hybridisation buffer (40% deionized formamide (v/v),

10% dextran sulphate, 2x SSC, 0.05 M phosphate buffer, pH 7.3), without addition of competitor DNA. This mixture was denatured for 10 min at 65°C, pre-annealed at 37°C for 1 hour and applied to each slide, covering with a 22x22mm coverslip. Hybridisation was carried out at 37°C for approximately 12 hours for same species and 72 hours for cross-species experiments. Post-hybridisation washes were performed in 50% formamide/1x SSC twice for 5 min each, followed by 2x SSC twice for 5 min each, and 4x SSC with 0.05% Tween-20 (4xT), and then once for 4 min at 42°C. Probe detection was carried out using 200 µL per slide of diluted Cy3-streptavidin antibody (Amersham) (1:500), in 4xT, at 37°C for 30 min. After detection, slides were washed in 4xT three times for 3 min each at 42°C and mounted in Vectashield mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories) and sealed with nail varnish. Images were captured and processed using the CytoVision Genus system (Applied Imaging, USA) and a Cohu CCD camera mounted on an Olympus BX60 microscope. Brightness and contrast were corrected with Corel Draw Suit X6.

The chromosome nomenclature adopted was that used by Khokha et al. (2009) in which the chromosomes were classified by decreasing size.

Results

Were isolated chromosomes from 12 peaks (A-J), recognized in the flow cytometry karyotype (Figure 1). We were able to recognize eight chromosomes from these peaks after FISH/painting assignment (Figures 2 and 3). We found that most of the probes made from these sorted chromosomes hybridised to a single pair of homologous chromosomes with relatively few nonspecific signals (Figure 2 A,B,C,D,D1,F,G,H,I,J).

We observed that probes generated from peaks E and K produced some hybridisation signals either on more than one chromosome pair (Figure 2E) or were not specific at all (Figure 2K).

The chromosome 7 is heteromorphic by flow karyotype, since we recovered it from three of the selected peaks (C, D and D1). This chromosome pair presented mainly uniform hybridization throughout the chromosome, without preference for the nucleolar organizer region at the long chromosome arm, which could be expected by

the presence of high amount of repetitive sequences. Actually we could notice an absence of hybridization signals in the nucleolar organizer region on some metaphases spread.

Figure1. Bivariate flow karyotype of *Xenopus tropicalis* (SPEEDY cell line). The peaks corresponding to the 12 obtained flow-sorted chromosomes (A-K) are shown. The FISH-assigned chromosomes are detailed in the Figures 2 and 3.

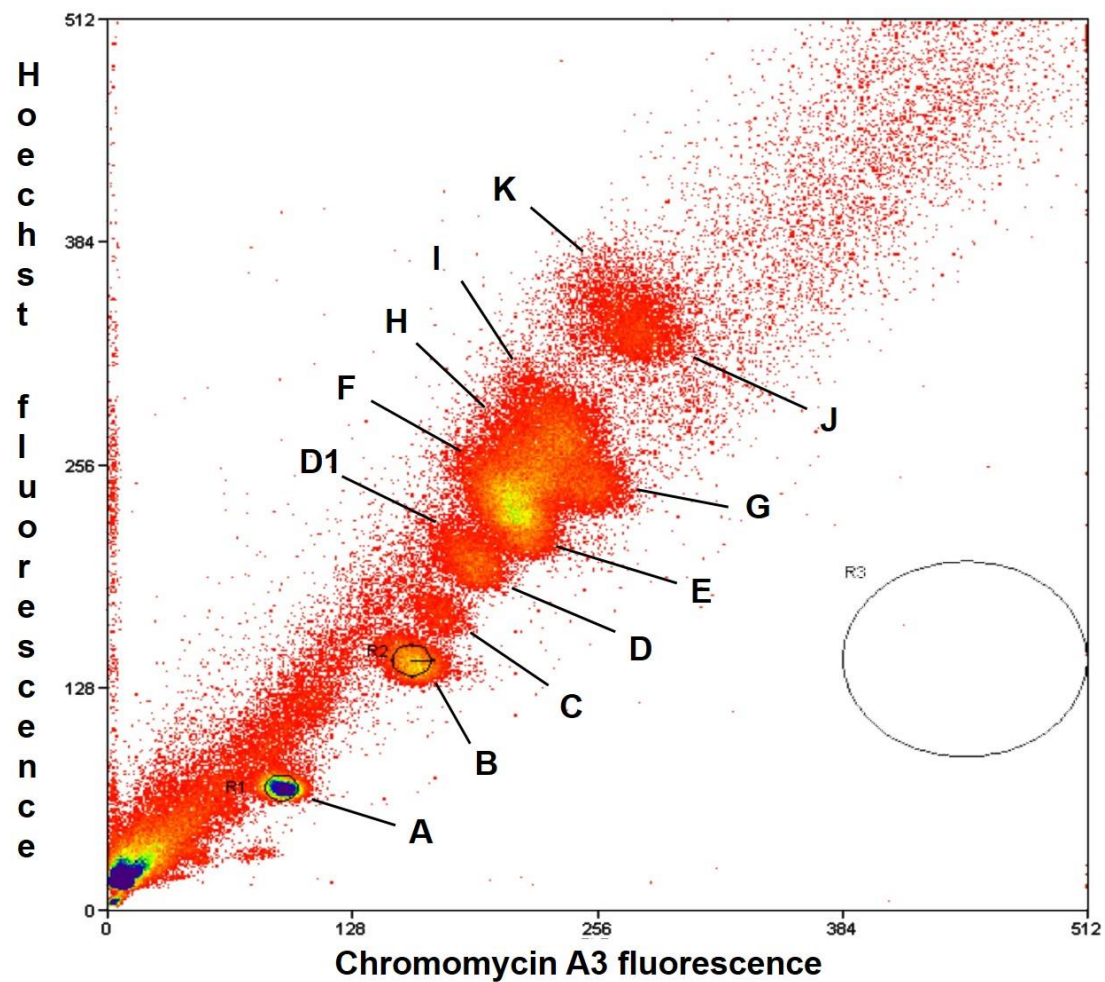


Figure 2. XTR probes from selected peaks hybridised in DAPI counterstained metaphases of *Xenopus tropicalis* (SPEEDY Cell line), without the use of competitor DNA. The chromosomes corresponding to peaks (A-K) and the respective marked chromosome pairs are shown in each metaphase.

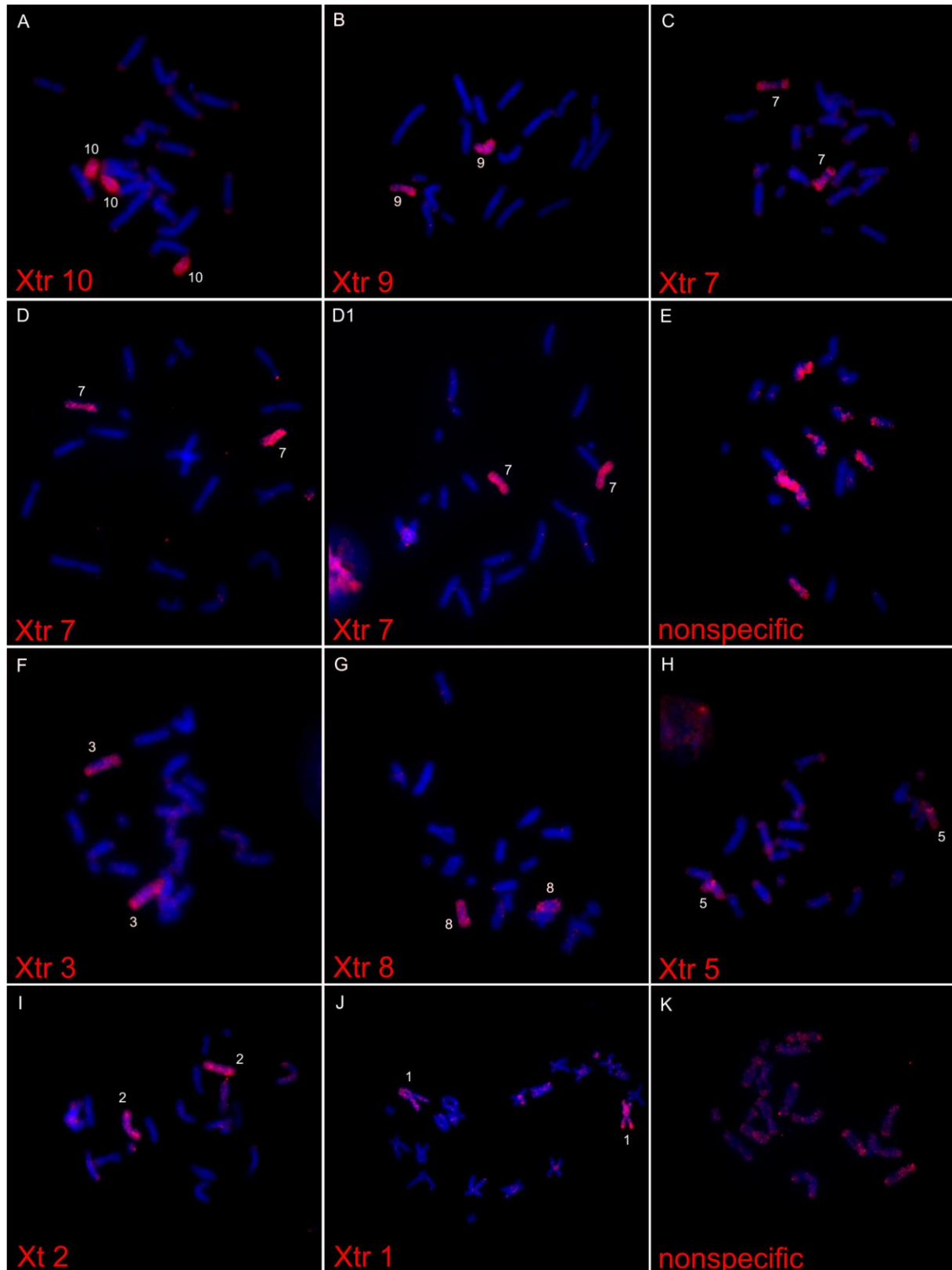


Figure 3. Assignment of the obtained probes in DAPI stained karyograms of *Xenopus tropicalis* (SPEEDY Cell line). The hybridization signals were removed for accurate identification of the marked chromosomes (insets).

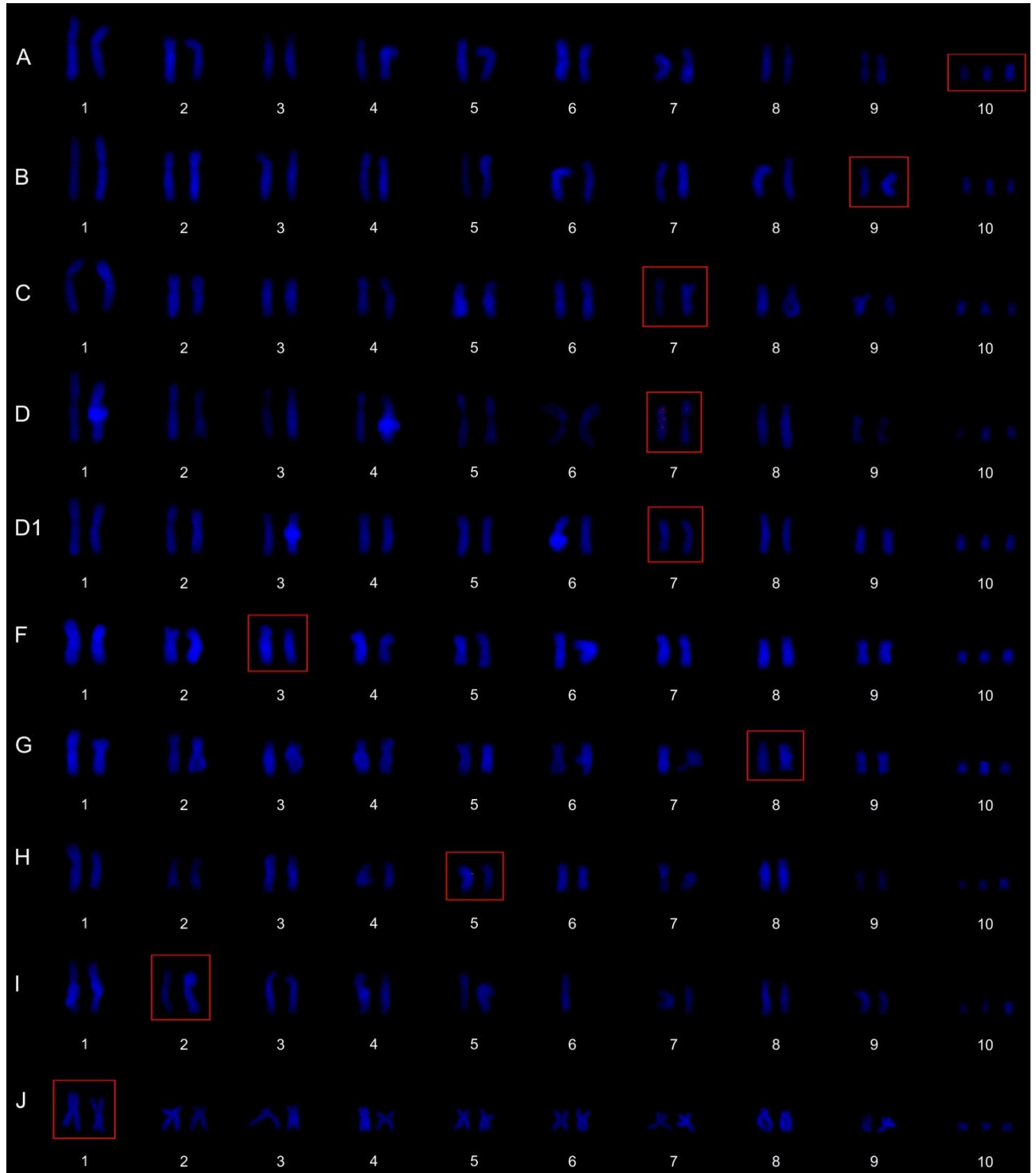
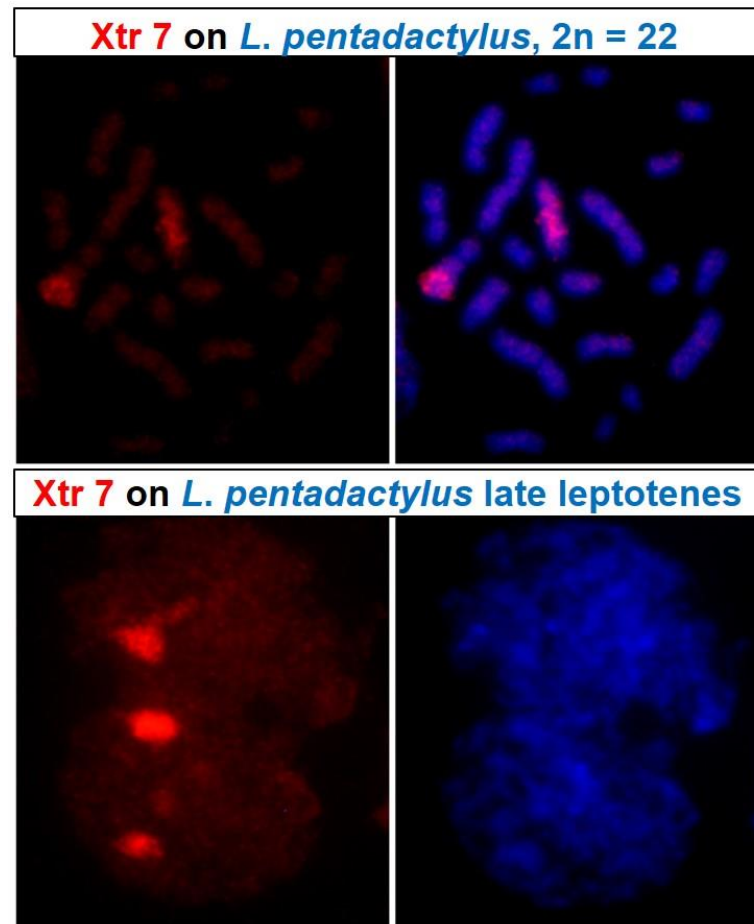


Figure 4. Cross-species painting of XTR 7 probe (peak C) on unidentified *Leptodactylus pentadactylus* (LPE) chromosomes (above), and in two late leptotene cells (below).



Discussion

The results correspond to the first report of entire frog chromosomes isolated using by flow cytometry. This result is a breakthrough that will enable significant advances to be made on the cytogenetic and genome organization in amphibian. In a previous study by Krylov et al. (2010), total chromosome probes were obtained by microdissection of *Xenopus tropicalis* chromosomes. But we could obtain significantly more sorted chromosomes by flow cytometry and obtain painting probes that have higher efficiency in subsequent FISH hybridizations. Thus, cross-species

chromosome painting experiments are more likely to succeed procedures that make use of chromosome painting probes in amphibians. For example Krylov et al. (2010) presented results on chromosome painting experiments, in which *X. tropicalis* probes were hybridized to *X. laevis* chromosomes. Similarly, Gruber et al. (2014) studied the B chromosome of one population of *Hypsiboas albopunctatus* (Hylidae), $2n = 22 + B$. Both studies used laser and glass needle microdissections results, respectively. Krylov and collaborators have confirmed the allotetraploid origin of the *X. laevis* karyotype based on rearrangements relative to the smallest chromosome (10) of *X. tropicalis*. The segments of this chromosome were found in pericentric regions on both arms of chromosomes 14 and 18 of *Xenopus laevis*.

Xenopus tropicalis chromosome pair 7 is of interest because it contains genes related to sexual differentiation in this species. Seifertova et al., (2013) sequenced the laser-microdissected short arms of this chromosome and they found more than 200 previously unmapped scaffolds on the analyzed chromosome arm, providing valuable low-resolution physical map information for *de novo* genome assembly. The authors used whole genome amplification method for 15 microdissected chromosome arms, providing sufficient high-quality material for localizing previously unmapped scaffolds and genes as well as recognizing mislocalized scaffolds.

In a very recent study, Uno et al. (2015) mapped sex linked genes revealing that chromosome 7 corresponds to Z and W sex chromosome in *Xenopus tropicalis*. They comment however about no female specific structure differences detectable by classic cytogenetic banding and comparative genomic hybridization and suggest that the female specific region is very small, and that there is just a few structure differentiating Z and W chromosomes.

Xenopus tropicalis chromosome 7 is the NOR bearing chromosome and shows a secondary constriction. We found three different peaks (C, D and D1) that correspond to this chromosome pair 7 in the flow karyotype described here. The peak C is in a different region compared to D and D1. Interestingly, the hybridizations of the probes made from chromosome 7, did not label the constriction region. Yet this, was expected for such a region rich in repetitive DNA sequences. This suggests that DOP-PCR the amplification from flow-sorted chromosomes, in combination with

probe renaturation could significantly reduce preferential hybridisation on these repetitive regions.

The flow cytometry heteromorphism relative to chromosome 7 could represent a measurable NOR polymorphism or even difference on the molecular content between Z and W chromosomes, including the number of rDNA in the nucleolar region in this chromosome.

Moreover, if the proposal above is correct, this data about the chromosome pair 7 can reveal that the SPEEDY cell line population has been derived from a female tadpole.

The specific signals to single chromosome pairs reinforce the genome stability in the *Xenopus tropicalis* SPEEDY cell line, at least by absence of gross translocations, being suitable for experiments that require this condition.

In preliminary painting experiments on chromosomes of *Leptodactylus pentadactylus* (Anura, Leptodactylidae) (Figure 4) we found that the *X. tropicalis* whole chromosome probes obtained by flow sorting is useful to study karyotype evolution in more phylogenetically distant amphibians. Considering this, we believe that this probes generated by flow-sorted chromosomes will be extremely useful for comparative evolutionary studies in amphibian species, specially that belonging to the genus *Xenopus*, as well as other genera in the family Pipidae.

References

Beklemisheva V, Romanenko S, Biltueva L, Trifonov V, Vorobieva N, et al: Reconstruction of karyotype evolution in core Glires. I. The genome homology revealed by comparative chromosome painting. *Chromosome Research* 19:549-465 (2011).

Gregory, TR: Animal genome size database. <http://www.genomesize.com>, 2015.

Gruber SL, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Foresti F, Haddad CFB, et al: Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridisation. *Comparative cytogenetics* 8: 185-197 (2014).

Grützner F, Rens W, Tsend-Ayush E, El-Mogharbel N, O'Brien PCM, et al: In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* 432:913-917 (2004).

Harland RM, Grainger RM: *Xenopus* research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends Genet* 2011, 27:507–515. 4.

Hellsten U, Harland RM, Gilchrist MJ, Hendrix D, Jurka J, et al: The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 328:633-636 (2010).

Kashiwagi K, Kashiwagi A, Kurabayashi A, Hanada H, Nakajima K, et al: *Xenopus tropicalis*: an ideal experimental animal in amphibia. *Exp Anim* 59:395-405 (2010).

Khokha MK, Krylov V, Reilly MJ, Gall JG, Bhattacharya D, et al: Rapid gynogenetic mapping of *Xenopus tropicalis* mutations to chromosomes. *Dev Dyn* 238:1398-1346 (2009).

Krylov V, Tlapakova T, Macha J. Localization of the single copy gene Mdh2 on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. *Cytogenet Genome Res* 116:110-112 (2007).

Krylov V, Kubickova S, Rubes J, Macha J, Tlapakova T, et al: Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. *Chromosome Research* 18:431-439 (2010).

Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, Souza ACP, et al: Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. *BMC Genetics* 11:28-36 (2010).

Nie W, O'Brien PC, Ng BL, Fu B, Volobouev V, et al: Avian comparative genomics: reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicephalus*, Charadriiformes)—an atypical species with low diploid number. *Chromosome Res.* 17:99-113 (2009).

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

Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'Brien, PCM, Yang F, Rens W, et al: Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research* 13:339-347 (2005).

Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Caputo V, Olmo E, et al: Conservation of chromosomes syntenic with avian autosomes in squamate reptiles revealed by comparative chromosome painting. *Chromosoma* 121:409-18 (2012).

Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA et al: Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. *Chromosoma* 120:455-468 (2011).

Rens W, O'Brien PC, Yang F, Graves JA, Ferguson-Smith MA: Karyotype relationships between four distantly related marsupials revealed by reciprocal chromosome painting. *Chromosome Res.* 7:461-74 (1999).

Rens W, Moderegger K, Skelton H, Clarke O, Trifonov V, Ferguson-Smith MA: A procedure for image enhancement in chromosome painting. *Chromosome Res* 14:497-503 (2006).

Romanenko SA, Perelman PL, Trifonov VA, Serdyukova NA, Li T, et al: A first generation comparative chromosome map between pig (*Cavia porcellus*) and humans. *PLoS One* 10:e0127937 (2015).

Seifertova E, Zimmerman LB, Gilchrist MJ, Macha J, Kubickova S, et al: Efficient high-throughput sequencing of a laser microdissected chromosome arm. *BMC Genomics* 14:357 (2013).

Sinzelle L, Thuret R, Hwang H, Herszberg B, Paillard E, et al: Characterization of a novel *Xenopus tropicalis* cell line as a model for *in vitro* studies. *Genesis* 50:316-324 (2012).

Telenius H, Pelmear AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A: Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes, Chromosomes & Cancer* 4:257-263 (1992).

Trifonov VA, Giovannotti M, O'Brien PC, Wallduck M, Lovell F, et al: Chromosomal evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting between Gekko and Hemidactylus species reveals phylogenetic relationships within the group. *Chromosome Research* 19:843-855 (2011).

Tymowska J: Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Gray, Pipidae. *Cytogenet Cell Genet* 12:297-304 (1973).

Uno Y, Nishida C, Takagi C, Igawa T, Ueno N, et al: Extraordinary Diversity in the Origins of Sex Chromosomes in Anurans Inferred from Comparative Gene Mapping. *Cytogenet Genom Res* doi: 10.1159/000431211 (2015).

Ventura K, O'Brien PCM, Yonenaga-Yassuda Y, Ferguson-Smith MA: Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Research* 17:1063-1078 (2009).

Yang F, Carter NP, Shi L, Ferguson-Smith MA: A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103:642-652 (1995).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados aqui apresentados reforçam a importância do uso da citogenética como ferramenta adicional, principalmente quando aliada a análise de sequência de genes e utilizando-se de espécimes coletados de suas respectivas localidades tipo, nos estudos em anfíbios do gênero *Leptodactylus* que visem à resolução de problemas taxonômicos e de sistemática, como naqueles relativos a complexos de espécies, comuns não apenas para o gênero, mas também para a ordem anura em geral. Exemplos claros podem ser destacados aqui com a revalidação de *Leptodactylus brevipes* e *L. intermedius*, bem como o estabelecimento de um mapa preliminar de distribuição de algumas das espécies do grupo *L. melanonotus*.

O cariótipo de *L. pentadactylus* coletado no sul da Amazônia evidencia um raro sistema de múltiplos cromossomos sexuais, surpreendente para vertebrados em geral, não apenas pelo número de elementos sexo-específicos, mas também por apresentar um cariótipo com mais cromossomos sexuais do que autossomos. Novas abordagens metodológicas poderão esclarecer os mecanismos que levaram à origem deste sistema, bem como a identificação e mapeamento do conteúdo gênico determinante à diferenciação de gônadas nesta espécie, o que poderá aumentar o conhecimento sobre a evolução de cromossomos sexuais múltiplos e convencionais em anfíbios. A ampliação dos estudos em espécimes de outras populações, atualmente designados *L. pentadactylus*, incluindo espécimes da localidade tipo, no Suriname ou adjacências, é necessária para a verificação da possibilidade de haver mais de um táxon em sinonímia, visto que exemplares identificados como *L. pentadactylus* de outras localidades, como aqueles coletados no Peru, não apresentaram os rearranjos cromossômicos evidenciados aqui. Finalmente, experimentos preliminares de pintura cromossômica com uso de sondas obtidas por citometria de fluxo da espécie *Xenopus (Silurana) tropicalis* sugerem, não somente a possibilidade de uso destas sondas em estudos de evolução cromossômica entre espécies filogeneticamente distantes, como também indicam provável homeologia do cromossomo 7 de *Xenopus tropicalis*, considerado sexual nesta espécie, com elementos segmentos de dois cromossomos, possivelmente translocados, e, portanto, participantes da cadeia meiótica de cromossomos sexuais em *L.*

pentadactylus, devendo ser melhor explorada a possível ação determinante do sexo destes segmentos nesta espécie.

REFERÊNCIAS

- ABRAMYAN, J.; EZAZ, T.; GRAVES, J. A. M.; KOOPMAN, P. Z and W sex chromosomes in the cane toad (*Bufo marinus*). **Chromosome research**, v. 17, n. 8, p. 1015-1024, 2009.
- AGUIAR-JR, O.; BACCI JR, M.; LIMA, A.P.; ROSSA-FERES, D.C.; HADDAD, C.F.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics**, v. 23, n. 5, p. 455-463, 2007.
- AMARO-GHILARDI, R.C.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence in situ hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia**, v. 57, n. 1, p. 53-65, 2004.
- AMARO-GHILARDI, R.C.; SKUK, G.; DE SÁ, R.O.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 5, n. 2, p. 119-133, 2006.
- ANGULO, A.; COCROFT, R.B.; REICHLE, S. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Peru. **Herpetologica**, v. 59, n. 4, p. 490-504, 2003.
- ARRUDA, M.P.; MORIELLE-VERSUTE, E. Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). **Genetics and Molecular Research**, p. 161-176, 2008.
- BALDISSERA JR, F.A.; OLIVEIRA, P.S.L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 335-345, 1993.
- BARALE, G.D.; SENN, E.P.; LISANTI, J.A. Polimorfismo de bandas C ligado al sexo em *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae). **Revista de la Universidad Nacional de Río Cuarto**, v. 10, p. 51-53, 1990.
- BERNECK, B. M.; COSTA, C.O.R.; GARCIA, P.C.A. A new species of *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic Forest of São Paulo state, Brazil. **Zootaxa**, v. 1795, p. 46-56, 2008.
- BIANCHI, N.O.; MOLINA, J.O. DNA replication patterns in somatic chromosomes of *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Anura). **Chromosoma**, v. 22, n. 4, p. 391-400, 1967.
- BIANCHI, N.O.; BIANCHI, M.S.; VIDAL-RIOJA, L. Heterochromatin late replication and secondary constrictions in the chromosome complement of *Leptodactylus ocellatus*. **Caryologia**, v. 26, n. 3, p. 397-403, 1973.

BOGART, J.P. Systematic problems in the amphibian family Lepto-dactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 9, n. 5, p. 369-383, 1970.

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

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

CAMARGO, A.; DE SA, R. O.; HEYER, W. R. Ronald. Phylogenetic analyses of mtDNA sequences reveal three cryptic lineages in the widespread neotropical frog *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799)(Anura, Leptodactylidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, n. 2, p. 325-341, 2006.

CAMPOS, J.R.C.; ANANIAS, F.; BRASILEIRO, C.A.; YAMAMOTO, M.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Chromosome evolution in three Brazilian *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. **Hereditas**, v. 146, n. 2, p. 104-111, 2009.

CARAMASCHI, U. Taxonomic status of *Leptodactylus ochraceus*, a forgotten species (Anura: Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 3, p. 523-528, 2008.

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

CARVALHO, T. R.; TEIXEIRA, B. F. V.; MARTINS, L. B.; GIARETTA, A. A. New bioacoustic and distributional data on *Bokermannohyla sapiranga* Brandão et al., 2012 (Anura: Hylidae): revisiting its diagnosis in comparison with *B. pseudopseudis* (Miranda-Ribeiro, 1937). **Zootaxa**, v. 3746, n. 2, p. 383-392, 2013.

DARST, C. R.; CANNATELLA, D. C. Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 31, n. 2, p. 462-475, 2004.

DE SÁ, R.O.; HEYER, W.R.; CAMARGO, A. A phylogenetic analysis of *Vanzolinius* Heyer, 1974 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): Taxonomic and life history implications. **Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro**, v. 63, n. 4, p. 707-726, 2005.

DE SÁ, R. O. D., GRANT, T., CAMARGO, A., HEYER, W. R., PONSSA, M. L., & STANLEY, E. Systematics of the neotropical genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae): phylogeny, the relevance of non-molecular evidence, and species accounts. **South American Journal of Herpetology**, v. 9, n. s1, p. S1-S100, 2014.

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

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 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. **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-240, 2005.

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

FOUQUET, A.; BLOTTO, B. L.; MARONNA, M. M.; VERDADE, V. K.; JUNCA, F. A.; DE SA, R.; RODRIGUES, M. T. Unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 67, n. 2, p. 445-457, 2013.

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

FROST, DARREL R. 2015. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (acessado em 20-07-2015). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA, 2015.

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

GIARETTA, A.A.; COSTA, H.C.M. A redescription of *Leptodactylus jolyi* Sazima and Bokermann (Anura, Leptodactylidae) and the recognition of a new closely related species. **Zootaxa**, v. 1608, p. 1-10, 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). **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-262, 2006.

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

HAAS, A. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia, Anura). **Cladistics**, v. 19, n. 1, p. 23-89, 2003.

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

HEYER, W.R. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v. 23, n. 3, p. 421-428, 1969.

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

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

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

HEYER, W.R. *Adenomera lutzi* (Amphibia: Leptodactylidae), a new species of frog from Guyana. **Proceedings of the Biology Society of Washington**, v. 88, n. 28, p. 315-318, 1975.

HEYER, W.R. A discriminant function analysis of the frogs of the genus *Adenomera* (Amphibia: Leptodactylidae). **Proceedings of the Biology Society of Washington**, v. 89, n. 51, p. 581-592, 1977.

HEYER, W.R. The relationships of *Leptodactylus diedrus* (Anura, Leptodactylidae). **Alytes**, v. 16, n. 1-2, p. 1-24, 1998.

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

HEYER, W. R.; DE SÁ, R. O. **Variation, systematics, and relationships of the *Leptodactylus bolivianus* complex (Amphibia: Anura: Leptodactylidae)**. Smithsonian Institution Scholarly Press, 2011.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.

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

KOKUBUM, M.N.; GIARETTA, A.A. Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) with endotrophic tadpoles: systematic implications. **Journal of Natural History**, v. 39, n. 20, p. 1745-1758, 2005.

KRYLOV, V.; TLAPAKOVA, T.; MACHA, J. Localization of the single copy gene Mdh2 on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, p. 110-112, 2007.

KRYLOV, V.; KUBICKOVA, S.; RUBES, J.; MACHA J.; TLAPAKOVA, T.; SEIFERTOVA, E.; SEBKOVA, N. Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. **Chromosome Research**, v. 18, n. 4, p. 431-439, 2010.

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

KWET, A.; STEINER, J.; ZILLIKENS, A. A new species of *Adenomera* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) from the Atlantic Rain Forest in Santa Catarina, southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 44, n. 2, p. 93-107, 2009.

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

LOURENÇO, L.B.; BACCI-JÚNIOR, M.; MARTINS, V.G.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; HADDAD, C.F.B. Molecular Phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). **Genetica**, v. 132, n. 3, p. 255-266, 2008.

LOURENÇO, L.B.; TARGUETA, C.P.; BALDO, D.; NASCIMENTO, J.; GARCIA, P.C.A.; ANDRADE, G.V.; B. HADDAD, C.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 92, p. 204-216, 2015.

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

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, X + 545 S., 61 Abb., 28 Tab. Cold Spring Harbor, N. Y. 1982. Cold Spring Harbor Laboratory, **Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie**, v. 24, n. 1, p. 32-32, 1984.

MARTINS, C.; GALETTI JR, P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in

Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, n. 5, p. 363-367, 1999.

MAXSON, L.R.; HEYER, W.R. Molecular systematic of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Fieldiana Zoology**, n. 41, p. 1-13, 1988.

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

MIRANDA, N.E.O.; MACIEL, N.M.; TEPEDINO, K.P.; SEBBEN, A. Internal larval characters in anuran systematic studies: a phylogenetic hypothesis for *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 53, p. 55-66, 2015.

NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; MILHOMEM, S.S.R.; O'BRIEN, P.C.M.; SOUZA, A.C.P.; FERGUSON-SMITH, M.A. Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, p. 28-36, 2010.

OLIVEIRA, E.H.C.; HABERMANN, F.A.; LACERDA, O.; SBALQUEIRO, I.J.; WIENBERG J.; MÜLLER, S. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world 's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). **Chromosoma**, v. 114, n. 5, p. 338-343, 2005.

PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y.; O'BRIEM, P.C.M.; YANG, F.; RENS, W.; BARROS, R.M.S.; NORONHA, R.C.R.; RISSINO, J.D.; OLIVEIRA, E.H.C.; FERGUSON-SMITH, M.A. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). **Chromosome Research**, v. 13, n. 4, p. 339-347, 2005.

PONSSA, M.L.; BRUSQUETTI, F.; SOUZA, F.L. Osteology and intraspecific variation of *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae), with comments on the relationship between osteology and reproductive modes. **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 1, p. 79-93, 2011.

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

PYRON, R.A.; WIENS, J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, n. 2, p. 543-583, 2011.

RENS, W.; O'BRIEN, P.C.; YANG, F.; GRAVES, J.A.; FERGUSON-SMITH, M.A. Karyotype relationships between four distantly related marsupials revealed by reciprocal chromosome painting. **Chromosome Research**, v. 7, p. 461-74, 1999.

RENS, W.; MODEREGGER, K.; SKELTON, H.; CLARKE, O.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M.A. A procedure for image enhancement in chromosome painting. **Chromosome Research**, v. 14, p. 497-503, 2006.

RUVINSKY, I.; MAXSON, L.R. Phylogenetic relationship among Bufonoid frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 3, p. 533-547, 1996.

SEGALLA, M.V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G.; GRANT, T.; HADDAD, C.F.B.; LANGONE, J.; GARCIA, P.C.A. Brazilian Amphibians – List of Species. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 2, p.37-48, 2014.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, v. 66, n. 4, p. 361-388, 1978.

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**, v. 103, n. 402, p. 25-38, 2000.

SILVA, A.P.Z.; GARCIA, P.C.A.; MARTINS, V.G.; BACCI, M. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. **Amphibia-Reptilia**, v. 25, n. 2, p. 185-196, 2004.

SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; GALASSI, G.G.; KASAHARA, S. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. **Genetica**, v. 127, n. 1-3, p. 35-44, 2006.

SINZELLE L, THURET R, HWANG H, HERSZBERG B, PAILLARD E, et al: Characterization of a novel *Xenopus tropicalis* cell line as a model for *in vitro* studies. **Genesis**, v. 50, n. 3, p. 316-324, 2012.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TARGUETA, C.P.; RIVERA, M.; SOUZA, M.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; LOURENÇO, L.B. Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura; Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetic relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 3, p. 709-725, 2010.

TELENIUS, H.; PELMEAR, A.H.; TUNNACLIFFE, A.; CARTER, N.P.; BEHMEL, A. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 4, p. 257-263, 1992.

TRIFONOV, V. A.; GIOVANNOTTI, M.; O'BRIEN, P. C.; WALLDUCK, M.; LOVELL, F.; RENS, W.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; CAPUTO, V.; FERGUSON-SMITH, M. A.

Chromosomal evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting between *Gekko* and *Hemidactylus* species reveals phylogenetic relationships within the group. **Chromosome Research**, v. 19, n. 7, p. 843-855, 2011.

VENTURA, K.; O'BRIEN, P.C.M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; FERGUSON-SMITH, M.A. Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. **Chromosome Research**, v. 17, n. 8, p. 1063-1078, 2009.

WILEY, J.E.; MEYNE, J.; LITTLE, M.L.; STORET, J.C. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hylid frogs. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 61, n. 1, p. 55-57, 1992.

YONENAGA-YASSUDA, Y. Contribuição da FISH à citogenética de mamíferos e répteis. In: Guerra, M. (Ed.) **Fish. Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto, p.89-114, 2004.

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

YANG, F.; CARTER, N.P.; Shi, L.; FERGUSON-SMITH, M.A. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. **Chromosoma**, v. 103, p. 642-652 1995.