
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luciana Oliveira Porto Latsch

**Análise citogenética comparativa de alguns
representantes da família Microhylidae
(Amphibia, Anura): uma abordagem clássica e
molecular**



Rio Claro - SP
2022

LUCIANA OLIVEIRA PORTO LATSCH

Análise citogenética comparativa de alguns representantes da família Microhylidae (Amphibia, Anura): uma abordagem clássica e molecular

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

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

Coorientador: Me. Marcelo João da Silva

Rio Claro - SP
2022

L364a	<p>Latsch, Luciana Oliveira Porto</p> <p>Análise citogenética comparativa de alguns representantes da família Microhylidae (Amphibia, Anura): uma abordagem clássica emolecular / Luciana Oliveira Porto Latsch. -- Rio Claro, 2022</p> <p>42 f. : tabs., fotos, mapas</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientadora: Patricia Pasquali Parise-Maltempo</p> <p>Coorientador: Marcelo João da Silva</p> <p>1. Citogenética. 2. Biologia Molecular. 3. Anura. I. Título.</p>
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

LUCIANA OLIVEIRA PORTO LATSCH

**ANÁLISE COMPARATIVA DE ALGUNS REPRESENTANTES DA
FAMÍLIA MICROHYLIDAE (AMPHIBIA, ANURA): UMA
ABORDAGEM CLÁSSICA E MOLECULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Patricia Pasquali Parise-Maltempo (orientadora)

Me. Marcelo João da Silva (coorientador)

Prof. Dr. Diogo Cavalcante Cabral de Mello

Dr. Kaleb Pretto Gatto

Aprovado em: 07 de Janeiro de 2022

Luciana O. P. Latsch

Assinatura do discente

Patricia Pasquali Parise-Maltempo

Assinatura do(a) orientador(a)

Marcelo João da Silva

Assinatura do(a) coorientador(a)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer meu pai, Luciano e minha mãe, Silvia, por sempre me impulsionarem a seguir meus sonhos e por acreditarem em mim. E especialmente as minhas irmãs Laís e Letícia, que apesar de todas as dificuldades sempre me apoiaram e contribuíram muito para que eu me pudesse me formar em Biologia.

Agradeço também ao meu namorado Gustavo que em todos os momentos difíceis esteve do meu lado. E por toda a paciência e carinho que teve comigo durante essa fase. E agradeço aos amigos que fiz durante a Graduação, pois ajudaram a construir a pessoa que eu sou hoje e com os quais vivi momentos muito importantes, felizes, engraçados, únicos e especiais.

Agradeço, a Professora Dra. Patrícia Pasquali Parise-Maltempi por todos os ensinamentos, por me ajudar nos momentos de desespero com este TCC, por estar sempre presente e pela sua orientação durante essa jornada. Agradeço, especialmente o Mestrando Marcelo João da Silva, que teve muita paciência comigo ao longo desses meses, que escutou todas as minhas dúvidas, que sempre me ajudou quando os experimentos davam errado e sempre disposto a me ajudar. Sou muito grata a vocês, de coração. E também ao Thiago Gazoni, por ser muito bondoso em me ajudar em alguns momentos, tirando algumas dúvidas. Também gostaria de agradecer aos demais integrantes do laboratório Carol, Mateus, Evelin, Luiza, Murilo e Giselle que sempre me ajudaram, escutaram meus desabafos, pelas risadas e pelos momentos juntos. Por fim, agradeço à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe UNESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo financiamento da pesquisa durante os últimos 2 anos.

RESUMO

Atualmente, são descritas para a ordem Anura 7.414 espécies com distribuição em praticamente todo mundo, sendo que no Brasil é registrada 1.144 espécies. São reconhecidas hoje 725 espécies na família Microhylidae, alocadas em 12 subfamílias apresentando mais de 60 gêneros. Dessa forma, por meio de análises citogenéticas clássicas e moleculares, foi estudado citogeneticamente as seguintes espécies: *Elachistocleis magna*, *Chiasmocleis shudikarensis* e *Dermatonotus muellerii*, com o intuito de verificar marcadores citológicos que possam caracterizar as espécies, comprovar a hipótese da biblioteca com relação aos satDNA, fornecer subsídios para resolver os problemas taxonômicos e acrescentar dado na literatura sobre esses animais, pois existem poucas informações citogenéticas a respeito do grupo. Para esse estudo foram realizadas análises mitóticas com Giemsa para a construção dos respectivos cariótipos, a qual mostrou uma grande semelhança com relação a morfologia e tamanho dos cromossomos. Também foi verificado a presença e o compartilhamento em *E. magna*, através de PCR e FISH, de três satDNA (PboSat1-176, PboSat2-173 e PboSat3-189) previamente isolados de *P. boiei*. Neste estudo, todos os satélites foram amplificados nas três espécies aqui analisadas. Já com relação a FISH de *Elachistocleis magna*, PboSat1-176 e PboSat2-173 não mostraram sinais evidentes de marcação como sonda. Já PboSat3-189, mostrou sinais nos cromossomos, porém, de forma dispersa pelos cromossomos, sendo padrão característico de elementos de transposição. Sabendo disso, podemos corroborar a hipótese da biblioteca, já que as espécies compartilham uma biblioteca ancestral de satDNA, que foram reduzidas/amplificadas ao longo do tempo. Por fim, os satDNAs se mostram importantes para obter dados de estudos evolutivos em anuros e como marcadores moleculares, pois estão presentes em anuros filogeneticamente distintos.

Palavras-chave: cariótipo, DNA satélite, Microhylidae.

ABSTRACT

Currently, 7,414 species are described for the Anura order, with distribution practically all over the world, and 1,144 species are registered in Brazil. Today, 725 species are recognized in the Microhylidae family, divided into 12 subfamilies with more than 60 genera. Thus, through classical and molecular cytogenetic analyses, the following species were studied cytogenetically: *Elachistocleis magna*, *Chiasmocleis shudikarensis* and *Dermatonotus muelleri* in order to verify cytological markers that can characterize the species, prove the library's hypothesis in relation to satDNA, provide subsidies to solve taxonomic problems and add data in the literature about these animals, as there is little cytogenetic information about the group. For this study, mitotic analyzes were carried out with Giemsa for the construction of the respective karyotypes, which showed a great similarity in relation to the morphology and size of the chromosomes. It was also verified the presence and sharing in *E. magna*, through PCR and FISH, of three satDNA (PboSat1-176, PboSat2-173 and PboSat3-189) previously isolated from *P. boiei*. In this study, all satellites were amplified in the three species analyzed here. Regarding FISH of *Elachistocleis magna*, PboSat1-176 and PboSat2-173 did not show evident signs of labeling as a probe. PboSat3-189, on the other hand, showed signs in the chromosomes, however, in a dispersed way throughout the chromosomes, being a characteristic pattern of transposition elements. Knowing this, we can support the library hypothesis, as the species share an ancestral satDNA library, which was reduced/amplified over time. Finally, satDNAs are important to obtain data from evolutionary studies in anurans and as molecular markers, as they are present in phylogenetically distinct anurans.

Key words: karyotype, Satellite DNA, Microhylidae.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 A família Microhylidae e suas mudanças taxonômicas	8
1.2 As espécies do estudo	13
1.2.1 <i>Elachistocleis magna</i>	13
1.2.2 <i>Dermatonotus muelleri</i>	13
1.2.3 <i>Chiasmocleis shudikarensis</i>	14
1.3 Citogenética e de genética molecular da família Microhylidae	15
1.4 DNAs repetitivos	16
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Material	21
3.2 Preparações citogenéticas	22
3.3 Coloração com Giemsa	23
3.4 Extração do DNA genômico	23
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
3.6 Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Montagem dos cariótipos em Coloração Convencional com Giemsa	27
4.2 Extração e quantificação de DNA	28
4.3 Reações de PCR das famílias de DNAs satélites	29
4.4 FISH	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	36

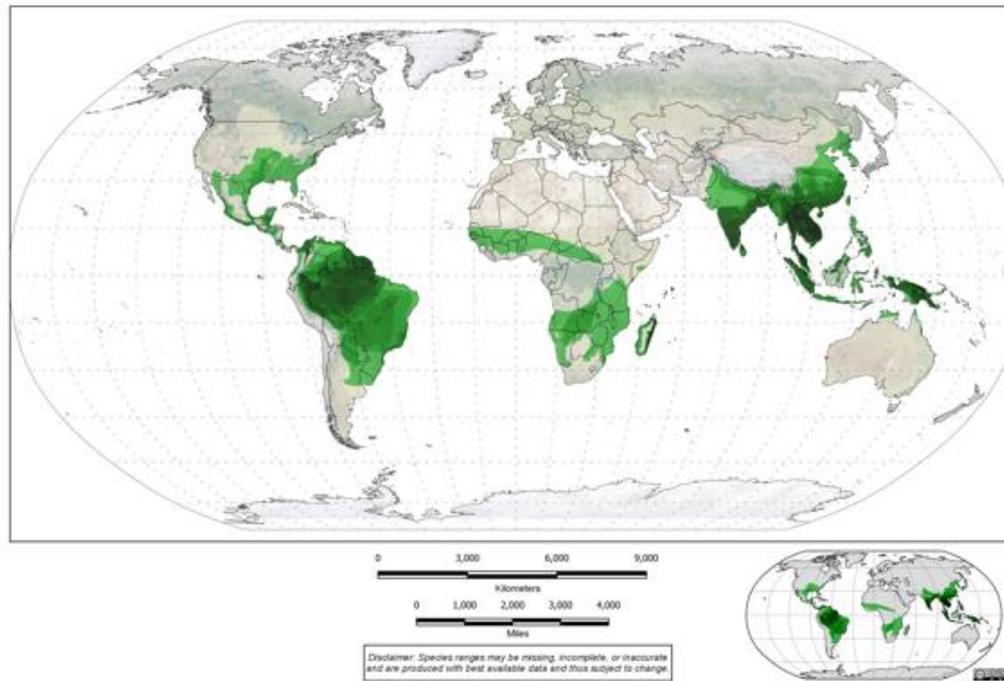
1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Microhylidae e suas mudanças taxonômicas

Mundialmente, são conhecidas até o momento, 8.386 espécies de anfíbios, incluindo os representantes das ordens Anura, Caudata e Gymnophiona. A ordem Anura configura a grande maioria desta classe, totalizando 7.414 espécies, sendo registradas em território brasileiro um total de 1.144 espécies (SEGALA *et al.*, 2021; FROST, 2021). Os anfíbios são praticamente cosmopolitas, pois localizam-se em quase todo o planeta, com exceção das latitudes extremas, da Antártica e da maioria das ilhas oceânicas.

Dentro dos anuros, encontra-se a família Microhylidae que conta com a presença de indivíduos com grande diversidade morfológica, contendo espécies de corpo achatado ou globoso, com a cabeça pequena e fina, e espécies com corpo reduzido e delgado. São relativamente pequenos e a maioria apresenta o corpo em forma de lágrima (FORLANI, 2010). Podem ser encontrados nas Américas, Ásia (Índia e grande parte do sudeste da Ásia, até a Nova Guiné), norte da Austrália, África Subsaariana e Madagascar (Figura 1) (VAN DER MEIJDEN *et al.*, 2007; FROST, 2021). Devido à sua distribuição ao longo dos continentes, os microilídeos têm sido considerados um alvo de pesquisa bastante atraente para estudos biogeográficos. Além disso, Savage (1973), propôs que a linhagem que deu origem à Microhylidae estavam distribuídas no supercontinente Gondwana e por isso sua atual distribuição pelo globo deve-se ao desmembramento desse continente, associando esse argumento a teoria das placas tectônicas (VAN DER MEIJDEN *et al.*, 2007).

Figura 1 - Distribuição dos representantes da família Microhylidae (em verde).



Fonte: Zoe Yoo. AmphibiaWeb (2021).

Segundo Feng e colaboradores (2017), a família Microhylidae mostra taxas aumentadas de diversificação após a extinção em massa no final do Cretáceo, levando às 724 espécies e às 12 subfamílias (Adelastinae, Asterophryinae, Cophylinae, Dyscophinae, Gastrophryninae, Haplophryninae, Kalophryninae, Melanobatrachinae, Microhyliinae, Otophrynae, Phrynomerinae e Scaphiophryninae) conhecidas atualmente. Estas espécies podem ser divididas em: Microilídeos do Velho Mundo (633 espécies), que possuem espécies com hábitos arbóreos, terrestres ou fossoriais, e Microilídeos do do Novo Mundo (83 espécies) com sapos de hábitos terrestres, de folhigo ou fossoriais. A diversidade do Novo Mundo é taxonomicamente agrupada em três subfamílias: a monotípica Adelastinae, criada para acomodar a única espécie *Adelastes hylonomo* Zweifel, 1986 (PELOSO *et al.*, 2016); Otophryninae Wassersug e Pyburn, 1987 que possui dois gêneros e nove espécies (*Otophryne* Boulenger, 1900 e *Synapturanus* Carvalho, 1954) e por fim, Gastrophryninae Fitzinger, 1843, representando o clado mais diverso dentre as três subfamílias, incluindo um total de 11 gêneros e 81 espécies (de SÁ *et al.*, 2012; PELOSO *et al.*, 2016; FROST, 2021).

No entanto, a família sofreu grandes mudanças taxonômicas ao longo dos anos. Primeiramente, Parker (1934) definiu a família Microhylidae com base em caracteres morfológicos não sinapomórficos e agrupou as 191 espécies conhecidas na época em 43 gêneros e 7 subfamílias: Asterophryinae, Brevicipitinae, Cophylinae, Dyscophinae, Melanobatrachinae, Microhylinae e Sphenophryinae. Mais tarde três subfamílias foram reconhecidas e adicionadas: Phrynomerinae, Scaphiophryinae e Otophryinae (EMERSON, 1971; TRUEB *et al.*, 2011). Estudos posteriores consideraram a família Microhylidae filogeneticamente próxima de Ranidae (LYNCH, 1973; TRUEB, 1973; BLOMMERS-SCHÖSSER, 1975; SOKOL, 1975; PYBURN, 1980).

Mais tarde, Frost e colaboradores (2004), distribuíram os gêneros de Microhylidae em nove subfamílias: Asterophryinae, Brevicipitinae, Cophylinae, Dyscophinae, Genyophryinae, Melanobatrachinae, Microhylinae, Phrynomerinae e Scaphiophryinae. Ainda em 2004, Van der Meijden e colaboradores chegaram à conclusão que Brevicipitidae não estava incluído em Microhylidae. Em 2006, Frost e colaboradores realizaram uma extensa revisão na classe Amphibia, utilizando sequenciamento de genes mitocondriais e propuseram diversas alterações, sendo algumas delas referentes à família Microhylidae, a qual passou por uma redução no número de subfamílias, contando com um total de sete. Houve a remoção das espécies de Genyophryinae para Asterophryinae, enquanto as da subfamília Brevicipitinae passaram à categoria de família denominada Brevicipitidae, e parte de suas espécies foram transferidas para uma nova subfamília, a Gastrophryinae. Particularmente, o gênero *Elachistocleis*, que era da subfamília Microhylinae passou a pertencer a Gastrophryinae. Além disso, alguns microilídeos não foram alocados em nenhuma subfamília, por não terem sido analisados ou porque os dados eram insuficientes.

Novas alterações na taxonomia foram apresentadas por Roelants e colaboradores (2007) e Van der Meijden e colaboradores (2007) que com base em dados moleculares propuseram 11 subfamílias para Microhylidae (FROST, 2008): duas delas ocorrendo no Novo Mundo (Gastrophryinae e Otophryinae) e nove ocorrendo no Velho Mundo (Asterophryinae, Cophylinae, Dyscophinae, Hoplophryinae, Kalophryinae, Melanobatrachinae, Microhylinae, Phrynomerinae e Scaphiophryinae) (de Sá *et al.*, 2012). Atualmente são reconhecidas 12 subfamílias

com o surgimento de Adelastrinae (PELOSO *et al.*, 2016), entretanto alguns estudos mais recentes estão ainda questionando essa classificação. Esse é o caso do trabalho de Tu e colaboradores (2018), que descobriram que esse táxon era irmão de todos os outros microilídeos ou que poderia ser irmão de Gastrophryinae, mas esses resultados acabam sendo inconsistentes com o reconhecimento de Adelastrinae como subfamília. Já em 2021, Fouquet e colaboradores descobriram evidências (através de análises moleculares) para a parafilia de Microhyliinae em relação a Adelastrinae + Otophryinae e sugeriram que seria melhor incluir *Adelastes* em Otophryinae.

Dentre as 12 subfamílias consideradas atualmente, Gastrophryinae merece aqui um destaque, pois abriga as espécies estudadas neste trabalho (*Elachistocleis magna*, *Dermatonotus muelleri* e *Chiasmocleis shudikarensis*). Esta subfamília apresenta um total de 81 espécies e segundo a árvore filogenética elaborada por Sánchez-Nivicela e colaboradores (2020) *Ctenophryne* é considerado grupo irmão de um clado composto por todas as espécies restantes de Gastrophryinae. Neste último, há dois grandes clados, *Chiasmocleis* e um clado composto por todos os gêneros restantes. *Elachistocleis* é irmão de *Gastrophryne* + *Hypopachus*. Dentre as espécies do gênero *Elachistocleis*, o *E. panamensis* é o primeiro a divergir. Além disso, *Dermatonotus* é considerado grupo irmão de *Elachistocleis* + *Gastrophryne* + *Hypopachus* (Figura 2).

Figura 2 - Relações filogenéticas entre os gêneros *Chiasmocleis*, *Dermatonotus* e *Elachistocleis*. Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir de análises de seqüências de DNA mitocondrial.



Fonte: Sanchez *et al.* (2020).

1.2 As espécies do estudo

1.2.1 *Elachistocleis magna*

Essa espécie é encontrada no Brasil, nos estados de Rondônia, sul do Amazonas e dois terços do oeste de Mato Grosso e ao leste do Pará e supostamente no nordeste adjacente da Bolívia. Os membros deste gênero são terrestres, costumam ser ativos durante o dia e a noite, e geralmente são encontrados em ecossistemas de planície e áreas abertas pantanosas (LIMA *et al.*, 2006; FROST, 2021). Os indivíduos apresentam glândula pós-comissural e dorso em coloração acinzentada, a maioria dos espécimes também apresenta grandes manchas de cor “creme”, especialmente, nas axilas e virilhas, nos flancos, bem como na superfície dorsal dos pés (TOLEDO, 2010). Chama atenção pelo seu tamanho, sendo considerada maior do que todos os outros congêneres, apresentando 31 mm em adultos de ambos os sexos e até 51 mm em indivíduos do sexo feminino (TOLEDO, 2010) (Figura 3).

Figura 3 - *Elachistocleis magna*.



Fonte: Mauro Teixeira Junior, 2018 (AmphibiaWeb).

1.2.2 *Dermatonotus muelleri*

Dermatonotus muelleri (Boettger, 1885) é a única espécie do gênero *Dermatonotus* e é conhecida por ter maior tamanho corporal, quando comparada a outros anuros da família (Figura 4). É uma espécie endêmica da América do Sul, sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai. Apresenta comportamento reprodutivo explosivo durante os meses da primavera, durando apenas cinco dias. Além disso, este animal tem hábito noturno e é altamente especializado em predação de Isopteras. Consegue se adaptar bem ao habitat, pois visa conservar energia para

reprodução ou tempos de estivação (NOMURA, 2003; NOMURA & ROSSA-FERES, 2011).

Durante a estação seca e a escassez de alimentos, esta espécie pode sobreviver devido a sua especialização alimentar e sua capacidade de cavar uma câmara subterrânea para proteção, se caracterizando como animal de hábito fossorial (NOMURA, 2003; NOMURA *et al.*, 2009; NOMURA & ROSSA-FERES, 2011). Nesse caso, as fêmeas acasalam uma única vez, enquanto os machos são poligâmicos (NOMURA, 2003). O desenvolvimento larval é rápido e a metamorfose é finalizada dentro de 22 a 26 dias a partir da deposição do ovo (FABREZI *et al.*, 2012).

Figura 4 - *Dermatonotus muelleri*.



Fonte: Sheila Andrade, 2011 (AmphibiaWeb).

1.2.3 *Chiasmocleis shudikarensis*

Segundo Frost (2021), *Chiasmocleis* compõe o maior gênero da subfamília Gastrophryinae, apresentando 36 espécies, incluindo *Chiasmocleis shudikarensis* (Figura 5). Esta espécie é encontrada na Guiana, Guiana Francesa e no Brasil, no norte do rio Amazonas no Amapá, Amazonas, Pará e Roraima. Também é uma espécie de hábito fossorial e no período reprodutivo os machos podem ser encontrados vocalizando e flutuando na água durante o dia e a noite (LIMA *et al.*, 2006). Além do mais, segundo Lima e colaboradores (2006), a reprodução ocorre, geralmente, entre os meses de março e maio e os ovos são depositados na superfície da água. De acordo com Rodrigues e colaboradores (2010), *C. shudikarensis* se reproduz exclusivamente em poças isoladas de curta duração, por isso a importância da preservação desses locais.

Figura 5 - *Chiasmocleis shudikarensis*.



Fonte: Fonte: Jasper van Dalen, 2005 (AmphibiaWeb).

1.3 Citogenética e de genética molecular da família Microhylidae

Os primeiros relatos citogenéticos de microhilídeos do Novo Mundo referem-se a 13 espécies provenientes do Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Estados Unidos, Guatemala e Peru (LEÓN, 1970; MORESCALCHI *et al.*, 1970; RABELLO, 1970; BOGART, 1973; BOGART e NELSON, 1976; BOGART *et al.*, 1976). Todos esses cariótipos foram descritos com base na coloração com Giemsa, no quais foi observada uma variação no número diplóide de $2n = 22, 24$ e 26 cromossomos. Em 1976, Blommers-Schlosse, fez análises de cromossomos de 12 espécies da família Microhylidae provenientes de Madagascar, e todas elas apresentaram o número diplóide igual a 26. Mais tarde, Kasahara & Haddad (1997) analisaram os cariótipos de *Chiasmocleis schubarti* com $2n = 24$ e de uma espécie poliplóide, *Chiasmocleis leucosticta*, com $2n = 4x = 48$, ambas coletadas no Brasil, com o uso de coloração convencional. Além disso foram também apresentadas informações sobre a localização da AgRON em *C. schubarti*.

Um pouco mais tarde começou a aparecer dados de análises moleculares, utilizando DNA mitocondrial e nuclear como os que foram apresentados por Frost e colaboradores (2006) e Matsui e colaboradores (2005) que estudaram as relações taxonômicas entre as populações de *Microhyla ornata* em alguns países da Ásia. Os autores concluíram que o nome *Microhyla ornata* é restrito às populações do sul da

Ásia. Para as populações de Taiwan e uma ampla região da China ao Sudeste Asiático, o nome *Microhyla fissipes* deveria ser aplicado, enquanto as populações de Ryukyu (Japão) são mais apropriadamente referidas como *Microhyla okinavensis*, embora existam outras diferenciações genéticas reconhecidas dentro desta última espécie.

Em 2018, Poyarkov e colaboradores, relataram uma nova espécie do gênero *Micryletta* do norte do Vietnã, descrita com base em dados moleculares (Gene 16S rRNA mtDNA) e morfológicos. Mais recentemente, em 2020, Sánchez-Nivicela e colaboradores apresentaram uma nova filogenia da subfamília Gastrophryninae baseada nas sequências de DNA dos genes mitocondriais 12S rRNA, 16S rRNA, COI e genes nucleares BDNF, cmyc2, H3A, 28S, SIA1 e Tyr. Já em 2021, Kundu e colaboradores, através também de análises de DNA mitocondrial, afirmaram a existência de um complexo de espécies de *M. berdmorei* ou diversidade críptica dentro de sua distribuição no Sul e Sudeste Asiático.

Dados citogenéticos sobre as espécies do presente estudo (*Elachistocleis magna*, *Dermanotus muelleri* e *Chiasmocleis shudikarensis*) não são ainda relatados na literatura. Isso provavelmente se deve ao fato de que espécies da família Microhylidae são relativamente raras na natureza, quando comparado com a maioria dos outros anuros, provavelmente devido ao hábito fossorial da maioria das espécies e também pelo fato de quase todas as espécies possuírem uma temporada de reprodução muito curta (DUELLMAN & TRUEB, 1986). Além disso, de acordo com Zug (1993), devido ao seu tamanho pequeno há grande dificuldade na obtenção de preparações citológicas com uma quantidade adequada de células em metáfase, o que tende a restringir o emprego de diferentes técnicas citogenéticas e as interpretações filogenéticas acabam sendo baseadas somente nas características morfológicas, que têm sido prejudicadas pela extensa homoplasia (de SÁ *et al.*, 2012).

1.4 DNAs repetitivos

Grande parte dos genomas dos eucariotos são compostos por sequências de DNA repetitivo que podem ser classificados em DNA repetitivo em tandem, ou seja, sequências que se encontram agrupadas, uma do lado da outra e dentro dessa categoria estão os RNAs ribossômicos (rRNAs), famílias de genes codificadores de proteínas, DNA telomérico, DNA centromérico, DNAs satélites. E tem-se também

sequências que apresentam repetições dispersas ao longo do genoma, como é o caso dos transposons, retrotransposons e algumas famílias codificadoras de proteínas (LÓPEZ-FLORES & GARRIDO-RAMOS, 2012; BISCOTTI *et al.*, 2015).

DNA satélite (satDNA) compõe uma das partes mais abundantes dos genomas e diferentes famílias de satDNAs podem estar presente no genoma de uma espécie. Além disso, espécies que são relacionadas entre si podem compartilhar um conjunto ou uma biblioteca de satélites. Entretanto, é comum que cada espécie tenha uma ou algumas famílias predominantes, mas geralmente, são conservadas (GARRIDO-RAMOS, 2017). Um exemplo disso é o DNA alfa-satélite centromérico, que representa mais da metade do conteúdo total de satDNA humano genoma (MIGA, 2015).

O DNA satélite encontra-se especialmente em regiões de heterocromatina constitutiva, a qual está localizada principalmente nas áreas centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos, mas também pode ser encontrada em locais intersticiais (GARRIDO-RAMOS, 2015). Com o avanço da ciência, pode-se mostrar sua função na estruturação do centrômero e telômeros, se revelando extremamente importante durante a montagem do cinetócoro, da segregação cromossômica e do reconhecimento dos cromossomos homólogos durante a meiose (UGARKOVIC *et al.*, 2002; PLOHL *et al.*, 2008; PLOHL *et al.*, 2014).

Tendo isso em vista, os satDNAs podem ser utilizados em estudos evolutivos, pois eventos de amplificação ou deleção podem ocasionar polimorfismos em uma família de DNA satélite, sendo a base para alterações evolutivas entre espécies (PLOHL *et al.*, 2012). Além disso, são excelentes marcadores para genômica comparativa no nível cromossômico, sendo um exemplo disso o 5S rDNA, que vem sendo bastante usado em estudos cromossômicos (DA BUSTOS *et al.*, 2020; CHOLAK *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2021). Outro ponto bastante interessante é o fato de que cromossomos B, ou supranumerários, são constituídos de sequências repetitivas, que podem estar presentes ou não no complemento A, contribuindo para identificação da origem e evolução desses cromossomos (LÓPEZ-LEON *et al.*, 1994; MILANI *et al.*, 2017; RUIZ-RUANO *et al.*, 2017; SERRANO-FREITAS *et al.*, 2020; STORNIOLI *et al.*, 2021). Outro ponto muito interessante é com relação a diferenciação de cromossomos sexuais em anuros, a amplificação da heterocromatina é bastante importante. Já que a heterocromatina geralmente é composta por DNA repetitivos, existindo uma relação entre DNA satélites e distinção de cromossomos sexuais (VITORAZZI, *et al.*, 2014).

Essa multiplicidade de características atreladas ao DNA satélite se deve principalmente à alta taxa de variação dessas sequências (PLOHL *et al.*, 2012). Portanto, para entender melhor a evolução e o funcionamento do genoma eucariótico, é importante determinar como e por que os DNA satélites variam entre os indivíduos e as espécies, visto que existem ligações entre satélites de diversos organismos (LOWER *et al.*, 2018).

Uma vez que uma família de satDNA foi espalhada por todo o genoma, cada repetição que constitui os satDNA de uma espécie poderia seguir uma evolução independente, divergindo livremente entre si ou até mesmo sofrer uma evolução coesa. Inclusive, os membros de uma família de satDNA apresentariam um maior grau de similaridade intra-específica e divergência interespecífica, seguindo um padrão de “*Concerted evolution*” (GARRIDO-RAMOS, 2017).

Segundo o modelo “*Concerted evolution*”, as variações tendem a se espalhar de forma não-independente pelo genoma, levando a uma homogeneização das sequências, conseqüentemente, seriam fixadas através de indivíduos que reproduzem entre si (DOVER, 1982; DOVER, 1986; DOVER, 2002). Sendo assim, haveria a tendência de homogeneizar as mutações das sequências mais rapidamente do que aqueles que não estão ligados reprodutivamente, podendo assim levar a uma evolução divergente, portanto, o DNA satélite é alterado devido ao acúmulo gradual de divergência na sequência (PLOHL *et al.*, 2012; GARRIDO-RAMOS, 2017). No entanto, a “*Concerted evolution*” depende de vários fatores intrínsecos e extrínsecos e esse padrão de evolução pode ser alterado de tal forma que as diferenças entre as espécies nem sempre são tão perceptíveis como seria de se esperar (GARRIDO-RAMOS, 2017).

Embora exista essa rápida evolução das sequências repetitivas, Salser e colaboradores (1976) propuseram a “hipótese da biblioteca”, na qual espécies relacionadas compartilham uma biblioteca ancestral de diferentes sequências de DNA satélites, que podem contrair ou amplificar em um conjunto de satDNAs compartilhados por um grupo de organismos, mas que não inclui necessariamente alterações na sequência, conseqüentemente as mudanças evolutivas desses satélites seriam majoritariamente quantitativa. Desta forma, um ou alguns satDNAs podem se tornar altamente representados em um táxon, enquanto outros permanecem com um baixo número de cópias, e muitas vezes não conseguem ser detectados (PLOHL,

2010). Em algumas espécies, devido a uma alta eficiência desses mecanismos, os perfis dos satélites mudam significativamente em um tempo evolutivo consideravelmente rápido, e em outras, mais devagar (UGARKOVIC & PLOHL, 2002). Esta hipótese acaba por não abordar algumas questões bastante importantes. Por exemplo: como novos satélites surgem; como as bibliotecas formam e sobrevivem à purificação das repetições relacionada à especiação e da evolução combinada, aparecimento recorrente de componentes a partir de elementos transponíveis (MEŠTROVIĆ *et al.*, 2015; BELYAYEV *et al.*, 2020).

Palacios-Gimenez e colaboradores (2020), analisaram a evolução do DNA satélite em gafanhotos do gênero *Schistocerca*, e sugeriram eventos casuais para a evolução do satDNA e que várias tendências evolutivas implicam em ampliações ou reduções, portanto, corroborando e concordando com a hipótese da biblioteca de que as mudanças são principalmente quantitativas. Além disso, as ampliações ou contrações do satDNA podem influenciar a evolução de sequências consenso de monômeros e, por acaso, desempenhar um papel importante na dinâmica da deriva.

Por outro lado, tem-se os estudos realizados por Belyayev e colaboradores (2020), averiguando espécies diplóides de *Chenopodium album* nos quais descobriram que os dados moleculares por eles obtidos, acabam por refutar essa hipótese. Os autores observaram que o satelitoma de espécies de *C. album* contém oito famílias principais de satDNA, que surgiram em momentos diferentes e através de mecanismos diferentes. Por exemplo, as famílias f1 e f7 de satDNA específicas são derivadas de elementos transponíveis, já as famílias f2 e f3 são provavelmente unidades originadas com base em monômeros de f1, mas em momentos e em linhagens diferentes. Além disso, a antiga família f3 não é mais encontrada na maioria das espécies diplóides, o que indica sua completa eliminação. A eliminação de satDNA e o aparecimento de novas famílias de espécies únicas com a f2 e f4, acabam por contradizer a “hipótese da biblioteca”.

Em anfíbios são poucos os trabalhos envolvendo análises de DNAs satélites, porém um exemplo desses estudos é o trabalho de Vittorazzi e colaboradores (2011) que envolve um DNA satélite denominado PcP190 que foi isolado do genoma da espécie *Physalaemus cuvieri*. Em trabalhos posteriores esse satélite foi também identificado em outros representantes das famílias Leptodactylidae, Hylodidae e Hylidae, o que mostra que essas sequências são amplamente distribuídas e parecem

ser conservadas nesses anuros por pelo menos 70 milhões de anos, tratando-se, então, de um DNA satélite antigo (VITTORAZZI *et al.*, 2014; GATTO *et al.*, 2016).

Outro exemplo interessante de sequências de DNA satélites de anfíbios pode ser visto no trabalho de Silva e colaboradores (2020) que descreve os satélites PboSat1-176 e PboSat2-173 coincidentes com a heterocromatina C positiva revelada por Bandamento C em todos os cromossomos de machos e fêmeas, sugerindo uma possível relação destas repetições com a função dos centrômeros em *P. boiei*. Já um outro satélite, PboSat3-189, que também se encontra nas regiões centroméricas e pericentroméricas, apresenta um número menor de repetições em alguns cromossomos, sugerindo que eventos de amplificação/deleção estão acontecendo no genoma desta espécie. Foi relatado também que o monômero desse satélite (PboSat3-189) é bastante similar (em torno de 89%) com as sequências do satélite PcP190 em outras três espécies de anuros, indicando que é uma família de satDNA mais antiga do que se imaginava, justamente por estar presente em espécies distintas. Além disso, alguns estudos verificaram um acúmulo diferencial do DNA satélite PcP190 no cromossomo sexual W, enquanto o cromossomo Z possui uma banda C que não é detectado pelas sondas PcP190 (VITTORAZZI, *et al.*, 2014; GATTO *et al.*, 2016, 2018).

Apesar de décadas de pesquisa, o conhecimento sobre o significado funcional dos DNAs satélites continua limitado e uma discussão sobre sua funcionalidade ainda permanece. Dessa forma, levando-se em consideração a falta de estudos citogenéticos convencionais e moleculares em anuros, sobretudo na família Microhylidae e as constantes mudanças taxonômicas, neste estudo foram comparados os cromossomos de *Elachistocleis magna*, *Dermatonotus mullerii* e *Chiasmocleis shudikarensis*. Além disso, foi avaliada a presença e o compartilhamento de três sequências de satDNA previamente isoladas de *P. boiei* por da Silva e colaboradores (2020), que vêm se mostrando presente em outras espécies de anfíbios. E com isso, verificar se a hipótese da biblioteca pode ser comprovada ou não, já que esses representantes da família Microhylidae e *Proceratophrys boiei* estão filogeneticamente distantes.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi analisar os cromossomos das espécies de anuros da família Microhylidae, através de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares, visando a descrição cariotípica, a identificação e o mapeamento por hibridação *in situ* dos DNAs satélites citados anteriormente na introdução (PboSat01-176, PboSat02-173 e PboSat03-189).

Com isso, busca-se compreender se existem diferenças cromossômicas entre as espécies tanto em questão de número e morfologia dos cromossomos, quanto em relação à presença de rearranjos estruturais. Além disso, procura-se verificar se estes satélites são conservados nestas espécies (*Elachistocleis magna*, *Dermatonotus mullerii* e *Chiasmocleis shudikarensis*), se podem ser considerados bons marcadores moleculares e verificar a veracidade da hipótese da biblioteca.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

Para as análises citogenéticas, foram utilizadas preparações cromossômicas de exemplares das espécies *Elachistocleis magna*, *Dermatonotus mullerii*, *Chiasmocleis shudikarensis* (Tabela 1). Os indivíduos coletados foram identificados com auxílio do Prof. Dr. Célio F. B. Haddad, do Departamento de Biodiversidade, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP. Também foram catalogados e depositados na Coleção CFBH do mesmo Departamento.

As preparações cromossômicas de fígado (F), medula (M), intestino (I) e testículo (T) (quando machos) foram obtidas previamente, em projetos de outros membros do grupo de pesquisa e estavam armazenadas no freezer do Laboratório de Citogenética Animal, localizado no Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Rio Claro, SP. Portanto, não foi necessário realizar novas coletas de indivíduos na natureza.

Tabela 1 - Detalhes sobre as preparações cromossômicas disponíveis, locais de coleta e número de identificação das espécies analisadas neste trabalho. Sendo F (fígado), I (intestino), M (medula) e T (testículo).

Espécie	Sexo	Material citológico disponível	Local de coleta	Nº de identificação
<i>E. magna</i>	Macho	F, I, T	Alta Floresta, MT	219
<i>E. magna</i>	Fêmea	F, I	Alta Floresta, MT	220
<i>E. magna</i>	Macho	F, I, T	Alta Floresta, MT	221
<i>E. magna</i>	Macho	F, I, T	Paranaita, MT	224
<i>E. magna</i>	Fêmea	F, I	Paranaita, MT	225
<i>E. magna</i>	Macho	F, I, T	Paranaita, MT	226
<i>E. magna</i>	Fêmea	F, I, M	Paranaita, MT	259
<i>D. muelleri</i>	Fêmea	F, I	Santo Antônio, RN	430
<i>D. muelleri</i>	Macho	F, I, T	Santo Antônio, RN	431
<i>D. muelleri</i>	Macho	F, I, M, T	Santo Antônio, RN	436
<i>D. muelleri</i>	Macho	F, I, T	Santo Antônio, RN	438
<i>C. shudikarensis</i>	Fêmea	I	Lelygebergte, Suriname	K004
<i>C. shudikarensis</i>	Fêmea	I	Lelygebergte, Suriname	K045
<i>C. shudikarensis</i>	Fêmea	I	Lelygebergte, Suriname	K046
<i>C. shudikarensis</i>	Fêmea	I	Lelygebergte, Suriname	K047
<i>C. shudikarensis</i>	Fêmea	I	Lelygebergte, Suriname	K048
<i>C. shudikarensis</i>	Fêmea	I	Lelygebergte, Suriname	K049

Fonte: autoria própria.

3.2 Preparações citogenéticas

As preparações cromossômicas utilizadas estavam preservadas e armazenadas em freezer -20°C. Foram obtidas com tratamento prévio dos animais com colchicina a 1%, injetada intraperitonealmente na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso, cerca de quatro horas antes do sacrifício, seguindo os procedimentos adotados no Laboratório de Citogenética Animal, de acordo com Baldissera *et al.* (1993). Foi realizado tratamento hipotônico com solução de KCl 0,075M durante 45 minutos a 37°C e a fixação, com Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético).

3.3 Coloração com Giemsa

A coloração tradicional com Giemsa 1% foi utilizada para análise do número, morfologia e montagem do cariótipo das espécies. As preparações cromossômicas foram retiradas do freezer e o material foi gotejado em uma lâmina em banho-maria a 60°C. Em seguida, as lâminas com as metáfases foram coradas com uma solução de Giemsa 1% por 10 minutos, à temperatura ambiente (GALLEGO, 2008). Os cromossomos foram ordenados por tamanho decrescente e sua morfologia foi determinada com base na posição do centrômero em metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico e telocêntrico (GUERRA, 1986). As lâminas foram analisadas previamente ao microscópio óptico Zeiss, e posteriormente utilizando o microscópio BX51 da Olympus para a captura digital das imagens, realizada com câmera DP71 acoplada a um computador, através do *software* DP controller. Ajustes de brilho e contraste foram realizados utilizando o programa Adobe® Photoshop® CS6, e a montagem de pranchas com os cariótipos foi realizada no programa CorelDraw® e Microsoft® PowerPoint®.

3.4 Extração do DNA genômico

A extração do DNA total dos espécimes analisados foi realizada a partir de amostras de fígado e/ou músculo fixados em álcool, utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega®, seguindo as determinações do fabricante. A qualidade das amostras extraídas foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed®. As amostras (3µl cada) foram misturadas a 1 µl de tampão de corrida BlueJuice™ Gel Loading Buffer (6X) para visualização da corrida em gel de agarose 1%. Foi colocado 1 µl de marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder, ThermoFisher® como referência para determinar o tamanho das bandas. Os géis foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. Além disso, foi realizada uma quantificação por meio do espectrofotômetro NanoDrop® 2000, Thermo Scientific® de alta precisão, utilizando 1µL de cada amostra extraída.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a reação de PCR foram utilizados: 0,5 µl de DNA (50-100 ng/µl), 0,5 µl de dNTPs 5 mM, 0,1 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (ThermoFisher®) e 0,5 µl de primer forward e 0,5 µl de primer reverse de cada DNA satélite, resultando

em um volume final de 10 μ l. Neste trabalho foram utilizados *primers* previamente desenhados dos DNAs satélites PboSat1-176, PboSat2-173 e PboSat3-189 (Tabela 2) isolados de *Proceratophrys boiei* para a realização de PCR em cada uma das espécies.

A amplificação ocorreu em termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos em um gradiente de temperatura (Tabela 3), para a escolha da temperatura ótima de amplificação de cada um dos oligonucleotídeos; 1 minuto e 20 segundos a 72°C; e extensão final de 5 minutos também a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed®. As amostras foram misturadas a 1 μ l de tampão de corrida BlueJuice™ Gel Loading Buffer (6X) para visualização da corrida no gel. Foi colocado 1 μ l de marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (ThermoFisher®) como referência para determinar o tamanho das bandas. Os géis foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta.

Tabela 2 - Características das famílias de DNA satélites e primers utilizados nas reações de PCR.

Família de DNA satélite	Tamanho do monômero (pb)	Monômero	Primer Forward	Primer Reverse
PboSat1-176 GenBank M N475836.1	176	GAAAAACAGTCACTTGC CTACCCATTTCATTCTA TGGGAAGAAGCAACTTGA GATATGGATGTCAATTT CTCTGTGCAGGAATGTC AGGCGAATGAAAACCTCA ATGCTGCCAGGCTTGT TCCATGACCCTTTAGCC ACACCAAGTCGGAGGA GTTGGTCACTCTTCAGG TTTGGGA	GTCAGGC GAATGAA AACTC	ATTCCTGCA CAGAGAAAT TG
PboSat2-173 GenBank: MN475837.1	173	CCACAACCTGGATGCTTC TTCCATAGGAATGAATG GGCAGGCAAGTGACTG GATTTTTCTCCCAAACC TGAAGAGTGACAAACTC CTCCGACTTGGTGTGG CTAAAGGGTCATGGAAA CAAGCCTGGCAGCATT GAGTTTTTCATTTTCATCA CATTCTGCACAGAGAT TTTCA	CCTCCGA CTTGGTG TGGC	AGTTTGTCA CTCTTCAGG TTTG
PboSat3-189 GenBank: MN475838.1	189	CTAGATTTTCAGTGGTCT TTATAAAAAGAGATTAC ACGAGAAAAGCTACCTTT GAGAAGAAAAGGATCA ACAGAACAAGGGATTC CCAGCCAGTCTCCCAT GCTGGTACTTGCCTTG CCTCAAGCTGCGTAGC GGCTGCGATCTGACGA GTGCAGGGACCTTCAG CTTAGAATGGCCGTTG ACGAGTTCAG	CATGCTGG TACTTGCCT TGCC	GAGACTGGC TGGAATCC C

Fonte: da SILVA *et al.* (2020).

Tabela 3 - Temperatura de anelamento dos *primers* utilizados no trabalho.

Espécies	Temperatura de anelamento do Sat 1	Temperatura de anelamento do Sat 2	Temperatura de anelamento do Sat 3
<i>E. magna</i>	62°C	57°C	57°C
<i>D. muelleri</i>	62°C	57°C	57°C
<i>C.shudikarensis</i>	62°C	54°C	57°C

Fonte: da SILVA *et al.* (2020).

3.6 Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

A técnica de FISH foi realizada utilizando os produtos de PCR obtidos na etapa anterior como sonda. Os procedimentos adotados foram de acordo com Cabral-de-Mello e Marec (2021), com pequenas modificações realizadas para adequação ao grupo dos anfíbios.

A marcação não-isotópica da sonda com digoxigenina ocorreu através da técnica de *nick-translation* com as condições gerais de 16°C durante 60 minutos, seguidos de 10 minutos a 65°C e temperatura de manutenção a 10°C. Depois, iniciou-se a etapa de preparação das lâminas com desidratação em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos cada, lavagem em 2xSSC por 5 minutos em temperatura ambiente, seguindo por uma solução de PBD + formaldeído (0,04g de leite em pó, 40 µl de Triton, 800 µl de 20xSSC, 32 ml de água destilada e 4 ml de formaldeído) por 10 minutos. Em seguida, lavagem em 2xSSC 2 vezes, por 5 minutos cada e desidratação em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos cada.

A solução de hibridação (3 µl da sonda + 3 µl de sulfato dextrano 50% + 1,5 µl de 20xSSC e 7,5 µl de formamida 100%) foi desnaturada em termociclador a 95°C por 10 minutos e 15 µl dessa solução de hibridação contendo a sonda, foi aplicada sob cada lâmina. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em placa de vidro em banho maria a 72°C por 4 minutos (satélite 1) e 3 minutos e 30 segundos (satélite 2 e 3) e deixadas em câmara úmida a 37° *overnight*.

Após esse tempo, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente das lâminas, que foram lavadas em 2xSSC e 0,1xSSC a 42°C e 3 vezes com PBD (1g de leite em pó + 20 µl de 20xSSC + 500 µl de Triton + 100 µl de água) a 45°C por 5 minutos cada. Depois, seguiu-se com a etapa de detecção, na qual cada lâmina foi incubada com

0,5 µl de *Antidigoxigenina* + 100 µl PBD por 1 hora em câmara úmida a 37°C e lavadas em três banhos de 5 minutos de PBD a 45°C. Para finalizar, as lâminas foram montadas com 10 µl de solução de DAPI+anfitading, cobertas com lamínula e armazenadas em geladeira no escuro.

Os cromossomos submetidos à técnica de FISH foram examinados sob luz ultravioleta e com uso de filtros específicos, utilizando o microscópio BX51 da Olympus. A captura digital das imagens foi realizada com câmera DP71 acoplada a um computador, através do *software* DP controller. As imagens dos cromossomos corados com DAPI e a de marcação com a *digoxigenina* foram sobrepostas no próprio DP controller. Ajustes de brilho e contraste foram realizados utilizando o programa Photoshop CS6, e a montagem de pranchas foi realizada no programa Microsoft PowerPoint.

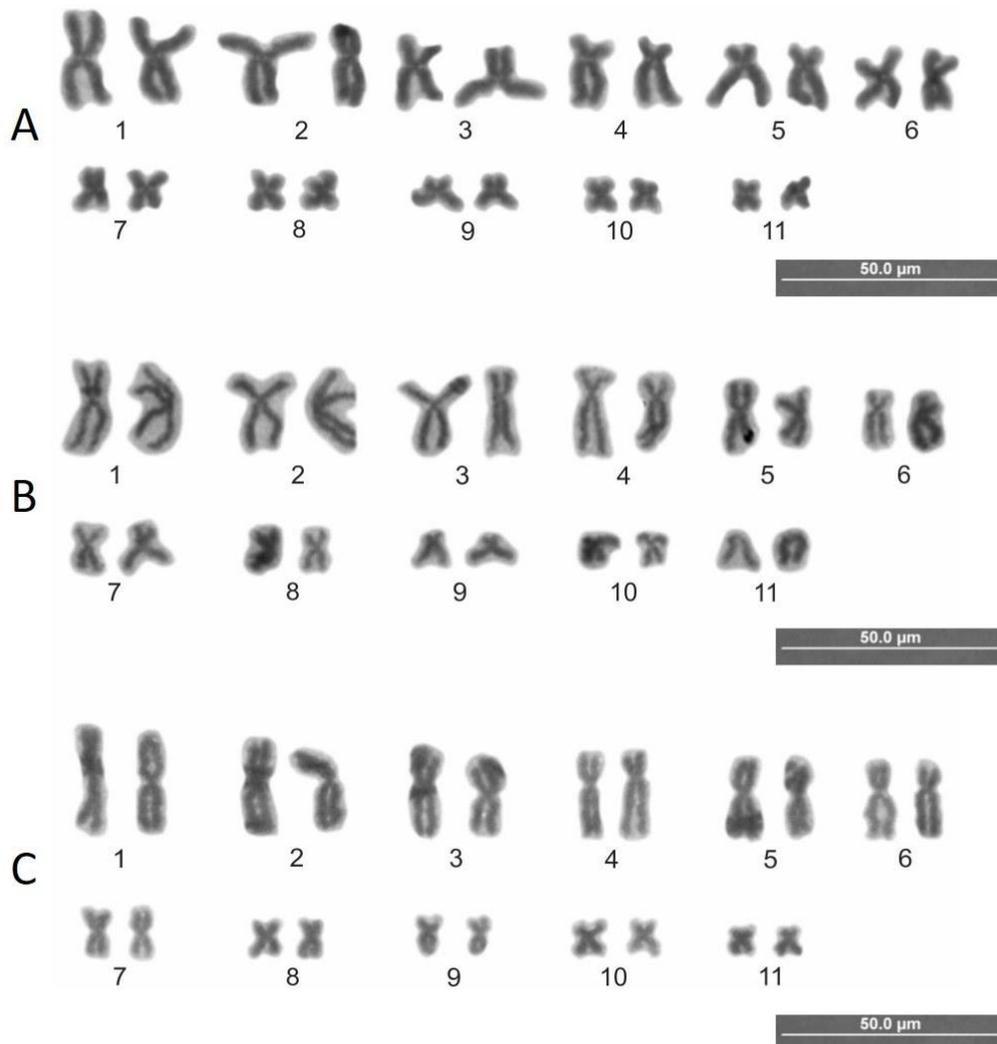
4 RESULTADOS

4.1 Montagem dos cariótipos em Coloração Convencional com Giemsa

Todas as espécies aqui estudadas, *E. magna*, *C. shudikarensis* e *D. muelleri*, apresentaram um número diplóide de $2n = 22$ cromossomos em ambos os sexos analisados (Figura 6). Para as três espécies, com a coloração em Giemsa, não foi observado heteromorfismo cromossômico relacionado a diferenciação sexual.

Com relação à morfologia, *E. magna* (Figura 6A) apresentou 5 pares de cromossomos metacêntricos (1, 6, 7, 8 e 10), 3 pares submetacêntricos (2, 3 e 11) e 3 pares acrocêntricos (4, 5 e 9). *C. shudikarensis* (Figura 6B), apresentou 4 pares metacêntricos (1, 7, 8 e 11), 3 pares submetacêntricos (2, 3 e 5), 4 pares acrocêntricos (4, 6 e 9) e 1 par telocêntrico (11). E por fim, *D. muelleri* (Figura 6C), apresentou 4 pares metacêntricos (1, 7, 8 e 10) e 7 pares submetacêntricos (2, 3, 4, 5, 6, 9 e 11).

Figura 6 - Cariótipos em coloração convencional (Giemsa). Em (A), *Elachistocleis magna*; em (B), *Chiasmocleis shudikarensis*; em (C) de *Dermatonotus muelleri*.

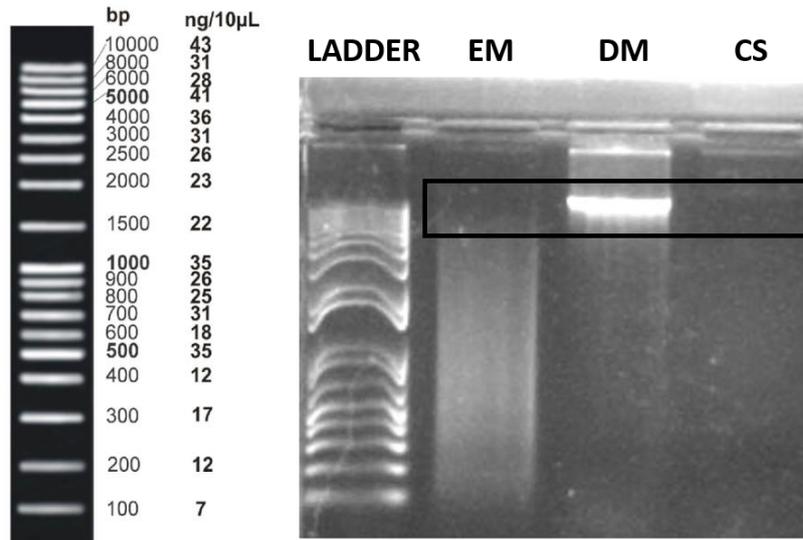


Fonte: autoria própria.

4.2 Extração e quantificação de DNA

Após a extração de DNA total para as três espécies estudadas aqui, as amostras foram submetidas à uma quantificação, tanto por meio de visualização de bandas em gel de agarose quanto via espectrofotômetro NanoDrop®. As amostras obtidas para *D. muelleri* apresentaram uma banda bem evidente no gel de agarose, enquanto para *C. shudikarensis* e *E. magna* os resultados de extração de DNA não mostraram evidência consistente de DNA extraído no gel (Figura 7). Porém, a quantificação via espectrofotômetro NanoDrop® mostrou as seguintes concentrações de DNA: *D. muelleri* (94,4 ng/µl), *E. magna* (36,0 ng/µl) e *C. shudikarensis* (22,3 ng/µl), indicando baixa concentração de DNA na extração das duas últimas espécies.

Figura 7 - Extração de DNA total. *EM*: *Elachistocleis magna*; *DM*: *Dermatonotus muelleri*; *CS*: *Chiasmocleis shudikarensis*. Ladder: 1 Kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific®.

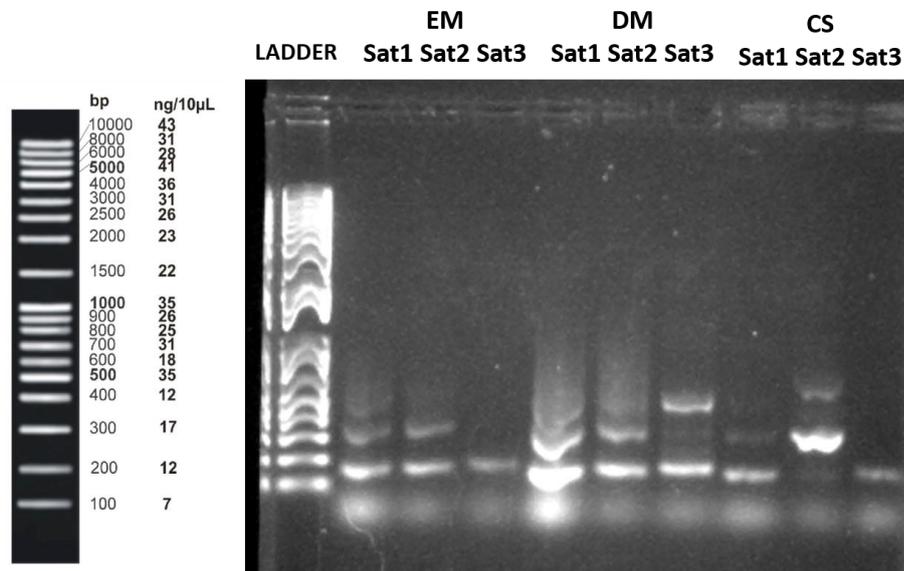


Fonte: autoria própria.

4.3 Reações de PCR das famílias de DNAs satélites

Foram realizados ensaios de amplificação de três famílias de DNAs satélites (PboSat1-176, PboSat2-173 e PboSat3-189) utilizando primers previamente desenhados. Os três DNAs satélites foram amplificados de forma satisfatória em todas as espécies, de acordo com as bandas formadas no gel de agarose, em conformidade com os tamanhos de monômeros descritos para cada um deles (Figura 8). As amostras de PCR foram selecionadas e utilizadas como sondas nos experimentos de FISH.

Figura 8 - Amplificação dos DNA satélites PboSat1-176 (SAT1), PboSat2-173 (SAT2) e PboSat3-189 (SAT3). *EM*: *Elachistocleis magna*; *DM*: *Dermatonotus muelleri*; *CS*: *Chiasmocleis shudikarensis*. Ladder: 1 Kb Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific®.



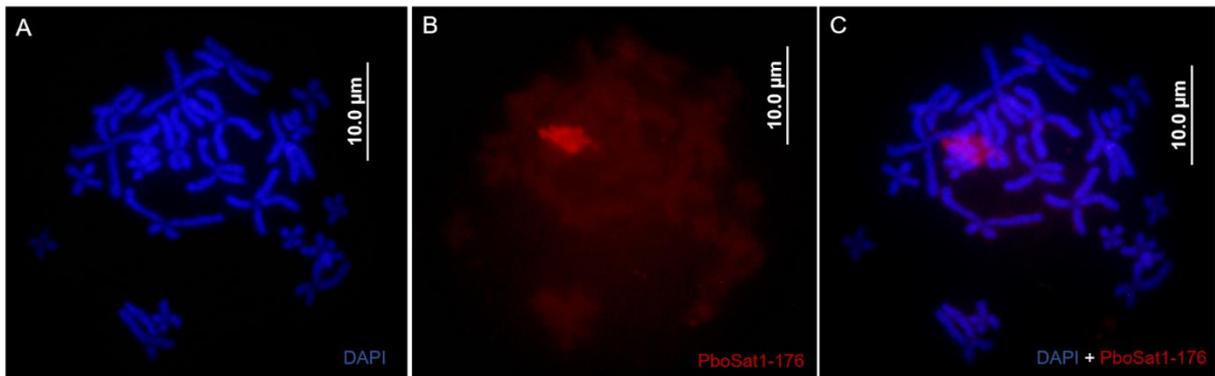
Fonte: autoria própria.

4.4 FISH

Devido às restrições impostas pela pandemia de Covid-19 e a impossibilidade de uso dos laboratórios de pesquisas da UNESP, os experimentos de FISH ficaram comprometidos. Com isso, após recente retomada de atividades foi decidido realizar ensaios apenas com a espécie *E. magna*, utilizando os três satélites em questão.

Os cromossomos submetidos a hibridização com o satélite PboSat1-176 não mostraram sinais evidentes de marcação (Figura 9). Após algumas rodadas de hibridização e visualização de metáfases, o padrão observado para este satélite mostra que apesar da amplificação positiva por PCR, o conjunto de sequências não deve estar clusterizado o bastante para ser detectado pela técnica de FISH.

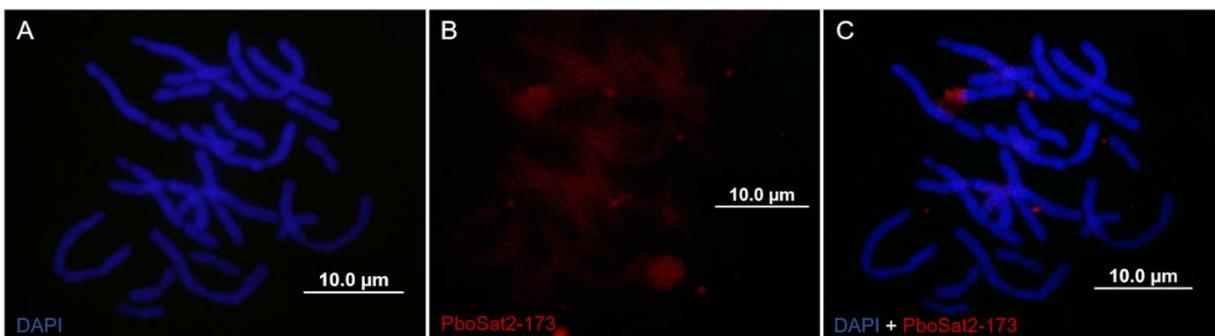
Figura 9 - Metáfases mitóticas de *Elachistocleis magna* após hibridação *in situ* tendo satélite PboSat1-176 como sonda. Em A, coloração em DAPI; em B, sonda do satélite; em C, imagens sobrepostas.



Fonte: autoria própria.

Os cromossomos submetidos a hibridização *in situ* utilizando o satélite PboSat2-173 como sonda, também não mostraram sinais evidentes da sonda, tanto na imagem da sonda (vermelho) quanto na sobreposta (Figura 10).

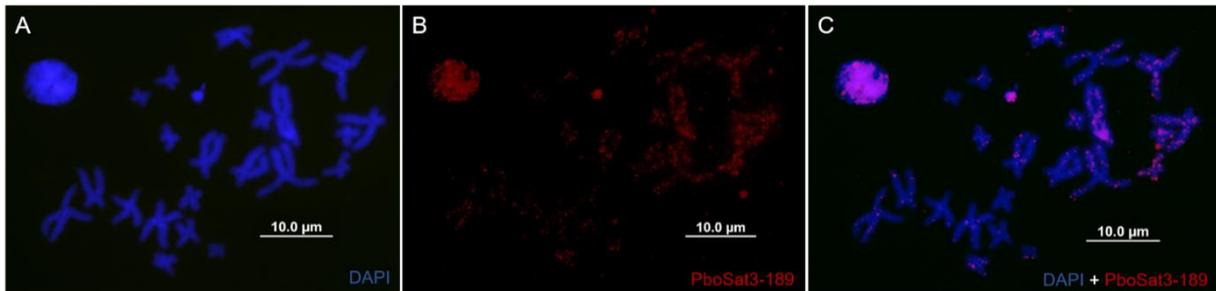
Figura 10 - Metáfases mitóticas de *Elachistocleis magna* após hibridação *in situ* tendo como sonda o satélite PboSat2-173. Em A, coloração em DAPI; em B, sonda do satélite; em C, imagens sobrepostas.



Fonte: autoria própria.

Para o satélite PboSat3-189, a hibridização *in situ* mostrou sinais nos cromossomos, porém, com padrão espalhado. No entanto, os sinais observados são claros e dispersos por vários cromossomos, padrão característico de elementos de transposição (Figura 11).

Figura 11 - Metáfases mitóticas de *Elachistocleis magna* após hibridação in situ tendo como sonda o satélite PboSat3-189. Em A, coloração em DAPI; em B, sonda do satélite; em C, imagens sobrepostas.



Fonte: autoria própria.

5 DISCUSSÃO

Com relação a morfologia e tamanho cromossômicos foi observado uma grande semelhança, entre as três espécies analisadas. Percebe-se que o tamanho dos cromossomos vai sendo reduzido gradualmente até o sexto par, sem uma demarcação clara entre os cromossomos grandes e médios. Já a partir do sétimo par, todos são pequenos, praticamente sem diferença de tamanho entre eles. Essa é uma característica que se repete em outras espécies já cariotipadas da família Microhylidae, como é o caso de *Arcomover passarellii*, *Elachistocleis ovalis*, *Chiasmocleis bicegoi*, *Chiasmocleis schubati*, *Chiasmocleis leucosticta*, *Microhyla fissipes*, *Microhyla pulchra*, *Microhyla heymonsi* (BOGART & NELSON, 1976; KURAMATO, 1990; KASAHARA & HADDAD, 1997; SANGPAKDEE *et al.*, 2017). Essa característica também se mostra presente nos estudos realizados por Rabello (1970) envolvendo a espécie *Dermatonotus muelleri*, que dentre as 3 espécies aqui estudadas, é a única que foi cariotipada. Esse parece ser um padrão observado também em outras famílias de anfíbios anuros, como por exemplo Leptodactylidae, Hylidae e Odontophrynidae (AMARO-GHILARDI *et al.*, 2006; BRUSCHI *et al.*, 2012; TARGUETA *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2021).

A diferença mais marcante verificada entre os três cariótipos foi em relação ao par 11 de *Chiasmocleis shudikarensis*, que é o único telocêntrico observado. Isso equivale para as outras espécies cariotipadas do mesmo gênero, como *Chiasmocleis schubati* e *Chiasmocleis leucosticta* (KASAHARA & HADDAD, 1997). Essa característica é interessante quando associada com as relações filogenéticas na árvore proposta por Sánchez e colaboradores (2020). Na filogenia, o gênero *Chiasmocleis*, mais distante, aparece como sendo um grupo mais ancestral, enquanto

Elachistocleis é grupo irmão direto de *Dermatonotus*. Além disso, *Elachistocleis* é um grupo que surgiu mais recentemente na escala evolutiva em comparação com as outras duas espécies analisadas neste trabalho (SÁNCHEZ *et al.*, 2020).

Nas espécies da família Microhylidae analisadas até o presente momento, ocorre uma ampla variação do número cromossômico, com cariótipos variando de $2n = 18, 20, 22, 24$ e 26 (KURAMATO, 1990). As três espécies estudadas neste trabalho apresentaram número diplóide $2n = 22$. Esse número chama a atenção, especialmente para a espécie *Chiasmocleis shudikarensis*, que é a única do gênero até o momento, como esse número cromossômico, diferente das demais espécies que mostram um cariótipo com $2n = 24$ cromossomos (BOGAR & NELSON, 1976; KURAMATO, 1990; KASAHARA & HADDAD, 1997). Isso indica que pode ter ocorrido eventos de redução como por exemplo fissões/fusões ou deleções que resultaram nessa diferenciação cariotípica no curso evolutivo da família Microhylidae. Apesar de Sangpakdee e colaboradores (2017) terem verificado a presença de um par cromossômico heteromórfico em *M. fissipes*, indicando a presença de cromossomos sexuais diferenciados, isso não ocorreu nas espécies aqui analisadas, indicando o estado homomórfico de cromossomos sexuais nestas espécies, embora seja necessário a aplicação de outras técnicas para melhor caracterizar e identificar cromossomos sexuais

Os três DNAs satélites aqui estudados tiveram sucesso na amplificação por PCR utilizando os DNAs extraídos dos seus respectivos indivíduos. No entanto, diferentemente do esperado, os experimentos de hibridização *in situ* não mostraram sinais aparentes nos cromossomos para dois dos satélites analisados (PboSat1-176 e PboSat2-173), provavelmente por não estarem agrupados o suficiente, ou por não serem abundantes em *Elachistocleis magna* a ponto de serem detectados pela FISH. Já o satélite PboSat3-189, mostrou sinais evidentes de marcações espalhados por vários cromossomos, com um padrão disperso, semelhante ao observado para elementos transponíveis ou microssatélites. Esse padrão de marcação é bem diferente do trabalho envolvendo *Proceratophrys boiei*, no qual os sinais de PboSat3-189 foram detectados na região centromérica de todos os cromossomos da espécie, embora com diferentes tamanhos de blocos nos cromossomos (DA SILVA *et al.*, 2020).

Ainda, a hibridização com os SatDNAs PboSat1-176 e PboSat2-173 em *P. boiei* mostrou uma localização cromossômica centromérica e pericentromérica, sugerindo o possível envolvimento destas sequências para a função centromérica, bem como o processo de heterocromatinização. Além disso, os satélites mapeados encontram presentes no cromossomo sexual W, ocupando toda a área heterocromática, revelando a contribuição deste DNA repetitivo para a quantidade de heterocromatina constitutiva em *P. boiei*, podendo estar relacionados com a diferenciação dos cromossomos sexuais nesta espécie (DA SILVA *et al.*, 2020). Apesar de amplificados em DNA genômico, em *E. magna* aqui estudado, os satélites PboSat1-176 e PboSat2-173 não mostraram sinais evidentes de marcação nos cromossomos, o que nos levou a inferir que as sequências estão presentes no genoma desta espécie, porém, não a ponto de serem detectadas por FISH.

Apesar de determinante para a afirmação da presença e localização de sequências de DNAs repetitivos, sinais evidentes na FISH podem não aparecer, e mesmo assim é válida a confirmação da presença dessas sequências genômicas. Em insetos, por exemplo, dependendo da repetição mapeada e da espécie estudada, o tamanho dos sinais pode ser variável, provavelmente devido ao número de repetições ocorrendo em loci específicos e sua organização nos cromossomos (CABRAL-DE-MELLO & MAREC 2021). O fato de formar bandas de amplificação confiáveis no gel de agarose, demonstra a presença daquela sequência no genoma, levando-se em conta uma extração de DNA total bem sucedida.

Esses casos que não mostram sinais aparentes na FISH, uma das possibilidades para tentar solucionar esta questão seria fazer uma detecção mais sensível de sinais de hibridização, porém, há relatos de trabalhos demonstrando que a não visualização dos sinais pode não estar relacionada à sensibilidade do método utilizado, mas a uma organização específica das sequências mapeadas, que podem não estar agrupadas e/ou em baixo número de cópias de repetições de DNA, que pode ser o caso dos satélites mapeados em *E. magna* neste trabalho (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; MILANI *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2020; CABRAL-DE-MELLO e MAREC 2021).

Para as espécies de Microhylidae estudadas aqui, a garantia da presença de satélites é concedida pelas ampliações genômicas bem sucedidas dos satélites em questão. Desta forma, destaca-se a importância da utilização no futuro de técnicas

modernas de identificação de sequências repetitivas, tais como sequenciamento de nova geração (NGS) dos próprios genomas, combinadas com análises de bioinformática para busca de *repeats*, tais como o RepeatExplorer (NOVÁK *et al.*, 2013), SatMiner (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016), entre outros, que estão sendo extensivamente estudados, revelando uma diversidade de sequências repetitivas e suas funcionalidades em vários organismos (RUIZ-RUANO *et al.*, 2018; BARDELA *et al.*, 2020; FERRETI *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2020; CREPALDI & PARISE-MALTEMPI 2020; CREPALDI *et al.*, 2021).

O satélite PboSat3-189 descrito por Da Silva e colaboradores (2020) é uma interessante sequência monomérica que parece ser compartilhada por muitas espécies de anuros. Através de comparações de alinhamento de sequências, o monômero do PboSat3-189 é altamente similar com outro DNA satélite já descrito para anuros, o PcP190, descrito para diferentes famílias de anfíbios (VITTORAZZI *et al.*, 2014; GATTO *et al.*, 2016, 2019; TARGUETA *et al.*, 2018). Esse satélite se mostrou presente no genoma das espécies de Microhylidae analisadas neste trabalho, e em *E. magna* foi detectado por FISH, indicando que provavelmente uma família de satDNA antiga, por estar presente em famílias de anfíbios anuros muito distantes filogeneticamente.

Esse compartilhamento de famílias de DNAs satélites é suportado pela hipótese da biblioteca, em que espécies diferentes distantes filogeneticamente e evolutivamente entre si podem compartilhar uma biblioteca ancestral de diferentes sequências de DNA satélites, que podem diminuir ou amplificar distintamente em cada uma (SALSER *et al.*, 1976). Em alguns casos, esses satélites podem se tornar mais abundantes, como em *P. boiei* (DA SILVA *et al.*, 2020) e em outros, nem tanto, como observado nas espécies da família Microhylidae analisadas neste trabalho, e em cada espécie esse processo evolutivo pode ocorrer mais lentamente ou mais rapidamente.

Por meio de ampliações e mapeamento por FISH foi possível mostrar que os três satélites analisados encontram-se presentes em *E. magna*, *D. muelleri* e *C. shudikarensis*, apesar de terem sido descritos para *P. boiei*, uma espécie muito distante filogeneticamente. Esse compartilhamento de sequências pode ser um bom indicativo de conservação de famílias de satDNAs em anuros, sobretudo o satélite PboSat3-189, mais extensivamente estudado. Estudos mais aprofundados a nível

genômico em espécies de Microhylidae podem ser fundamentais para uma melhor compreensão da dinâmica evolutiva de compartilhamento dessas sequências.

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho contribuem para aumentar o pouco conhecimento que se tem sobre DNAs satélites em anfíbios anuros, além de atualizar a descrição cariótica, contribuindo para a citogenética em geral. Foi encontrado um número diplóide conservado ($2n=22$), com morfologia cromossômica similar, impossibilitando uma distinção de espécies somente pela observação dos cariótipos. Sendo assim, é necessário realizar estudos mais aprofundados, como análise de bandeamento C, marcação das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) e até mesmo outras abordagens moleculares. Além disso, apesar de ter ocorrido as ampliações dos três DNAs satélites nas espécies analisadas neste trabalho, é preciso continuar os estudos, utilizando técnicas modernas de sequenciamento e bioinformática para comparação de sequências, bem como análise de genoma específico, no qual poderia ver a abundância genômica de sequências, bem como análise de compartilhamento por meio de análises *in silico*. A FISH em todas as espécies também é necessária, pois ampliará as discussões sobre a organização cromossômica dessas sequências, já que foram amplificadas nos genomas. Além de contribuir com informações citogenéticas e moleculares atualizadas para anfíbios anuros, esse estudo abre caminhos para análises mais profundas da presença e compartilhamento de DNAs satélites em sapos, podendo ser muito útil para estudos evolutivos e genômicos futuros.

REFERÊNCIAS

AMARO-GHILARDI, R. C.; SKUK, G.; DE SÁ, R. O.; TREFAUT, R. M.; 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, 2006.

AMPHIBIAWEB: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2021. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <https://amphibiaweb.org/>. (Accessed: 10 set, 2021).

BALDISSERA, F. A. JR.; 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.

BARDELLA, V. B., MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Analysis of *Holhymenia histrio* genome provides insight into the satDNA evolution in an insect with holocentric chromosomes. **Chromosome Research**, v. 28, n. 3, p. 369-380, 2020.

BELYAYEV, A.; JANDOVÁ, M.; JOSEFIOVÁ, J.; KALENDAR, R.; MAHELKA, V.; MANDÁK, B.; & KRAK, K. The major satellite DNA families of the diploid *Chenopodium album* aggregate species: Arguments for and against the “library hypothesis”. **PLoS one**, v. 15, n. 10, p. e0241206, 2020.

BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J.S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, 23(3), 415-420. 2015.

BLOMMERS-SCHLÖSSER, R. M. A. Chromosomal analysis of twelve species of Microhylidae (Anura) from Madagascar. **Genetica**, v. 46, n. 2, p. 199-210, 1976.

BOETTGER, O. Liste von reptilien und batrachiern aus Paraguay. **Zeitschrift für Naturwissenschaften**, v. 58, n. 3, p. 213-248, 1885.

BOGART, J. P. Evolution of Amuran Karyotypes. **Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems**, p. 337-349, 1973.

BOGART, James P.; TANDY, Mills. Polyploid amphibians: three more diploid-tetraploid cryptic species of frogs. **Science**, v. 193, n. 4250, p. 334-335, 1976.

BOGART, J. P.; NELSON, C. E. Evolutionary implications from karyotypic analysis of frogs of the families Microhylidae and Rhinophrynidae. **Herpetologica**, p. 199-208, 1976.

BOULENGER, G. A. Batrachians. *In* E. R. Lankester, Report on a collection made by Messrs. F. V. McConnell and J. J. Quelch at Mount Roraima in British Guiana. Transactions of the Linnean Society of London. 2nd series. **Zoology**, v. 8, p. 55–56, 1900.

BRUSCHI, D. P.; BUSIN, C. S.; SIQUEIRA, S.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, v. 149, n. 1, p. 34-40, 2012.

DE BUSTOS, A.; FIGUEROA, R. I.; SIXTO, M.; BRAVO, I.; CUADRADO, Á. The 5S rRNA genes in *Alexandrium*: their use as a FISH chromosomal marker in studies of the diversity, cell cycle and sexuality of dinoflagellates. **Harmful Algae**, v. 98, p. 101903, 2020.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MAREC, F. Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 296, n. 3, p. 513-526, 2021.

- DE CARVALHO, A. L. A preliminary synopsis of the genera of American microhylid frogs. Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan 555: 1–19, 1954.
- CHOLAK, L. R.; HADDAD, C. F.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic analysis of the genus *Thoropa* Cope, 1865 (Anura-Cycloramphidae) with evolutionary inferences based on repetitive sequences. **Genetics and molecular biology**, v. 43, 2020.
- CREPALDI, C.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Heteromorphic sex chromosomes and their DNA content in fish: an insight through satellite DNA accumulation in *Megaleporinus elongatus*. **Cytogenetic and genome research**, v. 160, n. 1, p. 38-46, 2020.
- CREPALDI, C.; MARTÍ, E.; GONÇALVES, É. M.; MARTÍ, D. A.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Genomic Differences Between the Sexes in a Fish Species Seen Through Satellite DNAs. **Frontiers in genetics**, v. 12, 2021.
- DOVER, G. A. Species Evolution. **Nature**, v. 299, p. 111, 1982.
- DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in genetics**, v. 2, p. 159-165, 1986.
- DOVER G. A. Molecular drive. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 11, p. 587-589, 2002.
- DUELLMAN, W. E., TRUEB, L. Biology of Amphibians. Hightstown, N. J., USA; London, England, 1986.
- EMERSON, S. B. The fossorial frog adaptive zone: a study of convergence and parallelism in the Anura. Los Angeles: University of South California; 1971. Ph. D.
- FABREZI, M., QUINZIO, S., GOLDBERG, J., & DE SÁ, R. O. The development of *Dermatonotus muelleri* (anura: microhylidae: gastrophryinae). **Journal of Herpetology**, v. 46, n. 3, p. 363-380, 2012.
- FENG, Y. J.; BLACKBURN, D. C.; LIANG, D.; HILLIS, D. M.; WAKE, D. B.; CANNATELLA, D. C.; ZHANG, P. Explosive radiation of frogs at the K–Pg boundary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 114, p. E5864-E5870, 2017.
- FITZINGER, L. J. F. J. Systema Reptilium. Fasciculus Primus. Wien: Braumüller et Seidel. 1843.
- FORLANI, M. D. C. **Morfologia do gênero *Chiasmocleis* Méhely, 1904 (Anura, Microhylidae, Gastrophryinae), e suas implicações filogenéticas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1. American Museum of Natural History, New York, USA, 2021. Electronic Database. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> Acesso em: 10 nov. 2021.
- FOUQUET, A.; LEBLANC, M. F.; RÉJAUD, A.; RODRIGUES, M. T.; CASTROVIEJO-FISHER, S.; PELOSO, P. L. V.; PRATES, I.; MANZI, S.; SUESCUN, U.; BARONI, S.; MORAES, L. J. C. L.; RECODER, R.; DE SOUZA, S. M.; DAL VECCHIO, F.; CAMACHO, A.; GHELLERE, J. M.; ROJAS-RUNJAIC, F. J. M.; GAGLIARDI-URRITIA,

G.; DE CARVALHO, V. T.; GORDO, M.; MENIN, M.; KOK, P. J. R.; HRBEK, T.; WERNECK, F. P.; CRAWFORD, A. J.; RON, S. R.; MUESES-CISNEROS, J. J.; ZAMORA, R. R. R.; PAVAN, D.; SIMÕES, P. I.; ERNST, R.; FABRE, A. C. Species diversity and biogeography of an ancient frog clade from the Guiana Shield (Anura: Microhylidae: *Adelastes*, *Otophryne*, *Synapturanus*) exhibiting spectacular phenotypic diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 132, n. 2, p. 233-256, 2021.

GALLEGO, L. F. K. **Análise citogenética de anfíbios simpátricos oriundos da Floresta Atlântica**. Monografia. Universidade de São Paulo, 2008.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenetic Genome Research**, v. 146, p. 153–170, 2015.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, p. 230, 2017.

GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the sex chromosome heteromorphism of the paradoxical frog *Pseudis tocantins*. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0156176, 2016.

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

GATTO, K. P., SEGER, K. R., GARCIA, P. C. D. A., & LOURENÇO, L. B. Satellite DNA Mapping in *Pseudis fusca* (Hylidae, Pseudinae) Provides new insights into sex chromosome evolution in paradoxical frogs. **Genes**, v. 10, n. 2, p. 160, 2019.

GUERRA, M. S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et. **Brazil. J. Genet**, v. 9, p. 741-743, 1986.

HE, J.; LIN, S.; YU, Z.; SONG, A.; GUAN, Z.; FANG, W.; CHEN, S.; ZHANG, F.; JIANG, J.; CHEN, F.; WANG, H. Identification of 5S and 45S rDNA sites in Chrysanthemum species by using oligonucleotide fluorescence in situ hybridization (Oligo-FISH). **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 21-31, 2021.

KASAHARA, S.; HADDAD, C. F. B. Karyotypes of two Brazilian microhylid frogs of the genus *Chiasmocleis*, including a new case of polyploidy. **Journal of Herpetology**, p. 139-142, 1997.

KUNDU, S., LALREMSANGA, H. T., BIAKZUALA, L., DECEMSON, H., MUANSANGA, L., TYAGI, K., CHANDRA, K.; KUMAR, V. Genetic diversity of the Pegu Rice Frog, *Microhyla berdmorei* (Anura: Microhylidae) based on mitochondrial DNA. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 6, n. 5, p. 1586-1591, 2021.

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

LEÓN, P. E. Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. **Revista de Biología Tropical**, v. 17, n. 1, p. 119-124, 1970.

LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMANN, L. K.; RODRIGUES, D. J.; KELLER, C.; HÖDL, W. Guide to the frogs of Reserva Adolpho Ducke, central Amazonia. **Attema Design Editorial, Manaus**, 2006.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 1-28, 2012.

LÓPEZ-LEÓN, M. D.; NEVES, N.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S.; HEWITT, G. M.; CAMACHO, J. P. M. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosom Res**, v. 2, n. 2, p. 87-92, 1994.

LOWER, S. S.; MCGURK, M. P.; CLARK, A. G.; BARBASH, D. A. Satellite DNA evolution: old ideas, new approaches. **Current opinion in genetics & development**, v. 49, p. 70-78, 2018.

LYNCH, J. D. The transition from archaic to advanced frogs. Vial, J. L. ed., *Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems*: 133–182. Columbia, Missouri, University of Missouri Press. 1973.

MATSUI, M.; ITO, H.; SHIMADA, T.; OTA, H.; SAIDAPUR, S. K.; KHONSUE, W.; TANAKA-UENO, T.; WU, G. F. Taxonomic relationships within the Pan-Oriental narrow-mouth toad *Microhyla ornata* as revealed by mtDNA analysis (Amphibia, Anura, Microhylidae). **Zoological Science**, v. 22, n. 4, p. 489-495, 2005.

MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B.; PAVLEK, M.; VOJVODA-ZELJKO, T.; ŠATOVIĆ, E.; PLOHL, M. Structural and functional liaisons between transposable elements and satellite DNAs. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 583-596, 2015.

MIGA, K. H. Completing the human genome: the progress and challenge of satellite DNA assembly. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 421-426, 2015.

MILANI, D.; RAMOS, É.; LORETO, V.; MARTÍ, A. D.; CARDOSO, A. L.; DE MORAES, K. C. M.; MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2017.

MILANI, D.; BARDELLA, V. B.; FERRETTI, A. B.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MELO, A. D. S.; MOURA, R. C.; LORETO, V.; SONG, H.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Satellite DNAs unveil clues about the ancestry and composition of B chromosomes in three grasshopper species. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 523, 2018.

MORESCALCHI, A.; GARGIULO, G.; OLMO, E. Notes on the chromosomes of some Amphibia. **Journal of Herpetology**, v. 4, n. 1/2, p. 77-79, 1970.

NOMURA, F. **Ecologia reprodutiva e comportamento de forrageio e escavação de *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885) (Anura, Microhylidae)**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, p. 95, 2003.

NOMURA, F.; ROSSA-FERES, D. C.; LANGEANI, F. Burrowing behavior of *Dermatonotus muelleri* (Anura, Microhylidae) with reference to the origin of the burrowing behavior of Anura. **Journal of Ethology**, v. 27, n. 1, p. 195, 2009.

NOMURA, F.; ROSSA-FERES, D.C. The frog *Dermatonotus muelleri* (Boettger 1885) (Anura Microhylidae) shifts its search tactics in response to two different prey distributions. *Ethol. Ecol. Evol.* 23, 318-328, 2011.

NOVAK, P.; NEUMANN, P.; PECH, P.; STEINHAISSL, J.; MACAS, J. RepeatExplorer: a galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, p. 792–3, 2013.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MILANI, D.; SONG, H.; MARTI, D. A.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; RUIZ-RUANO, F. J.; CAMACHO, J. P. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Eight million years of satellite DNA evolution in grasshoppers of the genus *Schistocerca* illuminate the ins and outs of the library hypothesis. **Genome biology and evolution**, v. 12, n. 3, p. 88-102, 2020.

PARKER, H. W. A monograph of the frogs of the family Microhylidae. London: British Museum (Natural History), 1934.

PELOSO, P. L., FROST, D. R., RICHARDS, S. J., RODRIGUES, M. T., DONNELLAN, S., MATSUI, M., LEMMON, E. M., LEMMON, W. C., WHEELER, W. C. The impact of anchored phylogenomics and taxon sampling on phylogenetic inference in narrow-mouthed frogs (Anura, Microhylidae). **Cladistics**, v. 32, n. 2, p. 113-140, 2016.

PLOHL, M.; LUCHETTI, A.; MEŠTROVIĆ, N.; MANTOVANI, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1-2, p. 72-82, 2008.

PLOHL, M.; PETROVIĆ, V.; LUCHETTI, A.; RICCI, A.; SATOVIĆ, E.; PASSAMONTI, M.; MANTOVANI, B. Long-term conservation vs high sequence divergence: the case of an extraordinarily old satellite DNA in bivalve mollusks. **Heredity**. 104.6: 543–551, 2010.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 126-152, 2012.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**, v. 123, p. 313–325, 2014.

POYARKOV, N. A.; VAN NGUYEN, T.; VAN DUONG, T.; GORIN, V. A.; YANG, J. H. A new limestone-dwelling species of *Micryletta* (Amphibia: Anura: Microhylidae) from northern Vietnam. **PeerJ**, v. 6, p. e5771, 2018.

PYBURN, W. F. **An unusual anuran larvae from the Vaupés region of southeastern Colombia**. *Papéis Avulsos de Zoologia*. São Paulo 33: 231–238, 1980.

RABELLO, M. N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, v. 23, n. 1, p. 45-59, 1970.

ROELANTS, K.; GOWER, D. J.; WILKINSON, M.; LOADER, S. P.; BIJU, S. D.; GUILLAUME, K.; MORIAU, L.; BOSSUYT, D. F. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 3, p. 887-892, 2007.

RUIZ-RUANO, F. J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

RUIZ-RUANO, F. J.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CAMACHO, J. P. M. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. **Chromosoma**, v. 126, n. 4, p. 487-500, 2017.

RUIZ-RUANO, F. J.; CASTILLO-MARTÍNEZ, J.; CABRERO, J.; GÓMEZ, R.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZ-LEÓN, M. D. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, v. 127, n. 3, p. 323-340, 2018.

SÁ, R. O. de; STREICHER, J. W.; SEKONYELA, R.; FORLANI, M. C.; LOADER, S. P.; GREENBAUM, E.; RICHARDS, S.; HADDAD, C. F. B. Molecular phylogeny of microhylid frogs (Anura: Microhylidae) with emphasis on relationships among New World genera. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-21, 2012.

SALSER, W.; BOWEN, S.; BROWNE, D.; EL ADLI F.; FEDOROFF, N.; FRY, K.; HEINDELL, H.; PADDOCK, G.; POON, R.; WALLACE, B.; WHITCOME, P. Investigation of the organization of mammalian chromosomes at the DNA sequence level. **Federation proceedings**, v. 35, n. 1, p. 23-35, 1976.

SANCHEZ-NIVICELA, J. C.; PELOSO, P. L.; URGILES, V. L.; YÁNEZ-MUÑOZ, M. H.; SAGREDO, Y.; PÁEZ, N.; RON, S. Description and phylogenetic relationships of a new trans-Andean species of *Elachistocleis* Parker 1927 (Amphibia, Anura, Microhylidae). **Zootaxa**, v. 4779, n. 3, p. 18, 2020.

SANGPAKDEE, W.; PHIMPHAN, S.; TENGJAROENKUL, B.; PINTHONG, K.; NEERATANAPHAN, L.; TANOMTONG, A. Cytogenetic study of three microhylid species (Anura, Microhylidae) from Thailand. **Cytologia**, v. 82, n. 1, p. 67-74, 2017.

SAVAGE J. M. The geographic distribution of frogs: pattern and predictions. In *Evolutionary Biology of Anurans: Contemporary Research on Major Problems*. Edited by: Vial JL. Columbia, Missouri: University of Missouri Press; p. 351-445, 1973.

SCHARTL, M.; SCHMID, M.; NANDA, I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. **Chromosoma**, v. 125, n. 3, p. 553-571, 2016.

SEGALLA, M.; BERNECK, B.; CANEDO, C.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GARCIA, P. C. A.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LOURENÇO, A. C.; MANGIA, S.; MOTT, T.; NASCIMENTO, L. TOLEDO, L. F.; WERNECK, F.; LANGONE, J. A. List of Brazilian amphibians. **Herpetologia Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 121-217, 2021.

SERRANO-FREITAS, E. A.; SILVA, D. M.; RUIZ-RUANO, F. J.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, R. P. M.; FORESTI, F. Satellite DNA

content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 1, p. 195-207, 2020.

SILVA, D. M.Z de A.; UTSUNOMIA, R.; RUIZ-RUANO, F. J.; DANIEL, S. N.; HASGIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

SILVA, M. J. da, DESTRO, R. F., GAZONI, T., NARIMATSU, H., DOS SANTOS, P. S. P., HADDAD, C. F., PARISE-MALTEMPI, P. P. Great abundance of satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) revealed by genome sequencing. **Cytogenetic and genome research**, v. 160, n. 3, p. 141-147, 2020.

SILVA, M. J. D., SANTOS, M. D., GAZONI, T., CHOLAK, L. R., HADDAD, C. F. B., & PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic approaches provide evidence of a conserved diploid number and cytological differences between *Proceratophrys* species (Anura: Odontophrynidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

SOKOL, O. M. 1975. The phylogeny of anuran larvae: a new look. **Copeia**, p. 1-23, 1975.

STORNIOLI, J. H. F.; GOES, C. A. G; CALEGARI, R. M.; SANTOS, R. Z.; GIGLIO, L. M.; FORSTI, F.; OLIVEIRA, C.; PENITENTE, M.; FORESTI, F. P.; UTSUNOMIA, R. The B Chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Characiformes) Are Highly Enriched in Satellite DNAs. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1527, 2021.

TARGUETA, C. P.; GUERRA, V.; GAMBALE, P. G.; BASTOS, R. P.; SILVA, D. D. M.; TELLES, M. P. D. C. Cytogenetics of two hylid frogs from Brazilian Cerrado. **Genetics and molecular biology**, v. 41, p. 814-819, 2018.

TOLEDO, L.F. A new species of *Elachistocleis* (Anura; Microhylidae) from the Brazilian Amazon. **Zootaxa**, v. 2496, n. 1, p. 63-68, 2010.

TRUEB, L. Bones, frogs, and evolution. Vial, J. L. ed., Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems: 65–132. Columbia, Missouri, University of Missouri Press, 1973.

TRUEB, L.; DIAZ, R.; BLACKBURN, D. C. Osteology and chondrocranial morphology of *Gastrophryne carolinensis* (Anura: Microhylidae), with a review of the osteological diversity of New World microhylids. **Phyllomedusa**, v. 10, n. 2, p. 99-135, 2011.

TU, N.; YANG, M.; LIANG, D.; ZHANG, P. A large-scale phylogeny of Microhylidae inferred from a combined dataset of 121 genes and 427 taxa. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 126, p. 85-91, 2018.

UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **The EMBO journal**, v. 21, n. 22, p. 5955-5959, 2002.

VAN DER MEIJDEN, A.; VENCES, M.; HOEGG, S; BOISTEL, R.; CHANNING, A.; MEYER, A. Nuclear gene phylogeny of narrow-mouthed toads (Family: Microhylidae) and a discussion of competing hypotheses concerning their biogeographical origins. **Mol Phylogenet**, v. 44, n. 3, p. 1017-1030, 2007.

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; DEL-GRANDE, M. L.; RECCO-PIMENTEL, M. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 101–107, 2011.

VITTORAZZI, S. E.; LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC genetics**, v. 15, n. 1, p. 1-1.

WASSERSUG, R.; W. F. PYBURN. 1987. The biology of the Pe-ret toad, *Otophryne robusta* (Microhylidae), with special consideration of its fossorial larva and systematic relationships. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 91, n. 2, p. 137-169, 1987.

ZWEIFEL, R. G. A new genus and species of microhylid frog from the Cerro de la Neblina Region of Venezuela and a discussion of relationships among New World microhylid genera. **American Museum Novitates**, n. 2863, p. 1–24, 1986.

ZUG, G.R. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. San Diego: Academic Press, 527p., 1993.