



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,  
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO - PPGGBC



**ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DE  
*PHYLLOMEDUSA***

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação  
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação  
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

FERNANDO DE JESUS SILVA



JEQUIÉ – BA  
MARÇO – 2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação  
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação  
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



FERNANDO DE JESUS SILVA

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM ESPÉCIES DE *PHYLLOMEDUSA*



Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Caroline Garcia

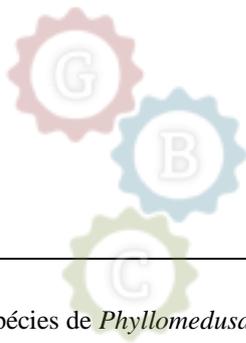


JEQUIÉ – BA  
MARÇO – 2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

S58 Silva, Fernando de Jesus.  
Estudos citogenéticos em espécies de *Phyllomedusa* (Anura-Hylidae) / Fernando de Jesus Silva. - Jequié, UESB, 2016.  
64 f. il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação) -Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Garcia.

1. Phyllomedusinae (Anura-Hylidae) – Estudos citogenéticos em espécies 2. Anfíbios em áreas de Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica (estudos citogenéticos em espécies) – Bandamento-C 3. *Phyllomedusa* – Rearranjos cromossômicos 4. Phyllomedusinae em áreas da Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica (estudos citogenéticos) – RONS I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.

CDD – 577.4

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

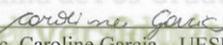
DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

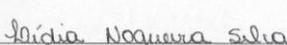
**Título:** Estudos citogenéticos em espécies de *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae).

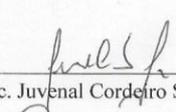
**Autor (a):** Fernando de Jesus Silva

**Orientador (a):** Profa. Dra. Caroline Garcia

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:

  
Prof. D. Sc. Caroline Garcia – UESB / Jequié-BA

  
Prof. D. Sc. Lídia Nogueira Silva – IFBA / Valença-BA

  
Prof. D. Sc. Juvenal Cordeiro Silva Junior – UESB / Jequié-BA

Data de realização: 31 de março de 2016.

Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho – Jequié/BA – CEP 45.206-190.  
Telefones: (0\*\*73) 3528-9725 – E-mail: ppgbc@uesb.edu.br

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Dedico esse trabalho à meus pais, José e Marilene, e irmãos, Fagner e Mônica, pelo amor incondicional e apoio constante.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## AGRADECIMENTOS

A conclusão de mais essa etapa em minha vida, sem sombra de dúvidas, não seria possível sem a presença de vocês, e é por isso que de coração aberto e cheio de alegria que venho os agradecer.

Primeiramente, à Deus, por ouvir sempre as minhas orações, me encorajar e guiar os passos de minha chegada até aqui.

Aos meus pais, Marilene e José, e aos meus irmãos, Mônica e Fagner, que sempre acreditaram em mim, me apoiando em todas as minhas decisões e entendendo minha ausência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC) pelo acolhimento e oportunidade de realizar esse trabalho.

À minha amiga e orientadora, Caroline Garcia, pela bonita relação que criamos que vai além de simples orientado-orientador. Por me apresentar o mundo dos répteis e anfíbios sob outra perspectiva, que não o medo e o nojo. Por se mostrar disposta a me ajudar todas as vezes que fora solicitada. Por sempre acreditar no meu potencial, elevando minha autoestima nos percalços que deparei por essa estrada. Pelo amadurecimento, vide ensinamentos e “puxões de orelha” e pelos prazerosos momentos de descontração, que sem dúvidas, tornou menos árdua minha chegada até aqui.

Ao professor, Juvenal Cordeiro e a turma de Citogenética Geral (2014.2) por creditar à mim a confiança de um trabalho conjunto, me dando a oportunidade do estágio à docência.

Ao professor Miguel Trefaut e seu aluno de doutorado Mauro, por partilharem de todo o conhecimento e experiência no estágio de campo que fiz no Parque Estadual da Serra do Conduru (PESC) e por ceder algumas amostras do meu objeto de pesquisa para que pudesse realizar o trabalho.

À Lídia, pela concessão de algumas amostras para a realização desse trabalho.

À todo o quadro de professores da pós-graduação, que muito contribuíram para o meu conhecimento e por estarem sempre dispostos a ajudar quando foram solicitados. Em especial, aos professores: Caroline Garcia, Juvenal Cordeiro, Paulo Affonso, Débora Diniz, Marcelo Cervine, Ana Maria e Lorena.

Às secretárias do PPGGBC, em especial a Josiane Vieira, pelo carinho, “cafezinhos” e por sempre arrumar um jeitinho para atender a nossas necessidades imediatas.

À minha turma de mestrado, pelo convívio, companheirismo e ajuda mútua nas disciplinas e alguns colegas, na pesquisa. Destaco meus agradecimentos para a turma da disciplina de Biologia da Conservação: Morena (Valéria), Du (Márcia), Aponilha (Poliane), Petiço (Elaine), Rogim / Mininim de vó (Roger), MK (Mírian) e Jefferson, por tornar as madrugadas mais tranquilas e divertidas nas traduções de textos e montagem de apresentações de aula. Destaco também colegas como, Jose (Joseli), Acelga (Anselmo), Beca (Rebeca), Alta (Altair) e Joque (Joquebede).

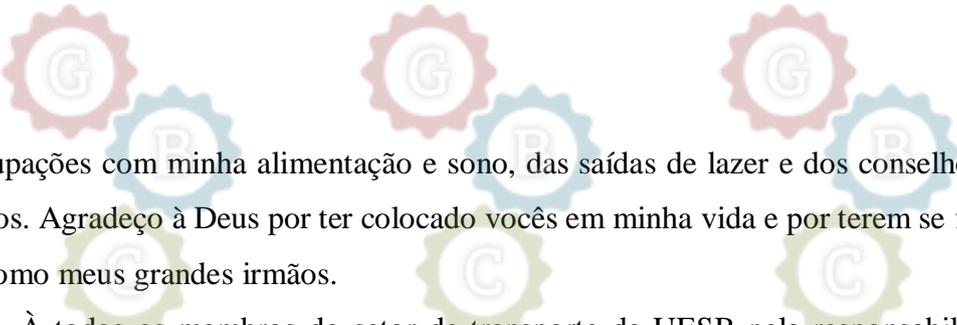
À todos os amigos e companheiros dos laboratórios de Citogenética e Genética Molecular da UESB, pela ajuda, permuta de conhecimento e experiências, congressos já idos, comemorações e resenhas geradas. Em especial, volto os meus agradecimentos à: Jhon (Jonatas), Mah (Marcelle), Du (Márcia), Mi (Millena), Ramon, Tati (Tatiane), Brinni (Fabrinni), Bela (Isabela), Polentinha (Ana Paula), Lu (Luciana), Mari (Marina), Vanderlú (Vanderlan), Nix (Nathanna), Xande (Alexandre), Hermana (Jamille Bitencourt), Japa (Aline), Recruta (Leandro Argôlo), Sil (Sílvia), Lidinha (Lídia), Gal (Evanildes), Araga (Leandro Aragão), Juli (Juliane), Nata (Renata Vasconcelos), Fabi (Fabilene), Man (Henrique), Jal (Jádila), Hanna-na (Hanna), Jhon (João Leno), Sheu (Sheila), Pig (Érica) e Lévis (Levi).

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Herpetologia da UESB: Lenon (Gabriel), Maica (Michael), Maica (Tales), Peppa (Jamille Freitas), pelos divertidos momentos em campo me ajudando com as coletas em Contendas do Sincorá.

Aos meus queridos irmãos de república: Ted (Henrique), Lúcio, Adélia, Di (Diêgo), Pêre (Iulle) e Chandon (Ian), pelos ótimos momentos vividos de companheirismo, alegria, descontração, apoio, carinho, resenhas, solidariedade, união e proteção.

Aos meus velhos e queridos amigos: Kah (Kahelle), Mãe (Jorge), Polenta (Leandra), Ju (Juliana), Were (Laila) e Moreno (Hyago), pelas descontrações e por cada palavra de incentivo e orações ao longo do mestrado.

Aos três irmãos que vida me presentou, Mah (Marcelle), Jhon (Jonatas Gomes) e Mamão verde (Yan Couto), que tanto fizeram para que esse trabalho acontecesse. Sou muito grato à vocês pelo que representam na minha vida. Jamais esquecerei da força com as coletas, da ajuda em laboratório, das palavras de encorajamento e ânimo, das



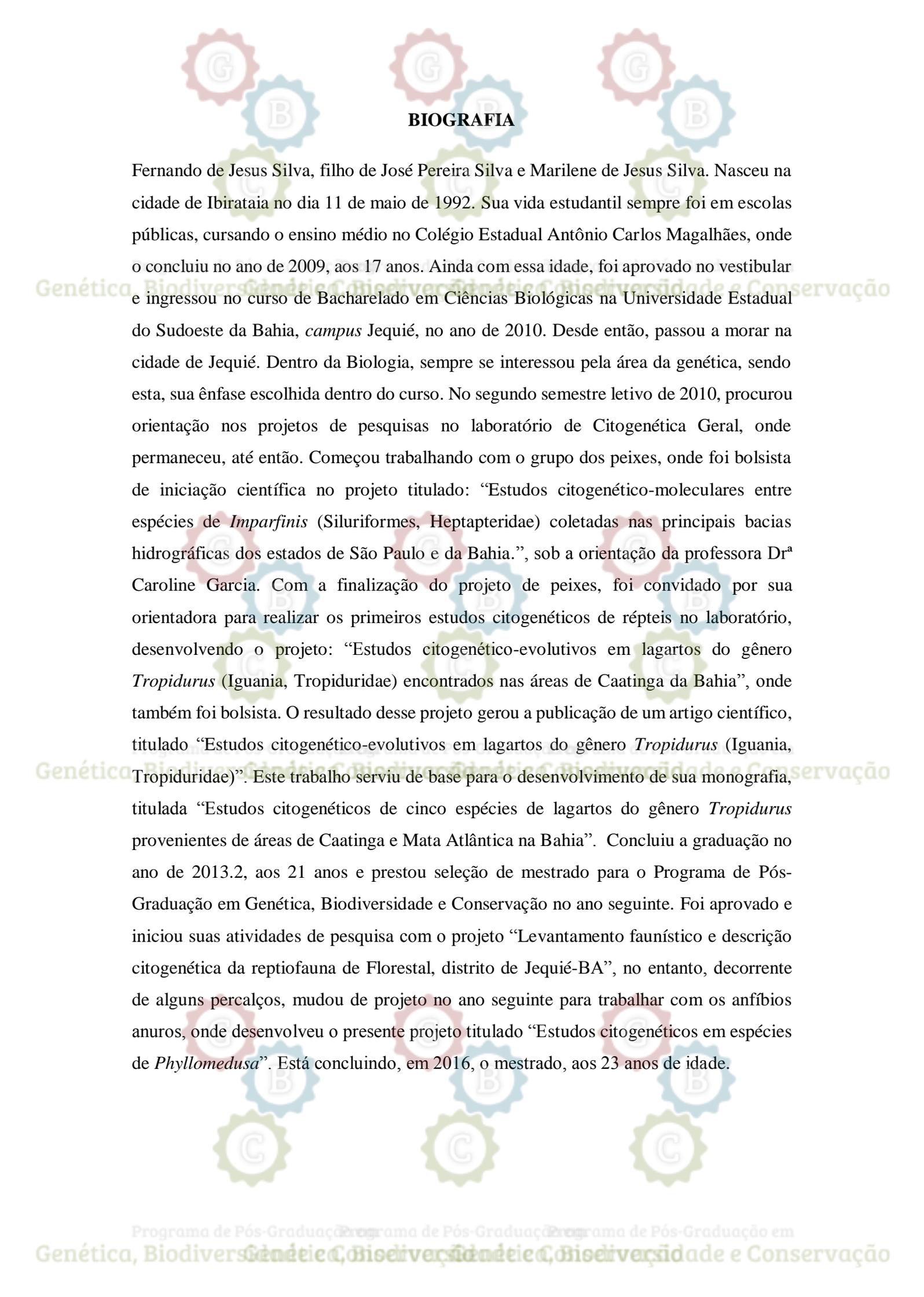
preocupações com minha alimentação e sono, das saídas de lazer e dos conselhos mais sinceros. Agradeço à Deus por ter colocado vocês em minha vida e por terem se firmado nela como meus grandes irmãos.

À todos os membros do setor de transporte da UESB pela responsabilidade e descontração, desde os agendamentos de coletas até a chegada em campo. Em especial, a Walt Disney (Valdnei), um camarada que antes de motorista competente, é uma pessoa do coração grandioso.

Ao meu objeto de trabalho, as “Phyllós”, por cada sacrifício realizado para que essa pesquisa pudesse ser desenvolvida.

Enfim, à todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui, afinal nada nessa vida se é construído sozinho. MUITO OBRIGADO!!!





## BIOGRAFIA

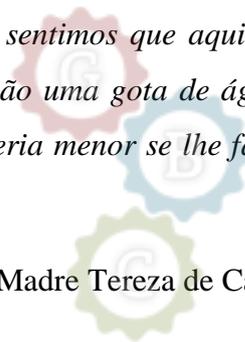
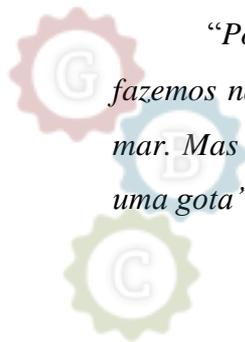
Fernando de Jesus Silva, filho de José Pereira Silva e Marilene de Jesus Silva. Nasceu na cidade de Ibirataia no dia 11 de maio de 1992. Sua vida estudantil sempre foi em escolas públicas, cursando o ensino médio no Colégio Estadual Antônio Carlos Magalhães, onde o concluiu no ano de 2009, aos 17 anos. Ainda com essa idade, foi aprovado no vestibular e ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Jequié, no ano de 2010. Desde então, passou a morar na cidade de Jequié. Dentro da Biologia, sempre se interessou pela área da genética, sendo esta, sua ênfase escolhida dentro do curso. No segundo semestre letivo de 2010, procurou orientação nos projetos de pesquisas no laboratório de Citogenética Geral, onde permaneceu, até então. Começou trabalhando com o grupo dos peixes, onde foi bolsista de iniciação científica no projeto titulado: “Estudos citogenético-moleculares entre espécies de *Imparfinis* (Siluriformes, Heptapteridae) coletadas nas principais bacias hidrográficas dos estados de São Paulo e da Bahia.”, sob a orientação da professora Dr<sup>a</sup> Caroline Garcia. Com a finalização do projeto de peixes, foi convidado por sua orientadora para realizar os primeiros estudos citogenéticos de répteis no laboratório, desenvolvendo o projeto: “Estudos citogenético-evolutivos em lagartos do gênero *Tropidurus* (Iguania, Tropiduridae) encontrados nas áreas de Caatinga da Bahia”, onde também foi bolsista. O resultado desse projeto gerou a publicação de um artigo científico, titulado “Estudos citogenético-evolutivos em lagartos do gênero *Tropidurus* (Iguania, Tropiduridae)”. Este trabalho serviu de base para o desenvolvimento de sua monografia, intitulada “Estudos citogenéticos de cinco espécies de lagartos do gênero *Tropidurus* provenientes de áreas de Caatinga e Mata Atlântica na Bahia”. Concluiu a graduação no ano de 2013.2, aos 21 anos e prestou seleção de mestrado para o Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação no ano seguinte. Foi aprovado e iniciou suas atividades de pesquisa com o projeto “Levantamento faunístico e descrição citogenética da reptiofauna de Florestal, distrito de Jequié-BA”, no entanto, decorrente de alguns percalços, mudou de projeto no ano seguinte para trabalhar com os anfíbios anuros, onde desenvolveu o presente projeto titulado “Estudos citogenéticos em espécies de *Phyllomedusa*”. Está concluindo, em 2016, o mestrado, aos 23 anos de idade.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



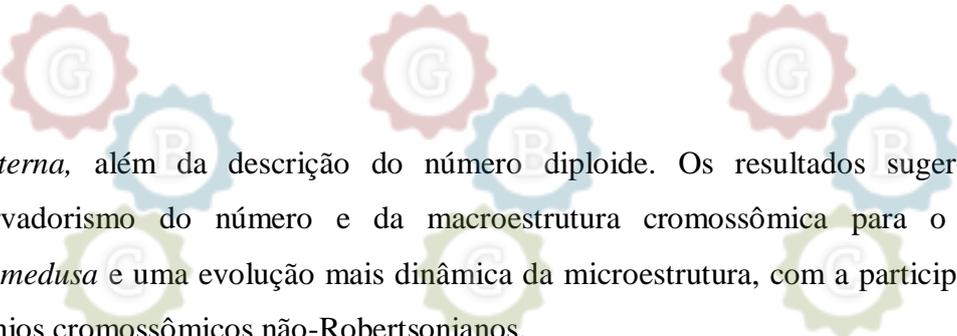
*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Tereza de Calcutá)

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## RESUMO

A família Hylidae destaca-se por deter a maior diversidade de anfíbios do mundo. Após ter sido alvo de constantes revisões taxonômicas, a família passou a compreender três subfamílias: Hylinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae. Dentro desta última tem-se destaque para *Phyllomedusa*, um gênero que atualmente compreende quatro grupos de espécies: *P. burmeisteri*, *P. perineros*, *P. tarsi* e *P. hypochondrialis*. Contudo, a taxonomia e as relações filogenéticas desse gênero não são muito bem estabelecidas. A maioria das espécies apresenta  $2n=26$  cromossomos, sendo uma característica marcante do grupo. No presente trabalho foram analisadas citogeneticamente quatro populações pertencentes a três espécies de *Phyllomedusa* (*P. burmeisteri*, *P. nordestina* e *P. tomopterna*) coletadas em áreas de Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica. Todas as populações analisadas apresentaram  $2n=26$  cromossomos com  $NF=52$ . Os pares cromossômicos 2, 7, 9 e 10 apresentaram morfologia variável enquanto o restante do complemento cariotípico mostrou macroestrutura conservada. Foram observadas constrições secundárias para ambas as populações de *P. nordestina* situadas nos cromossomos do par 8 e em um dos homólogos do par 13 (Contendas do Sincorá) e em um dos homólogos dos pares 1 e 8 (Jequié). Também observou-se um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos do par 8 na população de *P. nordestina* de Contendas do Sincorá, o qual não esteve relacionado ao sexo dos animais. O bandamento C revelou blocos heterocromáticos nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos das populações de *P. nordestina* (grande quantidade) e *P. tomopterna*, e na maioria dos cromossomos de *P. burmeisteri*. Blocos  $BC^+$  também foram observados na porção terminal de alguns cromossomos da *P. tomopterna*. RONS múltiplas puderam ser observadas nos cariótipos de três populações: *P. burmeisteri* (região pericentromérica do braço longo de um dos homólogos do par 7 e em um dos homólogos do par 9); *P. nordestina* de Contendas do Sincorá (regiões intersticiais dos braços curtos do par 8 e na porção terminal do braço longo do par 13) e *P. nordestina* de Jequié (região intersticial do braço curto de um dos homólogos do par 1 e na região intersticial do braço longo de um dos homólogos do par 8). RONS simples foram reveladas na população de *P. tomopterna* no par 7, no entanto, variaram na localização (região intersticial do braço curto do primeiro homólogo, e porção terminal do braço curto do segundo homólogo). Foi observado um heteromorfismo de tamanho das RONS na população de *P. nordestina* de Contendas do Sincorá. São apresentadas as primeiras informações citogenéticas de *P.*



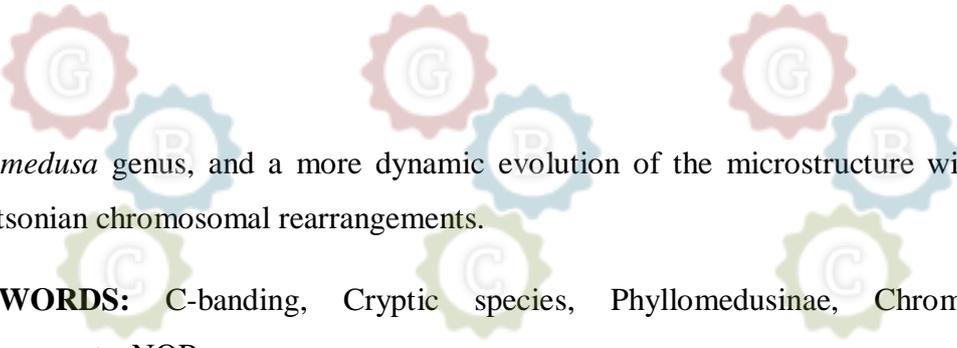
*tomopterna*, além da descrição do número diploide. Os resultados sugerem um conservadorismo do número e da macroestrutura cromossômica para o gênero *Phyllomedusa* e uma evolução mais dinâmica da microestrutura, com a participação de rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bandamento-C, Espécies crípticas, Phyllomedusinae, Rearranjos cromossômicos, RONS.



## ABSTRACT

The Hylidae family highlights as the most diverse group of amphibians. Extensive taxonomic revisions reorganized the family that now comprises three subfamilies: Hylinae, Pelodyadinae and Phyllomedusinae. Within the later is *Phyllomedusa*, an outstanding genus that currently comprises four species: *P. burmeisteri*, *P. perineros*, *P. and P. tarsi* *hypochondrialis*. However, the taxonomy and phylogenetic relationships of this genus are not very well established. Most of species has  $2n = 26$  chromosomes, which is a hallmark of the group. Herein this study, four populations of *P. burmeisteri*, *P. nordestina* and *P. tomopterna* collected in areas of Caatinga, Atlantic Forest and Amazon Rainforest were cytogenetically analyzed. All samples showed  $2n = 26$  chromosomes with  $NF = 52$ . The chromosome pairs 2, 7, 9 and 10 showed varying morphology of the karyotype while all other pairs showed conserved macrostructure. Secondary constrictions for both populations of *P. nordestina* were observed and located in the homologues 8 and in one of the homologues 13 (Contendas do Sincorá), as well as in one of the homologues 1 and 8 (Jequié). Futhermore, there was a size heteromorphism between the couterparts of pair 8 of the population of *P. nordestina* of Contendas do Sincorá, which was not related to the animal sex. The C-banding stain revealed heterochromatic blocks in pericentromeric regions of all chromosomes of the populations of *P. nordestina* (big loads) and *P. tomopterna*, and in most *P. burmeisteri* of chromosomes. Blocks  $BC^+$  were observed in the terminal region of some chromosomes from *P. tomopterna*. Multiple NORs could be observed in karyotypes from three populations: *P. burmeisteri* (pericentromeric region of the long arm of one of the homologues 7 and in homologues 9); *P. nordestina* from Contendas do Sincorá (interstitial regions in the short arms of pair 8 and the terminal portion of the long arm of pair 13); and *P. nordestina* from Jequié (interstitial region of the short arm of one of the homologues 1 and interstitial region of the long arm of one of the homologues 8). Single NORs were detected in the pair 7 from *P. tomopterna*, however, the location varied between the chromosomes (interstitial region in the short arm of one, and in the short end portion of the other homologue). One of the NORs size heteromorphism was observed in the population of *P. nordestina* of Contendas do Sincorá. They are presented the first cytogenetic information *P. tomopterna*, beyond the description of the diploid number. These results suggest conservation of the chromosome number and macrostructure for



*Phyllomedusa* genus, and a more dynamic evolution of the microstructure with non-Robertsonian chromosomal rearrangements.

**KEY-WORDS:** C-banding, Cryptic species, Phyllomedusinae, Chromosomal rearrangements, NORs.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## LISTAS DE FIGURAS

1. Árvore filogenética da ordem Anura. Em destaque, ramos identificando a estruturação da família Hylidae. Fonte: Frost *et al.* (2006) em <http://amphibiaweb.org>.
2. Mapa do Brasil identificando os pontos de coleta das amostras de *Phyllomedusa* analisadas no presente estudo, com suas respectivas coordenadas geográficas.
3. Exemplares de espécies do gênero *Phyllomedusa* analisadas no presente estudo: A) *Phyllomedusa nordestina*; B) *Phyllomedusa burmeisteri*; C) *Phyllomedusa tomopterna* (©2005 Jasper van Dalen).
4. Cariótipos de *Phyllomedusa* submetidos à coloração convencional com Giemsa. A) *P. burmeisteri*; B) *P. nordestina* (Contendas do Sincorá); C) *P. nordestina* (Jequié); D) *P. tomopterna*. Em destaque: cromossomos evidenciando as constrições secundárias (caixa) e par heteromórfico (sublinhado).
5. Metáfases somáticas de *Phyllomedusa*, após bandamento C: A) *P. burmeisteri*; B) *P. nordestina* (Contendas do Sincorá); C) *P. nordestina* (Jequié) e D) *P. tomopterna*. Em destaque, setas identificando as regiões de heterocromatina nas regiões terminais de alguns cromossomos em *P. tomopterna*.
6. Regiões organizadoras de nucléolo reveladas nos cromossomos das diferentes populações de *Phyllomedusa*, analisadas no presente estudo, após impregnação por nitrato de prata: A) *P. burmeisteri*; B) *P. nordestina* (Contendas do Sincorá); C) *P. nordestina* (Jequié) e D) *P. tomopterna*.



## LISTA DE TABELAS

1. Distribuição das espécies nos diferentes grupos taxonômicos e espécies não alocadas a nenhum dos grupos do gênero *Phyllomedusa* baseada no estudo de Faivovich *et al.* (2010).
2. Resumo dos dados citogenéticos, dos últimos estudos, realizados com espécies do gênero *Phyllomedusa*.
3. Número de indivíduos e sexo, por espécie do gênero *Phyllomedusa*, analisados citogeneticamente, no presente estudo.
4. Padrão de morfologia cromossômica observado nas diferentes populações de *Phyllomedusa* analisadas no presente estudo, baseado nas medições propostas por Green e Session (1991). Em vermelho, variações interespecíficas. Em azul: variação intraespecífica.

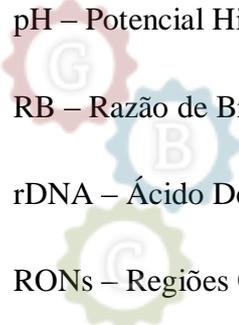
## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- $2n$  = Número Diploide
- $2x$  (SSC) – Solução Salina Citratada
- Ag-RONs – Impregnação de prata em Regiões Organizadoras de Nucléolo
- AT – Adenina-Timina
- BA – Bahia
- $Ba(OH)_2$  – Dióxido de Bário
- Banda-C – Banda Constitutiva
- $BC^+$  - Bloco Constitutivo Positivo
- CA – Caatinga
- CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
- $CMA^{+3}$  – Cromomicina A3
- CS – Contendas do Sincorá
- DAPI – 4'-6-diamidino-2-fenilindol
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EGB – Estação Gregório Bondar
- FA – Floresta Amazônica
- FISH – Hibridação *in situ* por Fluorescência
- GC – Guanina-Citosina
- HCL – Ácido Clorídrico
- JQ – Jequié

- 
- M – Metacêntrico
  - MA – Mata Atlântica
  - ML – mililitro

- Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
- MMA – Ministério do Meio Ambiente

- MP – Megapixels
- MUZUSP – Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo
- NF – Número Fundamental
- PA – Pará

- 
- pH – Potencial Hidrogeniônico
  - RB – Razão de Braço
  - rDNA – Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
  - RONS – Regiões Organizadoras de Nucléolo
  - RPM – Rotação Por Minuto;

- Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
- SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia

- SM – Submetacêntrico
- SPP – Espécies
- ST – Subtelocêntrico
- UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	22
2.1. Classe Amphibia e Ordem Anura: Características Gerais .....	22
2.2. Domínios Morfoclimáticos e Anurofauna Associada .....	23
2.2.1. Caatinga .....	23
2.2.2. Mata Atlântica .....	24
2.2.3. Floresta Amazônica .....	25
2.3. A Família Hylidae e o Gênero <i>Phyllomedusa</i> .....	26
2.4. Citogenética de Anura com Enfoque no Gênero <i>Phyllomedusa</i> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
3.1. Geral .....	32
3.2. Específicos .....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1. Área de Estudo e Coleta de Material Biológico.....	33
4.2. Análise Citogenética.....	35
4.2.1. Preparação Cromossômica e Suspensão Celular.....	35
4.2.2. Detecção da Distribuição da Heterocromatina Constitutiva (Sumner, 1972) .....	36
4.2.3. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-RONs) (Howell e Black, 1980) .....	36
4.3. Captura das Imagens .....	37
4.4. Montagem dos Cariótipos.....	37
<b>5. RESULTADOS</b> .....	38
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49
<b>9. ANEXOS</b> .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se por ser detentor de uma das maiores biodiversidade do planeta, e esse feito é em grande parte devido à sua anfíbiofauna, considerada a mais diversa do mundo.

Dentre os anfíbios existentes, a ordem Anura sobressai-se das demais por representar a maior diversidade de espécies. No Brasil, a Mata Atlântica é o domínio que abriga a maior parte dessa diversidade, sendo destacada também pelo seu elevado nível de endemismo em função das características únicas dos seus variados habitats. Assim como a Mata, o domínio da Caatinga e da Floresta Amazônica também são marcados pela alta diversidade de anfíbios anuros e pelo seu elevado grau de espécies endêmicas.

Não obstante, os biomas em questão, vêm sofrendo constantes pressões antrópicas, que colocam em risco a sobrevivência de muitas espécies de anuros. Estes, que atualmente tem sido alvo de muitos declínios populacionais, resultantes principalmente da destruição, degradação e fragmentação desses habitats.

Uma das famílias mais bem representadas desses biomas é Hylidae, um táxon que atualmente subdivide-se em três subfamílias: Hylinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae. Esta última, caracterizada pela presença de organismos com pupila em fenda vertical, dorso verde com padrões contrastantes de vermelho, azul e amarelo nos flancos, oviposição fora do ambiente aquático, larvas com diversos caracteres exclusivos, além de 95 transformações em proteínas nucleares e mitocondriais e em genes ribossômicos, comporta, hoje, seis gêneros: *Agalychnis*; *Cruziohyla*; *Pachymedusa*, *Phasmahyla*, *Phrynomedusa* e *Phyllomedusa*, sendo que este último destaca-se por ser o mais representativo com 31 espécies descritas, até o momento. Sabe-se hoje que o gênero encontra-se dividido em quatro grupos: *Phyllomedusa burmeisteri*, *Phyllomedusa perinesos*, *Phyllomedusa tarsi* e *Phyllomedusa hypochondrialis* (Caramaschi, 2006; Frost, 2016).

Entretanto, *Phyllomedusa*, constitui um grupo taxonomicamente complexo e apresenta uma filogenia mal resolvida, principalmente devido à presença de espécies crípticas e complexos de espécies. Em vista disso, o gênero em questão vem sendo alvo de constantes revisões. Assim, estudos de várias naturezas têm sido utilizados, e a citogenética tem se mostrado como uma das principais ferramentas na resolução desses problemas.

Diante desse panorama, o estudo objetivou-se em fazer uma caracterização citotaxonômica comparativa de espécies do gênero *Phyllomedusa* em áreas de Caatinga Mata Atlântica e Floresta Amazônica, a partir de uma análise de citogenética clássica.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. A Classe Amphibia e a Ordem Anura: Características Gerais

Os anfíbios foram os primeiros animais entre os vertebrados a migrarem do meio aquático e colonizarem o ambiente terrestre e a denominação do grupo está atrelada ao fato de apresentarem organismos que vivem parte de sua vida no meio aquático, sob a forma de larva, e parte como indivíduos adultos no meio terrestre (Romer & Parsons, 1985; Pough, *et al.*, 2008).

A linhagem atual desses animais (Lissamphibia) constitui um grupo monofilético de organismos tetrápodes, caracterizados principalmente pela presença de um tegumento úmido e permeável à troca de gases respiratórios, além de sua dependência de água como fonte necessária à sua reprodução e parte do seu desenvolvimento (Hickman, *et al.*, 2004; Pough, *et al.*, 2008).

Com exceção das regiões polares e algumas ilhas oceânicas, os anfíbios encontram-se representados por todo o globo terrestre (Rossa-Feres, *et al.*, 2008). Considerado um grupo megadiverso, compreende atualmente 7.511 espécies, as quais estão alocadas em 546 gêneros e 75 famílias (Frost, 2016). De acordo com a revisão mais recente publicada pela Sociedade Brasileira de Herpetologia, o Brasil é o país detentor da maior diversidade de anfíbios do mundo, sendo descritas até o momento 1026 espécies, distribuídas em 100 gêneros e 24 famílias (Segalla *et al.*, 2014).

Esses animais caracterizam-se por apresentarem formas corporais bastante diversificadas e necessitarem de uma fonte externa de calor para o regulamento da temperatura corporal. Atualmente, encontram-se divididos em três ordens: Anura, Urodela e Gymnophiona (Hickman, *et al.*, 2004; Pough, *et al.*, 2008).

A ordem Anura é caracterizada pela presença dos anfíbios sem cauda, compreendendo os popularmente conhecidos como sapos, rãs e pererecas. Trata-se de um grupo de ampla distribuição geográfica, não ocorrendo apenas na Antártida e em algumas ilhas oceânicas (Pough, *et al.*, 2008). Dentro da classe Amphibia, é a ordem mais bem representada mundialmente, com 6.623 espécies distribuídas em 445 gêneros e 53 famílias (Frost, 2016). No Brasil, Anura também é o grupo mais ocorrente, com 913 espécies, alocadas em 87 gêneros e 19 famílias (Segalla *et al.*, 2014).

Uma das principais características que define os anuros é a sua especialização corporal adaptada para o salto, o que permite a fuga rápida desses animais frente à predação (Pough, *et al.*, 2008). Além disso, esses organismos apresentam respiração

pulmonar e cutânea nos indivíduos adultos, e branquial nos girinos; podem ser ovíparos, vivíparos ou ovivíparos e geralmente detém cuidado parental para com seus ovos e filhotes; (Hickman, *et al.*, 2004; Pough, *et al.*, 2008).

Na maioria dos casos, apenas os machos desse grupo apresentam a capacidade de vocalizar como estratégia indicativa de defesa territorial e atratividade de fêmeas para a reprodução, e tal característica mostra-se como uma importante ferramenta taxonômica, uma vez que os cantos emitidos são espécie-específicos. (Pough, *et al.*, 2008). No entanto, casos raros, como observado no estudos de Emerson & Boyd (1999), existe um desempenho de vocalização da fêmea atuando no processo de reprodução.

## **2.2. Domínios Morfoclimáticos e Anurofauna Associada**

### **2.2.1 Caatinga**

A Caatinga consiste em um domínio morfoclimático genuinamente brasileiro que perfaz oito estados do Nordeste e a porção norte de Minas Gerais, ocupando 11% de todo o território do país (MMA, 2016). A denominação do termo vem do Tupi, e significa “mata branca”, uma alusão feita à vegetação no período de seca, onde a maioria das plantas perde as suas folhas (Freitas & Silva, 2007).

O domínio da Caatinga é caracterizado pela presença de várias fisionomias distintas, incluindo os brejos de altitude e as dunas do Rio São Francisco. Porém, é comumente marcado pela presença de uma vegetação típica, com predominância de cactáceas, bem como um sistema de chuvas irregulares e solos rasos e litólicos com afloramentos rochosos (Rodrigues, 2003; Leal *et al.*, 2005; Freitas & Silva, 2007).

Além de possuir uma grande biodiversidade, mesmo que ainda subestimada, a Caatinga destaca-se pela detenção de um elevado grau de endemismo de representantes tanto da fauna como da flora (Leal *et al.*, 2005). Essa característica é resultante das exclusivas interações ecológico-evolutivas desses organismos nesses ambientes, associada aos eventos de isolamento genético por processos geográficos (Rodrigues, 2003). Mediante a esse alto nível de endemismo, o domínio em questão, desponta-se como um importante foco a ser preservado (Freitas & Silva, 2007).

Comparada aos demais domínios morfoclimáticos do Brasil, a diversidade de anfíbios da Caatinga é a menor, uma vez que os índices pluviométricos são muito baixos e os períodos chuvosos são irregulares (Freitas & Silva, 2007). Em relação à fauna de anuros, até então, já foram reconhecidas para o local um total de 48 espécies que encontram-se distribuídas em seis famílias, sendo elas: Bufonidae, Hylidae,

Leptodactylidae, Microhylidae, Pipidae e Pseudidae. Destas, Leptodactylidae e Hylidae são as mais bem representadas, com 23 e 19 espécies descritas, respectivamente. Esses dados podem ainda ser ampliados caso sejam intensificados os estudos na área (Rodrigues, 2003).

### 2.2.2 Mata Atlântica

Distribuída no Brasil do Piauí ao Rio Grande do Sul, o domínio morfoclimático da Mata Atlântica consiste da associação de vários ecossistemas, os quais incluem: as faixas litorâneas do Atlântico com seus manguezais e restingas, florestas de baixadas e de encosta da Serra do Mar, florestas interioranas, as matas de araucárias e os campos de altitude (Campanili & Prochnow, 2006).

Atualmente, esse domínio encontra-se reduzido a fragmentos que não ultrapassam 9% de sua extensão original (Fundação SOS Mata Atlântica, 2016), sendo considerado o segundo mais ameaçado do mundo. Ainda assim, detém uma das maiores biodiversidades do planeta, abrigando uma gama de representantes tanto da fauna quanto da flora, muito dos quais, endêmicos (Campanili & Prochnow, 2006).

Em vista desse alto grau de ameaça à biodiversidade associado ao seu elevado nível de endemismo, a Mata Atlântica desponta-se como uma das 34 áreas mundiais prioritárias à conservação, ditas, *hotspots* (Costa & Guerra, 2012).

Com relação à fauna de anfíbios, a Mata Atlântica mostra-se bastante abundante e megadiversa, isso porque, detém uma grande variedade de habitats e microhabitats com características muito peculiares. Tais características, muita das vezes, resultam na restrição de algumas espécies ou grupos a esses locais, sendo responsáveis pelo elevado número de endemismo do bioma, estimado em 85% (Haddad, 1998; Rossa-Feres *et al.*, 2008).

Segundo Haddad *et al.* (2013), até o momento, o domínio de Mata conta com a presença de 543 espécies de anfíbios descritas, sendo, Anura, a ordem que mais contribui para essa diversidade, com 529 espécies. Apesar dessa alta diversidade, alguns fatores, como: destruição, degradação e fragmentação de habitats têm se tornado os principais responsáveis pelo crescente número de declínios populacionais e extinções de muitas espécies de anfíbios no mundo (Rossa-Feres, *et al.*, 2008). E pelo fato da Floresta Atlântica, em sua grande parte, se encontrar atualmente limitada a pequenos fragmentos, o risco de extinção à esses animais torna-se ainda maior.

De acordo com Campanili & Prochnow (2006), das espécies descritas como ameaçadas de extinção para o domínio em questão, 16 são anfíbios e exclusivos da Mata. A nível nacional, Silvano & Segalla (2005) e Tabarelli *et al.* (2005) apontam a Mata Atlântica como o bioma que abriga o maior número de espécies de anfíbios ameaçadas de extinção, tornando-se necessário medidas urgentes que busquem a conservação imediata dessa fauna tão importante para a biodiversidade.

### 2.2.3 Floresta Amazônica

Dentre as florestas tropicais existentes no planeta, a Floresta Amazônica destaca-se por ser a maior delas, abrangendo uma faixa de 6,9 milhões de km<sup>2</sup> que perpassam nove países sul-americanos. Dentre estes, destaca-se o Brasil, que detém a maior parte desse domínio numa extensão de 4,2 milhões de km<sup>2</sup>, abrangendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do Maranhão (Greenpeace, 2016; MMA, 2016).

Ao longo de toda a sua distribuição, o domínio morfoclimático da Floresta Amazônica compreende um mosaico de ecossistemas formado por florestas de terra-firme, floresta de igapó, caatingas do Rio Negro e campos rupestres. Essa alta variedade de habitats associadas à condições abióticas específicas torna o domínio abrigo de uma grande diversidade de espécies (Coutinho, 2006).

No entanto, essa diversidade tem sido posta em risco devido as alterações causadas nos habitats naturais das espécies, que são produtos das constantes pressões antrópicas, causadas principalmente pelo desmatamento desenfreado. Este, que por sua vez, é causa da exploração predatória e ilegal da madeira, expansão agropecuária e extração exacerbada de minério, avanço da rede de estradas e crescimento das cidades. (Ferreira, *et al.*, 2005, Bernarde, 2007; Greenpeace, 2016). Além disso, poucos são os grupos que apresentam dados consistentes sobre diversidade, endemismo, dinâmica populacional e distribuição de espécies (Ramos & Galatti, 2002; Fearnside, 2006), tornando o conhecimento ínfimo perto da real biodiversidade existente.

Para os anfíbios, isso não é diferente. Segundo, Haddad & Prado (2005), em função das ações supracitadas, muitas das espécies de anfíbios anuros podem estar sendo extintas antes mesmo de terem sido catalogadas. Mas até então, tem-se conhecimento para a Floresta Amazônica brasileira, um total de 232 espécies de anfíbios descritas. Sendo a ordem Anura a mais representativa com 221 espécies, seguida de Gymnophiona (9) e Urodela (2) (Ávila-Pires *et al.*, 2007).

Esses números são ainda incipientes diante da real diversidade do domínio, e certamente aumentará caso seja intensificados os estudos em outras áreas e novas ferramentas na caracterização das espécies.

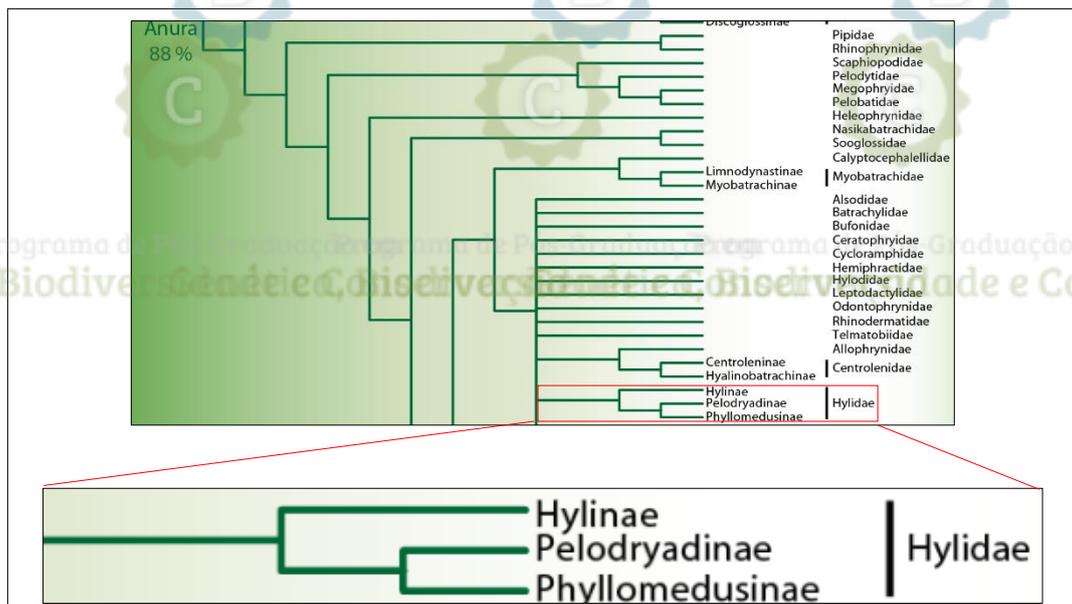
### 2.3. A Família Hylidae e o Gênero *Phyllomedusa*

Constituída atualmente por 953 espécies válidas, com ampla distribuição pelas Américas, Austrália/Papua-Nova Guiné, regiões temperadas da Eurásia e extremo norte da África, a família Hylidae destaca-se por deter a maior diversidade de anfíbios anuros do mundo (Faivovich, *et al.*, 2005; Catroli & Kasahara, 2009; Frost, 2016). Esta família é composta por animais que variam de pequeno à grande porte, compreendendo organismos que geralmente apresentam discos adesivos na ponta dos dedos (auxílio para escaladas) e uma grande variedade de modos reprodutivos (Faivovich, *et al.*, 2005).

Após o estudo realizado por Faivovich *et al.* (2005), baseado em uma análise robusta de sequências de DNA de genes mitocondriais e nucleares, foi possível traçar uma filogenia para a família Hylidae, que passou a compreender três subfamílias: Hylinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae. A conclusão dessa análise uniu Pelodyadinae e Phyllomedusinae como grupo-irmãos, que em conjunto, forma o táxon irmão de Hylinae (Figura 1). Esse estudo possibilitou uma ampla reorganização filogenética da família e foi respaldado por Frost *et al.* (2006) ao fazer uma revisão sistemática de toda a classe Amphibia, também baseada em dados moleculares e que representa a proposta aceita atualmente.

Phyllomedusinae, após ter sido alvo de constantes revisões taxonômicas, passou a compreender atualmente seis gêneros: *Agalychnis*, *Cruziohyla*, *Pachymedusa*, *Phasmahyla*, *Phrynomedusa* e *Phyllomedusa*. Em conjunto, esses gêneros somam 54 espécies que encontram-se amplamente distribuídas pela América Central e a leste dos Andes na América do Sul (Caramaschi, 2006; Frost, 2016).

A presença de caracteres como: pupila em fenda vertical, dorso verde com padrões contrastantes de vermelho, azul e amarelo nos flancos, oviposição fora do ambiente aquático, larvas com diversos caracteres exclusivos, além de 95 transformações em proteínas nucleares e mitocondriais e em genes ribossômicos, confere aos representantes de Phyllomedusinae uma exclusividade dentre os demais hílideos neotropicais (Caramaschi, 2006).



**Figura 1:** Árvore filogenética da ordem Anura. Em destaque, ramos identificando a estruturação da família Hylidae. Fonte: Frost *et al.* (2006) em <http://amphibiaweb.org>.

Dos gêneros supracitados, *Phyllomedusa* é o mais bem representado da subfamília, com 31 espécies descritas mundialmente e com distribuição por toda a América Central e na América do Sul a leste dos Andes, até o sul da Argentina (Bruschi *et al.*, 2013; Frost, 2016). No Brasil, até o presente momento, 22 espécies do gênero já foram reconhecidas (Segalla, *et al.*, 2014).

Segundo Faivovich *et al.* (2005), não se tem conhecimento de sinapormorfias que possam sustentar a monofolia do grupo. Eles apontam que as espécies que não pertenciam a nenhum dos gêneros de Phyllomedusinae foram realocadas dentro *Phyllomedusa*. O gênero em questão apresenta uma taxonomia e a definição das relações filogenéticas bastante conflituosas, principalmente devido à presença de espécies que são morfologicamente muito semelhantes, podendo resultar em imprecisões e/ou alterações na taxonomia do grupo (Faivovich *et al.*, 2005; Bruschi *et al.*, 2013).

Antigamente, o gênero *Phyllomedusa* era composto por seis grupos: *Phyllomedusa buckleyi*, *Phyllomedusa burmeisteri*, *Phyllomedusa guttata*, *Phyllomedusa hypochondrialis*, *Phyllomedusa perinesos* e *Phyllomedusa tarsius*. Duellman *et al.*, (1968b) fazendo uma análise de alguns caracteres morfológicos, propôs a existência de um novo clado para o gênero, onde os grupos *P. buckleyi* e *P. guttata* já não se enquadravam mais.

Em 1980, Cannatella *et al.* ao fazerem uma revisão do grupo *P. buckleyi*, propôs que o grupo merecia ser elevado a um status diferente dos outros grupos devido a características exclusivas, como: mãos e pés não-especializados, presença de glândula paratoide, membranas palpebrais não marcadas, grandes cabeças planas e correias rudimentares. No entanto, os autores continuaram a reconhecer as espécies do grupo dentro de *Phyllomedusa* até que sua monofilia fosse comprovada.

Posteriormente, análises moleculares do grupo, permitiu que Faivovich *et al.* (2005), realocassem o grupo *P. buckleyi* no gênero *Hylomantis*, este que atualmente se encontra dentro da subfamília Hyliinae (Frost, 2016). E as espécies do grupo *P. guttata* também foram inclusas no novo gênero *Phasmahyla*, mas permaneceram dentro da subfamília Phyllomedusinae (Frost, 2016).

Baseado em dados morfológicos, moleculares e acústicos, o gênero *Phyllomedusa* encontra-se dividido em quatro grupos distintos, os quais alocam 24 das 31 espécies válidas atualmente: *Phyllomedusa burmeisteri* (5 spp.), *Phyllomedusa hypochondrialis* (9 spp.), *Phyllomedusa perinesos* (4 spp.) e *Phyllomedusa tarsius* (6 spp.). Sete espécies até o momento não foram alocadas em nenhum desses grupos (Tabela 1) (Faivovich *et al.*, 2010; Frost, 2016; Bruschi *et al.*, 2013; Barth *et al.*, 2013).

#### 2.4. Citogenética de Anura com Enfoque no Gênero *Phyllomedusa*

Embora considerado um grupo megadiverso dentre os vertebrados, os anfíbios apresentam uma escassez de dados com relação a estudos citogenéticos, (Nunes & Fagundes, 2008).

Geralmente, grupos que são altamente diversos e amplamente distribuídos tendem a apresentar uma taxonomia bastante conflituosa, bem como uma filogenia não muito estabelecida. E no grupo dos anuros, isso não é diferente. Em função disso, estudos de várias naturezas têm sido utilizados na resolução desses problemas e a citogenética tem se mostrado como uma das principais ferramentas de grande eficácia (Hillis & Dixon, 1991, Lourenço, 1996).

Os primeiros estudos citogenéticos em Anura datam de 1930, onde foram analisados cromossomos em meiose. Somente a partir de 1959, após a utilização do reagente colchicina associado ao tratamento hipotônico das células é que foi possível estudar os cromossomos metafásicos mitóticos (Catroli e Kasahara, 2009).

**Tabela 1:** Distribuição das espécies nos diferentes grupos taxonômicos e espécies não alocadas a nenhum dos grupos do gênero *Phyllomedusa* baseada no estudo de Faivovich *et al.* (2010).

Grupos taxonômicos	Espécies alocadas nos diferentes grupos	Espécies não alocadas nos diferentes grupos
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	<i>P. bahiana</i>	
	<i>P. burmeisteri</i>	
	<i>P. distincta</i>	
	<i>P. iheringii</i>	
	<i>P. tetraploidea</i>	
<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	<i>P. ayeaye</i>	
	<i>P. azurea</i>	
	<i>P. centralis</i>	
	<i>P. hypochondrialis</i>	<i>P. atelopoides</i>
	<i>P. megacephala</i>	<i>P. bicolor</i>
	<i>P. nordestina</i>	<i>P. boliviana</i>
	<i>P. oreades</i>	<i>P. sauvagii</i>
	<i>P. palliata</i>	<i>P. tomopterna</i>
	<i>P. rohdei</i>	<i>P. vaillanti</i>
	<i>P. baltea</i>	
<i>Phyllomedusa perinesos</i>	<i>P. duellmani</i>	
	<i>P. ecuatoriana</i>	
	<i>P. perinesos</i>	
	<i>P. camba</i>	
	<i>P. coelestis</i>	
<i>Phyllomedusa tarsi</i>	<i>P. neildi</i>	
	<i>P. tarsi</i>	
	<i>P. trinitatis</i>	
	<i>P. venusta</i>	

Do ponto de vista cromossômico, a ordem em questão é a mais bem estudada. Ainda assim, apresenta dados para somente 17% de seus componentes. Tais dados, em sua maioria, estão limitados apenas à descrição do número e morfologia dos cromossomos baseados em coloração convencional (King, 1990). Embora necessário, esse tipo de informação não é suficiente para um maior conhecimento do grupo, uma vez que muitos táxons compartilham de cariótipos indistinguíveis com base nesse tipo de coloração. Técnicas mais refinadas como bandamento C, coloração por nitrato de prata (Ag-RONs), uso de fluorocromos base-específicos e hibridação *in situ* têm sido fundamentais numa melhor caracterização desses cariótipos, permitindo a diferenciação

de espécies e o estabelecimento das relações cariotípicas entre elas (Kasahara *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2004; Catroli e Kasahara, 2009).

Os primeiros trabalhos envolvendo citogenética de anuros mostraram que existe uma correlação positiva entre a morfologia dos indivíduos e o número cromossômico do grupo, onde, organismos morfologicamente mais ancestrais apresentam cariótipos com um maior número de cromossomos, e os de morfologia mais derivada um cariótipo com o número menor de cromossomos (Bogart, 1973). Baseado nessas análises, Bogart (1973) sugeriu que espécies de famílias mais derivadas (Dendrobatidae, Hylidae, Leptodactylidae e Ranidae) que apresentam cariótipos com 22 e 24 cromossomos, em sua maioria, tenham surgido de um cariótipo ancestral com 26 cromossomos. E que essa redução do número cromossômico parece estar associada aos eventos de fusões cêntricas ou de fusão *in tandem* ao longo da evolução.

Dentro de Anura, são ainda observados casos de alterações estruturais, embora estas não estejam relacionadas com a variação cariotípica numérica ocorrida ao longo do processo evolutivo do grupo (Bogart, 1973).

Assim como a ordem, a família Hylidae também é a mais estudada citogeneticamente, apresentando dados para 35% dos seus representantes. A maioria desses dados ainda limita-se a definição do número e morfologia cromossômica por coloração convencional, embora outros estudos já tenham utilizados coloração diferencial, principalmente, em relação ao bandamento C e detecções de RONS. Casos de citogenética molecular como emprego fluorocromos base-específicos (AT e GC) (Bruschi *et al.*, 2013) e técnica de FISH (Gruber, *et al.*, 2013) também já foram aplicados.

Dentro da família, o número cromossômico mostra-se bastante variável, indo de  $2n=18$  em *Hyla albosignata* e *Hyla leucopygia* (Bogart, 1973), hoje, *Aplastodiscus leucopygius* (Carvalho *et al.*, 2009; Frost, 2016) à  $2n = 4x = 52$  em *Phyllomedusa tetraploidea* (Haddad *et al.*, 1994). No entanto,  $2n=24$  cromossomos é tido como uma característica marcante para Hylidae, uma vez que a maioria das espécies, que estão inclusas dentro da subfamília Hyliinae, apresenta esse número diploide (Catroli e Kasahara, 2009). Casos de cromossomos supranumerários, como por exemplo, 24, 24+1B em *Hyla luctuosa* (Baldissera Jr. *et al.*, 1993), hoje, *Bokermannohyla luctuosa*; e organismos poliploides, como em *Phyllomedusa tetraploidea* (Haddad *et al.*, 1994), também já foram descritos para a família.

Além disso, há relatos para a ocorrência de sistemas de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ:ZW em *Hyla squirella* e *Pseudis tocantins*, e do tipo XX:XY

em *Hyla femoralis*, *Hyla japonica* e *Hyla savignyi* (Yosida, 1957; Anderson, 1991; Schmid e Steinlein, 2003; Wiley, 2003; Al-Sheri e Al-Salech, 2005; Busin *et al.*, 2008).

Não obstante, o gênero *Phyllomedusa* também apresenta uma escassez de dados citogenéticos, muitos dos quais, limitados somente à descrição do número e morfologia dos cromossomos (Bruschi *et al.*, 2012). A maioria das espécies do gênero apresenta  $2n=26$  cromossomos (Beçak *et al.*, 1970; Batistic *et al.*, 1975; Batistic, 1989; Kuramoto 1990), embora já tenha sido documentados casos de indivíduos tetraploides ( $2n = 4x = 52$ ) em *Phyllomedusa tetraploidea* (Haddad *et al.*, 1994) e com  $2n=40$  em *Phyllomedusa rohdei* (Nunes & Fagundes, 2008).

As regiões organizadoras de nucléolo constituem um dos marcadores cromossômicos mais estudados. No gênero *Phyllomedusa*, essas regiões mostram-se bastante variáveis quanto à quantidade e a localização. Os estudos já publicados revelam que a maioria das espécies analisadas apresentam esses sítios em mais de um par cromossômico, sendo considerados múltiplos, porém, também é possível encontrar algumas espécies que apresentam essas regiões em apenas um par de cromossomos. Decorrente dessa grande variação, as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) vêm sendo bastante utilizadas na diferenciação das espécies do grupo (Barth, 2009; Paiva *et al.*, 2010; Barth *et al.*, 2013; Bruschi *et al.*, 2013; Gruber, *et al.*, 2013).

Assim como as RONs, as regiões de heterocromatina constitutiva mostram-se bastante variáveis dentro do gênero, permitindo a identificação e separação de muitas espécies dentro do grupo. Geralmente, os blocos encontram-se bem evidentes e já foram identificados nas diferentes regiões dos cromossomos: pericentromérica e intersticialmente na maioria das espécies já estudadas e terminal, por exemplo, em *P. burmeisteri* (Barth, 2009; Bruschi *et al.*, 2012; Bruschi *et al.*, 2013; Gruber, *et al.*, 2013).

Em relação a citogenética molecular para o gênero em questão, até o momento já foram empregados fluorocromos base-específicos em alguns trabalhos, que revelaram uma similaridade com as regiões de heterocromatina ricas em AT (DAPI) e GC (CMA<sup>+3</sup>) (Bruschi *et al.*, 2013). E a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) foi aplicada por Bruschi *et al.* (2014a) e Gruber, *et al.* (2013), utilizando sondas de DNA telomérico que identificaram polimorfismos nos cariótipos, e Barth *et al.*, (2013) e Gruber, *et al.* (2013), que utilizaram sondas de DNA ribossomal confirmando a presença dos sítios ativos das RONs.

A tabela 2 (em anexo) faz um resumo dos dados citogenéticos das espécies estudadas, nos últimos anos, do gênero *Phyllomedusa*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Caracterizar citogeneticamente as espécies do gênero *Phyllomedusa* provenientes de áreas de Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica do Brasil.

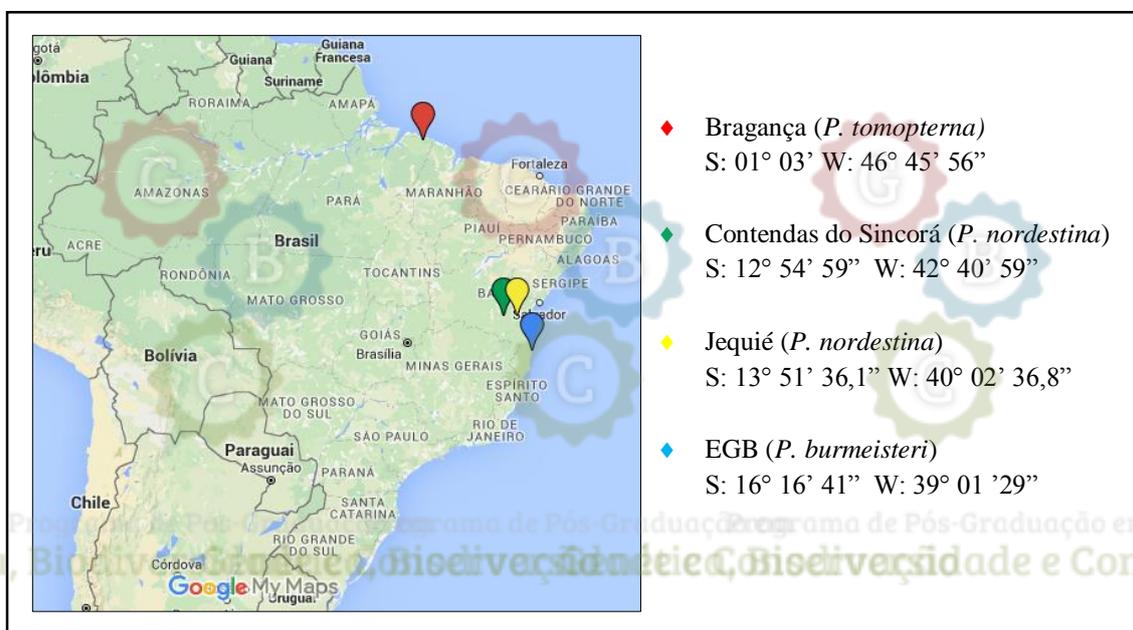
#### 3.2. Específicos

1. Fazer uma caracterização cromossômica comparativa por meio de técnicas de citogenética clássica (coloração convencional, bandamentos C, e detecção de Ag-RONs);
2. Identificar possíveis padrões citogenéticos dentro dos diferentes táxons de *Phyllomedusa*.
3. Fazer a primeira descrição citogenética com coloração diferencial (Bandamento C e detecção de Ag-RONs) na espécie *Phyllomedusa tomopterna*.
4. Reunir informações citogenéticas que possam ser futuramente utilizadas no entendimento das relações evolutivas do gênero *Phyllomedusa*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de Estudo e Coleta de Material Biológico

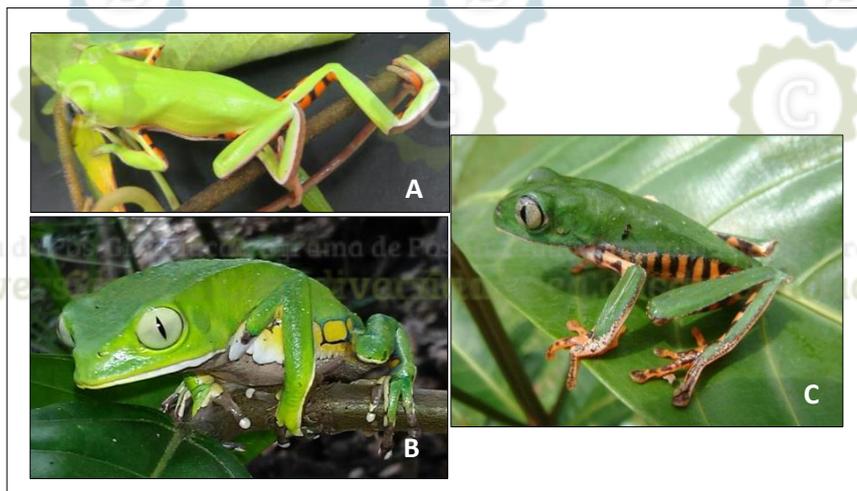
Das coletas realizadas nas áreas de Caatinga, foram obtidas amostras dos municípios de Jequié - BA (JQ) e Contendas do Sincorá - BA (CS). Nas áreas de Mata Atlântica, representantes do gênero foram obtidas na Estação Gregório Bondar (EGB) – Adm. CEPLAC, situada no município de Santa Cruz Cabralia - BA. E nas regiões de Floresta Amazônica, foram coletados indivíduos no município de Bragança-PA (Licenças permanentes para coleta de material biológico - Sisbio/ICMBio N° 30309 e 19754). Os pontos de amostragem dos espécimes com suas respectivas coordenadas geográficas encontram-se disposto no mapa (Figura 2).



**Figura 2:** Mapa do Brasil identificando os pontos de coleta das amostras de *Phyllomedusa* analisadas no presente estudo e suas respectivas coordenadas geográficas. Fonte: <https://maps.google.com.br/>

Do esforço amostral, foram coletados 56 indivíduos, distribuídos em três espécies do gênero *Phyllomedusa*: *Phyllomedusa burmeisteri*, *Phyllomedusa nordestina* e *Phyllomedusa tomopterna* (Figura 3). Os métodos de amostragem consistiram na busca ativa orientada por vocalização e os espécimes coletados foram transportados em sacos ou potes plásticos para o acondicionamento nas dependências do laboratório de Citogenética da UESB, em Jequié, para posterior processamento.

Os dados compilando localidade, sexo e quantidade de indivíduos por espécie encontram-se listados na tabela 3. Foram retiradas pequenas amostras de tecido (fígado e pulmão) para constituir o banco de tecidos. Os tecidos dos exemplares permanecerão



**Figura 3:** Exemplos de espécies do gênero *Phyllomedusa* analisadas no presente estudo: A) *Phyllomedusa nordestina*; B) *Phyllomedusa burmeisteri*; C) *Phyllomedusa tomopterna* (©2005 Jasper van Dalen).

no laboratório de Citogenética da UESB fazendo parte do banco de tecidos da Instituição.

**Tabela 3:** Número de indivíduos e sexo, por espécie do gênero *Phyllomedusa*, analisados citogeneticamente, no presente estudo.

Espécies	Local de Coleta	Nº de indivíduos e Sexo
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	Estação Gregório Bondar (MA)	4♂, 1♀
	Jequié (CA)	25♂, 7♀
<i>Phyllomedusa nordestina</i>	Contendas do Sincorá (CA)	10♂, 1♀
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Bragança (FA)	8♂, 0♀

Legenda: MA = Mata Atlântica; CA = Caatinga; FA = Floresta Amazônica.

Todos os espécimes utilizados foram fixados em formol 10% por três dias e transferidos para álcool etílico 70% para armazenamento. Os indivíduos provenientes das áreas de Caatinga e Mata Atlântica foram identificados pelo grupo do Dr. Miguel T. Rodrigues da Universidade de São Paulo e foram depositados no Museu de Zoologia da

Universidade de São Paulo (MUZUSP). Já os exemplares coletados nas áreas de Floresta Amazônica foram identificados pelo grupo de pesquisa com anfíbios do laboratório de Zoologia da Universidade Federal do Pará *campus* Bragança.

## 4.2. Análise Citogenética

### 4.2.1. Preparação Cromossômica e Suspensão Celular

A preparação cromossômica deu-se a partir da raspagem do epitélio intestinal e a obtenção da suspensão celular seguiu o protocolo descrito por Schmid (1978), com algumas modificações:

1. Foi injetado intraperitonealmente uma solução de colchicina 0,5%, na proporção de 0,02 ml por grama de peso do animal;
2. Após seis horas de exposição ao reagente, o animal foi previamente anestesiado com cloridrato de lidocaína e submetido a eutanásia por diminuição da temperatura corporal, em freezer;
3. Órgãos como o coração, fígado, pulmão e baço foram removidos e acondicionados em álcool 100% para futuras análises moleculares;
4. O intestino foi retirado e deixado imerso em água destilada para hipotonização das células por 20 minutos sendo posteriormente acondicionado em tubos Falcon contendo fixador Carnoy (3:1) por 24 horas em geladeira;
5. Após esse período foi feita uma incisão longitudinal do órgão, de modo que o seu lúmen ficasse exposto para a raspagem das células;
6. O produto da raspagem foi levado a tubos Falcon, homogeneizado com auxílio de pipetas Pasteur e centrifugado durante 10 minutos a 1200 rpm;
7. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionado de 2 a 10 ml de fixador, dependendo do tamanho do animal. O material novamente foi homogeneizado e levado a centrifuga por 10 minutos a 1200rpm;
8. O procedimento 7 foi repetido por mais 2x;
9. Após ser descartado o sobrenadante da última centrifugação, foi adicionado 1,5 ml de fixador. O material foi homogeneizado e transferido para microtubos eppendorfs onde foram armazenados a 20°C;
10. As suspensões obtidas foram pingadas em lâminas previamente lavadas com solução de Sulfocrômica por 20 minutos e em água corrente;

11. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa (5%) diluída em tampão fosfato 0,1M com pH 6,8 por aproximadamente 10 minutos e posteriormente foram lavadas em água corrente e secar ao ar.

#### 4.2.2. Detecção da Distribuição da Heterocromatina Constitutiva (Sumner, 1972)

1. Tratou-se as lâminas previamente preparadas com HCl 0,2N por 13 minutos em temperatura ambiente;
2. Lavou-se as lâminas em água corrente e colocou-as para secar ao ar;
3. Tratou-se as lâminas em solução aquosa de Ba(OH)<sub>2</sub> 5% a 45°C no banho-maria, por um tempo variou de 60 a 90 segundos de acordo ao tempo de envelhecimento das lâminas;
4. Lavou-se rapidamente as lâminas em HCl 0,2N a temperatura ambiente e posteriormente em água corrente;
5. Colocou-se as lâminas em solução salina 2xSSC a 60°C por 30 minutos;
6. Lavou-se as lâminas em água corrente e secar ao ar;
7. Corou-se com Giemsa 10% durante 10 minutos.

#### 4.2.3. Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolo (Ag-RONs) (Howell e Black, 1980)

1. Pingou-se sobre uma lamínula previamente preparada, 2 gotas de solução aquosa de gelatina a 2%, acrescida de ácido fórmico na proporção 1ml/100ml de solução, e 4 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%;
2. Cobriu-se a lamínula com a lâmina previamente preparada, tomando o cuidado para que não formassem bolhas de ar;
3. Incubou-se o conjunto lâmina e lamínula em banho-maria a 60°C até adquirir uma coloração de caramelo a marrom claro;
4. Lavou-se as lâminas em água destilada com auxílio de uma pisseta para a retirada da lamínula;
5. Lavou-se as lâminas em água corrente e colocou-as para secar ao ar;
6. Observou-se as lâminas ao microscópio.

#### 4.2. Captura das imagens

1. As preparações convencionais (Giemsa, banda-C e Ag-RONs) foram analisadas em microscópio óptico ou microscópio de epifluorescência Olympus BX51. Para as contagens cromossômicas e observações mais detalhadas utilizou-se a objetiva de imersão, num aumento de 1000 vezes;
2. As melhores metáfases foram capturadas com 5 Mp de definição utilizando sistema de análise de imagens Cool Snap Pro, com auxílio do programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics).

#### 4.3. Montagem dos Cariótipos

1. O número e a morfologia dos cromossomos foram determinados a partir da coloração convencional por Giemsa;
2. Os cariótipos foram montados utilizando o Adobe Photoshop 7.0.1;
3. A classificação cromossômica seguiu a proposta de Green e Session (1991) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB): RB= 1,00-1,67, metacêntrico (m); RB= 1,68-3,00, submetacêntrico (sm); RB= 3,01-7,00, subtelo-cêntrico (st); RB= maior que 7,00, telocêntrico (a);
4. Para o cálculo do número de braços cromossômicos (NF), admitiram-se os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelo-cêntricos como portadores de dois braços cromossômicos, e os cromossomos telocêntricos como portadores de apenas um braço;
5. As medições cromossômicas foram realizadas com o auxílio do software Paquímetro da Keila e os cromossomos foram dispostos em pranchas, separados de acordo com seu tamanho.



## 5. RESULTADOS

Todas as populações analisadas apresentaram número diploide equivalente a 26 cromossomos ( $2n=26$ ), com número fundamental de 52 ( $NF=52$ ) (Figura 4).

A despeito da morfologia cromossômica, o par 2 de *P. burmeisteri* e os pares 7 e 10 de *P. tomopterna* variaram em relação as espécies analisadas e o par 9 de *P. nordestina* de Jequié, variou dentre as diferentes populações da espécie e entre as demais espécies. Esses cromossomos apresentaram morfologia variada, sendo meta, submeteta e subtlocêntricos. (Figura 4 e Tabela 4). Os demais cromossomos do complemento mostraram macroestrutura conservada, sendo metacêntricos (1, 4, 8, 11, 12 e 13) e submetacêntricos (3, 5, 6) (Figura 4 e Tabela 4). Não foi identificada a presença de cromossomos sexuais diferenciados para nenhuma das populações.

Foram observadas a presença de constrições secundárias no par 8 e em um dos homólogos do par 13, na população de *P. nordestina* de Contendas do Sincorá e em um dos homólogos dos pares 1 e 8, na população de *P. nordestina* de Jequié (Figura 4). Além disso, pode-se ainda verificar um heteromorfismo de tamanho entre os homólogos do par 8 na população de *P. nordestina* proveniente de Contendas do Sincorá, o qual esteve relacionado com a presença da constrição secundária (Figura 4).

A técnica de bandamento C revelou a presença de blocos de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos da população de *P. tomopterna* e nas duas populações de *P. nordestina*. Na população de *P. burmeisteri*, os blocos pericentroméricos foram observados para a maioria dos cromossomos. Também se pôde notar a ocorrência de pequenos blocos  $BC^+$  na região terminal dos braços de alguns cromossomos para a população de *P. tomopterna*. Apesar de compartilharem o padrão de distribuição de heterocromatina pericentromérica, a quantidade dessas regiões diferiu entre as espécies analisadas, de forma que os blocos  $BC^+$  foram maiores em *P. nordestina* em relação a *P. burmeisteri* e *P. tomopterna* (Figura 5).

Nas populações analisadas, RONS múltiplas puderam ser observadas nos cariótipos de: *P. burmeisteri*, (região pericentromérica dos braços longos de um dos homólogos do par 7 e de um dos homólogos do par 9); *P. nordestina* de Contendas do Sincorá, (instersticialmente nos braços curtos do par 8 e na porção terminal dos braços longos do par 13, coincidindo com as regiões de constrição secundária); e *P. nordestina* de Jequié (região intersticial dos braços curtos de um dos homólogos do par 1 e na região intersticial dos braços longos de um dos homólogo do par 8, também coincidindo com as constrições secundárias) (Figuras 6).

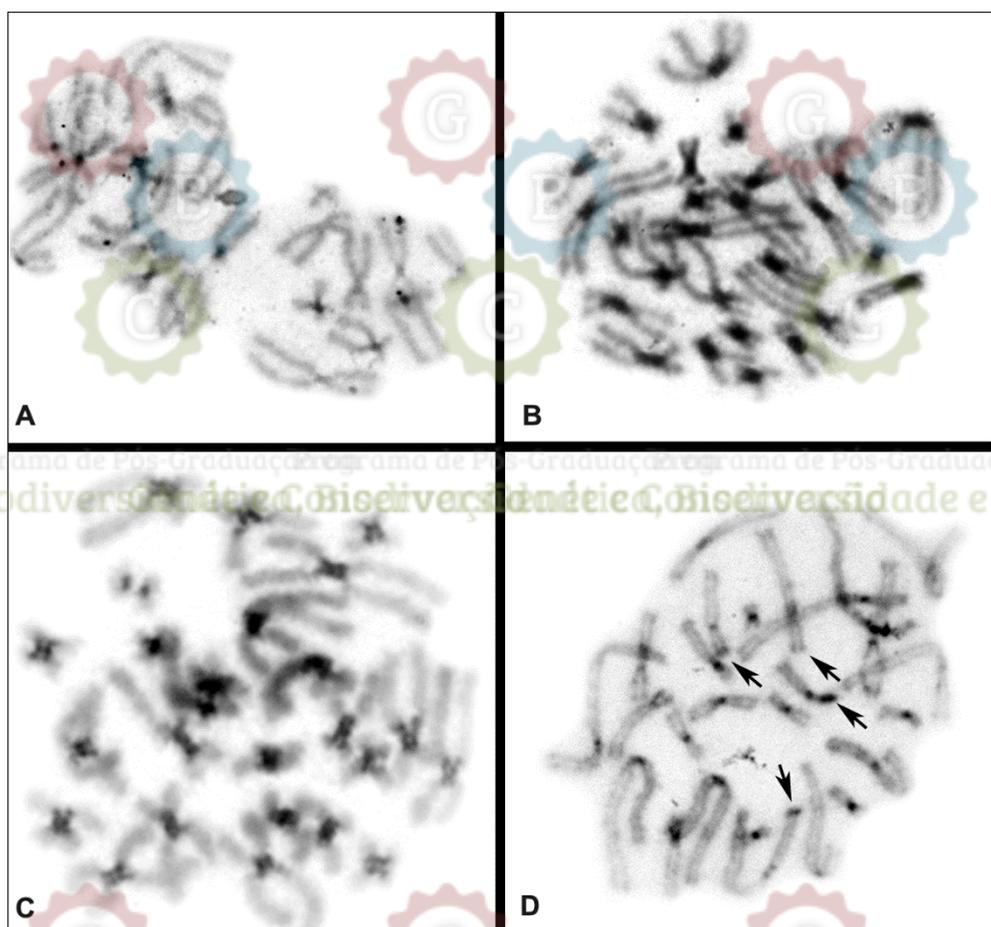


**Figura 4:** Cariótipos de *Phyllomedusa* submetidos à coloração convencional com Giemsa. A) *P. burmeisteri*; B) *P. nordestina* (Contendas do Sincorá); C) *P. nordestina* (Jequié); D) *P. tomopterna*. Em destaque: cromossomos evidenciando as constrições secundárias (caixa) e par heteromórfico (sublinhado).

**Tabela 4:** Padrão de morfologia cromossômica observado nas diferentes populações de *Phyllomedusa* analisadas no presente estudo, baseado nas medições propostas por Green e Session (1991). Em vermelho, variações interespecíficas. Em azul: variação intraespecífica entre populações distintas.

ESPÉCIES	PARES CROMOSSÔMICOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>P. burmeisteri</i>	M	M	SM	M	SM	SM	ST	M	SM	SM	M	M	M
<i>P. nordestina</i> (CS)	M	SM	SM	M	SM	SM	ST	M	SM	SM	M	M	M
<i>P. nordestina</i> (Jq)	M	SM	SM	M	SM	SM	ST	M	ST	SM	M	M	M
<i>P. tomopterna</i>	M	SM	SM	M	SM	SM	SM	M	SM	M	M	M	M

**Legenda:** M: Metacêntrico; SM: Submetacêntrico; ST: Subtelocêntrico.

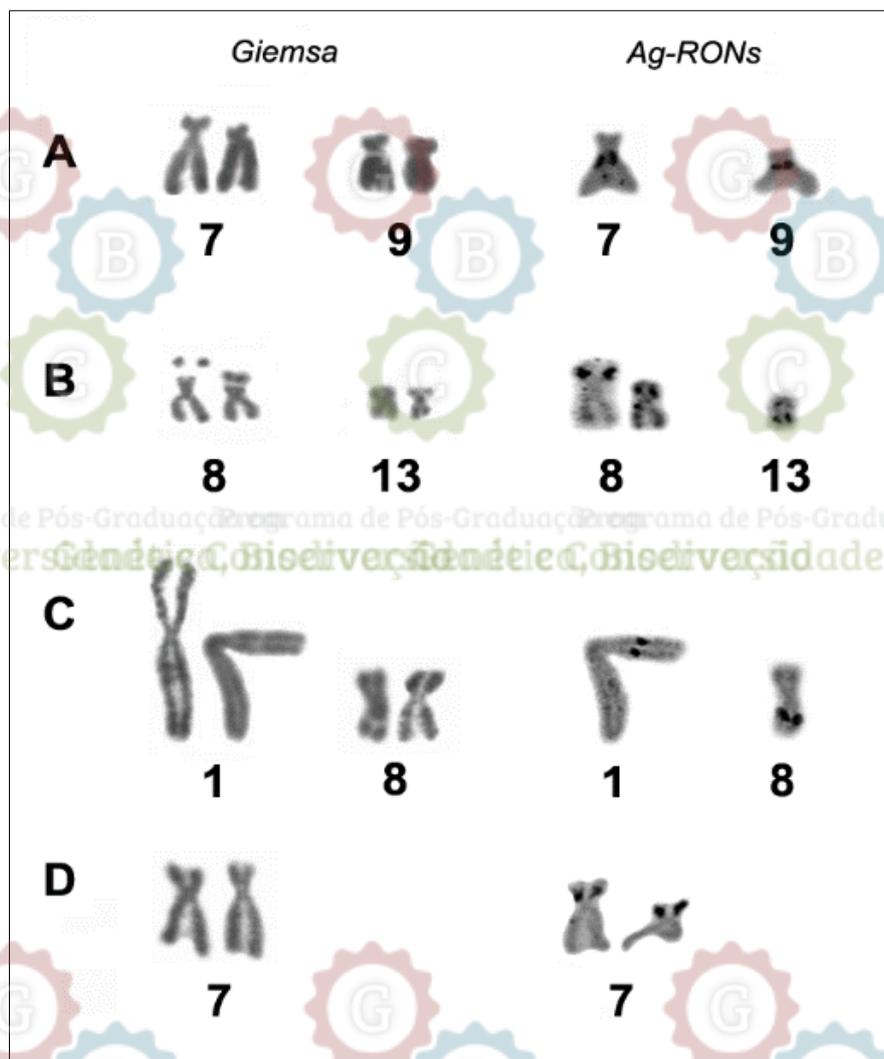


**Figura 5:** Metáfases somáticas de *Phyllomedusa*, após bandamento C: A) *P. burmeisteri*; B) *P. nordestina* (Contendas do Sincorá); C) *P. nordestina* (Jequié) e D) *P. tomopterna*. Em destaque, setas identificando as regiões de heterocromatina nas regiões terminais de alguns cromossomos em *P. tomopterna*.

*P. tomopterna* diferiu das demais espécies analisadas por apresentar RONS simples localizadas no par 7. Essas regiões, no entanto, mostram-se posicionadas diferencialmente entre os homólogos, estando situada na região intersticial dos braços curtos de um dos cromossomos, e na porção terminal dos braços curtos do outro. (Figura 6)

Um heteromorfismo de tamanho envolvendo as RONS foi observado para as regiões presentes no par cromossômico 8 em *P. nordestina* proveniente de Contendas do Sincorá (Figura 6).

Essa é a primeira vez que são descritos dados citogenéticos a respeito de bandamento C e RONS em *P. tomopterna*, além do número diploide.



**Figura 6:** Regiões organizadoras de nucléolo reveladas nos cromossomos das diferentes populações de *Phyllomedusa*, analisadas no presente estudo, após impregnação por nitrato de prata: A) *P. burmeisteri*; B) *P. nordestina* (Contendas do Sincorá); C) *P. nordestina* (Jequié) e D) *P. tomopterna*.

## 6. DISCUSSÃO

O número diploide de  $2n=26$  cromossomos encontrado para todas as populações, do presente estudo, já era esperado, uma vez que o mesmo mostra-se bem conservado dentro do gênero *Phyllomedusa* (Beçak *et al.*, 1970; Bogart, 1973; Barrio, 1976; Batistic, 1989; Barth, 2009; Catroli e Kasahara, 2009). No entanto, há relatos de indivíduos com  $2n=4x=52$  cromossomos na espécie *Phyllomedusa tetraploidea*, originada a partir de eventos de poliploidia (Haddad *et al.*, 1994) e com  $2n=40$  em *P. rohdei*, cujo aumento no número cromossômico foi provavelmente resultante de fissões cêntricas seguidas de inversões envolvendo o centrômero (Nunes & Fagundes, 2008). Esse último caso, que apresenta um número cromossômico muito discrepante, até mesmo para a família Hylidae, possivelmente tenha sido um aparente equívoco dos autores, já que amostras analisadas, por outros autores, do mesmo local e de regiões diferentes da espécie em questão, tenham mantido a constância do número cromossômico que é mais comumente encontrado dentro do gênero ( $2n=26$ ) (Gruber *et al.*, 2013).

Embora o número cromossômico de  $2n=24$  seja característico de Hylidae,  $2n=26$  também é bem documentado dentro da família, uma vez que encontra-se presente na maior parte dos representantes das subfamílias Phyllomedusinae e Pelodryadinae (Catroli & Kasahara, 2009); Os estudos realizados por Bogart (1973), propõem que os cariótipos com  $2n=24$  ou  $2n=22$ , tenham surgido a partir da redução do número cromossômico de um cariótipo ancestral com  $2n=26$  por meio de eventos como fusão cêntricas ou fusão em *tandem* ao longo da evolução. Sob essa análise, o número modal ( $2n=26$ ) em *Phyllomedusa* seria uma condição plesiomórfica dentro do grupo.

Em Hylidae, também observa-se uma uniformidade na morfologia cromossômica do grupo, havendo uma predominância de pares meta e submetacêntricos (Catroli e Kasahara, 2009). O presente estudo corroborou essa observação, havendo apenas quatro pares subtelo-cêntricos dentre as espécies analisadas. Segundo Gruber, *et al.* (2013) a maioria das espécies analisadas citogeneticamente em *Phyllomedusa* apresenta os dois braços cromossômicos bem evidentes em todo o cariótipo, entretanto, há registros de cromossomos telocêntricos em *P. tarsius* (Bruschi *et al.*, 2014a) e *P. camba* (Paiva *et al.*, 2010), em que não é possível fazer a distinção entre braço cromossômico e telômeros.

Embora pertença a grupos morfológicos distintos, a composição cariotípica das populações analisadas mostrou-se bem semelhantes. Semelhanças na morfologia cromossômica entre grupos distintos em *Phyllomedusa* também puderam ser observadas

nos estudos de Barth (2009), em que as populações de *P. rohdei*, pertencente ao grupo *P. hypochondrialis*, mostraram-se bem semelhantes com populações de *P. burmeisteri*, que é pertencente ao grupo *P. burmeisteri*.

Comparando as populações de *P. burmeisteri* do presente estudo, com as observadas por Barth (2009), nota-se um conservadorismo na morfologia dos pares 3, 5, 6, 9, 10, 11 e 13, os demais pares variaram entre meta, submete e subtelocêntricos. A variação na morfologia desses pares, provavelmente esteja relacionada a eventos de inversões pericêntricas, muito frequentes dentro de Hylidae e já documentado em outros grupos, como em *Dendropsophus* (Medeiros, 2005), *Hyla* (Medeiros, 2003), *Hypsiboas* (Carvalho *et al.*, 2014). Esse tipo de evento também pode explicar a diferença observada na morfologia do par 9 nas populações de *P. nordestina* na presente análise, em que na população de Jequié esse par foi subtelocêntrico enquanto que na população de Contendas do Sincorá foi submetacêntrico.

O padrão morfológico observado para os cromossomos da população de *P. nordestina* de Contendas do Sincorá, foi igual ao encontrado por Bruschi, *et al.* (2012) que analisou populações de *P. nordestina* e *P. rohdei* de diferentes localidades da Bahia. Esses dados reforçam a manutenção da macroestrutura cariotípica dentro do grupo *P. hypochondrialis*.

Os blocos de heterocromatina constitutiva, revelados pelo bandamento C, que foram encontrados próximos a região do centrômero, encontra-se bem documentado dentro do gênero *Phyllomedusa* (Barth, 2009; Bruschi, *et al.*, 2012; Barth, *et al.*; 2013; Bruschi *et al.*, 2013; Gruber, *et al.*, 2013) e parece ser uma característica marcante da citogenética do grupo. Além dessa localização, há casos na literatura que também revelam esses blocos na porção intersticial (Bruschi *et al.*, 2012) e na porção proximal dos telômeros (Bruschi *et al.*, 2013), padrão último, que foi semelhante ao observado para a presente população de *P. tomopterna*.

A redução do número e tamanho dos blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica, observada em *P. tomopterna*, no presente estudo, e em *P. rohdei* (Bruschi *et al.*, 2012) parece estar ligada justamente a presença dos blocos extras observados na porção terminal dos cromossomos dessas espécies, justificando-se ao fato de que possíveis eventos de inversões peri e/ou paracêntricas tenham ocorrido e dispersado o material condensado para as extremidades do cromossomo (Medeiros, 2005; Barth, 2009).

Embora não tenha apresentado blocos heterocromáticos na região intersticial e nem terminal dos cromossomos, a população de *P. burmeisteri* também apresentou pequenos blocos e pouca quantidade de heterocromatina. Esse padrão também já foi observado para outras espécies do gênero: *P. bahiana*, *P. tarsius* e *P. distincta* (Bruschi *et al.*, 2014a), bem como, para outros grupos da família Hylidae, por exemplo, o gênero *Leptodactylus* (Arruda & Morielle-Versute, 2008);

De acordo com Pieczarka & Mattevi (1998), muitos processos estão envolvidos no aumento da quantidade de heterocromatina no genoma, dentre os quais pode-se citar: eventos de replicações dessas regiões, trocas desiguais entre cromátides-irmãs, transposição desses locais e transformação da cromatina.

Segundo King (1991), espécies mais derivadas de anuros tendem a apresentar uma incorporação na quantidade de heterocromatina ao longo da evolução. Essa tendência foi observada nas populações de *P. nordestina* do presente estudo, que apresentaram grande quantidade nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, corroborando os estudos de Barth (2009) e Bruschi *et al.* (2012). De acordo com John (1988), esses blocos podem funcionar como barreiras cromossômicas, impedindo a ocorrência de rearranjos dessas regiões, isso explica o conservadorismo do padrão heterocromático constitutivo de *P. nordestina*, podendo-se inferir que essa parece ser uma característica típica da espécie dentro de *Phyllomedusa* e pode servir como um forte marcador citotaxonômico.

A técnica de bandamento tem sido de grande valia para os anuros, uma vez que tem permitido a identificação de polimorfismos e homologias cromossômicas nos diferentes táxons, separação de espécies crípticas, caracterização de pares cromossômicos heteromórficos entre machos e fêmeas, etc. (Schmid, 1980; Sumner 1990; Siqueira *et al.*, 2008).

O estudo das RONS tem sido potencialmente informativo nos trabalhos envolvendo anuros, já que estas regiões têm se mostrando altamente variáveis, tanto em quantidade quanto em localização nos cromossomos dos diferentes táxons do grupo. Isso porque, são regiões instáveis do genoma, sendo locais com maior possibilidade de rearranjos cromossômicos (Bruschi, *et al.*, 2013).

Em Hylidae, a maior parte dos estudos voltados à análise e detecção das RONS revelam que essas regiões encontram-se situadas em apenas um único par cromossômico (Bruschi *et al.*, 2012; Gruber *et al.*, 2013), sendo esta uma condição considerada por alguns autores como uma característica ancestral dentro de Anura (King *et al.*, 1990). No

entanto, esse padrão geralmente não se aplica ao gênero *Phyllomedusa*, que em sua maioria, apresenta múltiplos sítios em diferentes posições cromossômicas ao longo do genoma (Gruber *et al.*, 2013). No gênero em questão, RONS múltiplas já foram identificadas em *P. burmeisteri*, *Phyllomedusa sp.*, *P. sauvagii*, *P. distincta*, *P. iheringii*, *P. hypochondrialis*, *P. ayeaye*, *P. tarsiana*, *P. rohdei* e *P. tetraploidea* (ver Paiva *et al.*, 2010).

Segundo Gruber *et al.* (2013) existe uma manutenção da localização das RONS no grupo *P. burmeisteri* que estão presentes nos cromossomos 1 e 9 nas espécies já analisadas: *P. burmeisteri*, *P. distincta* e *P. iheringi*. No entanto, os autores citados anteriormente não incluíram as análises realizadas por Barth (2009), que detectou somente marcações nos cromossomos do par 9 de *P. burmeisteri* e *P. bahiana*. Na presente análise, foi possível detectar as RONS em um dos homólogos do par 9 e em um dos homólogos do par 7 na população de *P. burmeisteri*. O que pode-se concluir a respeito dessas três observações é de que o par 9 realmente parece ser mesmo um portador marcador dessas regiões dentro do grupo *P. burmeisteri* e que alguns possíveis eventos, como: inativação de genes ribossomais e transposição ou translocação recíproca envolvendo os cístrons de rDNA para outros cromossomos, provavelmente tenham sido possíveis responsáveis pelas variações encontradas nos estudos de Barth (2009) e no presente trabalho, respectivamente (Schubert & Wobus, 1985; Sumner, 1990).

De acordo com Schmid *et al.* (1982), casos de hetemorfismo de tamanho das RONS entre cromossomos homólogos é bem comum entre os anuros, como pode ser observado na população de *P. nordestina* de Contendas do Sincorá do presente estudo. O autor sugere que a explicação para ocorrência desse tipo de evento esteja relacionado com a duplicação, ou triplicação em *tandem* na região dos genes de DNA ribossomal. Além disso, a diferença no tamanho dessas regiões pode ser fruto de crossing-over desigual entre os homólogos, sendo mais comuns em RONS heterocromáticas (Barth, 2009). Segundo Schmid *et al.* (1982), a amplificação dessas regiões nos dois cromossomos seria uma condição letal, uma vez genes funcionais adjacentes às regiões que seriam duplicadas poderiam ser alterados ou até mesmo inativados. No entanto, essa condição de amplificação nos dois homólogos foi observada nos estudos de Barth (2009) em *P. bahiana*, não sendo observada qualquer alteração no genoma da espécie.

No presente estudo, pôde-se observar entre as populações de *P. nordestina* que houve uma variação na posição das RONS do par 8, embora pertençam a mesma espécie.

Esse fato pode ser explicado pela ocorrência de inversão pericêntrica nesses cromossomos. No entanto, quando ambas as populações de *P. nordestina* são comparadas àquelas estudadas por Bruschi *et al.* (2012), observa-se que o par portador das RONS é o 9. A migração de cístrons ribossomais para outros cromossomos, usada como um dos motivos para explicar a variação em *P. burmeisteri*, também pode ser aplicado às populações de *P. nordestina* supracitadas.

As variações de RONS já encontradas entre as diferentes populações de *P. burmeisteri* e de *P. nordestina*, possivelmente indique a existência de espécies crípticas, que são casos bem comuns no grupo dos anuros. Como, por exemplo, nas espécies amazônicas do gênero *Pristimantis* estudadas por Padiál & De La Riva (2009).

A diferença na posição das RONS entre os homólogos observada em *P. tomopterna*, no presente estudo, aparentemente ocorreu num processo semelhante ao de populações de *P. hypochondrialis* provenientes dos municípios de Alta Floresta do Pará (ver Bruschi *et al.*, 2013). No entanto, esse evento foi observado no par 8 dos cromossomos. Os autores observaram uma variação na posição das RONS entre os braços curtos dos homólogos desse par, onde um dos homólogos apresentavam essas regiões próximas ao centrômero e o outro homólogo, próximas à porção terminal. Quando submetidos ao bandamento C, foi possível observar blocos de heterocromatina nos locais opostos às RONS. A detecção das regiões ricas em GC pelo uso de fluorocromos confirmou a hipótese de um evento de inversão paracêntrica nesses cromossomos. Além desses, casos desse tipo também já foram observados em outros anuros.

Rearranjos cromossômicos como inversão e translocação (King *et al.*, 1990), amplificação de cístrons de rDNA (Macgregor & Kezer, 1973), e elementos genéticos transponíveis (Schubert & Wobus, 1985) são tidos como alternativas para explicar a origem das RONS múltiplas nos organismos.

A grande variação de RONS entre espécies e/ou populações impossibilita dizer com confiabilidade como se deu a evolução dessa característica no grupo e tal variação pode refletir a rapidez da evolução dessa característica para anfíbios de modo geral, descartando a ideia vigente anteriormente de que as RONS podem ser marcadores espécie-específicas para anuros.

O primeiro e único estudo citogenético com *P. tomopterna* foi realizado por Batic (1989), onde foi descrito apenas o número diploide da espécie ( $2n=26$ ). O presente estudo faz as primeiras análises utilizando coloração diferencial como o

bandamento e C e detecção das RONS. As informações obtidas associadas a estudos de outras naturezas podem ajudar a definir a posição taxonômica da espécie em um dos grupos do gênero.

Os resultados aqui gerados sugerem um conservadorismo do número e da macroestrutura cromossômica para o gênero *Phyllomedusa* e uma evolução mais dinâmica da microestrutura, com a participação de rearranjos cromossômicos não-Robertsonianos.



## 8. CONCLUSÃO

Com base nas análises dos resultados gerados no presente estudo, pode-se inferir que:

- O número modal de  $2n=26$  cromossomos apresentados por todas as populações no presente estudo, reforça a ideia de um conservadorismo do número diploide dentro do gênero *Phyllomedusa*, considerando a existência do mesmo ser um caráter plesiomórfico do grupo.
- A macroestrutura cromossômica de pares meta e submetacêntricos também mostra-se bastante conservada dentro do grupo, sendo bem documentada e corroborada com a maioria dos estudos até mesmo para a família Hylidae.
- A presença de blocos de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas, mostra-se bem característico dentro gênero *Phyllomedusa*. No entanto, grande quantidade desses blocos nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos em *P. nordestina* e a presença de blocos terminais em *P. tomopterna* revelam-se como bons marcadores citotaxonômicos para estas espécies.
- As variações de RONS já encontradas entre as diferentes populações de *P. burmeisteri* e de *P. nordestina*, possivelmente indique a existência de espécies crípticas, que são casos bem comuns no grupo dos anuros.
- A grande variação de RONS entre espécies e/ou populações aqui apresentada impossibilita dizer com confiabilidade como se deu a evolução dessa característica no grupo, e tal variação pode refletir a rapidez evolutiva dessa característica para anfíbios de modo geral, descartando a ideia vigente anteriormente de que as RONS são marcadores espécie-específicas para anuros.
- Essa é a primeira vez que é aplicada um tipo de coloração diferencial em *P. tomopterna*, identificando a quantidade e localização de bandas constitutivas e de RONS, na espécie.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHERI, AH; AL-SALECH, AA. 2005. Karyotype of amphibians in Saudi-Arabia 2. The karyotype of *Hyla savignyi*. Journal of Biological Sciences, vol. 5, nº 6, p. 768-770.

ANDERSON, K. 1991. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* tree frogs. In: GREEN, DM. & SESSIONS, SK. Amphibian Cytogenetics and Evolution. San Diego: Academic Press, p. 299-331.

ARRUDA, MP.; MORIELLE-VERSUTE, E. 2008. Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). Genetics and Molecular Research, vol. 7, nº 1, p. 161-176.

AVILA-PIRES, TCS.; HOOGMOED, MS.; VITT, LJ. 2007. Herpetofauna da Amazônia. In: NASCIMENTO, LB. & OLIVEIRA, ME. Herpetologia no Brasil II. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. p. 13-43.

BALDISSERA JR, FA.; OLIVEIRA, PSL.; KASAHARA, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* espécies (Amphibia-Anura) and description of a case with a supranumerary chromosome. Revista Brasileira de Genética, vol. 16, p. 335-345.

BARRIO, A. 1976. Estudio cariotípico y analisis audioespectrografico de los cantos de las espécies de *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae) que habitan em la Argentina. Physis, vol. 35, nº 90, p. 65-74.

BARTH, A. 2009. Estudos citogenéticos nas espécies de *Phyllomedusa* Wagler 1830 (Anura, Hylidae) encontradas no estado da Bahia – Brasil. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia molecular. 61p.

BARTH, A.; SOUZA VA.; SOLÉ, M; COSTA, MA. 2013. Molecular cytogenetics of nucleolar organizer regions in *Phyllomedusa* and *Phasmahyla* species (Hylidae, Phyllomedusinae): a cytotaxonomic contribution. *Genetics and Molecular Researchs*, vol. 12, nº 3, p. 2400-2408.

BATISTIC, RF.; SOMA, M.; BEÇAK, ML.; BEÇAK, W. 1975. Further studies on polyploidy amphibians. A diploid population of *Phyllomedusa burmeisteri*. *Journal of Heredity*, vol. 66, nº 3, p. 160–162.

BATISTIC, RF. 1989. Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura-Amphibia). São Paulo: Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado. 203p.

BEÇAK, ML.; DENARO, L.; BEÇAK, W. 1970. Polyploid and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics*, vol. 9, nº 4, p. 225-238.

BERNARDE, PS. 2007. Ambientes e temporada de vocalização da anurofauna no Município de Espigão do Oeste, Rondônia, Sudoeste da Amazônia - Brasil (Amphibia: Anura). *Biota Neotropica*, vol. 7, nº 2, p. 87-92.

BOGART, JP. Evolution of anuran karyotypes. 1973. In VIAL, JL. *Evolutionary Biology of the Anurans: contemporary research on major problems*. Columbia: University of Missuru Press, p. 337-349.

BRUSCHI, DP.; BUSIN, CS.; SIQUEIRA, S.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2012. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). *Hereditas*, vol. 149, nº 1, p. 34-40.

BRUSCHI, DP.; BUSIN, CS.; TOLEDO, LF.; VASCONCELLOS, GA.; STRUSSMANN, C.; WEBER, LN.; LIMA, AP.; LIMA, JD.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2013. Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. *BMC Genetics*, vol. 14, nº 70, p. 1-13.

BRUSCHI, DP.; RIVERA, M.; LIMA, AP.; ZÚÑIGA, AB.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2014a. Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (*Phyllomedusa*, Hylidae, Anura). *Molecular Cytogenetics*. vol. 7, nº 22, p. 1-12.

BRUSCHI, DP.; LUCAS, EM.; GARCIA, PCA.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2014b. Molecular and Morphological Evidence Reveals a New Species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* Group (Hylidae, Phyllomedusinae) from the Atlantic Forest of the Highlands of Southern Brazil. *Plos One*, vol. 9, nº 8, e105608.

BUSIN, CS.; ANDRADE, GV.; BERTOLDO, J.; DELGRANDE, ML.; UETANABARO, M.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2008. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/WZ sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genética*, vol. 133, nº 2, p. 119-127.

CAMPANILI, M. & PROCHNOW, M. 2006. Mata Atlântica – uma rede pela floresta. Brasília. RMA. 332p.

CANNATELLA, DC. 1980. A review of the *Phyllomedusa buckleyi* group (Anura: Hylidae). *Occasional Papers of the Museum of Natural History*, vol. 87, p. 1-40.

CARAMASCHI, U. 2006. Redefinição do grupo *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926), revalidação de *P. azurea* (COPE, 1862) e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arquivos do Museu Nacional*, vol. 64, nº 2, p. 159-179.

CARVALHO, KA.; GARCIA, PCA.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2009. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Genetics and molecular Research*, vol. 8, nº 4, p. 1498-1508.

CARVALHO, M. A.; RODRIGUES, M. T.; SIQUEIRA, S.; GARCIA, C. 2014. Dynamics of chromosomal evolution in the genus *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Genetics and Molecular Research*, vol. 13, nº 3, p. 7826-7838.

CATROLI, GF.; KASAHARA, S. 2009. Revisão dos dados citogenéticos da família Hylidae (Amphibia, Anura): Resultados e Perspectivas. *Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 15, nº 1, p. 67-86.

COSTA, C.; GUERRA, R. 2012. Uma Floresta de Oportunidades – um novo olhar sobre a Mata Atlântica do Nordeste. Volume único. Belo Horizonte: Conservação Internacional. 56p.

COUTINHO, LM. 2006. O conceito de bioma. *Acta Botânica Brasilica*, vol. 20, nº 1, p. 13-23.

DUELLMAN, WE. 1968b. The taxonomic status of some American hylid frogs. *Herpetologica*, vol. 24, nº 3, p. 194-209.

EMERSON, SB.; BOYD, SK. 1999. Mating vocalizations of female frogs: control and evolutionary mechanisms. *Brain, Behavior and Evolution*, vol. 53, nº 4, p. 187-197.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, CFB.; GARCIA, PCA.; FROST, DR.; CAMPBELL, JA.; WHEELER, WC. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. American Museum of Natural History*, nº 294, 240p.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, CFB.; BAÊTA, D.; JUNGFER, KH.; ÁLVARES, GFR.; BRANDÃO, RA.; SHEIL, C.; BARRIENTOS, LS.; BARRIO-AMRÓS, CL.; CRUZ, CAG.; WHEELER, WC. 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). *Cladistics*, vol. 26, nº 3, p. 227-261.

FEARNSIDE, PM. 2006. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. Acta Amazônica, vol. 36, nº 3, p. 395-400.

FERREIRA, LV.; VENTICINQUE, E.; ALMEIDA, S. 2005. O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. Estudos Avançados, vol. 19, nº 53, p. 157-166.

FREITAS, MA. & SILVA, TFS. 2007. A herpetofauna das caatingas e áreas de altitudes do nordeste brasileiro. Pelotas: Manuais de Campo USEB, nº 3, 388p.

FROST, DR.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, RH.; HAAS, A.; HADDAD, CF. B.; SÁ, RO.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, SC.; RAXWORTHY, CJ.; CAMPBELL, JA.; BLOTTO, BL.; MOLER, P.; DREWES, RC.; NUSSBAUM, RA.; LYNCH, JD.; GREEN, DM.; WHEELER, WC. 2006. The Amphibian Tree Of Life. Bulletin of the American Museum of Natural History, nº 297, 370p.

FROST, D.R. 2016. Amphibian Species of the World: An Online Reference, version 6.0. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2016.

FUNDAÇÃO DE SOS MATA ATLÂNTICA. 2016. A Mata Atlântica. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/nossa-cao/a-mata-atlantica/>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2016.

GREEN, DM.; SESSIONS, SK. 1991. Nomenclature for Chromosomes. In: GREEN, DM.; SESSIONS, SK. Amphibian Cytogenetics and Evolution. San Diego: Academic Press, p. 431-432.

GREENPEACE. 2016. Amazônia: Patrimônio brasileiro, futuro da humanidade. Disponível em: <<http://www.greenpeace.org/brasil/pt/O-que-fazemos/Amazonia/>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2016.

GRUBER, SL.; ZAMPIERI, AP.; HADDAD, CFB.; KASAHARA, S. 2013. Cytogenetic analysis of *Phyllomedusa distincta* Lutz, 1950 ( $2n = 2x = 26$ ), *P. tetraploidea* Pombal and Haddad, 1992 ( $2n = 4x = 52$ ), and their natural triploid hybrids ( $2n = 3x = 39$ ) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae). BMC Genetics, vol. 14, nº 75, p. 1-13.

HADDAD, CFB.; POMBAL JR, JP.; BATISTIC, RF. 1994. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). Journal of Herpetology, vol. 28, nº 4, p. 425-430.

HADDAD, CFB. 1998. Biodiversidade dos anfíbios no Estado de São Paulo. In: CASTRO, RM. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. São Paulo: Editora Fapesp, vol. 6, p. 17-26.

HADDAD, CFB. & PRADO, CPA. 2005. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. BioScience, vol. 55, nº 3, p. 207-217.

HADDAD, CFB.; TOLEDO, LF.; PRADO, CPA.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, JL.; SAZIMA, I. 2013. Guia de anfíbios da Mata Atlântica: diversidade de biologia. São Paulo: Anolisbooks, 544p.

HICKMAN, CP; ROBERTS, LS.; LARSON, A. 2004. A. Princípios integrados de zoologia, 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 846p.

HILLIS, DM.; DIXON, MT. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology, vol. 66, nº 4 p. 411-453.

HOWELL, WM.; BLACK, DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia, vol. 36, nº 8, p. 1014-1015.

JOHN, B. 1988. The Biology of Heterochromatin. In: VERMA, R. S. Heterochromatin- Molecular and structural aspects. New York: Cambridge University Press. p. 1-147.

KASAHARA, S.; ZAMPIERI SAP.; GRUBER SL.; HADDAD, CFB. 2003. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. Cytogenetic and Genome Research, vol. 103, nº 1-2, p. 155-167.

KING, M. 1990. Animal Cytogenetics. In: JOHN, B. & GWENT, C. Chordata 2. Amphibia. Berlin: Gebruder Borntraeger, 241p.

KING, M.; COTRERAS, N.; HONEUCUTT, RL. 1990. Variation within and between nucleolar regions in Australian hylids frogs (Anura) shown by 18S and 28S I situ hybridization. Genetica, vol. 80, nº 1, p. 17-29.

KING, M. 1991. The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In: GREEN, MG. & SESSIONS SK. Amphibians Cytogenetic and Evolution. San: Academic Prees, p. 359-391.

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

LEAL, IR.; SILVA, JMC.; TABARELLI, M.; JR, TEL. 2005. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. Megadiversidade, vol. 1, nº 1, p. 139-146.

LOURENÇO, LB. 1996. Estudo citogenético comparativo de *Edalorhina perezii* e *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. 113p.

MACGREGOR, HC.; KEZER, J. 1973. The Nucleolar Organizer of *Plethodon cinereus cinereus* (Green). I. Location of the Nucleolar Organizer by in situ Nucleic Acid Hybridization. *Chromosoma*, vol. 42, nº 4, p. 415-426.

MEDEIROS, LR.; ROSSA-FERES, DC.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2003. Chromosomal Differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) With a Description of NOR Polymorphism in *H. nana*. *Journal of Heredity*, vol. 94, nº 2, p. 149-154.

MEDEIROS, LR. 2005. Citogenética de *Dendropsophus* (Anura, Hylidae): Caracterizações e comparações cromossômicas. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural. 110 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). 2016. Caatinga. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acessado em: 15 de Janeiro de 2016.

NUNES, RRA. & FAGUNDES, V. 2008. Cariótipo de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura: Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu Biologia Mello Leitão*, nº 23, p. 21-36.

PADIAL, JM. & DE LA RIVA, I. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 155, nº 1, p. 97-122.

PAIVA, CR.; NASCIMENTO, J.; SILVA, APZ.; BERNARDE, OS.; ANANIAS, F. 2010. Karyotypes and Ag-NORs in *Phyllomedusa camba* De La Riva, 1999 and *P. rohdei* Mertens, 1926 (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae): cytotaxonomic considerations. *Italian Journal of Zoology*, vol. 77, nº 1, p. 116–121.

PIECZARKA, JC.; MATTEVI, M. 1998. Heterocromatina Constitutiva. In: DUARTE, FAM. Série Monografias. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, nº 7, p. 185-225.

POUGH, FH.; JANIS, CM.; HEISER, JB. 2008. A vida dos vertebrados. 4ª ed. São Paulo: Atheneu. 716 p.

RAMOS, CA. & GALATTI, U. 2002. Patterns of amphibian diversity in Brazilian Amazonia: conservation implications. *Forest Ecology and Management*, vol. 103, nº 1, p. 103-111.

RODRIGUES, MT. 2003. Herpetofauna da Caatinga. In: LEAL, IR.; TABARELLI, M.; SILVA, JMPC. *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Recife: Editora da UFPE, p. 181-236.

ROMER, AS.; PARSON, TS. 1985. *Anatomia Comparada dos Vertebrados*. São Paulo: Atheneu, p. 29-80.

ROSSA-FERES, DC.; MARTINS, M.; MARQUES, OAV.; MARTINS, IA.; SAWAYA, RJ.; HADDAD, CFB. 2008. Herpetofauna. In: RODRIGUES, RR.; JOLY, CA.; BRITO, MCW.; PAESE, A.; METZGER, JP.; CASATTI, L.; NALON, MA.; MENEZES, N.; IVANAUSKAS, NM.; BOLZANI, V.; BONONI, VLR. *Diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo*. São Paulo: FAPESP, p. 83-94.

SCHMID, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, vol. 66, nº 4, p. 361-388.

SCHMID, M. 1980. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome region in Anura. *Chromosoma*, vol. 77, nº 1, p. 83-103.

SCHMID, M. 1982. Chromosome Banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, vol. 87, nº 3, p. 327-344.

SCHMID, M.; STEILEIN, C. 2003. Chromosome banding in Amphibia XXIX. The primitive XY/XX sex chromosomes of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). Cytogenetics and Genome Research, vol. 101, n° 1, p. 74-79.

SCHUBERT, I.; WOBUS, U. 1985. In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. Chromosoma, vol. 92, n° 2, p. 143-148.

SEGALLA, MS; CARAMASCHI, U.; CRUZ, CAG.; GRANT, T.; HADDAD, CFB.; LANGONE, JA.; GARCIA, PCA. 2014. Brazilian Amphibians: List of Species. Herpetologia Brasileira, vol. 3, n° 2, p. 37- 48.

SILVANO, DL.; SEGALLA, M. 2005. Conservation of Brazilian Amphibians. Conservation Biology, vol. 19, n° 3, p. 653-658.

SIQUEIRA, S.; ANANIAS, F.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2004. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. Genetics and Molecular Biology, vol. 27, n° 3, p. 363-372.

SIQUEIRA, S.; AGUIAR-Jr, O.; STRÜSSMANN, C.; DEL-GRANDE, ML.; RECCO-PIMENTEL, SM. 2008. Chromosomal analysis of three Brazilian “eleutherodactyline” frogs (Anura: Terrarana), with suggestion of a new species. Zootaxa, p. 51–59.

SUMNER, AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research, vol. 75, n° 1, p. 304-306.

SUMNER, AT. 1990. Chromosome banding. 1ª ed. London: Unwin Hyman Ltd., 434p.

TABARELLI, M.; PINTO, LP.; SILVA, JMC.; HIROTA, M.; BEDÊ, L. 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade, vol. 1, n° 1, p. 132-138.

WINKELMANN, L. & NOLETO, RB. 2015. CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE *Phyllomedusa tetraploidea* (ANURA, HYLIDAE), PROVENIENTE DA MATA ATLÂNTICA PARANAENSE. *Luminária*, vol.17, nº 1, p. 146-157.

WILEY, JE. 2003. Replication banding and fish analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. *Cytogenetics and Genome Research*, vol. 101, nº 1, p.80-83.

YOSIDA, TH. 1957. Sex chromosomes of the tree frog, *Hyla arborea japonica*. *Journal of the Faculty of Science*, vol. 13, p. 352-358.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**Tabela 2:** Resumo dos dados citogenéticos, dos últimos estudos, realizados com espécies do gênero *Phyllomedusa*.

Grupos de espécie	Espécie	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	Bandamento C	RONs	Citogenética Molecular	Referências
<i>P. burmeisteri</i>	<i>P. bahiana</i>	Feira de Santana / BA	26	2k = 6m18sm2st	BC - Todos os cromossomos; BP - 6, 7, 9, 10, 11	RP - 9q9q	Fluorocromos - DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Barth (2009)
		Feira de Santana, Vitória da Conquista, Ituberá, Camacan, Ilhéus / BA	26	2k = 6m18sm2st	Técnica não empregada	RP - 9q9q	FISH - 45S de rDNA	Barth <i>et al.</i> (2013)
		Feira de Santana, Vitória da Conquista, Ituberá, Camacan, Ilhéus / BA	26	2k = 6m18sm2st	BC - 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13 BP = 6pq6pq, 7pq7q, 11p11pq	Técnica não empregada	FISH - Sonda telomérica; Fluorocromos - DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Barth <i>et al.</i> (2014)
		Alagoinhas / BA	26	2k = 8m12sm6st	BC - Todos os cromossomos; BP - 1q1q, 3p3p, 6p6p, 8pq8pq, 11q11q	RP - 9q9q, 10q	FISH - Sonda telomérica; Fluorocromos - DAPI	Bruschi <i>et al.</i> (2014a)
	<i>P. burmeisteri</i>	Ituberá, Camacan, Ilhéus / BA	26	2k = 6m+18sm+2st	BC - Todos os cromossomos; BP - 6, 7, 9, 10, 11	RP - 9q9q	Fluorocromos - DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Barth (2009)
		Santa Cruz Cabrália (EGB) / BA	26	2k = 14m+10sm+2st	BP - Maioria dos cromossomos	RP - 7q, 9q	Técnica não empregada	Presente estudo
	<i>P. distincta</i>	Iporanga / SP	26	2k = 8m+12sm+6st	BC - Todos os cromossomos; BP - 1q1q, 3p3p, 6p6p, 8pq8pq, 11q11q	RP - 1p1p, 9q9q	FISH - Sonda telomérica; Fluorocromos - DAPI	Bruschi <i>et al.</i> (2014a)
		Ribeirão Branco, Ribeirão Grande / SP, Guaraqueçaba / PR	26	2k = 10m+12sm+4st	BC - 2, 3, 4, 5, 8, 9, 12, 13; BP - 1q1q, 6pq6pq, 7pq7pq, 10q10q, 11pq11pq; BI - 2p2p, 3p3p	RP - 1p1p, 9q9q	FISH - Sonda telomérica e sonda de rDNA; Fluorocromos - DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Gruber <i>et al.</i> (2013)

Grupos de espécie	Espécie	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	Bandamento C	RONs	Citogenética Molecular	Referências
<i>P. burmeisteri</i>	<i>P. tetraploidea</i>	Ribeirão Branco, Ribeirão Grande, Tatuf / SP	4n=52	4k = 20m+24s+8st	BC - 2, 3, 4, 5, 8, 9, 12, 13; BP - 1p1q1p1q1q, 6p6q6p6q6p6q, 7p7q7p7q7p7q, 10p10p10p10p, 11p11p11p11p11p; BI - 2p2p2p2p, 3p3p	Varição entre os espécimes: 1 - 1p1p, 8p8p8p (RP); 2 - 1p1p1p (RP), 8p8p8p (Todo o braço); 3 - 1p1p1p (RP), 8p 8p8p8p (Todo o braço) 4 - 1p1p1p (RP), 8p (Todo o braço) 8p8p (RP), 9q9q (RP); 5 - 1p1p (RP), 8p8p8p (Todo o braço), 9q9q9q (RP)	FISH - Sonda telomérica e sonda de rDNA; Fluorocromos - DAPI e CMA <sup>+</sup>	Gruber <i>et al.</i> (2013)
		União da Vitória / PR	4n=52	4k = 24m+20sm+8st	BC - 1, 4,5, 6, 9, 11; BP - alguns cromossomos	Técnica não empregada	Técnica não empregada	Wilkelman & Noieto (2015)
<i>P. hypochondrialis</i>	<i>P. azurea</i>	Uberlândia / MG	26	2k = 8m+14sm+4st	BC - Todos os cromossomos; BP = 7p7p; BT = 9p9p	RP - 4p4p	Técnica não empregada	Bruschi <i>et al.</i> (2013)
	<i>P. hypochondrialis</i>	Laranjal do Jari / AP, Prainha, Monte Alegre, Alenquer, Oriximiná, Óbidos / PA	26	2k = 8m+12sm+6st	BC - Todos os cromossomos; BP - 7p7p BT - 9p9p	RP - 8q8q	Técnica não empregada	

Grupos de espécie	Espécie	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	Bandamento C	RONs	Citogenética Molecular	Referências	
<i>P. hypochondrialis</i>	<i>P. hypochondrialis</i>	Belterra / PA	26	2k = 8m+12sm+6st	BC – Todos os cromossomos; BP – 7p7p BT – 8p8p8, 9p9p	RT - 8p8p8	Fluorocromos – DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Bruschi <i>et al.</i> (2013)	
	<i>Phyllomedusa</i> c.f. <i>hypochondrialis</i>	Alta Floresta / PA	26	2k = 8m+12sm+6st	BC – Todos os cromossomos; BP – 7p7p, 8p BT – 8p, 9p9p	RP - 8p RT = 8p	Fluorocromos – DAPI e CMA <sup>+3</sup>		
		Chapada dos Guimarães, Santa Terezinha / MT	26	2k = 8m+12sm+6st	BC – Todos os cromossomos; BP – 7p7p BT – 9p9p	RP – 8q8q	Técnica não empregada		
		São Luís, Bacabeira, Urbano Santos / MA, Porto Nacional / TO	26	2k = 8m+14sm+4st	BC – Todos os cromossomos; BP – 7p7p BT – 9p9p	RI – 7p7p	Técnica não empregada		
		<i>Phyllomedusa</i> sp. (aff <i>hypochondrialis</i> )	Barreiras / BA	26	2k = 8m+14sm+4st	BC – Todos os cromossomos; BP – 1p1p, 7p7p BT – 2q2q, 9p9p	RP – 3q RT – 3p, 4q RI – 7p7p	Técnica não empregada	
			Vitória da Conquista, Camacan / BA	26	2k = 16M+10SM	BP – Blocos bem evidentes em todos os cromossomos.	RI – Braço p de um par de metacêntrico	Fluorocromos – DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Barth. (2009)
		<i>P. nordestina</i>	Ituberá / BA	26	2k = 16M+10SM	BP – Blocos bem evidentes em todos os cromossomos.	RI - Braço p de 3 cromossomos	Fluorocromos – DAPI e CMA <sup>+3</sup>	
		Feira de Santana, Vitória da Conquista, Ituberá, Camacan / BA	26	2k = 18m+6sm+2st	Técnica não empregada	RI – 11p11p	FISH – sonda 45S de rDNA	Barth <i>et al.</i> (2013)	

Grupos de espécie	Espécie	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	Bandamento C	RONs	Citogenética Molecular	Referências
<i>P. hypochondrialis</i>	<i>P. nordestina</i>	Ituberá / BA	26	2k = 18m+6sm+2st	Técnica não empregada	RI – 9p, 11p11p	FISH – sonda 45S de rDNA	Barth <i>et al.</i> (2013)
		Feira de Santana, Vitória da Conquista, Ituberá, Camaçan / BA	26	2k = 6m+18sm+2st	BP – Blocos bem evidentes em todos os cromossomos.	Técnica não empregada	FISH – Sonda telomérica; Fluorocromos – DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Barth <i>et al.</i> (2014)
		Jequié, Vitória da Conquista / BA	26	2k = 12m+12sm+2st	BP – Blocos bem evidentes em todos os cromossomos.	RP - 9p9p	FISH - Sonda 28S de rDNA	Bruschi <i>et al.</i> (2012)
		Jequié / BA	26	2k = 12m+10sm+4st	BP – Blocos bem evidentes em todos os cromossomos.	RI – 1p, 8q	Técnica não empregada	Presente estudo
		Contendas do Sincorá / BA	26	2k = 12m+12sm+2st	BP – Blocos bem evidentes em todos os cromossomos.	RI – 8p8p RT – 13q	Técnica não empregada	
	<i>P. rohdei</i>	Ilhéus, Ituberá / BA	26	2k = 6m+18sm+2st	BC – 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12 BT – 11p11p, 12p12p	Variação entre os espécimes: RT - 1 – 11q11q 2 – 12p12p 3 – 12p12p, 13p 4 – 11p11p, 13p 5 – 8 (RC), 11p11p, 12p12p	Fluorocromos – DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Barth (2009)
		Ilhéus, Ituberá / BA	26	2k = 6m+18sm+2st	BC - Todos os cromossomos; BP = 11pq11pq	Técnica não empregada	FISH – Sonda telomérica; Fluorocromos – DAPI e CMA <sup>+3</sup>	Barth <i>et al.</i> (2014)
		Ilhéus / BA	26	2k = 12m+12sm+2st	BC - Todos os cromossomos; BT = 9q9q	RT - 9q9q	FISH - Sonda 28S de rDNA	Bruschi <i>et al.</i> (2012)
		Birituba-Mirim / SP	26	2k = 8m+18sm	Técnica não empregada	RP - 1p, 5p, 8p; RT – 3q, 11q, 12q	Técnica não empregada	Paiva <i>et al.</i> (2010)
		Linhares / ES	40	K = 16m+17sm+7st	Técnica não empregada	Técnica não empregada	Técnica não empregada	Nunes & Fagundes (2008)

Grupos de espécie	Espécie	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	Bandamento C	RONs	Citogenética Molecular	Referências
<i>P. tarsi</i>	<i>P. camba</i>	Ministro Andrezza / RO	26	2k = 10m+10sm+6t	Técnica não empregada	RP - 1p1p, 5q5q	Técnica não empregada	Paiva <i>et al.</i> (2010)
	<i>P. tarsi</i>	Reserva Ducke /AM, Yasuní (Equador)	26	2k = 8m+10sm+6t+2st	BC - Todos os cromossomos; BP - 1q1q, 3p3p, 4q4q, 6p6p, 8p8p, 11q11q	RP - 1p1p	FISH - Sonda telomérica; Fluorocromos - DAPI	Bruschi <i>et al.</i> (2014a)
Espécies não alocadas a nenhum dos grupos	<i>P. vaillanti</i>	Jacareacanga / PA, Porto Velho / RO, Yasuní (Equador)	26	2k = 8m+12sm+6st	BC - Todos os cromossomos; BI - 1q1q, 6q6q, 7q7q, 8p8p, 9q9q, 11q11q	RP - 7p7p	FISH - Sonda telomérica; Fluorocromos - DAPI	Presente estudo
	<i>P. tomopterna</i>	Bragança / PA	26	2k = 14m+12sm	RP - Todos os cromossomos; RT - presente em alguns cromossomos	RI - 7p; RT - 7p	Técnica não empregada	
Espécie nova	<i>P. rustica</i>	Água Doce / SC	26	2k = 8m+12sm+6st	BC - Todos os cromossomos; BP - 6q6q	RT - 9p9p	FISH - Sonda de rDNA; Fluorocromos - DAPI e Mistamicina	Bruschi <i>et al.</i> (2014b)

**Legenda:** m = metacêntrico; sb = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; t = telocêntrico; p = braço curto; q = braço longo; BC = banda centromérica; BP = banda pericentromérica; BI = banda intersticial; BT = banda terminal; RP = região pericentromérica; RI = região intersticial; RT = região terminal.