



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM *Hypsiboas* (ANURA: HYLIDAE): O
QUE OS CROMOSSOMOS PODEM NOS DIZER SOBRE A
EVOLUÇÃO DO GÊNERO**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
MILLENA SANTOS FIGUEREDO



Jequié - BA

2016

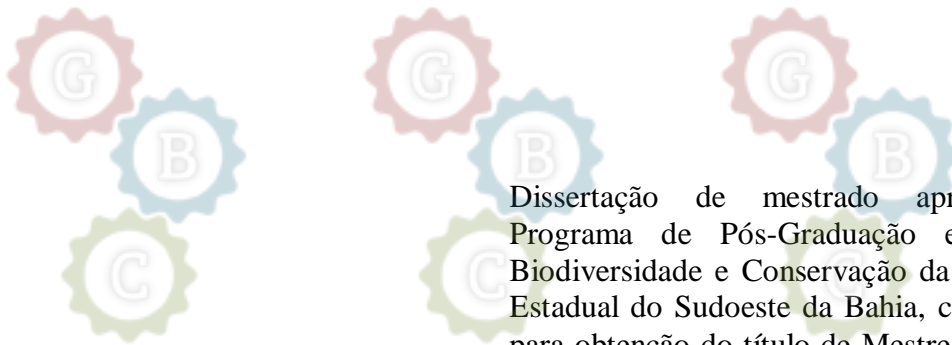
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



MILLENA SANTOS FIGUEREDO

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

DIVERSIDADE CARIOTÍPICA EM *Hypsiboas* (ANURA: HYLIDAE): O QUE OS CROMOSSOMOS PODEM NOS DIZER SOBRE A EVOLUÇÃO DO GÊNERO



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

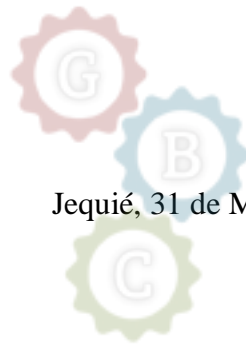
Orientadora: Prof^o Dra. Caroline Garcia



Jequié-BA

2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Jequié, 31 de Março de 2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Caroline Garcia (Orientadora) – UESB / Jequié



Profa. Dra. Débora Diniz – UESB / Jequié



Profa. Dra. Lídia Nogueira Silva – IFBA / Valença



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



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dedico este trabalho à minha família, a quem devo não só o meu sucesso mas a minha vida.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

a Deus, acima de tudo, pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me foram dadas;

À UESB e ao Programa de Pós Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, pelo acolhimento;

À CAPES pela concessão da bolsa, através da qual foi possível me deixar inteiramente ao desenvolvimento da pesquisa proposta;

À profa. Dra. Caroline Garcia, que além de orientadora é uma grande amiga, que tem me ajudado das mais diversas formas e a quem não tenho palavras para expressar minha gratidão pela incessante ajuda, por ter tido a paciência de ensinar e estar presente todo o tempo, mesmo quando a maternidade exigia sua ausência; por me defender do preconceito de não ser bióloga; por me incentivar quanto eu pensei em desistir; por comemorar comigo em cada nova descoberta, em cada acerto; pela amizade. Espero que Deus me dê um dia a oportunidade de retribuir tudo o que tem feito por mim;

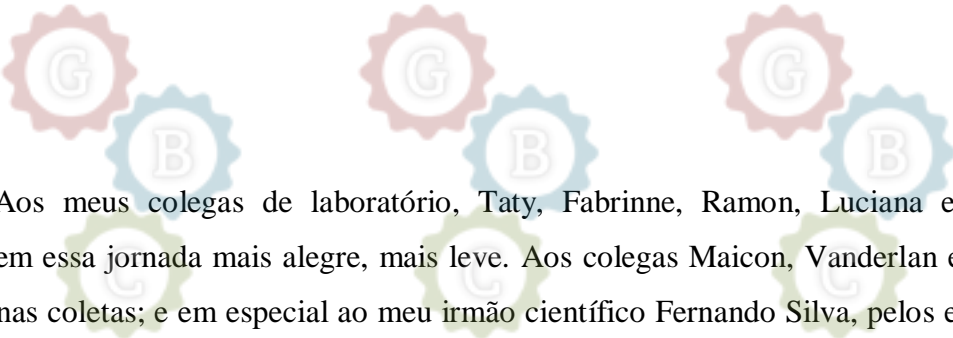
Ao prof. Dr Miguel Trefault (USP) e Mauro Teixeira Jr pelo valioso auxílio nas coletas e identificação das amostras;

Aos meus pais, que estiveram sempre comigo, que sempre cuidaram de mim e da minha filha para que eu pudesse buscar os meus objetivos. Por me acolherem sempre que eu precisei; por acreditarem em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditava; pelo amor incondicional que sempre me foi manifestado; pelo orgulho que fazem questão de expressar a meu respeito; por toda segurança e amor que é dado a mim, mas principalmente à minha filha.

Aos meus irmãos Matheus e Marvin, por serem maravilhosos comigo, por me serem sempre amorosos, amigos e mais que isso, cúmplices;

À minha filha tão amada, Maria Luisa, minha Malu, minha vida, o motivo da minha persistência. Quero ser sempre um bom exemplo, ser sempre um espelho para sua vida! Obrigada pela paciência com minha ausência, por compartilhar comigo os bons momentos e ser tão madura e compreensiva nos ruins;

Aos meus amigos da vida inteira e aos que adquiri no mestrado. Em particular, à maior responsável pelo meu primeiro passo na direção da concretização deste sonho: Marcelle Amorim, a quem chamamos carinhosamente de Peu. Obrigada, amiga e parceira, por ser meu apoio tanto no mestrado quanto na vida!



Aos meus colegas de laboratório, Taty, Fabrinne, Ramon, Luciana e Marina por tornarem essa jornada mais alegre, mais leve. Aos colegas Maicon, Vanderlan e Jamille pela ajuda nas coletas; e em especial ao meu irmão científico Fernando Silva, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo cuidado e pela amizade que me foi gratuitamente ofertada nesta jornada.

Aos outros professores do programa por tudo que me ensinaram, pelo carinho com que me acolheram; Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente desse trabalho, muito obrigada!



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

BIOGRAFIA

Millena Santos Figueredo, filha de Mara Nubia Santos Nascimento e Miguel Sebastião Figueredo Filho, nasceu em Jequié - BA aos 25 dias do mês de março de 1985. Coursou o ensino fundamental I no Educandário Sonho Infantil e em seguida iniciou o ensino fundamental II no Colégio Antônio Pinheiro, tradicional no município, onde concluiu ainda o ensino médio, no ano de 2002. Neste período teve o primeiro contato com a genética, despertando assim o desejo que se dedicar à pesquisa na área. No entanto o casamento em 2003, aos 18 anos e a filha Maria Luisa aos 19, no ano de 2004, acabaram por adiar a realização dos seus planos, que foram retomados no ano de 2006 ao ingressar no curso de bacharelado em enfermagem pela Faculdade de Tecnologia e Ciências. Apesar de ser um curso que tem pouco enfoque na genética e suas aplicações, um professor, que também foi grande amigo, chamado Mirabeau, reabriu a possibilidade de realizar seu sonho, através da pós-graduação *strictu sensu* na área de genética. Em 2010, concluiu o curso de enfermagem e ainda no mesmo ano e especialização *Latu Sensu* em Saúde Coletiva. Passou a dar aulas em cursos técnicos de enfermagem e de pós-graduação da área de saúde e serviço social. No ano de 2011 foi monitora do curso de Pós-Graduação em Gestão em Sistemas de Saúde, a partir de onde, em parceria com Dra. Maria Aparecida Cabral Tavares, passou a construir seu currículo para o ingresso no Mestrado Acadêmico. Entre 2012 e 2013 atuou como coordenada de Pós-Graduação *Latu Sensu* na Iprofit Educação Corporativa, além de ministrar aulas nesta e em outras instituições de Ensino da cidade. Ainda em 2013, após conhecer a Dra Caroline Garcia e após o conselho de sua amiga e principal responsável pela realização este sonho Marcele Amorin Carvalho, decidiu ingressar no Programa de Pós Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, o que ocorreu no ano de 2014. Neste programa, aprendeu e desenvolveu projeto de citogenética de anuros. Em dezembro de 2012 foi aprovada no concurso para exercer o cargo de enfermeira no município de Vitória da Conquista - BA, cidade situada a 155 km de Jequié, assumindo o mesmo em janeiro de 2016. Apesar das dificuldades encontradas no decorrer dos 2 anos de curso e dos desafios enfrentados, em 2016, ano em que completa 31 anos de idade, conclui com muito orgulho o Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação, como uma primeira etapa de uma grande caminho a ser percorrido para a realização do seu grande objetivo de estar inserida no cotidiano da pesquisa científica em genética.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

“Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio - e eis que a verdade se me revela”.

Albert Einstein

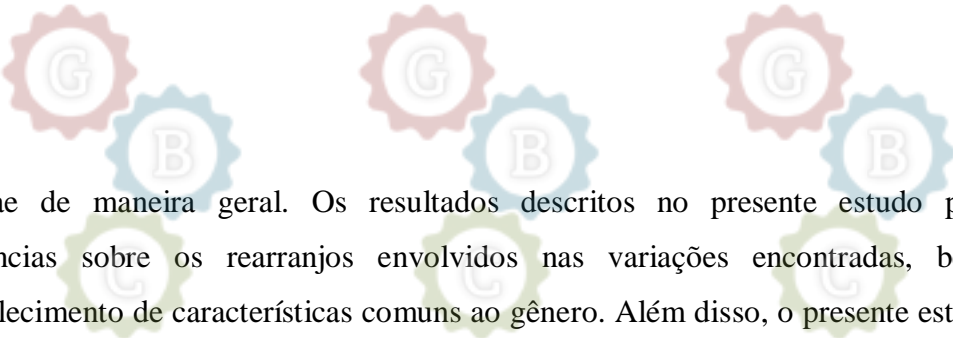


Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



RESUMO

Hylidae é a família de anuros com maior representatividade, contando com 953 espécies distribuídas em três subfamílias: Phyllomedusinae, Pelodriadinae e Hyalinae. Apresentam fórmula cariotípica variando de $2n=18$ a 52, sendo que o número diplóide mais frequente é $2n = 24$. Apresentam, embora com menor frequência, cromossomos supranumerários e diferenciação sexual. O gênero *Hypsiboas*, pertencente à subfamília Hyalinae, conta com 92 espécies com ampla variação morfológica e está dividido em sete grupos organizados a partir de similaridades morfológicas e sinapomorfias sugeridas: *Hypsiboas benitezi*, *H. punctatus*, *H. semilineatus*, *H. pellucens*, *H. albopunctatus*, *H. faber* e *H. pulchellus*. No Brasil, estudos citogenéticos relacionados às espécies pertencentes a estes grupos são escassos, contando com apenas 20 espécies descritas. Por outro lado, as sinapomorfias sugeridas não são suficientes para apoiar a divisão dos grupos, já que o gênero apresenta conflitos taxonômicos e filogenéticos. Sendo assim, é necessária a análise citogenética comparativa no grupo a fim de esclarecer os mecanismos de modificação cromossômica envolvidos na diferenciação do grupo e verificar a ocorrência de diversidade críptica e contribuir para elucidar as relações evolutivas do gênero. No presente estudo foram analisadas citogeneticamente quatro espécies de HYPYSIBOAS (*H. albomarginatus*, *H. crepitans*, *H. faber* e *H. pombali*) de 4 municípios da Bahia (Jequié, Maracás, Uruçuca e Santa Cruz Cabrália) e um município do Espírito Santo (Santa Teresa), a partir da utilização da técnica de Bandamento C e de impregnação por nitrato de prata. A partir da análise comparativa entre os resultados encontrados e os disponíveis na literatura, foi possível observar a manutenção da fórmula cariotípica padrão para a família com $2n = 24$ e $NF = 48$, com exceção de *H. albopunctatus* e *H. lanciformis* que apresentam redução para $2n = 22$. Os padrões de distribuição de heterocromatina variam tanto entre populações quanto entre espécies diferentes. No entanto é possível observar a manutenção de blocos de heterocromatina na região centromérica (com exceção de *H. multifasciatus*, que apresenta exclusivamente bandas intersticiais ao longo da maioria dos cromossomos). Além disso, algumas espécies, como *H. albomarginatus* e *H. crepitans*, apresentam similaridades na distribuição de heterocromatina em populações geograficamente próximas. Variações na localização RON também foram evidenciadas entre as espécies, com manutenção do padrão entre diferentes populações, com exceção de *H. albomarginatus* e *H. crepitans*, que apresentaram variação intraespecífica. Foram observadas ainda RONs múltiplas e RONs heterocromáticas, características pouco comuns para o gênero e para



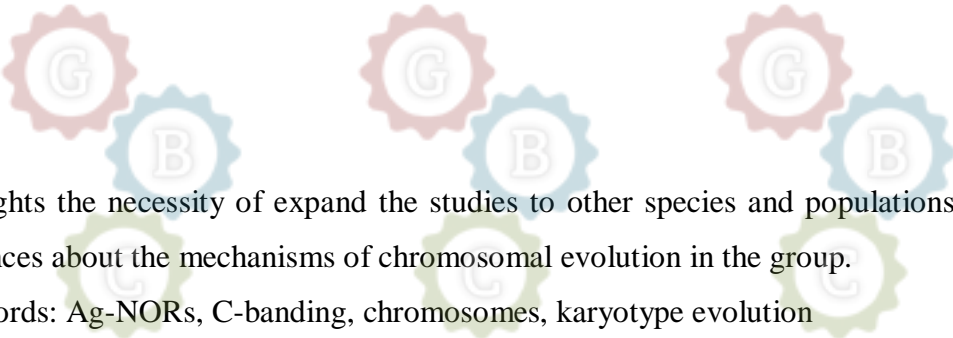
Hylidae de maneira geral. Os resultados descritos no presente estudo possibilitaram inferências sobre os rearranjos envolvidos nas variações encontradas, bem como o estabelecimento de características comuns ao gênero. Além disso, o presente estudo reforça o conflito taxonômico para o grupo e destaca a necessidade de se ampliar os estudos para outras espécies e populações, a fim de se obter maiores evidências para o melhor estabelecimento dos mecanismos de evolução cromossômica no grupo.

Palavras-chave: Ag-RONs, Bandamento C, cromossomos, evolução cariotípica.



ABSTRACT

Hylidae is the family of frogs with the largest representation, with 953 species in three subfamilies: Phyllomedusinae, Pelodriadae and Hylinae. They have karyotype ranging from $2n = 18$ to 52, and the most frequent diploid number is $2n = 24$. They present, although less frequently, supernumerary chromosomes and sexual differentiation. The genus *Hypsiboas* belonging to the Hylidae subfamily, has 92 species with large morphological variation and is divided into seven groups organized from morphological similarities and suggested synapomorphies: *Hypsiboas benitezi*, *H. punctatus*, *H. semilineatus*, *H. pellucens*, *H. albopunctatus*, *H. faber* e *H. pulchellus*. In Brazil, cytogenetic studies related to species in these groups are scarce, with just 20 described species. In the other hand, the suggested synapomorphies are not sufficient to support the group division since the genus presents taxonomic and phylogenetic conflicts. Thus, the comparative cytogenetic analysis in the group is necessary to clarify the mechanisms of chromosome modification involved in the group differentiation, to verify the occurrence of cryptic diversity and contribute to elucidate the evolutionary relationships of the genus. In this study were analyzed cytogenetically four species of *Hypsiboas* (*H. albomarginatus*, *H. crepitans*, *H. faber* and *H. pombali*) from four cities of Bahia (Jequié, Maracas, Uruçuca and Santa Cruz Cabrália) and one city of Espírito Santo (Santa Teresa), based on the use of C-Banding technique and impregnation with silver nitrate. From the comparative analysis between results of this research and the available literature was possible to observe the maintenance of pattern karyotype for the family with $2n = 24$ and $NF = 48$, with the exception of *H. albopunctatus* and *H. lanciformis*, both showing reduced to $2n = 22$. Heterochromatin distribution patterns vary between populations and between different species. However, is possible to observe the maintenance of heterochromatin blocks in the centromeric region (except for *H. multifasciatus*, presenting exclusively interstitial bands throughout most of the chromosomes). In addition, some species such as *H. albomarginatus* and *H. crepitans*, showing similarities in the distribution of heterochromatin in geographically close populations. Variations in RON position were also observed between species, with pattern maintenance among different populations, except for *H. albomarginatus* and *H. crepitans*, which showed intraspecific variation. There were also observed multiple NORs and heterochromatic NORs, unusual characteristics for the genus and for Hylidae. The results described in this study have allowed inferences about the rearrangements involved in the variations found and the evidencing of common genus characteristics. In addition, this study reinforces the taxonomic conflict for the group and



highlights the necessity of expand the studies to other species and populations, to get more evidences about the mechanisms of chromosomal evolution in the group.

Keywords: Ag-NORs, C-banding, chromosomes, karyotype evolution

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Indivíduos das espécies de *Hypsiboas* analisadas no presente estudo: A) *H. albomarginatus*; B) *H. crepitans*; C) *H. faber*; d) *H. pombali*

Figura 2 - Mapa do Estado da Bahia. À direita, os locais de coleta em destaque: 1) Municípios de Jequié (Chácara Alvorada e distrito de Florestal) e Maracás (Lagoa dos eucaliptos); 2) Região de Barra do Tajuípe (Reserva da Natureza) e 3) Município de Santa Cruz Cabrália (Reserva CEPLAC).


Figura 3 - Mapa do Estado do Espírito Santo. À direita, o local de coleta em destaque: município de Santa Teresa.

Figura 4 - Cariótipos submetidos à coloração convencional com Giemsa: A) *H. albomarginatus* de Santa Cruz Cabrália; B) *H. albomarginatus* de Florestal; C) *H. albomarginatus* de Maracás; D) *H. albomarginatus* de Santa Teresa; E) *H. crepitans* de Jequié; F) *H. crepitans* de Florestal; G) *H. crepitans* de Maracás; H) *H. faber* de Santa Cruz Cabrália; I) *H. faber* de Florestal; J) *H. pombali* da reserva Natureza.

Figura 5 – Cromossomos nucleolares de A) *H. albomarginatus* de Santa Cruz Cabrália; B) *H. albomarginatus* de Florestal; C) *H. albomarginatus* de Santa Teresa; D) *H. albomarginatus* de Maracás; E) *H. crepitans* de Jequié; F) *H. crepitans* de Florestal; G) *H. crepitans* de Maracás; H) *H. faber* de Santa Cruz Cabrália; I) *H. faber* de Florestal; J) *H. pombali* da reserva Natureza.

Figura 6 - Cariótipos submetidos a Bandamento C: A) *H. albomarginatus* de Santa Cruz Cabrália; B) *H. albomarginatus* de Florestal; C) *H. albomarginatus* de Maracás; D) *H. albomarginatus* de Santa Teresa; E) *H. crepitans* de Jequié; F) *H. crepitans* de Florestal; G) *H. crepitans* de Maracás; H) *H. faber* de Santa Cruz Cabrália; I) *H. faber* de Florestal.

Figura 7 - Idiogramas de *Hypsiboas* submetidas a análise citogenética: 1) *H. albomarginatus* (Nunes & Fagundes; 2008); 2) *H. albomarginatus* (Carvalho *et al.*, 2009); 3) *H. albomarginatus* (Presente estudo: Barrolândia); 4) *H. albomarginatus* (Presente estudo: Florestal); 5) *H. albomarginatus* (Presente estudo: Maracás); 6) *H. albomarginatus* (Presente estudo: Santa Teresa); 7) *H. albopunctatus* (Gruber *et al.* 2007); 8) *H. atlanticus* (Carvalho *et al.* 2014); 9) *H. bischoff* (Raberet *et al.*, 2004); 10) *H. boans* (Mattos *et al.*, 2014); 11) *H. cinerascens* (Mattos *et al.*, 2014); 12) *H. crepitans* (Gruber *et al.*, 2007); 13) *H. crepitans* (Carvalho *et al.*, 2014); 14) *H. crepitans* (presente estudo: Jequié); 15) *H. crepitans* (presente estudo: Florestal); 16) *H. crepitans* (presente estudo: Maracás); 17) *H. faber* (Nunes; Fagunes, 2008); 18) *H. faber* (Carvalho *et al.*, 2009); 19) *H. faber* (presente estudo: Barrolândia); 20) *H. faber* (presente estudo: Florestal); 21) *H. geographicus* (Mattos *et al.*, 2014); 22) *H.*



guentheri (Raber *et al.*, 2004); 23) *H. lanciformis* (Mattos *et al.*, 2014); 24) *H. marginatus* (Ananias *et al.*, 2004); 25) *H. multifasciatus* (Mattos *et al.*, 2014); 26) *H. pardalis* (Nunes & Fagundes, 2009); 27) *H. polytaenius*, (Nunes & Fagundes, 2008); 28) *H. pombali* (Carvalho *et al.*, 2014); 29) *H. pombali* (presente estudo: Reserva Natura); 30) *H. raniceps* (Gruber *et al.*, 2007); 31) *H. raniceps* (Mattos *et al.*, 2014); 32) *H. semiguttatus* (Ananias *et al.*, 2004); 33) *H. semilineatus* (Nunes & Fagundes, 2008); 34) *H. semilineatus* (Carvalho *et al.*, 2014); 35) *H. wavrini* (Mattos *et al.*, 2014).

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indivíduos coletados por espécie/localidade

Tabela 2 - Fórmulas cariotípicas descritas para espécies de *Hypsiboas* após padronização das medidas cromossômicas segundo Levan *et al.*, (1964).

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



LISTA DE ABREVIACÕES

2n – Número diplóide

Ag-RON – Impregnação por nitrato de prata em região organizadora de nucléolo

Ba(OH)₂ – Hidróxido de bário

BrdU - Bromodesoxiuridina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Dr - Doutor

rDNA – Ácido desoxirribonucléico ribossomal

HCl – Ácido clorídrico

m – metacêntrico

Mp – Megapixels

MUZUSP – Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo

NF – Número fundamental

p - braço cromossômico curto

q - braço cromossômico longo

RON – Região organizadora de nucléolo

sm - submetacêntrico

SSC – Solução citrato-salina

st– subtelocêntrico

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

USP – Universidade de São Paulo



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 A classe Amphibia e a ordem Anura.....	19
2.2 A família Hylidae.....	21
2.3 O gênero <i>Hypsiboas</i>	23
2.4 A Citogenética e suas aplicações no estudo de anfíbios.....	24
2.5 Estudos citogenéticos em Hylidae e no gênero <i>Hypsiboas</i>	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivos gerais.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Espécies estudadas.....	33
4.2 Indução à mitose.....	33
4.3 Obtenção de cromossomos mitóticos.....	33
4.4 Coloração convencional e determinação cariotípica.....	34
4.5 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Bandamento C).....	35
4.6 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).....	35
4.7 Captura e edição de imagens.....	35
5 RESULTADOS.....	36
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios, grupo mais antigo de vertebrados terrestres. Apresentam grande importância ecológica, necessitando de ambientes relativamente equilibrados para sua sobrevivência e, devido à sua fragilidade, podem ser utilizados como bioindicadores da qualidade ambiental. Em decorrência de, principalmente, alterações climáticas globais, da perda de hábitat e da introdução de patógenos, estes grupo vêm sofrendo um grande declínio em suas populações, ameaçando sua manutenção nos ecossistemas.

Considerada a maior família da ordem Anura, Hylidae apresenta ampla distribuição, representando cerca de 40% dos anuros descritos no Brasil. Em consequência disto, este é o grupo mais estudado geneticamente, embora isso represente a existência de informações para menos de 30% de seus representantes.

Em geral, os hílídeos possuem hábito arborícola, e uma estrutura corporal adaptada com cabeça grande, olhos voltados pra frente fornecendo uma visão binocular, cintura delgada, pernas longas. Contudo, a presença de discos digitais adesivos aumentados na extremidade dos dígitos, é sua característica mais marcante, permitindo a fixação desses animais nos diferentes substratos.

Fazendo parte desta família, o gênero *Hypsiboas* é um dos mais representativos, sendo representado atualmente por 92 espécies descritas, das quais 56 ocorrem no Brasil (Frost, 2016). São conhecidas popularmente como rãs gladiadoras, sapos ferreiro, sapos martelo, ou simplesmente pererecas, entre outros. Essas espécies estão distribuídas em sete grupos morfológicos – *Hypsiboas albopunctatus*, *Hypsiboas benítezi*, *Hypsiboas faber*, *Hypsiboas pellucens*, *Hypsiboas pulchellus*, *Hypsiboas punctatus* e *Hypsiboas semilineatus* baseados numa série de similaridades morfológicas e sinapomorfias moleculares.

Hypsiboas está distribuído desde a América Central, ao sul da Nicarágua até a Argentina, incluindo Trinidad e Tobago, entretanto, ainda que largamente distribuído e que possua um número expressivo de espécies, é um gênero pouco estudado citogeneticamente, o que dificulta o estabelecimento de padrões cariotípicos nos grupos do gênero e a elucidação dos conflitos taxonômicos.

Assim, o presente trabalho traz informações inéditas obtidas através da aplicação de técnicas citogenéticas em dez populações de quatro diferentes espécies de *Hypsiboas*, realizando inferências sobre a evolução cariotípica no gênero e trazendo informações sobre as divergências citogenéticas dentro e entre as populações estudadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A classe Amphibia e a ordem Anura

A classe Amphibia constitui grupo basal dos vertebrados terrestres, possuindo como principais características a epiderme glandular e a dependência da água para completar seu ciclo de vida (Hickman *et al.* 2004, Storer *et al.* 1989; Romer & Parsons, 1985), diferindo fundamentalmente de outros vertebrados terrestres (répteis, aves e mamíferos) pela vida bifásica. Neste grupo, larvas e adultos são geralmente bastante distintos, com diferentes formas, modos de locomoção e alimentação (Carroll, 2007). Apresenta distribuição cosmopolita, com presença de espécies em praticamente todos os continentes, estando ausentes apenas na Antártida, na maioria das ilhas oceânicas remotas, e locais extremamente desérticos (Zug, 2014).

O número de espécies de anfíbios conhecidas cresceu cerca de 50% desde 1985, sendo atualmente 7.487 (Frost *et al.*; 2016). Este fato deve-se ao aumento da facilidade de coleta em locais remotos e um significativo crescimento das comunidades científicas (Hickman *et al.*, 2004). No entanto, concomitante a esse aumento, percebe-se um declínio global na população desta classe, o que se deve aos mais diversos fatores, principalmente devido aos efeitos de ações antrópicas (Domenico, 2008).

Os representantes da classe Amphibia são divididos em três ordens, propostas com bases em caracteres que envolvem, principalmente, especializações locomotoras. São elas: Gymnophiona (cecílias); Urodela (salamandras) e Anura (sapos, pererecas e rãs) (Pough *et al.*, 2008). A representatividade de cada um destes grupos é bastante diversa, com Gymnophiona sendo a classe menos expressiva, com aproximadamente 200 espécies; Urodela, por sua vez, possui atualmente 698 espécies descritas. Dentro de Amphibia, Anura é a ordem mais representativa, com 6.583 espécies (Frost, 2016).

Estas três linhagens possuem formas corporais distintas, mas são identificadas como uma linhagem evolutiva monofilética devido a diversos caracteres derivados compartilhados, como: (1) estrutura do tegumento e importância das trocas gasosas cutâneas, com presença de glândulas mucosas que mantêm o tegumento úmido; (2) presença de área sensorial, a *papilla amphimiorum*, para detecção de frequências sonoras; (3) complexo *operculum-columella*, envolvido na transmissão de sons para a orelha interna; (4) bastonetes verdes, um tipo distinto de célula retiniana; (5) dentes pedicelados, nos quais a coroa e a base (pedicelo) são compostas por dentina e separadas por tecido conjuntivo fibroso; e (6) estrutura do músculo

levatos bulbi, que faz os olhos se tornarem salientes, aumentando a cavidade bucal (Pough *et al.*, 2008).

Dentre os anfíbios, os anuros mostram maior diversidade em ambientes tropicais úmidos. Salamandras habitam principalmente no Hemisfério Norte e são mais abundantes em florestas de altitude e úmidas. No entanto, as salamandras sem pulmões são diversas nas florestas tropicais montanhosas úmidas do México, América Central e América do Sul. Cecílias são encontradas em na região úmida dos trópicos, incluindo África, América e Ásia (Zug, 2014).

No Brasil a classe Amphibia está representada por 1.026 espécies, sendo que aproximadamente 1.000 destas são da ordem Anura, distribuídos nos diversos domínios morfoclimáticos existentes no país (Segalla *et al.*, 2014). Esta é a ordem dos anfíbios mais familiares para a maioria das pessoas (Pough *et al.*, 2008). Conhecidos há 150 milhões de anos, sapos, rãs e pererecas, como os anuros são popularmente conhecidos, ocupam uma grande variedade de habitats (Hickman *et al.* 2004) e diferem-se dos outros anfíbios pela capacidade especializada de saltar. Esta especialização inclui um encurtamento do corpo, a ausência de cauda no adulto e presença de longas e poderosas patas traseiras (Duellman & Rodrigues, 1994; Pough *et al.*, 2008).

A ordem Anura é um grupo diversificado, subdividindo-se em três subordens baseadas em características morfológicas, como número de vértebras, estrutura do cinturão peitoral e estrutura dos girinos, a saber: 1) Archaeobatrachia, com quatro famílias (Ascaphidae, Bombinatoridae, Discoglossidae, Leiopelmatidae); 2) Mesobatrachia, com seis famílias (Megophryidae, Pelobatidae, Pelodytidae, Pipidae, Rhinophrynidae, Scaphiopodidae); e 3) Neobatrachia, a subordem mais especializada, englobando cerca de 95% de todas as espécies da ordem, composta por 19 famílias (Allophrynidae, Amphignathodontidae, Arthroleptidae, Brachycephalidae, Bufonidae, Centrolenidae, Dendrobatidae, Heleophrynidae, Hemisotidae, Hylidae, Hyperoliidae, Leptodactylidae, Mantellidae, Microhylidae, Myobatrachidae, Ranidae Rhacophoridae, Rhinodermatidae, Sooglossidae) (Ford; Cannatella, 1993; Frost *et al.*, 2006).

Os anfíbios anuros apresentam variados modos de reprodução, como ovos e formas larvais aquáticas, deposição de ovos em local úmido, ovoviviparidade e viviparidade, sendo a fertilização externa a mais frequente (Duellman & Rodrigues, 1994). Alguns anuros, como o *Ascaphus truei*, têm uma extensão da cloaca, que é utilizada para introduzir o esperma na cloaca da fêmea, o que caracteriza a fecundação interna. Também foi demonstrada no *Eleutherodactylus coqui*, o que sugere que este tipo de fecundação ocorra em espécies que desovam em ambiente terrestre (Pough *et al.*; 2008).

Os períodos de reprodução em Anura estão normalmente relacionados a fatores como pluviosidade, temperatura, umidade e à disponibilidade de ambientes aquáticos temporários (Ávila & Ferreira 2004; Thomé & Brasileiro 2007). Estes eventos caracterizam o tipo de reprodução, que pode ser explosiva, cujos eventos reprodutivos ocorrem por apenas alguns dias; ou de reprodução prolongada, cuja duração excede este período (Wells, 1977). Muitas espécies desta ordem apresentam cuidado parental, desempenhando funções como a vigília dos ninhos e transporte dos ovos e girinos para a água. Este papel pode ser tanto paternal quanto maternal ou até biparental (Beck, 1998).

No Brasil os estudos envolvendo anuros foram concentrados na Amazônia, em florestas semidecíduais das regiões Sudeste e Sul e Mata Atlântica. Em outras regiões, como a Caatinga, esta ordem permanece praticamente desconhecida (Bertoluci *et al.*, 2007).

2.2 A família Hylidae

Hylidae é a maior família de Anura, contando com 953 espécies descritas. Sua ampla distribuição ocorre nas Américas do Norte do Sul, Índia Ocidental, Austrália/Papua-Nova Guiné e Eurásia, incluindo o extremo norte da África e os arquipélagos japoneses (Frost, 2016). Estes anuros são extremamente variáveis no tamanho (1,7-14 cm de comprimento), com dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos. Também apresentam variação na aparência, mas a presença de discos adesivos arredondados nas pontas dos dedos maioria das espécies os diferencia facilmente (Lima, 2005).

Além disso, apresentam cartilagem intercalada entre a penúltima e a última falange dos dígitos em forma de garra e mais larga na base. Os discos digitais, juntamente com a cartilagem intercalar, auxiliam a função de escalada. A maior parte dos membros desta família é arborícola. No entanto, alguns são aquáticos na fase adulta; outros são bromelícolas, alguns vivem em bambus gigantes e apenas um gênero apresenta hábito fossorial (Lutz, 1968).

Duellman (1970), um dos primeiros a propor a organização da família Hylidae, a subdividiu em quatro subfamílias: Hylinae, Hemiphractinae, Phyllomedusinae e Amphignathodontinae. Posteriormente, Trueb (1974) associou Amphignathodontinae e Hemiphractinae, conservando apenas o último táxon.

Com base em evidências de estudos previamente publicados, Duellman (1970) alocou todos os Hylídeos da Austrália em uma única subfamília, denominada Pelodyadrine. Defendeu, ainda, o monofiletismo de Hylidae, agora com quatro subfamílias, sugerindo como sinapomorfias a presença de falanges terminais em forma de garra e as três superfícies

articulares no metacarpo III (Duellman, 2001). Desde então Hylidae tem passado por ativas revisões. Recentemente o monofiletismo deste grupo foi questionado com base em dados moleculares que sugerem que Hemiphractinae não está filogeneticamente relacionado a Hylinae, Phyllomedusinae e Pelodyadinae (Haas, 2003; Darst; Cannatella, 2004).

Em 2005, foram propostas mudanças na organização do grupo, principalmente na subfamília Hylinae, com a alocação de 15 novos gêneros, dos quais quatro já eram conhecidos, quatro foram revalidados e seis foram descritos. Esta reestruturação foi baseada em estudos filogenéticos envolvendo genes mitocondriais (12S, tval, 16S e citocromo b), genes nucleares (rodopsina, tirosinase, RAG-1, S7 e 28S) e estudos morfológicos da musculatura do pé (Faivovich *et al.* 2005).

A partir dos dados moleculares obtidos neste estudo, foi constatada distância filogenética entre Hemiphractinae e as outras subfamílias de Hylidae, cujo monofiletismo foi corroborado. Desta forma, Hemiphractinae foi excluída do grupo, que compreende atualmente três subfamílias, sendo: Hylinae (685 espécies), com distribuição na Austrália e Papua Nova Guiné, Pelodyadinae (208 espécies) e Phyllomedusinae (60 espécies), com ampla distribuição principalmente na região Neotropical que se estende do Sul do México ao extremo sul da Argentina (Faivovich *et al.*, 2005). No Brasil, Hylidae é representada por 338 espécies situadas em 27 gêneros, correspondendo a quase 40% do total de anuros descritos no país (Oliveira *et al.*, 2010; Frost, 2016).

As três subfamílias de Hylidae apresentam sinapomorfias que garantem o monofiletismo de cada uma delas. Para Pelodyadinae, a única sinapomorfia possível é a presença de elementos apicais suplementares do músculo intermandibular (Tyler, 1971). O monofiletismo deste grupo foi apoiado por estudos moleculares recentes que apresentaram evidências a partir dos genes mitocondriais e ribossomais (Darst; Cannatella, 2004; Hoegg *et al.*, 2004).

O monofiletismo de Phyllomedusinae é suportado por diversas sinapomorfias, como elementos suplementares posterolaterais do músculo intermandibular; tendão superficial do dígito II surgindo de um músculo profundo, triangular que se origina no tarsal distal 2-3 e tendão superficial pro dígito III surgindo das aponeuroses plantares. Existem ainda caracteres larvais que apóiam o monofiletismo deste grupo (Faivovich *et al.*, 2005).

Estudos recentes fazem analogia entre elementos proposto apicais e pótero complementares da musculatura submandibular de hylídeos, estabelecendo, conseqüentemente, homologia com os elementos apicais reportados para Pelodyadinae e Phyllomedusa, constatando que as extensas semelhanças morfológicas e de desenvolvimento

dos elementos apicais indicam a presença destes elementos é um sinapomorfia de Phyllomedusinae + Pelodyadinae (Faivovich *et al.*, 2011).

Hylinae, por sua vez apresenta como caracteres em comum um tendão superficial do dígito V adicional longo, além de cariótipo com cerca de 24 cromossomos (Duellman, 1970). Após a revisão sistemática realizada em 2005, o grupo passou por uma reorganização taxonômica monofilética, sendo dividida em quatro tribos, sendo o gênero *Hypsiboas* é revalidado para incluir todas as espécies dos grupos *Hyla albopunctata*, *H. boans*, *H. geographica*, *H. granosa*, *H. pulchella*, and *H. punctata*, e do complexo de espécies *H. albomarginata* (Faivovich *et al.*, 2005).

2.3 O gênero *Hypsiboas*

O gênero *Hypsiboas* foi revalidado a partir da reorganização do gênero *Hyla*, realizado a partir de dados moleculares que evidenciaram o seu monofiletismo (Faivovich *et al.*, 2005). Conta atualmente com 92 espécies descritas (Frost, 2016). Por ser taxonomicamente complexo, tendo sido recentemente alvo de estudos morfológicos e genéticos que promoveram a realocação de muitas de suas espécies em outros gêneros (Faivovich *et al.*, 2005).

Sua distribuição vai desde a região tropical da América Central (incluindo Trinidad e Tobago) até a América do Sul (Frost, 2014). No Brasil, está distribuído principalmente em áreas de Mata Atlântica, Cerrado adjacente à Caatinga e formações de Cerrado, ocorrendo também na Floresta Amazônica, podendo ser encontrados em todos os morfoclimas brasileiros (Faivovich *et al.*, 2005).

As 92 espécies de *Hypsiboas* descritas são diagnosticadas por 33 transformações na proteína nuclear e mitocondrial e nos genes ribossomais e foram distribuídas em sete grupos morfológicos, a saber: *H. benitezi*, *H. punctatus*, *H. semilineatus*, *H. pellucens*, *H. albopunctatus*, *H. faber* e *H. pulchellus* (Frost, 2016; Faivovich *et al.*, 2005).

O grupo *H. benitezi* é composto por sete espécies que compartilham como característica comum a presença de uma glândula mental plana em machos (Faivovich *et al.* 2005); o grupo *H. punctatus*, por sua vez, é composto por oito espécies de pererecas pequenas, verdes e com membranas interdigitais reduzidas, segundo Cochran; Goin (1970), apesar de Faivovich *et al.* (2005) não indicarem qualquer sinapomorfia morfológica para este grupo sendo as espécies foram agrupadas neste caso de acordo com características moleculares.

O grupo *H. semilineatus* é composto por seis espécies e a possível sinapomorfia deste grupo é a presença de membranas reticuladas nas pálpebras, além das sinapomorfias moleculares encontradas por Faivovich *et al.* (2005); já o grupo *H. pellucens* agrupa três espécies que compartilham características em comum em relação aos marcadores moleculares, uma vez que não foram encontradas evidências morfológicas comuns para as espécies deste grupo (Faivovich *et al.*, 2005).

O grupo *H. albopunctatus* é composto por nove espécies que compartilham as características: forma do corpo, falta do tubérculo do metatarso e presença de membranas interdigitais apenas na base dos dedos (Cochran 1955), apesar de Faivovich *et al.* (2005) encontrarem apenas características moleculares em comum para este grupo e nenhuma evidência de sinapomorfias morfológicas; o grupo *H. faber* envolve oito espécies que foram agrupadas de acordo com sinapomorfias moleculares. Por fim, o grupo *H. pulchellus*, com trinta espécies é composto por espécies que possuem seu monofiletismo suportado por evidências moleculares (Faivovich *et al.*, 2005; Mattos *et al.*, 2014).

Apesar das sugestões para sinapomorfias realizadas por diversos autores, não há na literatura bases para o estabelecimento de sinapomorfias morfológicas para o gênero, que inclui atualmente todas as espécies anteriormente incluídas no *Hyla albopunctata*, *H. boans*, *H. geographica*, *H. granosa*, *H. pulchella* e grupos de espécies *H. punctata*, o complexo *H. albomarginata* (todas anteriormente do gênero *Hyla*) e várias espécies anteriormente não atribuídas a nenhum grupo (Faivovich *et al.*, 2005).

2.4 A citogenética e sua aplicação no estudo de anfíbios

A citogenética é um campo de estudo que tem permitido investigações em sistemática de diversos grupos através da análise de variações cromossômicas de maneira isolada ou em associação a outras técnicas, O desenvolvimento de pesquisas utilizando esta técnica permite a formulação de hipóteses sobre a evolução e filogenia de diferentes grupos taxonômicos (Lourenço, 1996).

De modo geral, citogenética é capaz de evidenciar alterações cromossômicas significativas que resultam em diversidade genética, auxiliando na compreensão entre gêneros e espécies, esclarecendo processos de especiação (White, 1978) ou auxiliando na diferenciação de espécies morfológicamente semelhantes. Além disso, auxilia na detecção de cromossomos sexuais, cuja presença/ausência separa espécies e cuja dinâmica evolutiva difere dos autossomos (Venezuela *et al.*, 2014).

Esse ramo da genética consiste no estudo da estrutura e função da célula, especialmente dos cromossomos, através da coloração dos cromossomos e da utilização de marcadores diferenciais ou para localização de regiões específicas. Inicialmente o principal método utilizado foi a coloração convencional com Giemsa (Morescalchi, 1967), a partir da qual muitos mecanismos de evolução cariotípica foram propostos (Lourenço, 1996).

A partir da década de 1970 foram desenvolvidos métodos e técnicas que promoveram a marcação diferencial dos cromossomos, facilitando sua identificação. Além disso, foram desenvolvidos procedimentos de localização de regiões específicas, como no caso do Bandamento C, que evidencia regiões de heterocromatina, e a impregnação por Nitrato de Prata, que localiza as regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) (Guerra 1988; Sumner, 2003; Kasahara, 2009;). Variações na estrutura cariotípica, bem como nas RONS (regiões organizadoras de nucléolo) e na localização da heterocromatina têm sido detectados com eficiência através destas técnicas de citogenética, em diversos outros organismos, inclusive humanos (ver Bucci-Innocenti *et al.*, 1983; Garcia *et al.*, 2005; Hüçük *et al.*, 2015).

Muitas destas técnicas têm sido aplicadas para o esclarecimento da estrutura das RONS, para determinar o envolvimento da heterocromatina na evolução de anfíbios e para enriquecer o conhecimento sobre a composição da heterocromatina (Vitelli *et al.*, 1982). As RONS, em particular, têm sido amplamente utilizadas como importantes marcadores na evolução cariotípica de diversos organismos. O número e a posição destes sítios são características de espécies ou de populações. Em anfíbios anuros, a análise das RONS através da impregnação por nitrato de prata tem demonstrado que a maioria das espécies possui apenas um par de RONS, apesar de alguns estudos terem demonstrado a presença de RONS múltiplas (Lourenço *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2014).

Todos os grupos que compõem a classe Amphibia compartilham algumas características citogenéticas, ao tempo em que mantêm outras específicas para cada ordem. No entanto ainda são escassos os estudos citogenéticos para esta classe, sendo que a grande maioria dos estudos realizados refere-se à ordem Anura, com foco na determinação da sua filogenia sob o ponto de vista citotaxonômico, além da definição dos mecanismos de determinação sexual (Venu *et al.*, 2011).

Em Gymnophiona, ordem menos estudada pela citogenética, com apenas 15% das espécies analisadas citogeneticamente, o número cromossômico varia de $2n = 20$ a 42, apresentando cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (Venu *et al.*, 2011). Algumas espécies apresentam diferenciação sexual (Venu & Venkalachalaiah, 2005), o que é menos comum em Anura. Dentre os escassos estudos citogenéticos para a ordem, pode-

se observar como característica comum a presença de blocos heterocromáticos na região adjacente ao centrômero como um padrão para o grupo (Venu; 2014), além de uma enorme variação interespecífica nos padrões de Bandamento C (Venu & Venkalachalaiah, 2013).

As RONS em Gymnophiona são localizadas em um único par cromossômico e são conservadas, características aparentemente plesiomórficas compartilhadas pelos anfíbios de modo geral (Venu & Venkalachalaiah, 2013; King *et al.*, 1990; Schmid *et al.*, 1990).

A ordem Caudata tem como principais características citogenéticas o número diplóide $2n=22-28$, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos em 60% das famílias descritas. No entanto, ocorrem algumas exceções, com variações significativas na forma e número dos cromossomos, que podem chegar a $2n=78$. Nesta ordem a poliploidia é comum (ao contrário de Anura e Gymnophiona) sendo esporadicamente observada em quase todos os grupos (Sessions, 2007).

Esta ordem apresenta heteromorfismo cromossômico e cromossomos sexuais em algumas espécies (Paris *et al.*, 1993). Além disso, apresenta também blocos heterocromáticos na região do centrômero e regiões intersticiais. Apresenta, ainda, RONS simples e homomórficas (Silva *et al.*, 2014).

As RONS são geralmente intraespecificamente conservadas em anuros, fazendo desta região um importante marcador espécie-específico, apesar da grande variabilidade entre as espécies mesmo de grupos próximos (Lourenço *et al.*, 1998). Este grupo pode apresentar RONS simples, o que ocorre na maioria das espécies estudadas; RONS múltiplas, ou RONS heteromórficas, variando quanto ao tamanho, localização ou distribuição dentro do complemento cromossômico (Barth *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2014; Mattos *et al.*, 2014).

Por outro lado, o Bandamento C tem evidenciado padrões distintos de distribuição de heterocromatina entre as famílias, gêneros e espécies (Catroli & Kasahara, 2009; Carvalho *et al.*; 2014; Mattos *et al.*, 2014). Estas variações foram atribuídas aos diferentes ambientes ocupados pelas populações. Embora os autores não atribuam estas diferenças a formas taxonomicamente diversas, elas referem-se a diferenças relativas à morfologia externa, comportamento reprodutivo e bioacústica entre os animais que ocorrem em diferentes localidades geográficas (Arruda & Morielle-Versute, 2008).

Neste contexto, fica evidente que a citogenética constitui importante ferramenta e sua aplicação é cada vez mais importante para estudos de filogenia, taxonomia, mecanismos de especiação e evolução (Catroli, 2008).

2.5 Estudos citogenéticos em Hylidae e no gênero *Hypsiboas*

A estrutura cariotípica da família Hylidae tem sido descrita com número diploide $2n = 24$, com algumas variações, incluindo reduções e poliploidias ($2n = 22-48$) (Nunes & Fagundes, 2008). Seus representantes apresentam não somente mesmo número diplóide, mas compartilham ainda uma morfologia cromossômica bastante uniforme, com cromossomos predominantemente metacêntricos e submetacêntricos. Sendo assim, apresentam geralmente $NF = 48$ (Catroli & Kasahara, 2009).

A subfamília Hyliinae, dividida em quatro tribos (Cophomantini, Lophiohilini, Hylinie Dendropsophini), compartilha as características cromossômicas da família. No entanto, cada tribo tem peculiaridades no que se refere ao número diplóide e frequência de supranumerários (Catroli & Kasahara, 2009). Além disso, a comparação entre cromossomos desta subfamília submetidos a BrdU com $2n = 24$, pertencentes ou não ao mesmo gênero, demonstrou um alto grau de correspondência nos padrões de bandamento (Kasahara *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2007).

A tribo Dendropsophini apresenta número cariotípico variando entre $2n = 24$ e $2n = 28$ (ex: *Pseudis cardosoi*). Além disso, no gênero *Dendropsophus* o padrão para número diplóide de $2n = 30$, com presença de supranumerários em algumas espécies (Foresti, 1972; Medeiros *et al.*, 2006). Em Lophiohilini, por sua vez, apesar da manutenção do padrão para o número diplóide na maioria das espécies, algumas exceções no gênero *Osteopilus* apresentam número diplóide maior (*Osteopilus brunneus* $2n = 34$) (Catroli & Kasahara, 2009).

Quase todas as espécies da tribo Hylini possuem também $2n=24$. No entanto, algumas espécies de *Anotheca* apresentam redução para $2n = 22$. Os gêneros *Bromeliohyala*, *Enomiohyala* e *Megastomatohyala* não possuem dados cariotípicos publicados (Catroli & Kasahara, 2009).

Dentre os componentes da tribo Cophomantini (*Hypsiboas*, *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus* e *Myersiophyla*) o cariótipo padrão apresenta 24 cromossomos. Exceções foram encontradas em *Aplastodiscus* ($2n = 18-22$). Em *Bokermannohyla* e *Hypsiboas* variações foram encontradas, incluindo cromossomos supranumerários (Baldissera-Jr *et al.*, 1993; Gruber *et al.*, 2007). Para *Hyloscirtus* e *Myersiophyla* não descrição de dados citogenéticos (Catroli & Kasahara, 2009).

No gênero *Hypsiboas*, apesar do número expressivo de espécies, são escassos os estudos citogenéticos. No Brasil apenas 20 espécies foram descritas citogeneticamente, equivalendo acerca de 25%, sendo que para 6 espécies foram publicadas apenas descrição da

morfologia cariotípica e localização das RONS (para revisão ver Carvalho *et al.*, 2014). A maior parte destas espécies é do grupo *H. puchellus*, que por sua vez abrange o maior número de espécies dentre os grupos morfológicos do gênero. Não há estudos citogenéticos no Brasil para os grupos *H. benitezi* e *H. pellucens* Nunes & Fagundes.

As espécies estudadas apresentam geralmente número diploide $2n = 24$, sendo que apenas *H. albopunctatus* e *H. lanciformis* apresentam uma redução para $2n = 22$ (Gruber *et al.*, 2007; Mattos *et al.*, 2014). Cromossomos supranumerários não são comuns no gênero, assim como para a ordem Anura em geral, sendo descrito apenas para *H. albopunctatus* (Gruber *et al.*, 2007). Além disso, não foram encontrados nos estudos realizados cromossomos sexuais (Carvalho *et al.*, 2014).

Apesar dos escassos relatos disponíveis para o gênero, é possível determinar que a maioria das espécies submetidas ao Bandamento C apresentam heterocromatina na região adjacente ao centrômero. Além disso, são comuns extensões para os braços cromossômicos, podendo ainda apresentar, embora com menor frequência e geralmente nos cromossomos maiores, blocos heterocromáticos na porção terminal (Carvalho *et al.*, 2014).

As RONS geralmente são homomórficas, localizando-se em um único par cromossômico, com exceção de *H. atlânticus* e *H. lanciformis*, em que foi observada a presença de RONS múltiplas (Carvalho *et al.*, 2014; Mattos *et al.*, 2014) e de *H. albomarginatus*, que apresentou RONS heteromórficas (Carvalho *et al.*, 2009). Além disso, variações na localização da RON foram encontradas em populações de *H. crepitans*, o que reforça a hipótese de que se trata de um complexo de espécies (Carvalho *et al.*, 2014).

Em seus estudos, Carvalho *et al.* (2014) realizaram uma revisão dos dados cromossômicos disponíveis para *Hypsiboas*, padronizando o sistema utilizado para classificação dos grupos cromossômicos, permitindo assim uma melhor comparação da macroestrutura cromossômica entre as espécies e populações.

Através dessa comparação os autores propuseram marcadores cromossômicos para algumas espécies e observaram padrões de microestrutura cariotípica semelhantes em espécies geograficamente relacionadas, levantando a hipótese que a organização da microestrutura cromossômica em *Hypsiboas* sofre influência geográfica, com espécies diferentes, porém geograficamente relacionadas, apresentando maiores semelhanças nos padrões de distribuição de heterocromatina do que em suas relações filogenéticas propriamente ditas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar análise citogenética comparativa de espécies/populações de *Hypsiboas*, buscando estabelecer os mecanismos de modificação cromossômica envolvidos na diferenciação do grupo, a fim de verificar a ocorrência de diversidade críptica (Carvalho *et al.*, 2014) e contribuir para elucidar as relações evolutivas do gênero.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar espécies e populações do gênero *Hypsiboas*, provenientes de localidades dos Estados da Bahia e Espírito Santo;
- Testar a proposta de Carvalho *et al.* (2014) na qual a organização da microestrutura cromossômica em *Hypsiboas* sofre influência geográfica, verificando se esta pode ser aplicada a todas as espécies/populações do grupo;
- Contribuir para a melhor caracterização genética de *Hypsiboas*, de forma a fornecer informações que possam auxiliar na verificação da existência de complexos de espécie e futuros estudos taxonômicos e evolutivos no gênero.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Espécies estudadas

Foram realizados estudos citogenéticos em quatro espécies pertencentes ao gênero *Hypsiboas*: *H. albomarginatus*, *H. crepitans*, *H. faber* e *H. pombali*, num total de 68 indivíduos analisados (Figura 1; Tabela 1).



Figura 1: Indivíduos das espécies de *Hypsiboas* analisadas no presente estudo: A) *H. albomarginatus*; B) *H. crepitans*; C) *H. faber*; D) *H. pombali* (Fonte: Mauro Teixeira Jr)

Tabela 1 - Indivíduos coletados por espécie/localidade

Espécie	Localidade	Coordenadas	Número de exemplares	
			Macho	Fêmea
<i>H. albomarginatus</i>	Distrito de Florestal (Jequié-BA)	13°79'93.3"S/ 39°84'67,4"W	05	02
	Lagoa Dos Eucaliptos (Maracás - BA)	13°43'78"S/ 40°42'65"W	03	-
	Reserva CEPLAC (Santa Cruz Cabrália-BA)	16°26'37"S/ 39°12'23"W	06	01
	Santa Teresa-ES	19°90'73" S/ 40°55'31" W	01	12
<i>H. crepitans</i>	Chácara Alvorada (Jequié -BA)	13°51'36,1" S/ 40°02'36.8"W	10	04
	Distrito de Florestal (Jequié-BA)	13°79'93.3"S/ 39°84'67,4"W	11	05
	Lagoa Dos Eucaliptos (Maracás-BA)	13°43'78"S/ 40°42'65"W	03	01
<i>H. faber</i>	Estação Experimental Gregório Bondar (Santa Cruz Cabrália-BA)	16°26'37"S/ 39°12'23"W	06	01
	Distrito de Florestal (Jequié-BA)	13°79'93.3"S/ 39°84'67,4"W	03	02
<i>H. pombali</i>	Reserva da Natura (Serra Grande-BA)	14°25'57,4"S/ 39°01'22,3"W	03	-
TOTAL=				68

Os exemplares foram coletados em áreas de caatinga, mata de transição ou mata atlântica nos municípios de Jequié, Maracás, Uruçuca e Santa Cruz Cabrália, no estado da Bahia (Figura 2) e em Santa Teresa, no estado do Espírito Santo (Figura 3), entre setembro de 2014 e novembro de 2015.

No município de Jequié-BA as coletas ocorreram na Chácara Alvorada, na região periférica a leste da cidade e no distrito de Florestal, região de Mata, úmida, situada a 24 km da rodovia BA 547, Jequié-Apuarema. Na região do município de Maracás as coletas foram realizadas na Lagoa dos Eucaliptos.

No distrito de Serra Grande, município de Uruçuca-BA, as coletas foram realizadas na região da Barra do Tajuípe, conhecida popularmente como reserva da Natura, área particular destinada ao turismo e estudos científicos. Em Santa Cruz Cabrália, o local de coleta foi a Estação Experimental Gregório Bondar, conhecida como Reserva CEPLAC, pois sua administração é de responsabilidade da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). No estado do Espírito Santo as coletas foram realizadas no município de Santa Teresa, situado na região central do estado.

Para fins de apresentação e discussão dos resultados foram adotados como identificação dos pontos de coleta: Jequié, Florestal, Natura, Maracás, Santa Cruz Cabrália e Santa Teresa.

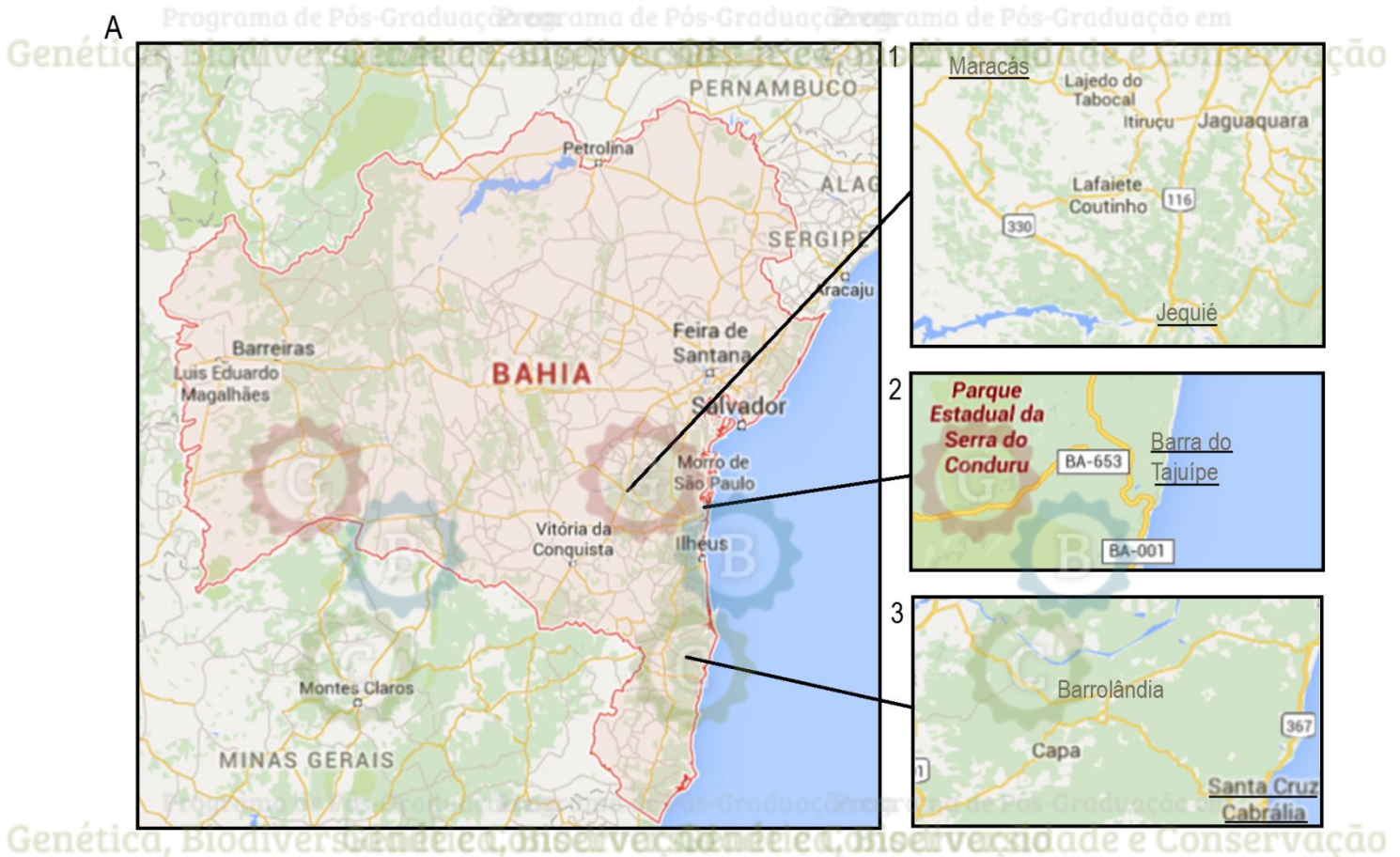


Figura 2: Mapa do Estado da Bahia. À direita, os locais de coleta em destaque: 1) Municípios de Jequié (Chácara Alvorada e distrito de Florestal) e Maracás (Lagoa dos eucaliptos); 2) Região de Barra do Tajuípe (Reserva da Natura) e 3) Município de Santa Cruz Cabrália (Reserva CEPLAC). Fonte: Google maps.

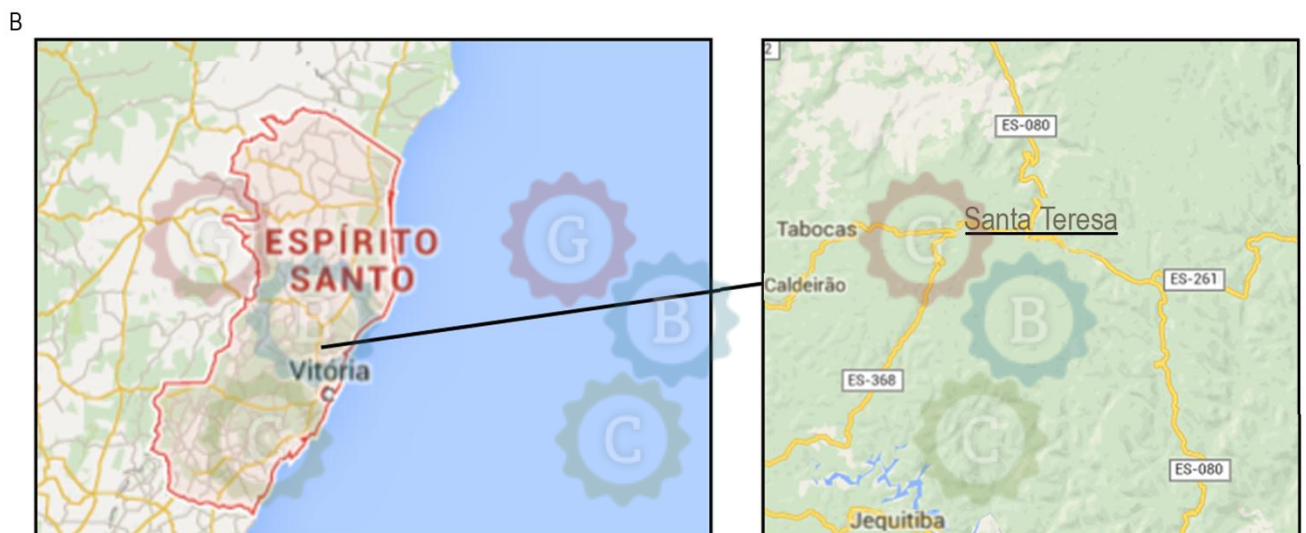


Figura 3: Mapa do Estado do Espírito Santo. À direita, o local de coleta em destaque: município de Santa Teresa. Fonte: Google maps.

As coletas e identificação dos animais foram realizadas em colaboração, sempre que possível, com a equipe do professor Dr. Miguel T. Rodrigues (USP-SP). Entre os métodos utilizados, destaca-se a busca ativa visual e por vocalização. Os espécimes coletados foram transportados em sacos e/ou potes para o acondicionamento nas dependências do laboratório de Citogenética da UESB em Jequié para posterior desenvolvimento das práticas.

Foram retiradas pequenas amostras de tecido (fígado e pulmão) para constituir o banco de tecidos. Os tecidos dos exemplares permanecerão no laboratório de Citogenética da UESB fazendo parte do banco de tecidos da Instituição.

Todos os espécimes utilizados foram fixados em formol 10% por três dias e transferidos para álcool etílico 70% para identificação, armazenamento e depósito de exemplares testemunhos em coleções herpetológicas em instituições de pesquisa qualificadas. Para isso, o laboratório conta com o apoio do professor Dr. Miguel T. Rodrigues (USP-SP) que realizou a identificação dos animais e seu depósito no Museu de Zoologia de São Paulo (MUZUSP).

4.2 Indução da mitose

Para se obter um maior número de células em metáfase, foram utilizadas técnicas para indução de mitoses utilizando uma solução concentrada de *Saccharomyces cerevisiae* em duas doses com intervalo de 24 horas entre elas, injetada na região intraperitoneal dos indivíduos, na proporção de 1 mL para cada 100g de peso do animal.

Após 48 h da aplicação da primeira dose do probiótico foi injetada colchicina *in vivo* na concentração 0,5% na região intraperitoneal do animal. Após seis horas o animal foi eutanaziado com dose letal de anestésico lidocaína a 5% na região ventral.

4.3 Obtenção de cromossomos mitóticos

A preparação cromossômica utilizada como base para o presente estudo deu-se a partir das células do epitélio intestinal. A obtenção da suspensão celular seguiu o protocolo de Schmid (1978) com adaptações.

As células intestinais foram hipotonizadas com água destilada durante o período mínimo de 20 min e máximo de 30 min, em temperatura ambiente. Em seguida o material foi fixado com 8 ml de fixador Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético), recém preparado e gelado. Após 24 horas o material foi raspado, ressuspensionado cuidadosamente com o auxílio de pipeta pauster de vidro e transferido para um tubo de centrífuga. O material foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm, descartando em seguida o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado 10 mL de fixador e o material foi ressuspensionado cuidadosamente e novamente centrifugado. Este processo foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foram adicionados 1,5 mL de fixador e o material foi ressuspensionado com cuidado. Esta suspensão celular foi armazenada em tubos de 1,5 mL, mantidas em freezer a 4°C, para posteriormente, após um período mínimo de 24 h, serem gotejadas em lâminas limpas e imersas em água destilada aquecida a 60 °C.

4.4 Coloração convencional e determinação cariotípica

Para a determinação do número e morfologia dos cromossomos, foi utilizada a coloração convencional por Giemsa (Schmid, 1978). As lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 10% por 10 min, depois lavadas em água corrente e secas ao ar. As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico e as contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram feitas com a objetiva de imersão, num aumento de 1000 vezes. As melhores metáfases foram capturadas utilizando sistema de análise de imagens e, posteriormente, os cariótipos foram montados levando-se em conta o tamanho e a posição do centrômero dos cromossomos.

A classificação cromossômica segue a proposta por Levan *et al.*, (1964) adotando-se os seguintes limites para a relação de braços (RB): RB= 1,00-1,70, metacêntrico (m); RB= 1,71-3,00, submetacêntrico (sm); RB= 3,01-7,00, subtelocêntrico (st); RB= maior que 7,00, telocêntrico (t).

Para o cálculo do número de braços cromossômicos (NF), adotamos os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como portadores de dois braços cromossômicos, e os cromossomos acrocêntricos como portadores de apenas um braço. As medições foram realizadas com o auxílio de um paquímetro e os cromossomos dispostos em pranchas, separados de acordo com seu tamanho.

4.5 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Bandamento C)

Para a detecção das regiões heterocromáticas foi utilizado o protocolo descrito por Sumner (1972), com modificações. A lâmina utilizada para a análise dos cromossomos mitóticos foi tratada com HCL 0,2N em temperatura ambiente por 13 minutos e lavada com água destilada. Após isto, a lâmina foi incubada por 50 a 60 segundos em solução de Hidróxido de Bário a 5% (filtrada e recém-preparada à 42 °C). A ação do Hidróxido de Bário foi interrompida com a imersão rápida em solução de HCL 0,2N à temperatura ambiente. A lâmina foi lavada em água destilada e incubada em solução 2xSSC a 60°C por 30 minutos e as lâminas foram posteriormente lavadas com água destilada várias vezes e deixadas para secar ao ar. As lâminas foram coradas com Giemsa a 20%, diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos e lavadas com água destilada.

4.6 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo por impregnação por nitrato de prata

A determinação das regiões organizadoras de nucléolo foi feita através da impregnação pelo nitrato de prata, seguindo o protocolo de Howell e Black (1980). A técnica consistiu no gotejamento de uma solução coloidal de gelatina com o acréscimo de ácido fórmico e Nitrato de Prata a 50% na proporção 1:2 sobre a lâmina contendo suspensão celular. Foi colocada uma lamínula por cima e em seguida, o material foi posto em uma câmara úmida a 60 °C por cerca de 3 a 8 minutos. Após a lâmina atingir a coloração marrom dourada, ela foi lavada com água destilada e a lamínula foi retirada naturalmente com a lavagem.

4.7 Captura e edição de Imagens

As preparações foram analisadas em microscópio ótico ou microscópio de epifluorescência e capturadas com 5Mp de definição através do sistema de análise de imagens CoolSnap Pro, utilizando-se para tal o programa Image Pro Plus (Media Cybernetics). Após o processo os cariótipos foram organizados com auxílio do programa Adobe Photoshop v8.0.

5 RESULTADOS

Todas as populações/espécies de *Hypsiboas* analisadas no presente estudo apresentaram $2n = 24$ cromossomos e $NF = 48$. Com exceção das populações de *H. albomarginatus* provenientes dos municípios de Santa Cruz Cabrália, Florestal e Maracás, que apresentaram a mesma constituição cromossômica, as demais populações diferiram com relação a sua fórmula cariotípica, sendo que o maior número de diferenças macroestruturais foi observado entre as populações de *H. faber* (Figura 4; Tabela 2).

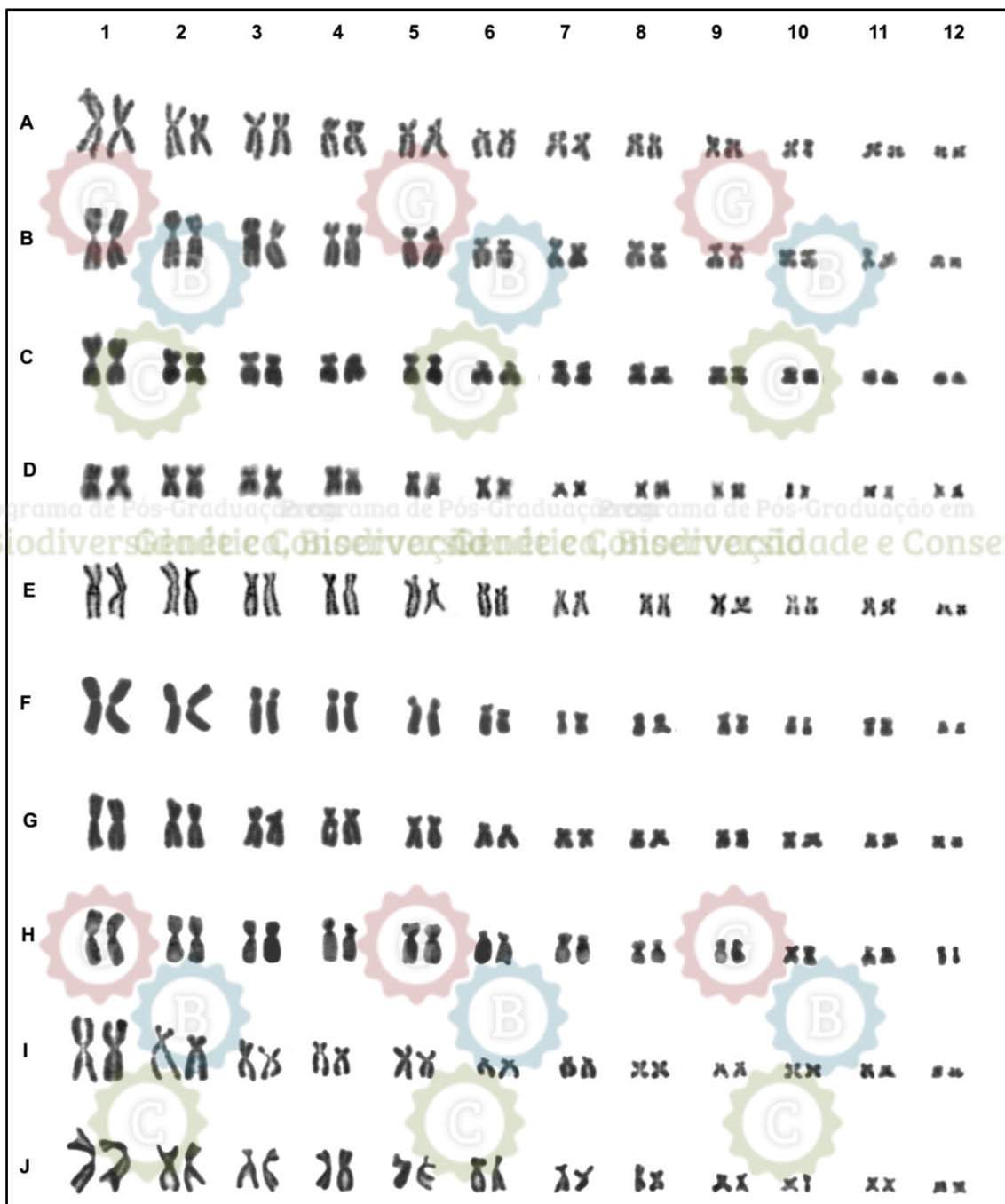


Figura 4: Cariótipos submetidos à coloração convencional com Giemsa: A) *H. albomarginatus* de Santa Cruz Cabrália; B) *H. albomarginatus* de Florestal; C) *H. albomarginatus* de Maracás; D) *H. albomarginatus* de Santa Teresa; E) *H. crepitans* de Jequié; F) *H. crepitans* de Florestal; G) *H. crepitans* de Maracás; H) *H. faber* de Santa Cruz Cabrália; I) *H. faber* de Florestal; J) *H. pombali* da reserva Natura.

A impregnação por nitrato de prata permitiu evidenciar a ocorrência de RONS simples para todos os grupos estudados. As populações de *H. faber* apresentaram RONS localizadas terminalmente nos braços longos do par 11 e em *H. pombali* sinais positivos para impregnação por nitrato de prata foram observados intersticialmente nos braços curtos do par 7. Diferenças interpopulacionais foram encontradas para *H. albomarginatus* e *H. crepitans*. Ambas as espécies apresentaram RONS intersticiais, entretanto para *H. albomarginatus*, as populações de Santa Cruz Cabrália, Florestal e Maracás apresentaram Ag-RONS nos braços curtos do par cromossômico 2, diferindo da população de Maracás, onde essas regiões mostraram-se localizadas nos braços longos do par 6 (Figura 5-A, B, C e D). No caso de *H. crepitans*, as populações provenientes de Florestal e Maracás apresentaram Ag-RONS localizadas nos braços longos do par 11, enquanto na população de Jequié essas regiões foram observadas nos braços longos do par 7 (Figura 5-E, F e G).

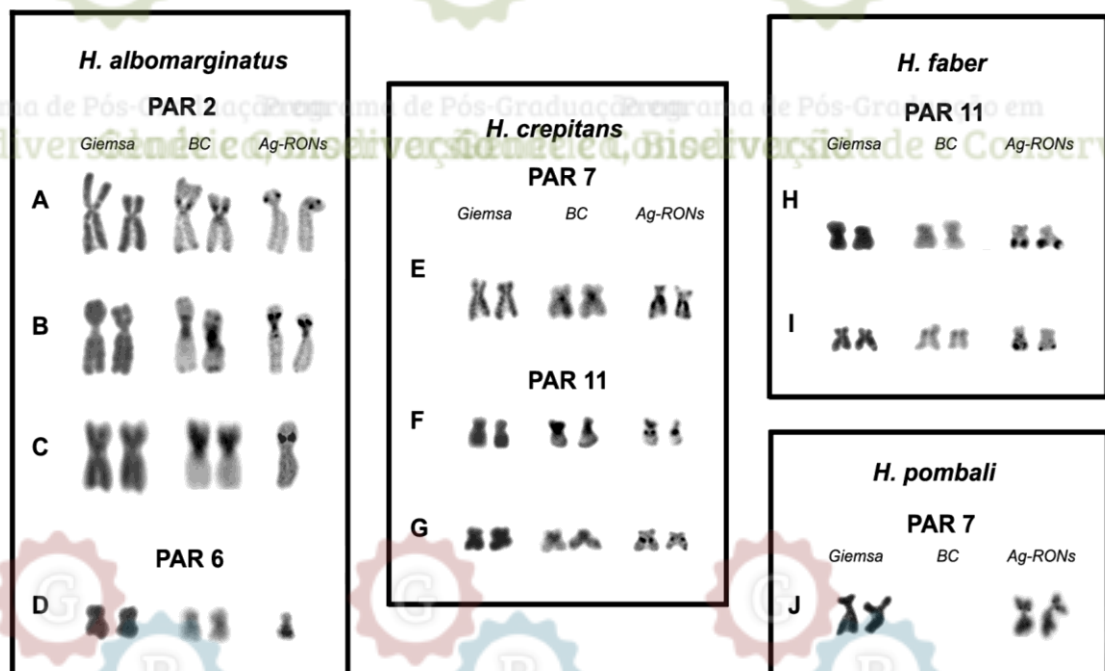


Figura 5: Cromossomos nucleolares de A) *H. albomarginatus* de Santa Cruz Cabrália; B) *H. albomarginatus* de Florestal; C) *H. albomarginatus* de Santa Teresa; D) *H. albomarginatus* de Maracás; E) *H. crepitans* de Jequié; F) *H. crepitans* de Florestal; G) *H. crepitans* de Maracás; H) *H. faber* de Santa Cruz Cabrália; I) *H. faber* de Florestal; J) *H. pombali* da reserva Natura.

O Bandamento C revelou a existência de blocos de heterocromatina constitutiva adjacentes aos centrômeros de todos os cromossomos de *H. albomarginatus*, *H. crepitans* e *H. faber*, sendo que não foi possível obter o padrão de Bandamento C para *H. pombali*. Mesmo populações com fórmula cariotípica idêntica puderam ser diferenciadas com base na quantidade e localização dos blocos heterocromáticos intersticiais e terminais. Destaca-se a presença de braços curtos totalmente heterocromáticos em *H. albomarginatus* (par 6 – populações de Santa Cruz Cabrália e Florestal; par 2 - população de Santa Tereza), *H. crepitans* (pares 6 e 10) e *H. faber* (pares 4 e 9 – população de Santa Cruz Cabrália; par 2 – população de Florestal). Todas as RONS mostraram-se eucromáticas, com exceção da população de *H. albomarginatus* de Santa Teresa (Figura 6).

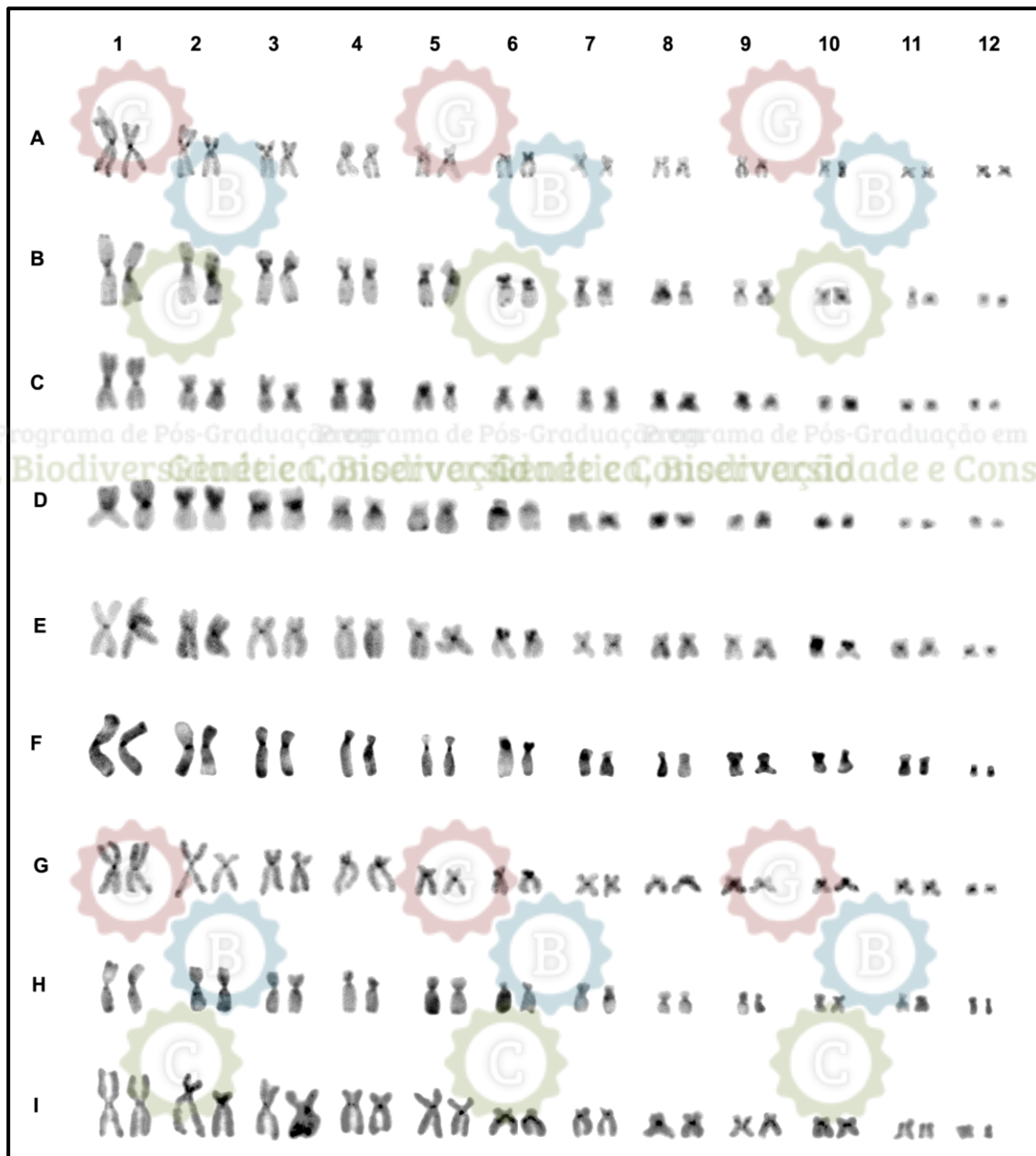
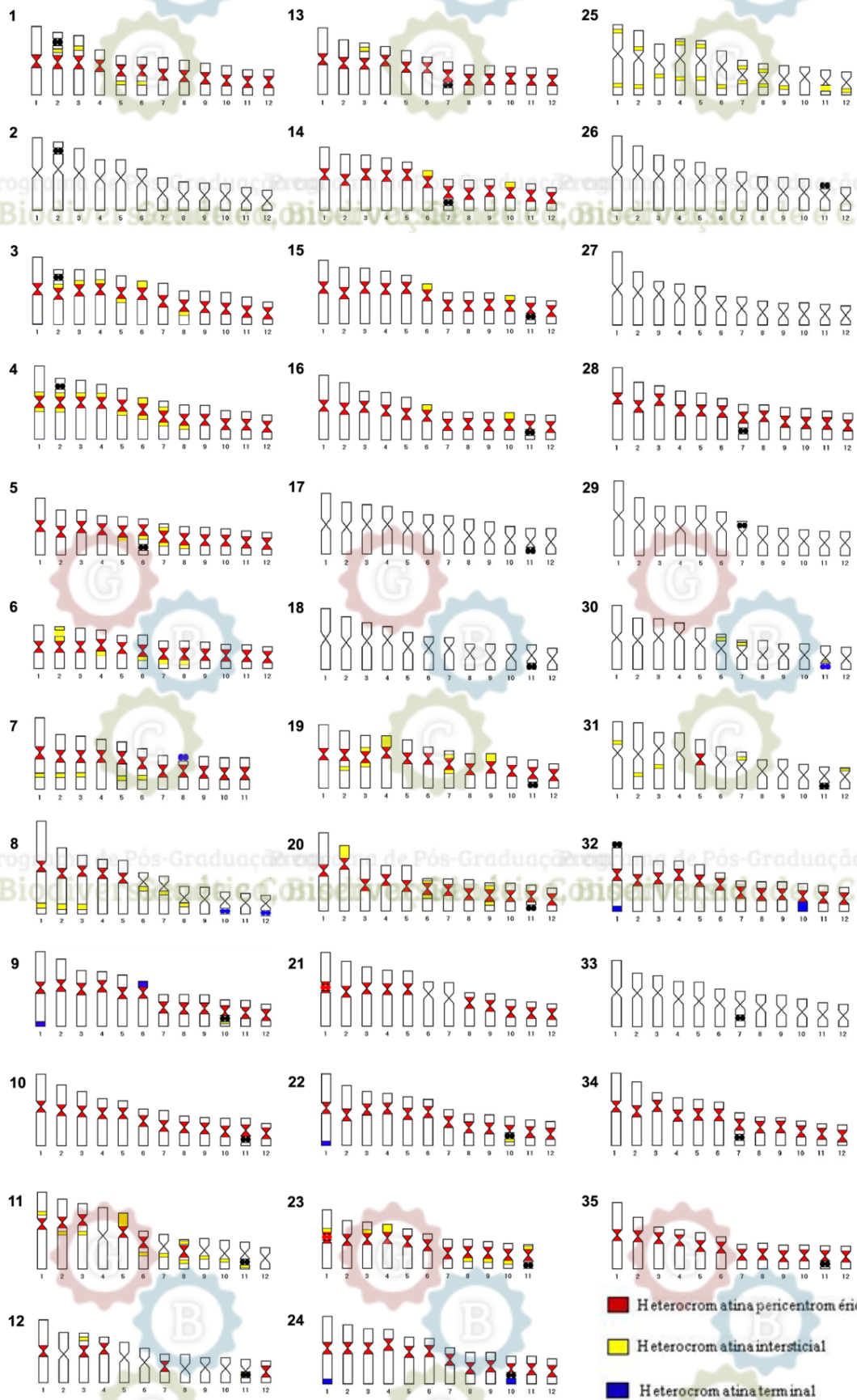









Figura 6: Cariótipos submetidos a Bandamento C: A) *H. albomarginatus* de Santa Cruz Cabrália; B) *H. albomarginatus* de Florestal; C) *H. albomarginatus* de Maracás; D) *H. albomarginatus* de Santa Teresa; E) *H. crepitans* de Jequié; F) *H. crepitans* de Florestal; G) *H. crepitans* de Maracás; H) *H. faber* de Santa Cruz Cabrália; I) *H. faber* de Florestal.

Foi realizada ainda a padronização segundo Levan *et al.*, (1960) das medidas cromossômicas dos trabalhos disponíveis na literatura para que estes pudessem ser comparados aos resultados encontrados no presente estudo. Foram identificados diferentes padrões de composição cromossômica, muitos desses compartilhados por diferentes espécies (Figura 7; Tabela 2). Com relação à macroestrutura cariotípica, pode-se observar que o primeiro par cromossômico, caracterizado como o maior par de cromossomos metacêntricos do complemento, é o único que mantém morfologia constante nas 35 populações já analisadas. Dentre os demais cromossomos, os pares 2, 10, 11 e 12 mostram-se menos variáveis, enquanto os pares 4, 5, 6 e 7 apresentaram uma maior variação morfológica devido ao posicionamento diferencial da constrição primária (Tabela 2).



-  Heterocromatina pericentromérica
-  Heterocromatina intersticial
-  Heterocromatina terminal
-  RON eucromática
-  RONS heterocromáticas
-  RONS heterocromáticas
-  RONS heterocromáticas

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

Figura 7 – Idiogramas de *Hypsiboas* submetidas a análise citogenética: 1) *H. albomarginatus* (Nunes & Fagundes; 2008); 2) *H. albomarginatus* (Carvalho *et al.*, 2009); 3) *H. albomarginatus* (Presente estudo: Barrolândia); 4) *H. albomarginatus* (Presente estudo: Florestal); 5) *H. albomarginatus* (Presente estudo: Maracás); 6) *H. albomarginatus* (Presente estudo: Santa Teresa); 7) *H. albopunctatus* (Gruber *et al.* 2007); 8) *H. atlanticus* (Carvalho *et al.* 2014); 9) *H. bischoff* (Raberet *et al.*, 2004); 10) *H. boans* (Mattos *et al.*, 2014); 11) *H. cinerascens* (Mattos *et al.*, 2014); 12) *H. crepitans* (Gruber *et al.* 2007); 13) *H. crepitans* (Carvalho *et al.*, 2014); 14) *H. crepitans* (presente estudo: Jequié); 15) *H. crepitans* (presente estudo: Florestal); 16) *H. crepitans* (presente estudo: Maracás); 17) *H. faber* (Nunes; Fagundes, 2008); 18) *H. faber* (Carvalho *et al.*, 2009); 19) *H. faber* (presente estudo: Barrolândia); 20) *H. faber* (presente estudo: Florestal); 21) *H. geographicus* (Mattos *et al.*, 2014); 22) *H. guentheri* (Raberet *et al.*, 2004); 23) *H. lanciformis* (Mattos *et al.*, 2014); 24) *H. marginatus* (Ananias *et al.*, 2004); 25) *H. multifasciatus* (Mattos *et al.*, 2014); 26) *H. pardalis* (Nunes & Fagundes, 2009); 27) *H. polytaenius*, (Nunes & Fagundes, 2008); 28) *H. pombali* (Carvalho *et al.*, 2014); 29) *H. pombali* (presente estudo: Reserva Natura); 30) *H. raniceps* (Gruber *et al.*, 2007); 31) *H. raniceps* (Mattos *et al.*, 2014); 32) *H. semiguttatus* (Ananias *et al.*, 2004); 33) *H. semilineatus* (Nunes & Fagundes, 2008); 34) *H. semilineatus* (Carvalho *et al.*, 2014); 35) *H. wavrini* (Mattos *et al.*, 2014). Fonte: Carvalho *et al.* (2014) com modificações.

Tabela 2 - Fórmulas cariotípicas descritas para espécies de *Hypsiboas* após padronização das medidas cromossômicas segundo Levan *et al.*, (1964).

Espécie (Grupo)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Referências
<i>H. albomarginatus</i> (<i>H. faber</i>)	m	m	m	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m	Carvalho <i>et al.</i> (2009)
	m	m	m	sm	sm	st	m	m	m	m	m	m	Nunes e Fagundes (2008)
	m	m	sm	sm	sm	st	m	m	m	m	m	m	Presente estudo (Santa Cruz Cabralia)
	m	m	sm	sm	sm	st	m	m	m	m	m	m	Presente estudo (Florestal)
	m	m	sm	sm	sm	st	m	m	m	m	m	m	Presente estudo (Maracás)
<i>H. albopunctatus</i> (<i>H. albopunctatus</i>)	m	m	sm	st	sm	sm	sm	m	sm	m	m	-	Gruberet <i>et al.</i> (2006)
<i>H. atlanticus</i> (<i>H. punctatus</i>)	m	m	st	st	sm	st	m	sm	m	sm	sm	sm	Carvalho <i>et al.</i> (2014)
<i>H. bischoffi</i> (<i>H. pulchellus</i>)	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	m	m	Raberet <i>et al.</i> (2004)
<i>H. boans</i>	m	m	sm	sm	st	sm	m	sm	sm	m	m	m	Mattos <i>et al.</i> (2014)
<i>H. cinerascens</i>	m	sm	st	m	sm	st	sm	sm	sm	m	sm	m	Mattos <i>et al.</i> (2014)
<i>H. crepitans</i> (<i>H. faber</i>)	m	m	sm	st	sm	sm	sm	m	m	sm	m	m	Gruberet <i>et al.</i> (2006)
	m	m	sm	st	sm	sm	sm	m	sm	m	m	m	Carvalho <i>et al.</i> (2014)
	m	m	sm	sm	st	st	sm	sm	m	sm	m	m	Presente estudo (Jequié)
	m	m	sm	sm	st	st	m	m	sm	sm	m	m	Presente estudo (Florestal)
	m	m	sm	sm	sm	st	m	m	m	m	m	m	Presente estudo (Maracás)
<i>H. faber</i> (<i>H. faber</i>)	m	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	Carvalho <i>et al.</i> (2009)
	m	m	sm	st	sm	st	st	sm	m	m	sm	m	Nunes e Fagundes (2008a)
	m	m	m	sm	sm	st	sm	m	sm	m	m	m	Presente estudo (Santa Cruz Cabralia)
<i>H. geographicus</i>	m	st	m	sm	m	st	st	m	m	m	m	m	Presente estudo (Florestal)
<i>H. geographicus</i>	m	sm	sm	sm	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	Mattos <i>et al.</i> (2014)
<i>H. guentheri</i> (<i>H. pulchellus</i>)	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	m	m	Raberet <i>et al.</i> (2004)
<i>H. lanciformis</i>	m	m	sm	st	st	sm	m	m	sm	m	m	-	Mattos <i>et al.</i> (2014)
<i>H. marginatus</i> (<i>H. pulchellus</i>)	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	m	m	Ananias <i>et al.</i> (2004)

<i>H. multifasciatus</i>	m	m	sm	sm	sm	sm	m	m	m	sm	m	m	Mattos <i>et al.</i> (2014)
<i>H. pardalis</i> (<i>H. faber</i>)	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	m	m	Nunes e Fagundes (2008a)
<i>H. polytaenius</i>	m	sm	sm	sm	sm	st	sm	m	m	m	m	m	Nunes e Fagundes (2008b)
<i>H. pombali</i>	m	m	sm	m	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	Carvalho <i>et al.</i> (2014)
<i>H. semilineatus</i>	m	m	sm	m	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	Presente estudo
<i>H. raniceps</i>	m	m	sm	st	sm	sm	sm	m	sm	m	m	m	Gruber <i>et al.</i> (2006)
(<i>H. albopunctatus</i>)	m	m	st	sm	m	sm	sm	m	m	m	sm	sm	Mattos <i>et al.</i> (2014)
<i>H. semiguttatus</i> (<i>H. pulchellus</i>)	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	m	m	Ananias <i>et al.</i> (2004)
<i>H. semilineatus</i>	m	m	st	sm	sm	st	sm	sm	sm	m	m	m	Nunes e Fagundes (2008a)
(<i>H. semilineatus</i>)	m	m	st	sm	sm	st	sm	sm	sm	m	m	m	Carvalho <i>et al.</i> (2014)
<i>H. wavrini</i>	m	sm	st	st	sm	sm	m	m	m	m	m	m	Mattos <i>et al.</i> (2014)

Legenda: m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico.



6 DISCUSSÃO

Com relação à macroestrutura cariotípica, foi possível observar um número diploide constante ($2n = 24$) com presença exclusiva de cromossomos de dois braços ($NF = 48$), independente da sua organização, com exceção de *H. lanciformis* e *H. albopunctatus*, que apresentaram número cromossômico inferior ($2n = 22$) (Gruber *et al.*, 2007; Matos *et al.*, 2014). Provavelmente, assim como os Dendrobatídeos e Ranídeos, a família Hylidae passou por eventos de redução cromossômica a partir de um ancestral com $2n=26$ cromossomos (Bogart, 1973).

Esta manutenção da estrutura cromossômica é observada de modo geral em toda a classe Amphibia, apresentando pouca ou nenhuma diferenciação longitudinal (Kasahara, 2003). A ausência de cromossomos acrocêntricos, observada em todos os cariótipos de *Hypsiboas* também é uma característica compartilhada entre anfíbios, com exceção de algumas espécies em Caudata e Gymnophiona (Sessions, 2007; Carvalho *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

Os anuros da família Hilydae geralmente mantêm o número cromossômico $2n = 24$, sendo este um marcador para a família, com exceção de algumas espécies apresentam números diplóides superiores ou inferiores, como em *Aplastodiscus leucopygius* ($2n = 18$) e em *Phyllomedusa tetraploidea* (até $2n = 52$) (Catroli, 2008). Tais variações podem estar relacionadas a dois mecanismos envolvidos na redução de número diplóide: fusões em *tandem* ou translocações envolvendo os pequenos cromossomos do cariótipo, o que poderia ter resultado também na mudança na posição das RONS (Gruber *et al.*, 2007). Além do número cromossômico reduzido, cromossomos supranumerários foram descritos também para *H. albopunctatus*, apresentando até quatro fórmulas cariotípicas diferentes (Ferro *et al.*, 2012; Gruber *et al.*, 2007).

A manutenção do padrão de morfologia para o primeiro cromossomo do complemento em *Hypsiboas*, observada após análise dos idiogramas (Figura 7) foi descrita anteriormente por Carvalho *et al.*, (2014), que ressaltaram ainda a manutenção da morfologia do cromossomo 5. No presente estudo foi possível observar que o par 5, embora em menor quantidade, também apresentou variações em sua morfologia. Por outro lado, a alta variabilidade dos cromossomos 4, 6 e 7, destacadas pelos autores, foram confirmadas no presente estudo. Esta variação, associada à manutenção do tamanho dos pares cromossômicos entre os cariótipos são evidências de que as inversões pericêntricas seriam o principal

mecanismo envolvido na diferenciação da macroestrutura cariotípica do grupo (Carvalho *et al.*, 2014).

A partir da análise comparativa entre os cariótipos foi possível constatar que apenas as espécies do grupo *H. pulchellus* analisadas compartilham padrões cariotípicos idênticos em relação à sua morfologia e organização. Além disso, os padrões de Bandamento C dentro dos grupos também evidenciam variações que confirmam processos de evolução cariotípica independentes. A partir destas evidências pode-se inferir que os dados citogenéticos não podem ser utilizados para apoiar a classificação e organização dos grupos morfológicos propostos para *Hypsiboas*.

Estudos citogenéticos em anfíbios têm demonstrado que as RONS são geralmente conservadas em anuros, fazendo desta região um importante marcador espécie-específico, apesar da grande variabilidade entre as espécies mesmo de grupos próximos (Lourenço *et al.*, 1998). De modo geral os anfíbios anuros apresentam RONS simples terminais, entretanto para *Hypsiboas* RONS simples intersticiais podem ser consideradas como uma característica plesiomórfica, e condições variantes como apomorfias (Carvalho *et al.*, 2014). Esta condição foi encontrada na maioria das espécies estudadas (Presente estudo; Ananias *et al.*, 2004; Raber *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2007; Nunes & Fagundes; 2008; Carvalho *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2014; Mattos *et al.*, 2014).

Em algumas espécies as RONS foram localizadas nas porções terminais de cromossomos menores, como no caso de *H. faber* (presente estudo, Carvalho *et al.*, 2009; Nunes & Fagundes, 2008) ou nos cromossomos maiores, como no caso de *H. albomarginatus* (presente estudo, Carvalho *et al.*, 2009; Nunes & Fagundes; 2008), *H. marginattus* e *H. semiguttatus* (Ananias *et al.*, 2004). Nas duas últimas espécies a localização da RON sugere que houve uma inversão pericêntrica, fazendo com que a RON se localizasse na região pericentromérica na primeira e na região terminal na segunda. Esta hipótese poderá ser confirmada a partir aplicação da técnica de Híbridação *in situ* Fluorescente utilizando sondas teloméricas.

Em *H. atlanticus* e *H. lanciformis*, por sua vez, foram observadas RONS múltiplas, característica exclusiva das duas espécies dentre as descritas para o gênero (Carvalho *et al.*, 2014; Mattos *et al.*, 2014). No caso de *H. lanciformis*, as RONS múltiplas são também heteromórficas, apresentando marcações em apenas um dos homólogos do cromossomo 1. Estas características foram descritas em outras espécies de hilídeos, a exemplo de *Phylomedusa bahiana*, que apresentou RONS múltiplas e heteromórficas em relação ao tamanho e *P. nordestina*, que apresentou RONS múltiplas e diferentes em relação à

localização (Barth *et al.*, 2013). De acordo com Carvalho *et al.*, (2014) no caso de *H. albomarginatus* e *H. crepitans* eventos de translocação ou transposição cromossômica com manutenção do número e do tamanho cromossômico também poderiam explicar o surgimento das RONS múltiplas, com a espécie ancestral apresentando RONS terminais em um par e por translocação ou transposição, parte dos sítios de rDNA serem transferidos para outra região, resultando em sítios múltiplos, porém menores (Figura 7).

A maioria dos anfíbios anuros, apesar de serem caracterizados por possuírem um único sítio de RON, possui um grande nível de heteromorfismo (King *et al.*, 1990). Schmidt (1982) detectou heteromorfismos nas RONS em cerca de 60% dos anfíbios estudados. A vasta maioria dos heteromorfismos envolvem a amplificação do rDNA em 1 dos homólogos. Já a possibilidade de deleção é sustentada pela presença de marca de Ag-RON em apenas 1 dos homólogos.

No entanto, a técnica de impregnação por nitrato de prata tem como limitação o fato de que em alguns casos marcações inespecíficas obtidas coincidiram com blocos heterocromáticos de natureza ácida (Sumner, 1990). Sendo assim, a utilização da técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente de rDNA do bloco 45S (correspondente às RONS) esclareceria dúvidas sobre a existência das RONS múltiplas em *H. atlanticuse* *H. lanciformis*.

Entre os indivíduos de *Hypsiboas* analisados, observou-se a presença de RONS heterocromáticas nas populações de *H. albomarginatus* (Santa Tereza-ES, presente estudo), *H. albopunctatus*, *H. atlanticus*, *H. geograficus*, *H. lanciformes*, *H. multifasciatus* e *H. raniceps* (Gruber *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2014; Mattos *et al.*, 2014), que podem ser resultado das inversões envolvendo blocos de heterocromatina, sendo este o mecanismo de rearranjo aparentemente mais comum na evolução cromossômica do grupo; transformando as regiões organizadoras de nucléolo em regiões associadas ou intercaladas por blocos heterocromáticos (Carvalho *et al.*, 2014). Merecem destaque as RONS de *H. lanciformes* e *H. geograficus* (Mattos *et al.*, 2014), que foram reveladas em região pericentromérica, fato pouco comum em Anura, mas que já foi relatado para indivíduos antes reconhecidos como *Bufo garmani*, *Bufo poweri* e *Bufo regularis* em Schmid (1978).

Variações intraespecíficas nas RONS foram encontradas ainda em *H. crepitans* (presente estudo; Carvalho *et al.*, 2014; Gruber *et al.*, 2007) e em *H. albomarginatus* (presente estudo; Carvalho *et al.*, 2009; Nunes & Fagundes; 2008). Segundo Carvalho *et al.* (2014) esses dados indicam que as RONS são marcadores cromossômicos fracos para identificar as possíveis espécies do gênero.

Considerando a localização das RONS para *H. albomarginatus*, Carvalho *et al.* (2014) sugeriram um marcador cromossômico para a espécie. No entanto, a variação da RON evidenciada no presente estudo sugere que, ou este não é um marcador válido ou esta pode ser uma espécie críptica, assim como já foi sugerido anteriormente para *H. Crepitans* (Carvalho *et al.*, 2014), *H. semiguttatus* (Antunes, 2007) e *Hypsiboas calcaratus* (Carminer e Ron, 2014), reforçando o conflito taxonômico no grupo.

O padrão de distribuição de heterocromatina é bastante variável nas espécies analisadas. No entanto, a presença de grande quantidade de heterocromatina na região pericentromérica na maioria ou em todos os cromossomos parece ser uma característica comum para o gênero (Raber *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009), com exceção de *H. multifasciatus*, que apresenta exclusivamente bandas intersticiais ao longo da maioria dos cromossomos (Mattos *et al.*, 2014). Este padrão de distribuição, segundo Carvalho *et al.* (2014) é considerado uma variação da condição ancestral, apresentando uma redução da heterocromatina pericentromérica à medida que apresenta blocos intersticiais e/ou terminais. O estabelecimento destes padrões pode estar relacionado a mecanismos de inversão pericêntrica e envolvidos na evolução cromossômica do grupo.

H. albomarginatus, por sua vez, é uma espécie que apresenta grande quantidade de heterocromatina constitutiva associada à região dos centrômeros e em regiões intersticiais. Apesar da morfologia dos cromossomos ser semelhante às outras espécies do grupo, os padrões de distribuição de heterocromatina e a localização das RONS, mostram-se bastante divergentes dos demais (Carvalho *et al.*, 2009). A partir da comparação de cinco populações (Figura 7), apesar da similaridade nos padrões de distribuição de heterocromatina, não é possível estabelecer marcadores citogênicos com base nas técnicas realizadas para a espécie.

Em *H. crepitans* as três populações com maior relação geográfica (Figura 7 - 14, 15 e 16) apresentam os braços curtos dos cromossomos 6 e 10 totalmente heterocromáticos. No entanto, nas outras populações previamente analisadas este padrão não se mantém, o que pode reforçar a hipótese de influência geográfica sobre a evolução cariotípica das espécies, bem como a ocorrência de diversidade críptica em *H. crepitans* (Carvalho *et al.*, 2014).

As regiões de heterocromatina constitutiva em *H. faber* são descritas pela primeira vez no presente estudo. Estas populações também apresentam blocos heterocromáticos em torno do centrômero, mantendo o padrão para o gênero. Além disso, nota-se a presença de blocos menores em relação à *H. albomarginatus*, apesar de as duas espécies pertecerem ao mesmo grupo (*H. Faber*). Dentre as populações estudadas, *H. faber* é a que mais apresenta

variação intraespecífica para os padrões de Bandamento C, apesar da manutenção da localização das RONS.

As populações pertencentes ao grupo *H. pulchellus* apresentam fórmula cariotípica idêntica e padrão de distribuição de heterocromatina semelhante. Além disso, apresentam um bloco heterocromático no braço longo do cromossomo 1 e outro ocupando quase todo o braço longo do cromossomo 10. Segundo Ananias *et al.* (2004) estas espécies estão mais estreitamente relacionadas entre elas que com as outras espécies do grupo. Apesar de *H. bischoffi*, *H. semiguttatus* e *H. marginatus* terem relação geográfica, a população de *H. guentheri* apresenta padrões semelhantes, sem estar geograficamente relacionada.

Com relação às populações de *Hypsiboas* analisadas neste estudo, pode-se observar indícios de evolução da estrutura cariotípica de diferentes populações de mesma localidade ou localidades próximas a partir da observação de semelhanças nos padrões de distribuição de heterocromatina em *H. albomarginatus* e *H. crepitans* da Bahia, o que evidencia a necessidade de se estender os estudos citogenéticos a outras espécies e populações.

Podemos sugerir que a diversidade genética apresentada por essas diferentes populações é provavelmente fruto da ampla distribuição das espécies, pois, as diferenças ambientais exercem uma diferente pressão seletiva em cada população. Além disso, a resposta das espécies a essa pressão também pode variar, acarretando mudanças no genoma dos indivíduos ou em seu padrão de expressão, resultando nas variantes geográficas apresentadas. A mudança nos padrões cromossômicos dentro das populações pode não refletir em alterações na estrutura do genoma, mas, com o tempo, o acúmulo de diferenças na morfologia e estrutura cromossômica pode funcionar como uma barreira pós zigótica, atuando no processo de especiação.

O presente estudo apresenta informações citogenéticas de 4 das 56 espécies de *Hypsiboas* que ocorrem no Brasil, em 10 diferentes populações, evidenciando uma grande variabilidade na estrutura cariotípica entre populações de *Hypsiboas*. Os dados encontrados, associados aos descritos previamente, reforçam a idéia de complexidade no gênero e apontam para a necessidade de estender o número de localidades e exemplares amostrados, a fim de melhor estabelecer os mecanismos evolução cariotípica, diversidade e filogeografia do grupo. Além disso, fornece evidências de que o gênero pode contar com a ocorrência de espécies crípticas, como *H. albomarginatus* e *H. crepitans*.

7 CONCLUSÕES

A partir das análises citogenéticas realizadas no gênero *Hypsiboas*, pode-se inferir que:

- O número diplóide em *Hypsiboas* mantém-se, de maneira geral, em $2n = 24$, com exceções para *H. lanciformis* e *H. albopunctatus*, que apresentam diferenciação com redução cromossômica a partir de uma característica plesiomórfica para $2n = 22$;
- A macroestrutura cariotípica em *Hypsiboas* não sofre grandes alterações, com pouca diferenciação na morfologia e organização longitudinal do complemento cromossômico, com exceção de *H. albopunctatus*, que apresenta um cromossomo supranumerário, fato comum na família Hylidae mais ainda pouco descrito no gênero;
- Dentre os grupos nos quais foram realizados estudos citogenéticos, *H. pulchellus* é o único que compartilha estrutura cariotípica idêntica e padrões de Bandamento C semelhantes. Nos outros grupos não é possível estabelecer padronização, variando tanto entre as espécies quanto entre populações diferentes;
- Apesar do consenso de que RONS intersticiais são uma característica plesiomórfica para *Hypsiboas*, o presente estudo apresentou uma variabilidade intraespecífica significativa, tendo sido descritas RONS homomórficas, heteromórficas, simples e múltiplas em regiões terminais e intersticiais em ambos os braços e destaque para *H. geographicus* e *H. lanciformis*, que apresentam RONS na região centromérica.
- A variação de localização das RONS poderia ser explicada por possíveis eventos de translocação ou transposição cromossômica, levando-se a manutenção do número e do tamanho cromossômico entre os diferentes cariótipos analisados e a ausência de rearranjos complexos. Esses mesmos mecanismos também poderiam explicar o surgimento das RONS múltiplas em *H. atlanticus* e *H. lanciformis*.
- RONS heterocromáticas são pouco comuns em hílideos, em particular no gênero *Hypsiboas*, ocorrendo em seis das 20 espécies analisadas citogeneticamente e podem ser resultados de inversões envolvendo blocos de heterocromatina nas regiões terminais e centroméricas;
- Os resultados do presente estudo confirmam a variação intraespecífica na localização das RONS em *H. crepitans* e aponta a mesma variação em *H. albomarginatus*, pressupondo a ocorrência de rearranjo cromossômico e a possibilidade de que sejam um complexo de espécies crípticas, devendo ser mais detalhadamente estudadas,

utilizando técnicas de citogenética molecular e genética molecular que podem elucidar divergências no genoma dos grupos;

- Apesar da manutenção do padrão de Bandamento C na região pericentromérica, em algumas espécies foi observada uma diminuição do número e do tamanho de blocos heterocromáticos nessas regiões, possivelmente associada à presença de blocos banda C positiva em regiões intersticiais e/ou terminais, sendo essas bandas resultantes de eventos de inversões envolvendo os blocos proximais à região centromérica, como em *H. multifasciatus*;
- As diferenças na localização das RONS, associadas à grande variação nos padrões de distribuição de heterocromatina reforçam a hipótese de conflito taxonômico no gênero *Hypsiboas*;
- Não é possível estabelecer marcadores cromossômicos baseados no padrão de distribuição de heterocromatina, bem como estabelecer padrões citogenéticos entre as espécies que compõem cada grupo que subdivide o gênero. A variabilidade intraespecífica encontrada pode, no entanto, ser reflexo de diversidade críptica, como em *H. albomarginatus* e *H. crepitans*.
- *H. albomarginatus* apresenta as RONS no par 2 precedidas de blocos heterocromáticos, além de distribuição de heterocromatina concentrada na região pericentromérica, com exceção da população de Santa Teresa-ES, mais distante geograficamente; o mesmo ocorre em *H. crepitans*, que apresenta maior similaridade na distribuição dos blocos heterocromáticos na região pericentromérica, além de braços heterocromáticos nas populações da Bahia (Carvalho *et al.*, 2014; presente estudo), diferindo da população de Alagoas (Gruber *et al.*, 2007). Apesar das semelhanças encontradas no presente estudo, para que se possa confirmar relação filogeográfica entre as espécies de *Hypsiboas* os estudos citogenéticos devem ser estendidos a outras populações e espécies, a fim de determinar com maior clareza os padrões evolutivos para o gênero.

REFERÊNCIAS

AGUIAR JR, O; LIMA, AP; GUARETTA, AA; RECCO-PIMENTEL SM. 2002. Cytogenetic analysis of four poison frogs of *theepipedobates* genus (Anura: Dendrobatidae). *Herpetologica*, 58(3), 293–303.

ALBERTS, B.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF; ROBERTS, K. & WALTER, P. 2003. *Molecular Biology of the Cell*, 4^o ed. Garland Science, New York, NY, 352(4), 378-80.

ALEXANDRINO, J; FERRAND, N. & ARNTZEN, JW. 2005. Morphological variation in two genetically distinct groups of the golden striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Contributions to Zoology*, 74: 213-222.

Amphibian Species Of The World, 2016, disponível em: http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/content/search?taxon=Hypsiboas&subtree=&subtree_id=&english_name=&author=&year=&country=194

ANANIAS, F, MODESTO, ADS, CELI MENDES, S. AND FELGUEIRAS NAPOLI, M. (2007) Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. *Hereditas*, 144: 206–212.

ANANIAS, F; GARCIA, PCS; RECCO-PIMENTEL, SM.. 2004. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 140: 42-48.

ANTUNES, AP. 2007. Descrição taxonômica e história natural de uma nova espécie de *Hypsiboas* da Mata Atlântica do alto da Serra de Paranapiacaba, estado de São Paulo (Amphibia, Anura, Hylidae). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. São Paulo.

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* 7(1): 161-176.

ÁVILA, RW; FERREIRA, VL. 2004. Richness of species and density of vocalization of anurans in an urban area of Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 21(4):887-892.

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 Research* 12(3):2400-2408.

BERTOLUCI, J; BRASSALOTI, RA; ROBEIRO-JUNIOR, JW; VILELA, VMFN; SAWAKUCHI, HO. 2007. Species composition and similarities among anuran assemblages of forest sites insoutheastern Brazil. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 64(4):364-374, July/August.

BEÇAK, ML. 1968. Chromosomal Analysis of Eighteen Species of Anura, *Caryologia*, 21(3):191-208.

BOGART, JP. 1973. Evolution of anuram karyotypes. In: VIAL, J. L. (ed.). Evolutionary Biology of the Anurans: contemporary research on major problems. University of Missouri Press, Columbia, 337-349.

BUCCI-INNOCENTI, S; RAGGHIANI, M; MANCINO, G. 1983. Chromosome and C-heterochromatin polymorphisms in the Italian newt, *Triturus italicus*. Chromosoma, 88(3): 208-15.

CARMINER, MA.; RON, SR. 2014. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. Zoo Keys, 370: 1-68

CARROLL, RL. 2007. The Palaeozoic Ancestry of Salamanders, Frogs and Caecilians. Zoological Journal of the Linnean Society, 150(Suppl. 1), 1–140.

CARVALHO, KA.; GARCIA, PCA. & RECCO-PIMENTAL, SM. 2009. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber group* (Anura, Hylidae). Genetics and Molecular Research 8(4):1498-1508.

CARVALHO, TR; GIARETTA, AA; FACURE, KG. 2010. A new species of *Hypsiboas Wagler* (Anura: Hylidae) closely related to *H. multifasciatus* Günther from southeastern Brazil. Zootaxa; 2521: 37–52.

CARVALHO, MA; RODRIGUES, MT; GARCIA, C; SIQUEIRA, S. 2014. Dinâmica da evolução cromossômica no Gênero *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). Genetics and Molecular Research 13 (3): 7826-7838.

CATROLI, GF. 2008. Cariótipo se seis espécies de *Bokermannohyla* dos grupos de *B. circumdata* e *B. pseudopseudis* (Anura, Hylidae). Rio Claro: Universidade Estadual Paulista. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas.

CATROLI, GF; KASAHARA, S. 2009. Cytogenetic data on species of the family Hylidae. Biol. Saude 15(1): 67-86.

COCHRAN, DM. 1955. Frogs of southeastern Brazil. Bulletin of the United States National Museum, 206: 1-423.

COCHRAN, DM.; GOIN, CJ. 1970. Frogs of Colombia. Bulletin of the United States National Museum., 288: 1-655.

DARST, CR., CANNATELLA, DC. 2004. Novel relationships among hylid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 31:462–475.

DOMENICO, EA. 2008. Herpetofauna do mosaico de unidades de conservação do Jacupiranga (SP). São Paulo: Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado em Zoologia. 199p.

DUELLMAN, WE; RODRIGUES, LO. 1994. Guide to the frogs of Iquitos region, Amazonian Peru. University of Kansas Printing Service, Lawrence, 92p.

DUELLMAN, WE. 1970. Hylid frogs of Middle America. Ithaca, NY: Society for the Study of Amphibians and Reptiles.

FAGUNDES, MVC. 2011. A contribuição da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) para o desenvolvimento regional. Pedro Leopoldo: Faculdades Pedro Leopoldo. Dissertação de Mestrado em Administração. 204 p.

FAIVOVICH, J; HADDAH, C; GARCIA, PCA et al. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bulletin of The American Museum of Natural History. 294: 240 p.

FAIVOVICH, J; BAËTA, D; CANDIOTI, V; HADDAD, CFB; TYLER, MJ. 2011. The Submandibular Musculature of Phyllomedusinae (Anura: Hylidae): A Reappraisal. Journal of Morphology 272:354–362.

FORD, L; CANNATELLA, DC. 1993. The major clades of frogs. Herpetol. Monogr. 7:94-117.

FOUQUET A.; GILLES A.; VENCES M.; et al. 2007. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. PLoS ONE 2(10): 119.

FREITAS, MA; SILVA, TFS. 2007. Guia ilustrado: a herpetofauna das Caatingas a áreas de altitude do Nordeste brasileiro. Pelotas: USEB, 384p.

FROST, D.R. 2016. Amphibia Species of the World: an online reference. American Museum of Natural History, New York. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Acesso em 20/01/2016.

FROST, DR.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, CFB.; et al. 2006. The amphibian tree of life. Bull. Am. Museum Nat. Hist. 297: 1-370.

GALLEGO, LFK. 2008. Análise citogenética de anfíbios simpátricos oriundos da Floresta Atlântica. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. Monografia do Curso de Ciências Biológicas. 36p.

GARCIA, M., MIRÓ, R., ESTOP, A., PONSÀ, M. AND EGOZCUE, J. 1983, Constitutive heterochromatin polymorphism in *Lagothrix lagothricha cana*, *Cebus apella*, and *Cebus capucinus*. Am. J. Primatol., 4: 117–126

GRUBER, SL.; HADDAD, FB; KASAHARA, S. 2007. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n = 24$ to $2n = 22$ in the genus. Genética, 130(3) pp 281-291.

GUERRA, MS. 1988. Introdução à Citogenética Geral. Pernambuco: Guanabara Koogan.

GEOGRAFIA DA BAHIA. 2014. Disponível em:

<http://www.suapesquisa.com/geografia/bahia.htm>. Acesso em 05/06/2014.

HAMMER, O.; HARPER, DAT. & RYAN, PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Paleontologia Eletronica*, 4(1) 9p.

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

HICKMAN-JUNIOR, CP.; ROBERTS, L.S. & LARSON, A. 2004. *Princípios Integrados de Zoologia*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

HILLIS, DM. & DIXON, MT. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*, 66, 411 -53.

HOEGG, S; VENCES, M; BRINKMANN & H; MEYER, A. 2004. Phylogeny and comparative substitution rates of frogs inferred from sequences of three nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution* 21(7):1188-1200

KÜÇÜKA, H; AYDINB, Y; ERZURUMLUOGLUA, E; Özdemirc, M; Hassad, H; Artane, S. 2015. The effects of a heterochromatin polymorphism in chromosome 6 on premature ovarian failure. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 4(1):41–43.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE).2010. Censo 2010. Brasília: IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

KASAHARA, S. 2009. *Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. 1 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 160p.

LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDBERG, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

LIMA, AP; MAGNUSSOM, WE.; MENIN, M et al. 2005. Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central = Guide to the frogs of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazonia /Manaus : Áttema Design Editorial.

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.

LOURENÇO, LB; RECCO-PIMENTEL, SM; CARDOSO, AJ. 1998. Polymorphism of the Nucleolus Organizer Regions (NORs) in *Physalaemus Petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by Silver Staining and Fluorescence In Situ Hybridization. *Chromosome Research*, 6(8); 621-28.

LUTZ, B. 1968. Taxonomy of the Neotropical Hylidae. The pearce sellards series: 11. Texas Memorial Museum. Austin. 31p.

MARCELINO, VR; HADDAD, CFB & ALEXANDRINO, J. 2010. Geographic Distribution and Morphological Variation of Striped and Nonstriped Populations of the Brazilian Atlantic

Forest Treefrog *Hypsiboas bischoffi* (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology*, 43(2): 351–361.

NASCIMENTO, APB. 2013. Biologia reprodutiva, caracterização cromossômica e morfológica de *Hypsiboas crepitans* (Anura: Hylidae) do sudoeste baiano. Jequié: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Monografia do curso de Ciências Biológicas. 64p.

NUNES, RRA. & FAGUNDES, V. 2008a. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hyalinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *BOL. Mus. Biol. Mello Leitão*, n. 23:21-36.

NUNES, RRA & FAGUNDES, V. 2008b. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species groups. *Genetics and Molecular Biology*, 31(4): 982-987.

OLIVEIRA, HHP; SOUZA, CCN; RIBEIRO, CL; et al. 2010. Citogenética comparativa das famílias Leptodactylidae e Hylidae do cerrado goiano. *Rev. Estudos. Goiânia*, 37(9/10): 725-35.

PEREIRA, MS; CANDATEN, A.; MILANI, D et al. 2011. Seasonal variation in the leaf-litter frog community (Amphibia: Anura) from an Atlantic Forest Area in the Salto Morato Natural Reserve, southern Brazil. *ZOOLOGIA* 28 (6): 755–761.

PEREIRA, RR; BASTOS, RP; CRUZ, AD; OLIVEIRA, HHP; NUNES, HF; et al. 2009. Estudos Citogenéticos de 23 Espécies de Anfíbios Anuros do Cerrado do Estado de Goiás, Brasil. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética, 30 de agosto a 02 de setembro de 2009. Águas de Lindóia.

POUGH, FH.; HEISER, JB. & MCFARLAND, WN. 2008. *A vida dos vertebrados*. 4 ed. Atheneu, São Paulo.

ROMER, A.S. & PARSON, T.S. 1985. Quem é quem entre os vertebrados. In: *Anatomia Comparada dos Vertebrados*, Atheneu Ed., São Paulo, pp. 29-80.

SCHMID, M. 1978. Chromosome Banding in Amphibia. I. Constitutive Heterochromatin and Nucleolus Organizer Regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma (Berl.)* 66, 361 – 388.

SILVA AP, HADDAD CF AND KASAHARA S. 2000. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. *Cytobios* 103: 25-38.

STORER, TI.; USINGER, RL.; STEBBINS, RC. & NYBAKKEN, JW. 1989. Classe Amphibia – Anfíbios. In *Zoologia Geral*. Companhia Ed. Nacional, pp. 618- 41.

SUMNER, A.T. 2003. *Chromosomes: organization and function*. Ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, 287p.

THOMÉ, M.T.C. & BRASILEIRO, C.A. 2007. Dimorfismo sexual, uso do ambiente e abundância sazonal de *Elachistocleis cf. ovalis* (Anura: Microhylidae) em um remanescente

de Cerrado no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. *Biota Neotrop.* 7(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n1/pt/abstract?article+bn00307012007> (Acesso em 01/11/2015).

TOLEDO, LF; SIQUEIRA, S; DUARTE, TC; VEIGA-MENONCELLO, APC. & RECCO-PIMETEL, SM. 2010. Description of a new species of *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 from the state of São Paulo, Southeastern Brazil (Anura, *Leiuperidae*). *J Herpetol* 1:185-191.

TRUEB, L. 1974. Systematic relationships of Neotropical horned frogs, genus *Hemiphractus* (Anura: Hylidae). *Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas* 29: 1-60.

VENEZUELA, N; BADENHORST, D; MONTIEL, E.E; LITERMAN, R. 2014. Molecular cytogenetic search for cryptic sex chromosomes in painted turtles *Chrysemys picta*. *Cytogenet Genome Res.*

VENU, G. C-Band Variation in Indian Caecilians (Amphibia: Gymnophiona) *International Journal of Scientific Research*, 3(2): 550-553.

VENU G, RAJENDRAN A, VENKATACHALAI AH G, GOWER DJ. 2005. Karyology of two species of Caecilians (*Caeciliidae*: Gymnophiona): Evolution through tandem fusion and sex chromosome dimorphism. *Caryologia* 58(2): 140-151.

VENU G, VENKATACHALAI AH G, GOWER DJ. 2011. The karyology of *Uraeotyphlus gansi*, and its implications for the systematics and evolution of Uraeotyphlidae (Amphibia: Gymnophiona). *Cytogenetics and Genome Research* 132: 182-187.

VITELLI, L; BATISTONI, R; ANDRONICO, F; NARDI, I & BARSACCHI-PILONE, G. (1982). Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. *Chromosoma* 84(4): pp 475-491.

WELLS, K.D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. *Anim. Behav.* 25(3):666-693.

ZUG, GR. Amphibian: Distribution and abundance. *Enclopaedia Britannica*. Disponível em: <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/21445/amphibian/40614/Distribution-and-abundance> Acesso em 09/07/2014.