

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E
BIOLOGIA EVOLUTIVA

**Citogenética comparativa de seis espécies de anuros do gênero
Leptodactylus (Leptodactylidae) coletadas no estado do Amazonas, Brasil**

ANA CAROLINA COELHO

MANAUS – AM

2013

ANA CAROLINA COELHO

**Citogenética comparativa de seis espécies de anuros do gênero
Leptodactylus (Leptodactylidae) coletadas no estado do Amazonas, Brasil**

Orientadora: Maria Claudia Gross, Dr^a

Coorientador: Marcelo Menin, Dr

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Financiamento: CNPq/FAPEAM - 573976/2008-2; CNPq/MCT 558318/2009-6; CNPq/FAPEAM, CNPq-563348/2010-0

MANAUS – AM

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

C672 Coelho, Ana Carolina

Citogenética comparativa de seis espécies de anuros do gênero *Leptodactylus* (Leptodactylidae) coletadas no estado do Amazonas, Brasil / Ana Carolina Coelho. — Manaus : [s.n.], 2013.

xv, 69 f. : il.

Dissertação (mestrado) — INPA, Manaus, 2013.

Orientador : Maria Claudia Gross

Coorientador : Marcelo Menin

Área de Concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. *Leptodactylus* – Citogenética. 2. Anuros – Amazônia. I. Título.

CDD 19. ed. 597.8

Sinopse:

Foram estudados os cromossomos mitóticos de *Leptodactylus andreae*, *Leptodactylus macrosternum*, *Leptodactylus pentadactylus*, *Leptodactylus petersii* e *Leptodactylus riveroi*, e cromossomos meióticos de *Leptodactylus hylaedactylus* e *Leptodactylus petersii*, todos coletados no estado do Amazonas. As espécies *L. andreae* e *L. hylaedactylus* apresentaram $2n=26$ e as demais apresentaram $2n=22$ cromossomos. As regiões organizadoras de nucléolo e sítios ribossomais 18S foram evidenciados nos homólogos do par 8 de *L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus* e *L. riveroi* e em *L. petersii* no par 6. Não foram evidenciados sítios teloméricos intersticiais. Esses dados, em conjunto com os dados da literatura, mostram a presença de variações cariotípicas entre os grupos intragenéricos de *Leptodactylus*.

Palavras-chave: Mitose, meiose, banda C, RON, DNAr 18S, sequências teloméricas.

Aos meus pais Tadeu e Silvana e à minha
tia Maria Emília (*in memoriam*) dedico.

“Colha logo os seus botões de rosa,
Pois o tempo vai correndo;
Esta flor que hoje sorri cheirosa,
Amanhã estará morrendo.”

Robert Herrick

A realização deste trabalho foi possível devido:

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Ao Laboratório de Citogenômica Animal (LACA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e, ao Laboratório de Genética Animal do INPA nos quais este trabalho foi desenvolvido contando com o financiamento dos projetos “Centro de Estudos e Adaptações da Biota Aquática da Amazônia (ADAPTA - AMAZÔNIA)” (CNPq/FAPEAM – 573976/2008-2), “Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade (SISBIOTA - Brasil)” (Edital MCT/CNPq/MMA/MEC/CAPES/FNDCT - Ação Transversal/FAPs Nº 47/2010), “Rede de pesquisa para ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade de vertebrados da Amazônia brasileira com aplicações sobre o seu uso e conservação – Rede BioPHAM “(CNPq/FAPEAM, CNPq-563348/2010-0) e “Inventários Biológicos na Amazônia Ocidental: Sub-Rede Manaus” (CNPq/MCTI 558318/2009-6).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudos durante a realização do mestrado.

Agradecimentos

À minha orientadora Dr^a *Maria Claudia Gross* pela amizade, ensinamentos, dedicação e pela confiança em mim depositada. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Dr *Marcelo Menin* por ter me ajudado em todos os momentos que precisei, pelas coletas e identificação dos animais. Muito obrigada!

À Dr^a *Eliana Feldberg* por ter cedido seu laboratório para a realização das análises das hibridações *in situ* fluorescentes em fotomicroscópio de epifluorescência.

Aos doutores *Izeni Pires Farias* e *Tomas Hrbek*, idealizadores do projeto SISBIOTA, por ter cedido parte do material analisado nesta dissertação.

À turma do mestrado de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do INPA (2011-2013).

Ao *Alexandre Almeida* e a *Karla Silva* por terem realizado o tombamento dos animais analisados neste trabalho.

A todos que ajudaram com as coletas, *Alexandre Almeida*, *David Telles*, *Karla Silva*, *Leonardo Paz*, *Ocínio "Juruna"*, *Patrik Viana*, *Rebeca McComb*, *Reysi Pegorini*, *Rodrigo Tiago*, *Sarah Py-Daniel*, *Sérgio Vaz*, *Thais Lemos* e a equipe de herpetologia do projeto SISBIOTA. Muito obrigada!

Aos mais novos doutores *Carlos Henrique Schneider* e *Maria Leandra Terencio* pelos ensinamentos e ajuda com as técnicas moleculares. Muito obrigada!

Aos colegas de laboratório *Camila*, *Francijara*, *Karol*, *Marília*, *Natália*, *Rafael* e *Renan* por toda a ajuda e companhia no laboratório.

Aos meus amigos da graduação, *Camila, Danilo, Fabiana, Igor, Isabela, Jean, Lilian, Marine, Poliana e Roberto*, turma de Ciências Biológicas - UEM (2006-2010) pela amizade, respeito e muitas risadas.

Às minhas amigonas *Natália Duarte Bento e Poliana Maria Sachertt* pelos conselhos e pelo companheirismo sempre. Muito obrigada pela verdadeira amizade durante todos esses anos!

Aos meus amigos *Gilvan Leite, Jennifer Ferreira, José Gregório, Júlia Leite, Juliana Vieira, Nathali Ristau e Thais Lemos* pela paciência, companheirismo, e por todos os momentos que passamos juntos. Muito obrigada pela amizade!

Aos meus pais *Tadeu e Silvana*, aos meus irmãos *Monalisa, Leonardo e Bruna*, aos meus sobrinhos *Giovanni e Clara* e as minhas meninas *Travessa e Elizabeth*, por todo amor, confiança, amizade e respeito. Por me amarem como sou e por fazerem de mim uma pessoa melhor. Amo vocês!

Aos amigos, que são parte da família, *André, Benedito e Eliana*, por toda a amizade, divertimento e ótimos churrascos durante todos esses anos. Muito obrigada!

Aos animais utilizados nessa dissertação, cuja morte não foi em vão.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma tornaram possível à realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

O gênero *Leptodactylus* apresenta 75 espécies predominantemente Neotropicais, com número diploide modal de 22 cromossomos. Porém, análises citogenéticas são incipientes em espécies de *Leptodactylus* provenientes da Amazônia central e pouco se sabe acerca do padrão cariotípico dos cinco grupos intragenéricos (*L. fuscus*, *L. ocellatus*, *L. marmoratus*, *L. melanonotus*, *L. pentadactylus*). Deste modo, foram realizadas análises citogenéticas clássicas e moleculares em cromossomos mitóticos de cinco espécies de *Leptodactylus* da Amazônia central (*L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus*, *L. petersii* e *L. riveroi*) e análises meióticas para as espécies *L. hylaedactylus* e *L. petersii*. As espécies *L. andreae* e *L. hylaedactylus* apresentaram $2n=26$ e as demais apresentaram $2n=22$ cromossomos. A região organizadora de nucléolo foi evidenciada no par 8 de *L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus* e *L. riveroi*, enquanto *L. petersii* teve marcação de Ag-RON nos pares 6 e 10. Estes resultados foram confirmados pela sonda de DNAr 18S, com exceção do par 10 de *L. petersii*. O padrão de bandamento C foi evidente na região centromérica para as 5 espécies estudadas mitoticamente e variações intraespecíficas foram observadas, quando comparados os resultados deste trabalho com o existente na literatura. Com relação às análises meióticas, *L. hylaedactylus* apresentou 13 bivalentes em metáfase I, enquanto *L. petersii* apresentou 11 bivalentes nesta fase. Nenhum sítio telomérico intersticial foi evidenciado, contudo isso não significa que rearranjos não ocorreram durante a carioevolução deste gênero, uma vez que variações na fórmula cariotípica são observadas, tanto intraespecificamente quanto interespecificamente. Com relação aos padrões cariotípicos dos grupos intragenéricos, de acordo com o encontrado na literatura, o número diploide igual a 22 cromossomos foi observado nas espécies do grupo *L. ocellatus*, bem como nos grupos *L. fuscus* e *L. pentadactylus*. No grupo *L. melanonotus* três números diploides estão presentes: 20, 22 e 24 e a maior variação do número diploide foi evidenciada no grupo *L. marmoratus*. Estes números diploides, aliados a dados referentes ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva e da região organizadora de nucléolo, disponíveis para várias espécies do gênero, indicam que o grupo *L. ocellatus* seria basal e que *L.*

marmoratus seria derivado, corroborando a proposta embasada em características reprodutivas.

ABSTRACT

The genus *Leptodactylus* has 75 species, most of them are from Neotropical, and with a modal diploid number of 22 chromosomes. However, cytogenetics analyses are incipient among *Leptodactylus* species from Central Amazon and studies about the karyotype pattern of the five intrageneric groups are poorly known (*L. fuscus*, *L. marmoratus*, *L. melanonotus*, *L. ocellatus*, *L. pentadactylus*). Classical and molecular cytogenetic analyses of mitotic chromosomes were conducted on five species of *Leptodactylus* from Central Amazon (*L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus*, *L. petersii* and *L. riveroi*), and meiotic analyses for species of *L. hylaedactylus* and *L. petersii*. The species *L. andreae* and *L. hylaedactylus* showed $2n=26$ chromosomes and other species which were analyzed showed $2n=22$ chromosomes. The nucleolus organizer region (NOR) was evident in the pair 8 of *L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus* and *L. riveroi*, while *L. petersii* was evident in the pairs 6 and 10. These results of NOR were confirmed by 18S rDNA probe, except for the pair 10 of *L. petersii*. The C-banding pattern was evident in the centromeric region of the five species, which were studied mitotically, and species-specific variations were observed in this present study. Regarding meiotic analyzes, *L. hylaedactylus* showed 13 bivalents of metaphase I while *L. petersii* showed 11 bivalents in the same phase. No interstitial telomeric site was evident, however doesn't mean that no rearrangements occurred during karioevolution of this genus, since variations in karyotype formula were observed both intraspecific and interespecific. Respect to standard karyotypics of intrageneric groups, diploid number as equal as 22 chromosomes were observed in *L. ocellatus* species as well as into the groups of *L. fuscus* and *L. pentadactylus*. In the group *L. melanonotus*, three diploid numbers were presented: 20, 22 and 24, and the most variation of diploid number were observed in the *L. marmoratus* group. These diploid numbers combined with data from constitutive heterochromatin standard distribution and organized nucleolus region, which are available for several species of genus *Leptodactylus*, indicate that *L. ocellatus* group would be ancient and *L. marmoratus* would be the newest, corroborating the proposal based in reproductive traits.

Sumário

I Introdução geral.....	16
II Objetivos.....	23
II.1 Geral	23
II.2 Específicos	23
III Capítulo 1.....	24
IV Conclusões.....	51
V Referências	52
VI Anexo.....	60

Lista de Figuras

Introdução geral

Figura 1. Relação filogenética entre os grupos intragenéricos da família Leptodactylidae.....19

Capítulo 1

Figura 1. Cariótipos em coloração convencional, regiões organizadoras de nucléolo impregnadas por nitrato de prata e sítio de DNAr 18S de *Leptodactylus*. (a, b, c) *L. andreae* (2n=26), (d, e, f) *L. macrosternum* (2n=22), (g, h, i) *L. pentadactylus* (2n=22), (j, k, l) *L. petersii* (2n=22), (m, n, o) *L. riveroi* (2n=22). Barra=10µm.....40

Figura 2. Padrão de bandamento C de *Leptodactylus*. (a) *L. andreae*, (b) *L. macrosternum*, (c) *L. pentadactylus*, (d) *L. petersii*, (e) *L. riveroi*. Barra=10µm.....41

Figura 3. Distribuição das sequências teloméricas (TTAGGG)_n depois da técnica de hidridação *in situ* fluorescente em metáfases de *Leptodactylus*. (a) *L. andreae*, (b) *L. macrosternum*, (c) *L. pentadactylus*, (d) *L. petersii*, (e) *L. riveroi*. Barra=10µm.....42

Figura 4. Cariótipo em coloração convencional e fases meióticas de *Leptodactylus hylaedactylus*. Barra=10µm.....43

Figura 5. Fases meióticas de *Leptodactylus petersii*. Barra=10µm.....43

Anexo

Figura 1. Espécies analisadas.....62

Figura 2. Mapa indicando a Amazônia central e os locais de coleta.....63

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Dados citogenéticos publicados para populações de *Leptodactylus*, de acordo com os grupos intragenéricos.....27

Tabela 2. Exemplares analisados, indicando espécie, locais de coleta, amostragem, sexo e número de tombo.....34

Tabela 3. Morfologia dos cromossomos, número diploide/número fundamental de braços cromossômicos e posição da região organizadora de nucléolo nas espécies analisadas.....39

Anexo

Tabela 1. Exemplares analisados, indicando espécie, locais de coleta, amostragem, sexo e número de tombo.....61

Lista de Abreviaturas

2n - Número diploide

Ag - RON - Região organizadora de nucléolo impregnada com nitrato de prata

Banda C - Técnica clássica em que se detecta a heterocromatina constitutiva

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

FC - Fórmula cariotípica

FISH - Hibridação *in situ* fluorescente

FITC - Fluoresceína isotiocianato (*fluorescein isothiocyanate*)

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

ITS - Sítios teloméricos intersticiais

m - metacêntrico

NF - Número fundamental

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RON - Região organizadora de nucléolo

SDS - Dodecil sulfato de sódio

sm - submetacêntrico

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSC - Solução salina de citrato padrão

st - subtelocêntrico

t - telocêntrico

I Introdução geral

Os anfíbios atuais, conhecidos como Lissamphibia, são tetrápodes com tegumento úmido e ausência de escamas (Pough *et al.* 2008). Ainda, são os únicos vertebrados vivos que apresentam transição entre os ambientes aquáticos e terrestres, verificáveis tanto na ontogenia como também em sua filogenia (Hickman *et al.* 2004). Neste grupo são encontradas três linhagens distintas, denominadas: a) Anura, com 49 famílias, totalizando 6200 espécies de sapos, rãs e pererecas; b) Urodela, com 9 famílias e 652 espécies de salamandras e tritões; c) Gymnophiona, com 10 famílias reconhecidas recentemente (Wilkinson *et al.* 2011) e 192 espécies de cecílias ou ápodes (Frost 2013). No Brasil são registradas 946 espécies, incluindo uma salamandra, 32 cecílias e 913 anuros (Segalla *et al.* 2012).

A bacia Amazônica abriga grande parte desta biodiversidade, tendo registro de mais de 232 espécies de anuros na Amazônia brasileira (Avila-Pires *et al.* 2007), o que totaliza aproximadamente 24% da anfíbiofauna brasileira. Normalmente, sapos, rãs e pererecas apresentam dimorfismo sexual em diferentes características morfológicas, coloração e tamanho corporal (Vitt e Caldwell 2009). A família Leptodactylidae, reúne espécies muito diversas em aparência, estrutura e tamanho, podendo variar de 2 a 20 centímetros de comprimento (Lima *et al.* 2012). Em geral, as espécies desta família depositam seus ovos em ninhos de espuma e os girinos apresentam diferentes formas de desenvolvimento, de acordo com a espécie (Heyer 1969). Os representantes desta família ocorrem na área compreendida entre o extremo sul do Texas (EUA), Sonora (México), norte das Antilhas e sul do Brasil (Frost 2013). Atualmente, 189 espécies já foram descritas (Frost 2013), sendo 67 registradas na Amazônia brasileira (Avila-Pires *et al.* 2007).

Contudo, a sistemática da família Leptodactylidae tem sido considerada problemática desde o início dos anos 1970. Até recentemente, a família era considerada como uma das mais diversas dentro do grupo dos anuros (Frost 1985), porém mudanças taxonômicas foram propostas após uma extensa revisão baseada em dados de sequenciamento de genes nucleares e mitocondriais (Frost *et al.* 2006). Nesta revisão, muitos gêneros pertencentes à família Leptodactylidae foram realocados em novos táxons e a família deixou

de ser a mais diversa, uma vez que o antigo gênero *Eleutherodactylus*, com mais de 800 espécies, não faz mais parte da mesma. Atualmente, a família Leptodactylidae é composta por 12 gêneros, que estão divididos em 3 subfamílias. A subfamília Leiuperinae apresenta 6 gêneros, sendo eles: *Edalorhina* Jiménez de la Espada, 1870 (2 espécies), *Engystomops* Jiménez de la Espada, 1872 (9 espécies), *Eupemphix* Steindachner, 1863 (1 espécie), *Physalaemus* Fitzinger, 1826 (45 espécies), *Pleurodema* Tschudi, 1838 (15 espécies) e *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926 (16 espécies). A subfamília Leptodactylinae com 4 gêneros, sendo eles: *Adenomera* Steindachner, 1867 (15 espécies), *Hydrolaetare* Gallardo, 1963 (3 espécies), *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (75 espécies) e *Lithodytes* Fitzinger, 1843 (1 espécie). E por fim, a subfamília Paratelmatoibiinae com 2 gêneros, sendo eles: *Paratelmatoibius* Lutz e Carvalho, 1958 (6 espécies) e *Scythrophrys* Lynch, 1971 (1 espécie) (Grant et al. 2006; Frost 2013). A família Leptodactylidae é parafilética com relação à Leiuperidae se considerado que os gêneros *Paratelmatoibius* e *Scythrophrys* são mais estreitamente relacionados com os leiuperídeos do que com os demais leptodactilídeos. Porém, recentemente foi proposta a expansão da família Leptodactylidae, com inclusão de todos os gêneros de Leiuperidae e reconhecimento de Leiuperinae, Leptodactylinae e Paratelmatoibiinae como subfamílias, evitando assim o parafiletismo entre os leptodactilíneos (Pyron e Wiens 2011).

O gênero *Leptodactylus* contém espécies distribuídas no sul da América do Norte, na América do Sul, incluindo as ilhas do Caribe, Antilhas e Bahamas (Frost 2013). Na Amazônia central são observadas espécies do gênero *Leptodactylus* ocorrendo tanto em áreas abertas (ex.: *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus longirostris*), quanto em interior e borda de floresta (*Leptodactylus knudseni*, *Leptodactylus mystaceus*, *Leptodactylus pentadactylus*, *Leptodactylus rhodomystax*, *Leptodactylus riveroi* e *Leptodactylus stenodema*) (Lima et al. 2012). Os girinos da maioria das espécies do gênero são aquáticos, salvo poucas exceções, tais como a espécie *Leptodactylus hylaedactylus*, cujos girinos completam seu desenvolvimento no ninho (Lima et al. 2012).

As espécies de *Leptodactylus* estão divididas em cinco grupos intragenéricos, de acordo com características morfológicas, ecológicas e reprodutivas, sendo eles: grupo *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus marmoratus*, *Leptodactylus melanonotus*, *Leptodactylus ocellatus* e *Leptodactylus pentadactylus* (Heyer 1969).

Ainda dentro do gênero *Leptodactylus*, incluindo as antigas espécies do gênero *Adenomera* que foram realocadas neste gênero dentro do grupo *Leptodactylus marmoratus* (*sensu* Frost et al. 2006), é possível inferir a transição de uma história de vida intimamente ligada à água para uma mais terrestre (Heyer 1969). De uma forma simplificada, as espécies do grupo *L. ocellatus* fazem ninhos de espuma flutuantes em lagoas e seus girinos são exotróficos, sendo este comportamento considerado basal dentre os *Leptodactylus* (Haddad e Prado 2005). Ninhos de espuma com ovos e estágios larvais iniciais em ninhos subterrâneos construídos são característicos de espécies pertencentes ao grupo *L. fuscus* (Haddad e Prado 2005). Espécies dos grupos *L. melanonotus* e *L. pentadactylus* constroem ninhos de espuma na água acumulada em bacias escavadas, o que se caracteriza como um modo reprodutivo intermediário entre um ambiente aquático e terrestre (Heyer 1969; Haddad e Prado 2005). Já, a maioria das espécies do grupo *L. marmoratus* são consideradas derivadas por serem independentes da água para reprodução, e caracterizam-se pela construção de ninhos de espuma em câmaras subterrâneas com os girinos apresentando desenvolvimento endotrófico completo, no ninho, sem a necessidade de completarem o desenvolvimento em ambiente aquático (Haddad e Prado 2005). Assim, dentre as espécies analisadas neste estudo, *Leptodactylus andreae* e *Leptodactylus hylaedactylus* fazem parte do grupo de *Leptodactylus marmoratus*; *Leptodactylus macrosternum* pertence ao grupo *Leptodactylus ocellatus*; *Leptodactylus pentadactylus* está alocada no grupo *Leptodactylus pentadactylus*; *Leptodactylus petersii* faz parte do grupo *Leptodactylus melanonotus* e parte do complexo *Leptodactylus wagneri-podicipinus* e *Leptodactylus riveroi* encontra-se como intermediário entre os representantes do grupo *Leptodactylus melanonotus* e *Leptodactylus ocellatus* (Frost et al. 2006).

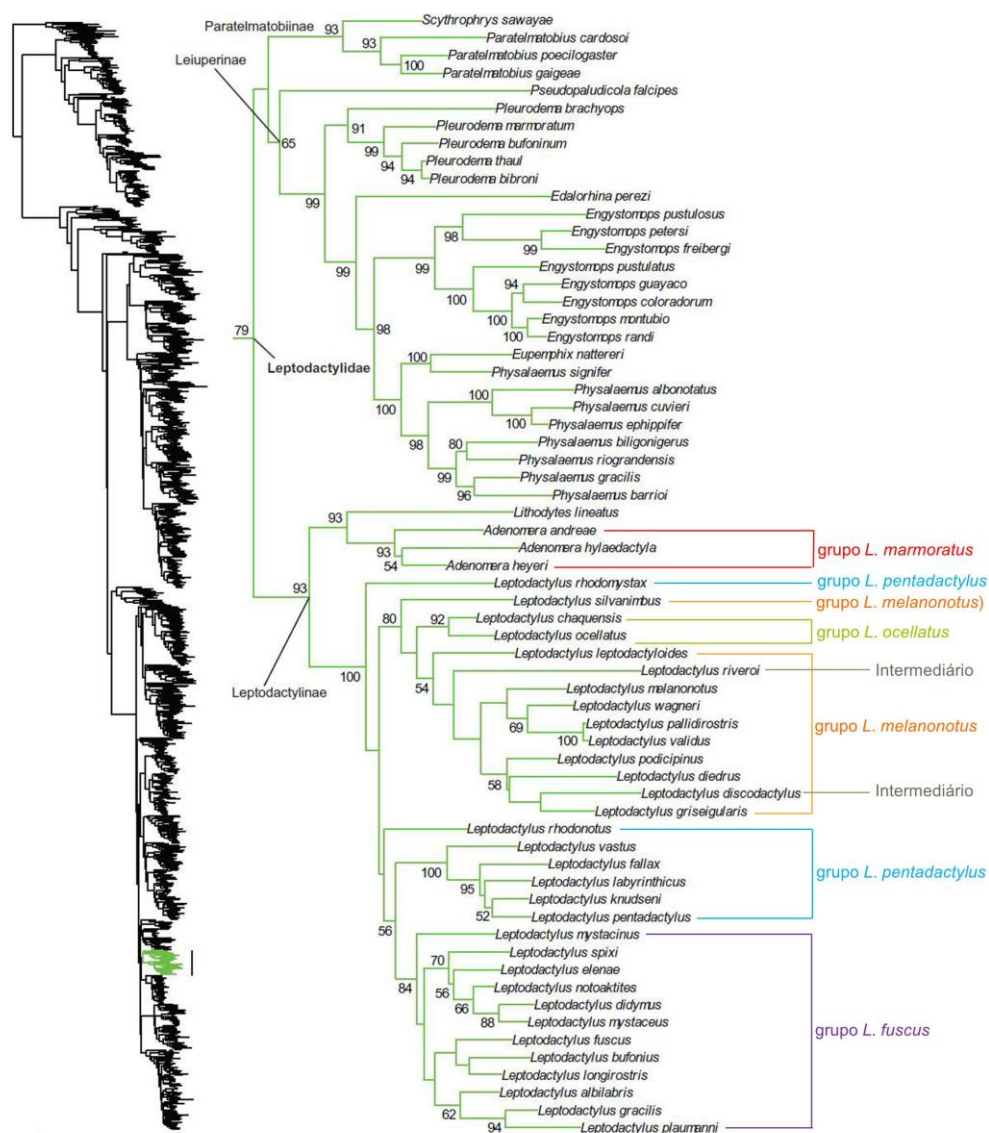


Figura 1. Relação filogenética entre grupos intragenéricos da família Leptodactylidae, baseada em 9 genes nucleares e 3 genes mitocondriais (Fonte: modificado de Pyron e Wiens 2011, 33p). As espécies do grupo *L. marmoratus* juntamente com *Lithodytes lineatus* fazem parte do subgênero *Lithodytes* (Frost 2013). Os grupos intragenéricos de *Leptodactylus* (Heyer 1969), bem como os números diploides (2n) encontrados para espécies pertencentes ao grupo (para detalhes do número diploide, ver tabela 1 do artigo).

Os estudos citogenéticos realizados até momento para as espécies do gênero *Leptodactylus* mostram número diploide modal de $2n=22$ cromossomos. Porém, variações desse número foram encontradas para duas espécies do grupo *L. melanonotus*, sendo elas *Leptodactylus* sp. (aff. *podicipinus*), com

2n=20 cromossomos (Gazoni *et al.* 2012) e *L. silvanimbus* com 2n=24 (Amaro-Ghilardi *et al.* 2006) e para todas as espécies descritas cariotipicamente do grupo *L. marmoratus*: *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) com 2n=23 (Campos *et al.* 2009); *Leptodactylus* cf. *marmoratus* e *L. marmoratus* com 2n=24 (Bogart 1974; Campos *et al.* 2009); *Leptodactylus andreae*, *L. diptyx* e *L. hylaedactylus* com 2n=26 cromossomos (Bogart 1974; Campos *et al.* 2009; Suárez 2010) e também *L. lineatus* com 2n=18 cromossomos (Bogart 1970; Heyer 1974; Suárez 2010).

Os estudos meióticos para as espécies *L. chaquensis*, *L. knudseni*, *L. labyrinthicus*, *L. ocellatus*, *L. petersii* e *L. podicipinus* mostraram a presença de 2n=11 bivalentes em diplóteno/diacinese/metáfase I, confirmando número diploide igual a 22 cromossomos (Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; Gazoni *et al.* 2012). *Leptodactylus* sp. (aff. *podicipinus*) apresentou 2n=10 bivalentes na metáfase I e 10 cromossomos na metáfase II (Gazoni *et al.* 2012). Já as espécies *Leptodactylus marmoratus* e *L. cf. marmoratus* apresentaram 2n=12 bivalentes e *L. hylaedactylus* 2n=13 bivalentes, confirmando o número diploide de 24 e 26 cromossomos, respectivamente (Campos *et al.* 2009; Gazoni *et al.* 2012). Em *Leptodactylus* sp. (aff. *bokermanni*) 10 bivalentes e 1 trivalente foram evidenciados em diplóteno/diacinese/metáfase I, porém como apenas um indivíduo foi analisado não foi possível inferir se tratava-se de um sistema de determinação cromossômica de sexo ou se o trivalente era em função de um rearranjo robertsoniano (Campos *et al.* 2009). Ainda, a espécie *Leptodactylus pentadactylus* (2n=22) apresentou múltiplas translocações e na metáfase I, além de 5 bivalentes, foi evidenciada uma cadeia cromossômica em anel com os demais 12 cromossomos. Deste modo, é evidente que diferentes tipos de rearranjos cromossômicos ocorreram na evolução cariotípica das espécies de *Leptodactylus* e, conseqüentemente, na família Leptodactylidae.

Desde o início da década de 1970, acreditava-se que as espécies da família Leptodactylidae, e de famílias mais derivadas, como Dendrobatidae, Hylidae e Ranidae, poderiam ter se originado a partir de um ancestral que apresentasse um cariótipo semelhante ao encontrado em gêneros mais primitivos, com 2n=26 cromossomos (Bogart 1973). Assim, o mecanismo

predominante na evolução dos anuros dessas famílias seria a fusão cêntrica, que poderia ter levado à redução do número cromossômico de algumas espécies na família Leptodactylidae (Beçak 1968). Porém, admite-se que a fusão não era evidente em todas as espécies e que inversões pericêntricas ou outras translocações poderiam ter mascarado o processo de fusão (Beçak 1968).

Contudo, até o momento não existe um consenso sobre o número diploide basal para o gênero *Leptodactylus*. A primeira hipótese é que o cariótipo com 24 cromossomos poderia ter derivado de um cariótipo com $2n=22$ através de fissões seguidas de inversões nos pares fissionados; e a segunda, que se embasa em mudanças sistemáticas propostas para *Leptodactylus* por Frost *et al.* (2006), considera o $2n=24$ cromossomos como número diploide ancestral e os cariótipos da maioria das espécies ($2n=22$) representariam condições derivadas dentro do gênero (Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Gazoni *et al.* 2012).

Com relação à organização do genoma da maioria dos *Leptodactylus*, a heterocromatina constitutiva apresenta-se localizada na região centromérica dos cromossomos, com algumas variações espécie-específicas, que englobam braços totalmente heterocromáticos, blocos heterocromáticos intersticiais e na região telomérica (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Arruda e Morielle-Versute 2008; Campos *et al.* 2009; Campos 2010; Oliveira *et al.* 2010; Suárez 2010; Zaracho e Hernando 2011; Gazoni *et al.* 2012). Ainda, diferenças interpopulacionais também são evidenciadas quanto ao padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva, tais como as encontradas em algumas espécies do grupo *L. fuscus* e *L. melanonotus* (Suárez 2010).

Dados referentes à região organizadora de nucléolo (RON), mostram que a maioria dos *Leptodactylus* apresenta RON simples, presentes nos homólogos do par 8, fato confirmado pela localização de sítios ribossomais da família 45S em algumas espécies (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; Silva *et al.* 2004; Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Arruda e Morielle-Versute 2008; Campos 2010; Oliveira *et al.* 2010; Zaracho e Hernando 2011). Contudo, diferentemente da maioria, *Leptodactylus laticeps* e

Leptodactylus syphax apresentam RON na região intersticial do braço curto do par 2 (Suárez 2010); *Leptodactylus rhodomystax* na região distal do braço longo do par 3 (Suárez 2010), *Leptodactylus mystacinus* e *Leptodactylus* sp. (aff. *podicipinus*) no par 4 (Suárez 2010; Gazoni et al. 2012) e *L. hylaedactylus* no par 7 (Campos et al. 2009). Já, RONs múltiplas e/ou sítios ribossomais múltiplos foram identificados em *Leptodactylus mystacinus*, com sítios localizados nos cromossomos dos pares 4 e 8 (Silva et al. 2006) e *L. marmoratus*, nos pares 6 e 8 (Gazoni et al. 2012). Diferenças interpopulacionais com relação à atividade da RON foram evidenciadas em espécies dos grupos *L. melanonotus* e *L. fuscus* (Suárez 2010).

Apesar de cerca de 60% das espécies dos *Leptodactylus* já apresentarem alguma informação sobre o seu cariótipo, análises citogenéticas clássicas e moleculares são incipientes em espécies provenientes da Amazônia central e pouco se sabe acerca do padrão cariotípico dos cinco grupos intragenéricos (*L. fuscus*, *L. ocellatus*, *L. marmoratus*, *L. melanonotus*, *L. pentadactylus*). Assim, a análise citogenética de diferentes táxons, bem como a comparação do cariótipo de indivíduos de diferentes populações de uma mesma espécie, pode revelar e/ou auxiliar na separação dos táxons, sendo este o enfoque do trabalho, que também visou estabelecer parâmetros cariotípicos nos grupos intragenéricos.

II Objetivos

II.1 Geral

Caracterizar cariotipicamente as espécies *Leptodactylus andreae*, *Leptodactylus macrosternum*, *Leptodactylus pentadactylus*, *Leptodactylus petersii* e *Leptodactylus riveroi*, utilizando marcadores cromossômicos clássicos e moleculares e analisar fases meióticas de *Leptodactylus hylaedactylus* e *Leptodactylus petersii*, todos coletados no estado do Amazonas, Brasil, bem como estabelecer o padrão cariotípico dos cinco grupos intragenéricos utilizando dados disponíveis na literatura.

II.2 Específicos

- Determinar o número diploide de cinco espécies e haploide de duas espécies, de indivíduos reconhecidos como pertencentes ao gênero *Leptodactylus* coletados nas proximidades dos municípios de Manaus, Iranduba, Santa Isabel do Rio Negro, São Sebastião do Uatumã e Tapauá, todos pertencentes ao estado do Amazonas.
- Estabelecer os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva (Banda C) e das regiões organizadoras de nucléolo (RONs) em cromossomos mitóticos.
- Localizar sequências de DNA repetitivo (DNAr 18S e sequências teloméricas) em cromossomos mitóticos pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).
- Verificar se existe variação intraespecífica entre indivíduos pertencentes à mesma espécie, mas provenientes de diferentes populações, por meio de comparações com dados da literatura.
- Verificar se padrões cariotípicos pode ser identificado entre os grupos intragenéricos, considerando os dados disponíveis na literatura e os resultados obtidos neste trabalho.

III Capítulo 1

Artigo – Revisão citogenética dos grupos de *Leptodactylus* (Leptodactylidae, Anura) e inclusão de dados de seis espécies da Amazônia central: padrões intragenéricos e interespecíficos

Introdução

A família Leptodactylidae possui 189 espécies descritas, das quais 91 pertencem ao gênero *Leptodactylus* (*sensu* Frost *et al.* 2006). As espécies deste gênero são encontradas do sul da América do Norte à América do Sul, incluindo as ilhas do Caribe, Antilhas e Bahamas (Frost 2013). Na Amazônia central espécies ocorrem em áreas abertas (ex.: *Leptodactylus fuscus*), em interior e borda de floresta (*Leptodactylus knudseni*, *Leptodactylus mystaceus*, *Leptodactylus pentadactylus*, *Leptodactylus riveroi*, *Leptodactylus petersii*) e nas margens de áreas alagadas (*Leptodactylus macrosternum*) (Lima *et al.* 2012). A maioria das espécies do gênero possui girinos aquáticos, salvo poucas exceções, tais como as espécies *Leptodactylus andreae* e *Leptodactylus hylaedactylus*, cujos girinos completam seu desenvolvimento em um ninho de espuma (Lima *et al.* 2012).

Devido às diferentes características morfológicas, ecológicas e comportamentais, as espécies do gênero *Leptodactylus* são organizadas em cinco grupos intragenéricos, sendo o modo reprodutivo a característica mais relevante para sua distinção (Heyer 1969). As espécies do grupo *L. ocellatus* possuem um modo reprodutivo considerado basal, totalmente dependente da água perene (Haddad e Prado 2005). Ninhos de espuma com ovos e estágios larvais iniciais em ninhos subterrâneos são característicos de espécies pertencentes ao grupo *L. fuscus* (Haddad e Prado 2005). Espécies dos grupos *L. melanonotus* e *L. pentadactylus* depositam ninhos de espuma na água acumulada em bacias construídas pelo macho, o que se caracteriza como um modo reprodutivo intermediário entre um ambiente aquático e terrestre (Heyer 1969; Haddad e Prado 2005). Já a maioria das espécies do grupo *L. marmoratus* são consideradas derivadas por serem independentes da água na sua reprodução, caracterizando-se pela construção de ninhos de espuma em câmaras subterrâneas (Haddad e Prado 2005). Deste modo, *L. andreae* e *L.*

hylaedactylus fazem parte do grupo de *Leptodactylus marmoratus*; *L. macrosternum* pertencente ao grupo *Leptodactylus ocellatus*; *L. pentadactylus* está alocada no grupo *Leptodactylus pentadactylus*; *L. petersii* faz parte do grupo *Leptodactylus melanonotus* no complexo *Leptodactylus wagneri-podicipinus* e, por fim, *L. riveroi* é intermediário entre os representantes do grupo *Leptodactylus melanonotus* e *Leptodactylus ocellatus* (Frost et al. 2006).

Apesar do conhecimento existente acerca dos grupos intragenéricos em *Leptodactylus*, a taxonomia das espécies deste gênero, bem como da família Leptodactylidae, ainda não estão totalmente compreendida, sendo a sistemática considerada problemática desde o início dos anos 70 (Frost 1985; Frost et al. 2006; Grant et al. 2006; Pyron e Wiens 2011; Frost 2013). Neste contexto, estudos citogenéticos podem auxiliar na distinção dos táxons, bem como na compreensão da história evolutiva, buscando entender quais são as relações filogenéticas que os unem do ponto de vista cariotípico.

Até o momento, cerca de 60% das espécies do gênero já foram cariotipadas (Beçak 1968; Denaro 1972; Bogart 1974; De Luca e Jim 1974; Silva et al. 2000; Amaro-Ghilardi et al. 2004; Silva et al. 2004; Amaro-Ghilardi et al. 2006; Silva et al. 2006; Arruda e Morielle-Versute 2008; Campos et al. 2009; Oliveira et al. 2010; Campos 2010; Suárez 2010; Gazoni et al. 2012). Destas, 77,5% apresentam número diploide igual a 22 cromossomos, com variação na fórmula cariotípica e regiões organizadoras de nucléolo evidenciadas no par cromossômico 8. Ainda, heterocromatina constitutiva localizada na região centromérica da maioria dos cromossomos é comum para todas as espécies. Contudo, algumas possuem blocos heterocromáticos adicionais que permitem a distinção de táxons (Tabela 1).

Considerando que as espécies do gênero *Leptodactylus* apresentam uma ampla distribuição na região Neotropical e quase metade das espécies já possui dados citogenéticos descritos, cinco espécies provenientes da Amazônia central foram caracterizadas citogeneticamente visando à comparação destes dados com os disponíveis na literatura para avaliar se existem diferenças interpopulacionais. Ainda, a composição cariotípica de *Leptodactylus riveroi* foi descrita pela primeira vez no presente trabalho. Com base em informações citogenéticas disponíveis para as espécies de

Leptodactylus, padrões cariotípicos foram identificados entre os grupos intragenéricos.

Tabela 1. Dados citogenéticos disponíveis para espécies de *Leptodactylus*, de acordo com os grupos intragenéricos. Local de coleta, número diploide (2n), fórmula cariotípica (FC), número fundamental (NF) e região organizadora de nucléolos (RONS). Para cálculo do número fundamental foram considerados como portadores de dois braços os cromossomos meta (m), submetacêntricos (sm) e subteloicêntricos (st) e como portadores de braço único os cromossomos telocêntricos (t). Braço curto (p). Braço longo (q). Terminal (t). Intersticial (i). Proximal (pr). Pericentromérica (pe). Desemparelhado (up). -- corresponde aos dados não indicados na publicação original.

Grupo	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	Banda C	RONS	DNAr 18S	ITS	Referências
<i>L. fuscus</i>	<i>L. albilabris</i>	Barrio Rio Grande, Porto Rico	22	14m+6sm+2st	44	--	--	--	--	1
	<i>L. bufonius</i>	Córdoba, Corrientes e Santiago del Estero, Argentina	22	14m+4sm+4st 16m+4sm+2st	44	Centrômeros 1(i),8(i),q2,q9	q8(i)	8	--	1;11
	<i>L. elenae</i>	Misiones e Santa Fé, Argentina	22	14m+8sm	44	Centrômeros 1,4,7,8(pe),q3,p11	q8(i)	--	--	11
	<i>L. furnarius</i>	SP, Brasil Misiones, Argentina	22	6m+6sm+8m/sm+2st 14m+6sm+2st	44	Centrômeros p1,3,4(t)	p8(i),q8(i)	--	--	9;11
	<i>L. fuscus</i>	ES, GO, SP e RS, Brasil	22	6m+8sm+8m/sm 14m+6sm+2st 6m+6sm+8m/sm+2st 10m+12sm	44	Centrômeros Telômeros e intersticiais p5(i),p4,7,8(t)	p8(t)	8	--	1;2;7;9;10;11
	<i>L. gracilis</i>	Córdoba, Corrientes e Misiones, Argentina SC e SP, Brasil	22	10m+10sm+2st 6m+16sm 12m+10sm 16m+4sm+2st	44	Centrômeros 1pt,8ppr,9qpr	p,q8(i)	8	--	1;4;5;11

¹Bogart 1974; ²Silva *et al.* 2000; ³Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; ⁴Silva *et al.* 2004; ⁵Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; ⁶Silva *et al.* 2006; ⁷Arruda e Morielle-Versute 2008; ⁸Campos *et al.* 2009; ⁹Campos 2010; ¹⁰Oliveira *et al.* 2010; ¹¹Suárez 2010; ¹²Zaracho e Hernando 2011; ¹³Gazoni *et al.* 2012.

Grupo	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	Banda C	RONs	DNAr 18S	ITS	Referências
L. fuscus	<i>L. latinasus</i>	Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy e Tucumán, Argentina	22	10m+6sm+4st+2t 8m+8sm+4st+2t	42	Centrômeros	8(pe)	--	--	1;11
	<i>L. mystaceus</i>	PA, Brasil Caqueta, Colômbia	22	10m+6sm+6st 6m+6sm+8m/sm+2st 12m+8sm+2st	44	Centrômeros	p,q8(i)	--	--	1;9;11
	<i>L. mystacinus</i>	Cundinamarca, Colômbia MT e SP, Brasil	22	14m+2sm+6st 10m+12sm 6m+8sm+8m/sm	44	Centrômeros Telômeros	q4(pr),q8 p1,8(i),q8(i),p11,p4(t)	4,8,p4(t)	--	1 (= <i>L. labialis</i>);5;6;11
	<i>L. notoaktites</i>	SP, Brasil	22	6m+8sm+8m/sm	44	Centrômeros	p8	--	--	2
	<i>L. plaumanni</i>	SC, Brasil Misiones, Argentina	22	6m+16sm 16m+4sm+2st	44	Centrômeros p1(t),p8(pr),q9(pr)	p8(i),q8	8	--	4;11
	<i>L. troglodytes</i>	PI, Brasil	22	14m+6sm+2st	44	--	--	--	--	11

¹Bogart 1974; ²Silva *et al.* 2000; ³Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; ⁴Silva *et al.* 2004; ⁵Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; ⁶Silva *et al.* 2006; ⁷Arruda e Morielle-Versute 2008; ⁸Campos *et al.* 2009; ⁹Campos 2010; ¹⁰Oliveira *et al.* 2010; ¹¹Suárez 2010; ¹²Zaracho e Hernando 2011; ¹³Gazoni *et al.* 2012.

Grupo	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	Banda C	RONs	DNAr 18S	ITS	Referências
L. melanonotus	<i>L. griseigularis</i>	Huánuco, Peru	22	4m+8sm+2st+8t	36	--	--	--	--	1
	<i>L. leptodactyloides</i>	PA, Brasil	22	8m+2sm+4st+8t	36	Centrômeros Telômeros	8q	8	Ausente	11
	<i>L. melanonotus</i>	Vera Cruz, México	22	12m+6sm+4st	44	--	--	--	--	1
	<i>L. natalensis</i>	RJ, Brasil	22	6m+4sm+6st+6t	38	--	--	--	--	1
	<i>L. petersii</i>	AP e MT, Brasil	22	12m+10sm 16m+4sm+2st 12m+8sm+2st	44	Centrômeros q1(t),p7(t)	q4(pr),q8(i)	--	Ausente	5;11;13
	<i>L. podicipinus</i>	MG, MT e SP, Brasil Corrientes e Misiones, Argentina	22	6m+4sm+4st+8t 6m+6sm+8m/t+2t 6m+4sm+2m/sm+2st+8t 8m+2sm+4st+8t 6m+6sm+2st+8t	34,36,42	Centrômeros	p8(t),q8(i)	8	Presente	1;2;9;11;13
	<i>L. sp. (aff. podicipinus)</i>	MT, Brasil	20	12m+4sm+4st	40	Centrômeros	q4(pr)	4	Presente	13
	<i>L. pustulatus</i>	PA, PI e TO, Brasil	22	12m+10sm 14m+4sm+2st	44	Centrômeros Telômeros	p8(t)	8	--	5;11
	<i>L. silvanimbus</i>	Belén Gualcho, Honduras	24	12m+12sm	48	--	p8(t)	--	--	5

¹Bogart 1974; ²Silva *et al.* 2000; ³Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; ⁴Silva *et al.* 2004; ⁵Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; ⁶Silva *et al.* 2006; ⁷Arruda e Morielle-Versute 2008; ⁸Campos *et al.* 2009; ⁹Campos 2010; ¹⁰Oliveira *et al.* 2010; ¹¹Suárez 2010; ¹²Zaracho e Hernando 2011; ¹³Gazoni *et al.* 2012.

Grupo	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	Banda C	RONs	DNAr 18S	ITS	Referências
	<i>L. bolivianus</i>	Cundinamarca, Colômbia	22	16m+4sm+2st	44	--	--	--	--	1(= <i>L. wagneri</i>)
	<i>L. chaquensis</i>	Chaco e Corrientes, Argentina MS e MT, Brasil	22	12m+8sm+2st	44	Centrômeros Telômeros p3,4,7,9,11(i),q8(i)	p3,5,p8(i)	8	Ausente	11;13
<i>L. ocellatus</i>	<i>L. macrosternum</i>	PA e TO, Brasil	22	14m+8sm 10m+10sm+2st	44	Centrômeros Telômeros p4,5,6,11(i),q8,10(i)	p8(t)	8	--	5;11
	<i>L. latrans</i>	Salto, Uruguai Córdoba, Argentina BA, GO, MG, MS, MT, PE, PI, PR, RJ, RS e SP e TO, Brasil	22	12m+6sm+4st 6m+8sm+8m/sm 12m+10sm 6m+6sm+2st+8m/sm 14m+6sm+2st	44	Centrômeros q4(pr),p3,5,6,9,10(i) p4,7,8,9,q1(i),Telômeros p8(pr),q3,4,7p1	p8(t)	8	Ausente	1;2;3;5;7;9;10;11 (= <i>L. ocellatus</i>)

¹Bogart 1974; ²Silva *et al.* 2000; ³Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; ⁴Silva *et al.* 2004; ⁵Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; ⁶Silva *et al.* 2006; ⁷Arruda e Morielle-Versute 2008; ⁸Campos *et al.* 2009; ⁹Campos 2010; ¹⁰Oliveira *et al.* 2010; ¹¹Suárez 2010; ¹²Zaracho e Hernando 2011; ¹³Gazoni *et al.* 2012.

Grupo	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	Banda C	RONs	DNAr 18S	ITS	Referências
L. pentadactylus	<i>L. knudseni</i>	MT e PA, Brasil	22	12m+10sm 10m+8sm+2st	44	Telômeros, (i),(pr),(pe),	p8	--	Ausente	3;11
	<i>L. labyrinthicus</i>	GO, PI e SP, Brasil Misiones, Argentina	22	6m+8sm+8m/sm 12m+10sm 14m+4sm+4st 10m+8sm+4st 12m+8sm+2st	44	Centrômeros Telômeros, q2(i),(pe)	p8(t)	8	--	2;5;7;10;11;13
	<i>L. laticeps</i>	Chaco, Formosa e Salta, Argentina	22	14m+4sm+4st	44	Centrômeros q1,4,6,7,10(t) p2,5,6,8,11(t) p1,3,5(i)	p2(i)	2	--	11
	<i>L. paraensis</i>	PA, Brasil	22	12m+4sm+6st	44	--	p8(t)	--	--	11
	<i>L. pentadactylus</i>	Huánuco, Perú MT e SP, Brasil	22	14m+6sm+2st 12m+10sm (4up) 12m+6sm+4st	44	Centrômeros Telômeros Intersticiais	p8(t)	8	Ausente	1;3;11;13
	<i>L. rhodomystax</i>	MT e PA, Brasil	22	12m+6sm+4st 12m+8sm+2st	44	Centrômeros q1,p8(t)	q3(t)	3	--	11;13
	<i>L. rhodonotus</i>	Huánuco, Perú	22	14m+6sm+2st	44	--	--	--	--	1
	<i>L. syphax</i>	GO e PA, Brasil	22	6m+6sm+8m/sm+2st 16m+2sm+4st	44	Centrômeros Intersticiais Telômeros	p2,3(i)	--	Ausente	9;11

¹Bogart 1974; ²Silva *et al.* 2000; ³Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; ⁴Silva *et al.* 2004; ⁵Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; ⁶Silva *et al.* 2006; ⁷Arruda e Morielle-Versute 2008; ⁸Campos *et al.* 2009; ⁹Campos 2010; ¹⁰Oliveira *et al.* 2010; ¹¹Suárez 2010; ¹²Zaracho e Hernando 2011; ¹³Gazoni *et al.* 2012.

Grupo	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	Banda C	RONs	DNAr 18S	ITS	Referências
L. marmoratus	<i>L. andreae</i>	Huánuco, Perú	26	2m+8sm+4st+12t	40	--	--	--	--	1
	<i>L. diptyx</i>	Chaco, Corrientes, Formosa, Paso de la Prata, Argentina	26	2m+4sm+2st+18t 2m+6sm+18t	34	Centrômeros Pericentroméricas	7,8(pr)	--	--	11;12
	<i>L. hylaedactylus</i>	AP e RO, Brasil Huánuco, Perú	26	2m+4sm+2st+18t 2m+6sm+18t	34	Centrômeros	7(pr)	--	--	1;8
	<i>L. marmoratus</i>	SP, Brasil	24	4m+2sm+4st+14t 4m+4sm+2st+14t	34	Centrômeros	6(pr)	6,8(pr)	Presente	1;13
	<i>L. cf. marmoratus</i>	SP, Brasil	24	4m+6sm+14t 24m	34,48	Centrômeros	6,8(pr)	6	--	8
	<i>L. sp. (aff. bokermanni)</i>	SP, Brasil	23	4m+6sm+2st+8t 1m(up)+2t(up)	36	Centrômeros 7(pe)	11(t)	--	--	8

¹Bogart 1974; ²Silva *et al.* 2000; ³Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; ⁴Silva *et al.* 2004; ⁵Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; ⁶Silva *et al.* 2006; ⁷Arruda e Morielle-Versute 2008; ⁸Campos *et al.* 2009; ⁹Campos 2010; ¹⁰Oliveira *et al.* 2010; ¹¹Suárez 2010; ¹²Zaracho e Hernando 2011; ¹³Gazoni *et al.* 2012.

Material e métodos

Espécies e locais de coleta

Foram realizadas análises cromossômicas de 22 indivíduos de seis espécies: *Leptodactylus andreae*, *Leptodactylus hylaedactylus*, *Leptodactylus macrosternum*, *Leptodactylus pentadactylus*, *Leptodactylus petersii* e *Leptodactylus riveroi*. Todos os indivíduos foram coletados no estado do Amazonas, Brasil (Tabela 2). Buscas acústicas e visuais foram realizadas durante a noite, guiada pelo canto dos animais, e a captura foi manual. Após a morte dos animais, por dose letal de xilocaína em gel 5%, foram retirados o fígado e a medula óssea dos fêmures para a análise citogenética, e os exemplares foram fixados em formol 10% por 24 horas, conservados em álcool 70% e depositados na Coleção Zoológica Paulo Bührnheim da Universidade Federal do Amazonas (CZPB-UFAM), no município de Manaus, AM, Brasil. Todos os animais foram capturados com autorizações cedidas pelo ICMBio/SISBIO (N. 35424-1, 3678-1, 11323) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (no. 076/2012).

Tabela 2. Exemplares analisados de *Leptodactylus*, indicando as espécies, locais de coleta, sexo e número de tombo na Coleção Zoológica Paulo Bührnheim (CZPB-UFAM). Sendo: ♂ = macho; ♀ = fêmea; ? = sexo indeterminado; J = juvenil. Os locais de coleta são: a - Campus da UFAM, Manaus (03°06'4,3"S, 59°58'32"W); b - INPA, Manaus (03°5'21"S, 59°59'21"W); c - Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus (02°55'37"S, 59°53'31"W); d - lago Catalão, Iranduba (03°09'47"S, 059°54'29"W); e - rio Jatapu, São Sebastião do Uatumã (0°53'36"W, 58°51' W); f - rio Darahá, Santa Isabel do Rio Negro (0°24'24"N, 65°1'1"W); g - igarapé do Jacinto (rio Purus), Tapauá (04°50'20"S, 62°53'28"W).

Grupo (Frost et al. 2006)	Espécie	Local de coleta	Nº de espécimes/ Sexo	CZPB-UFAM
<i>Leptodactylus marmoratus</i>	<i>Leptodactylus andreae</i> Müller, 1923	b f	2? 1?	164-345
	<i>Leptodactylus hylaedactylus</i> (Cope, 1868)	a b	1♂ 1♀	162-340
	<i>Leptodactylus macrosternum</i> Miranda-Ribeiro, 1926	d	1♂ e 1♀	163-343
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	<i>Leptodactylus pentadactylus</i> (Laurenti, 1768)	a e f g	1♂ e 1♀ 1♀ 1♀ e 1J 4?	160-333
<i>Leptodactylus melanonotus</i>	<i>Leptodactylus petersii</i> (Steindachner, 1864)	a c d	2♂ 1♀ 1♂	161-335
Intermediário entre os representantes do grupo <i>Leptodactylus melanonotus</i> e <i>Leptodactylus ocellatus</i>	<i>Leptodactylus riveroi</i> Heyer e Pyburn, 1983	c	1♂ e 1♀	161-334

Citogenética clássica

Os animais foram tratados com injeção intraperitoneal de colchicina, na proporção de 0,1mL/10g de peso corporal, nas concentrações de 0,0125%, 0,1% ou 1%, por 12 horas, segundo Baldissera Jr *et al.* (1993) com modificações. Para indução de divisão celular foi utilizado fermento biológico, na mesma proporção (Cole e Leavens 1971). Os animais foram eutanasiados com dose letal de xilocaína em creme (5%), seguindo as normas exigidas pelo comitê de ética da Universidade Federal do Amazonas. Foi retirado o fígado, a medula óssea dos fêmures e, quando possível, os testículos. Para a obtenção da suspensão cromossômica mitótica a partir da medula e fígado foram utilizadas as técnicas descritas por Ford e Hamerton (1956) e Baldissera Jr *et al.* (1993). As células foram hipotonizadas em solução de KCl 0,075M, fixada em Carnoy I por três vezes e mantida em *freezer* até o momento da confecção das lâminas. As suspensões foram gotejadas em toda extensão da lâmina, pré-aquecida em banho-maria à 50°C e, depois de secas, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5% em tampão fosfato. Para obtenção dos cromossomos meióticos, os testículos dos animais foram colocados em solução hipotônica de KCl 0,075M, em seguida foram fixados por três vezes em Carnoy I e armazenados em *freezer* a -10°C (Gross *et al.* 2009). Para a confecção das lâminas meióticas, pequenos fragmentos de testículo, foram colocados sobre a lâmina seca e limpa. Em seguida acrescentou-se duas gotas de ácido acético a 50%, e o testículo foi macerado e espalhado por toda a superfície da lâmina. A lâmina foi seca em placa aquecedora a 40°C, corada com Giemsa (5%) e seca a temperatura ambiente. A detecção das regiões organizadoras de nucléolo foi efetuada de acordo com Howell e Black (1980) e as regiões de heterocromatina constitutiva segundo a metodologia de Sumner (1972).

Citogenética molecular

Foi realizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) descrita por Pinkel *et al.* (1986) com alguns ajustes, utilizando sondas homólogas e heterólogas de DNAr 18S e sondas de sequências teloméricas (TTAGGG)_n. A extração do DNA utilizado para obtenção das sondas de DNAr 18S foi feita a

partir do tecido muscular das espécies *Leptodactylus fuscus* e *Leptodactylus riveroi* utilizando o protocolo básico de Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações. As sondas foram obtidas por amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (Saiki *et al.* 1988) utilizando os *primers*: DNAr 18S (IpF 5'CCGCTTTGGTGACTCTTGAT e IpR 5'CCGAGGACCTCACTAAACCA) (Gross *et al.* 2010). Para amplificação das regiões teloméricas foi utilizada a sequência (TTAGGG)_n, seguindo metodologia proposta por Ijdo *et al.* (1991). A marcação das sondas de DNAr 18S das espécies *L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus* e *L. riveroi* e da sonda telomérica de todas as espécies analisadas, incluindo *L. petersii*, foi feita utilizando o *Kit DIG-NickTM Translation Mix* da Roche e o sinal foi detectado com o anticorpo antidigoxigenina, na cor vermelha. Para a marcação da sonda de DNAr 18S de *L. petersii* foi utilizado o *Kit BioNickTM Labeling System* da Invitrogen e o sinal foi detectado com o anticorpo avidina-FITC, na cor verde. As lâminas foram contracoradas com DAPI.

Análises cromossômicas

Foi analisado um mínimo de 30 metáfases por indivíduo, em fotomicroscópio de luz. As melhores metáfases mitóticas e fases meióticas foram fotografadas em objetiva de imersão, com câmera digital *AxioCam Erc5*, da Zeiss. As metáfases submetidas à hibridação *in situ* foram capturadas e analisadas em fotomicroscopia de epifluorescência *Olympus Bx-51*, em objetiva de imersão. Os cariótipos foram montados utilizando o software *Adobe Photoshop Cs4®*. Os cromossomos mitóticos, após terem sido recortados e emparelhados, foram medidos utilizando o programa livre *Image J* e organizados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com o critério de relação de braços (RB=BM/Bm, onde BM = braço maior e Bm = braço menor), segundo Green e Sessions (1991; 2007), utilizando tanto os cromossomos em coloração convencional, quanto os submetidos ao tratamento com hidróxido de bário. O número fundamental (NF) foi determinado de acordo com o número de braços cromossômicos, considerando-se, os metacêntricos, submetacêntricos e

subtelocêntricos como tendo dois braços cromossômicos e telocêntricos como tendo apenas um braço (Green e Sessions 1991; 2007).

Resultados

Das seis espécies analisadas, *Leptodactylus andreae* e *Leptodactylus hylaedactylus* apresentaram número diploide igual a 26 cromossomos e NF=34, sendo a fórmula cariotípica de ambos igual a $2m + 2sm + 4st + 18t$ (Figura 1a; Figura 4a); *Leptodactylus macrosternum*, *Leptodactylus pentadactylus* e *Leptodactylus riveroi* apresentaram $2n=22$ cromossomos e NF=44 (Figura 1d, 1g, 1m) e *Leptodactylus petersii* apresentou 22 cromossomos e NF=42 (Figura 1j). *Leptodactylus macrosternum* apresentou $8m + 8sm + 6st$; *Leptodactylus pentadactylus* $12m + 6sm + 4st$; *Leptodactylus petersii* $8m + 2sm + 10st + 2t$ e *Leptodactylus riveroi* $10m + 8sm + 4st$ (Tabela 3). Não foram observados cromossomos sexuais diferenciados para nenhuma das espécies (Figura 1).

As regiões organizadoras de nucléolo estas foram evidenciadas no par 8 para as espécies *L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus* e *L. riveroi* sendo para as 3 primeiras espécies na região terminal do braço curto e para a última espécie na região proximal do braço longo (Figura 1c; e; h; n). A região organizadora de nucléolo de *L. petersii* foi observada nos braços curtos dos pares 6 e 10, nas porções intersticiais e proximais, respectivamente (Figura 1k). Os sítios de DNAr 18S coincidiram com as regiões organizadoras de nucléolo para todas as espécies com exceção de *L. petersii*, no qual o par 10 impregnado pelo nitrato de prata, não apresentou um sítio de DNAr 18S.

Com relação ao padrão de bandamento C, todos os cromossomos das cinco espécies analisadas apresentaram marcação centromérica. Contudo, *L. andreae* apresentou marcação tênue se comparada com as demais espécies, sendo os pares cromossômicos 1, 2, 3 e 4 mais fortemente marcados (Figura 2a). Para *L. macrosternum* as marcações centroméricas dos pares 7 e 8 invadiam os braços curtos, além de haver marcações terminais brandas nos braços longos dos pares 1, 2 e 6 e fortes marcações terminais nos pares 3 e 4 (Figura 2b). *Leptodactylus pentadactylus* apresentou marcação na região terminal do braço longo dos pares 2, 3 e 5; marcação na região terminal do

braço curto do par 1, e braços totalmente heterocromáticos nos pares 8 (braço longo) e 10 (braço curto) (Figura 2c). *Leptodactylus petersii* apresentou marcações centroméricas brandas, com regiões heterocromáticas conspícuas nos pares 3 e 4, as quais invadiam as porções pericentroméricas, além de marcações terminais mais evidentes nos pares 5 e 10 (Figura 2d). Para *Leptodactylus riveroi* foi observado marcação na região terminal do braço curto e longo dos pares 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 e 10 e marcação na região terminal do braço longo dos pares 4 e 6 (Figura 2e).

As sequências teloméricas foram observadas nas regiões terminais de todos os cromossomos das espécies analisadas, não tendo sido observado nenhum sítio telomérico intersticial pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (Figura 3).

Com relação à meiose, para *Leptodactylus hylaedactylus* foi encontrado número diploide igual a 26 cromossomos. Foram observados 13 bivalentes em metáfase I, a maioria com dois quiasmas terminais, e 13 cromossomos em metáfase II (Figura 4). Análises meióticas para *Leptodactylus petersii*, com $2n=22$ cromossomos, mostraram metáfase I com 11 bivalentes, a maioria com dois quiasmas terminais, e metáfase II com 11 cromossomos (Figura 5).

Tabela 3. Morfologia dos cromossomos, número diploide (2n), número fundamental (NF), pares portadores da região organizadora de nucléolo (Ag-RON), localização física cromossômica dos sítios ribossomais 18S (DNAr 18S) e das sequências teloméricas de seis espécies de *Leptodactylus* registradas no estado do Amazonas.

Espécie	Morfologia dos pares cromossômicos													2n/NF	Ag-RON	DNAr 18S	Sequências teloméricas
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				
<i>L. andreae</i>	st	sm	st	m	t	t	t	t	t	t	t	t	t	26/34	8qp	8qp	Telômeros
<i>L. hylaedactylus</i>	st	sm	st	m	t	t	t	t	t	t	t	t	t	26/34	-	-	-
<i>L. macrosternum</i>	m	st	st	sm	sm	m	st	sm	m	m	sm	-	-	22/44	8pt	8pt	Telômeros
<i>L. pentadactylus</i>	m	st	sm	st	sm	m	sm	m	m	m	m	-	-	22/44	8pt	8pt	Telômeros
<i>L. petersii</i>	sm	st	st	st	st	m	m	st	m	m	t	-	-	22/42	6pi;10pp	6pi	Telômeros
<i>L. riveroi</i>	m	sm	sm	sm	st	st	m	sm	m	m	m	-	-	22/44	8pt	8pt	Telômeros

m =metacêntrico
sm =submetacêntrico
st =subtelocêntrico
t =telocêntrico

pi=região intersticial dos braços curtos
pt= região terminal dos braços curtos
pp= região proximal dos braços curtos
qp= região proximal dos braços longos

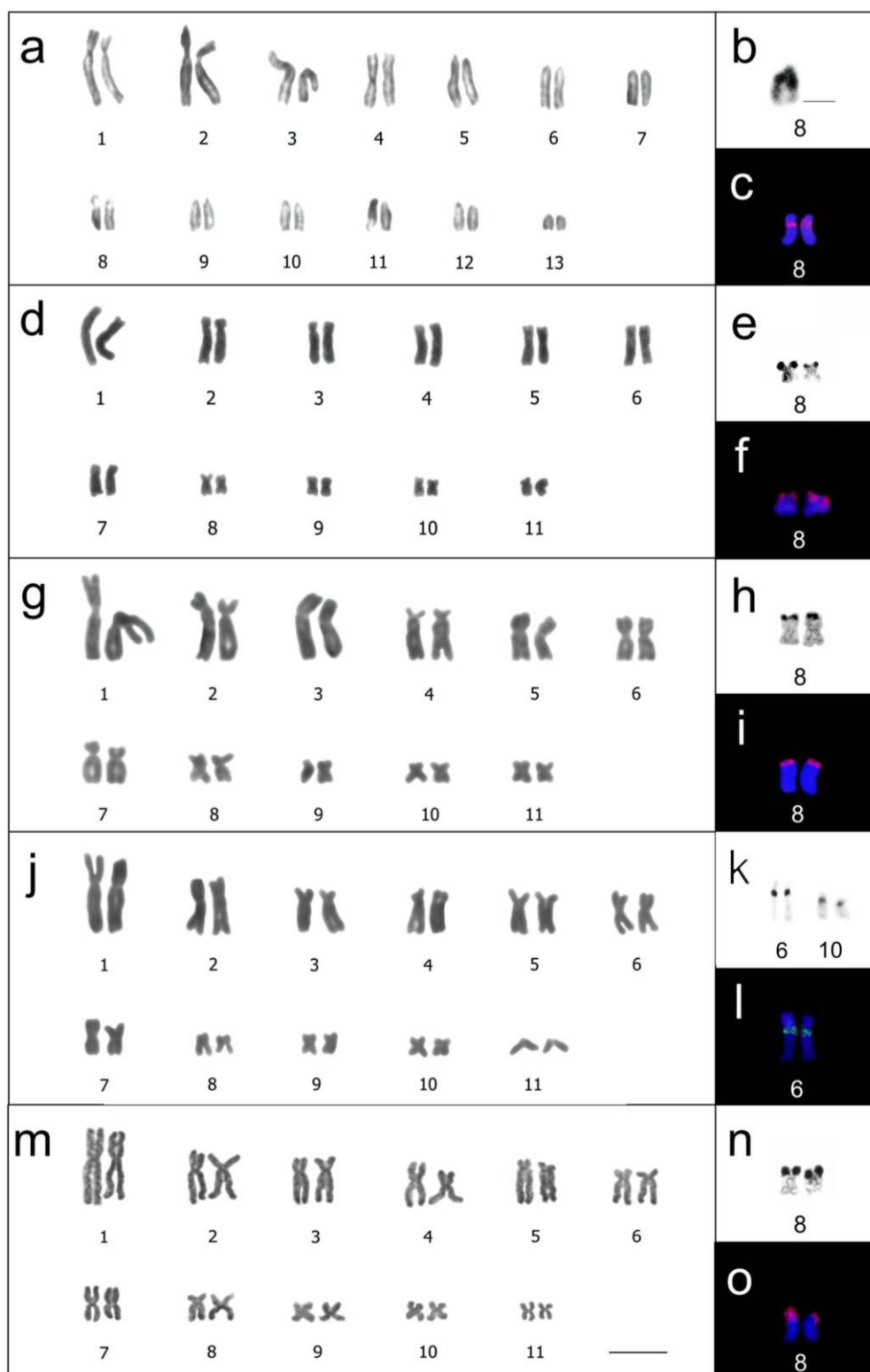


Figura 1. Cariótipos em coloração convencional, regiões organizadoras de nucléolo impregnadas por nitrato de prata e sítio de DNAr 18S de *Leptodactylus*: (a, b, c) *L. andreae* (2n=26); (d, e, f) *L. macrosternum* (2n=22); (g, h, i) *L. pentadactylus* (2n=22); (j, k, l) *L. petersii* (2n=22); (m, n, o) *L. riveroi* (2n=22). Barra=10μm.

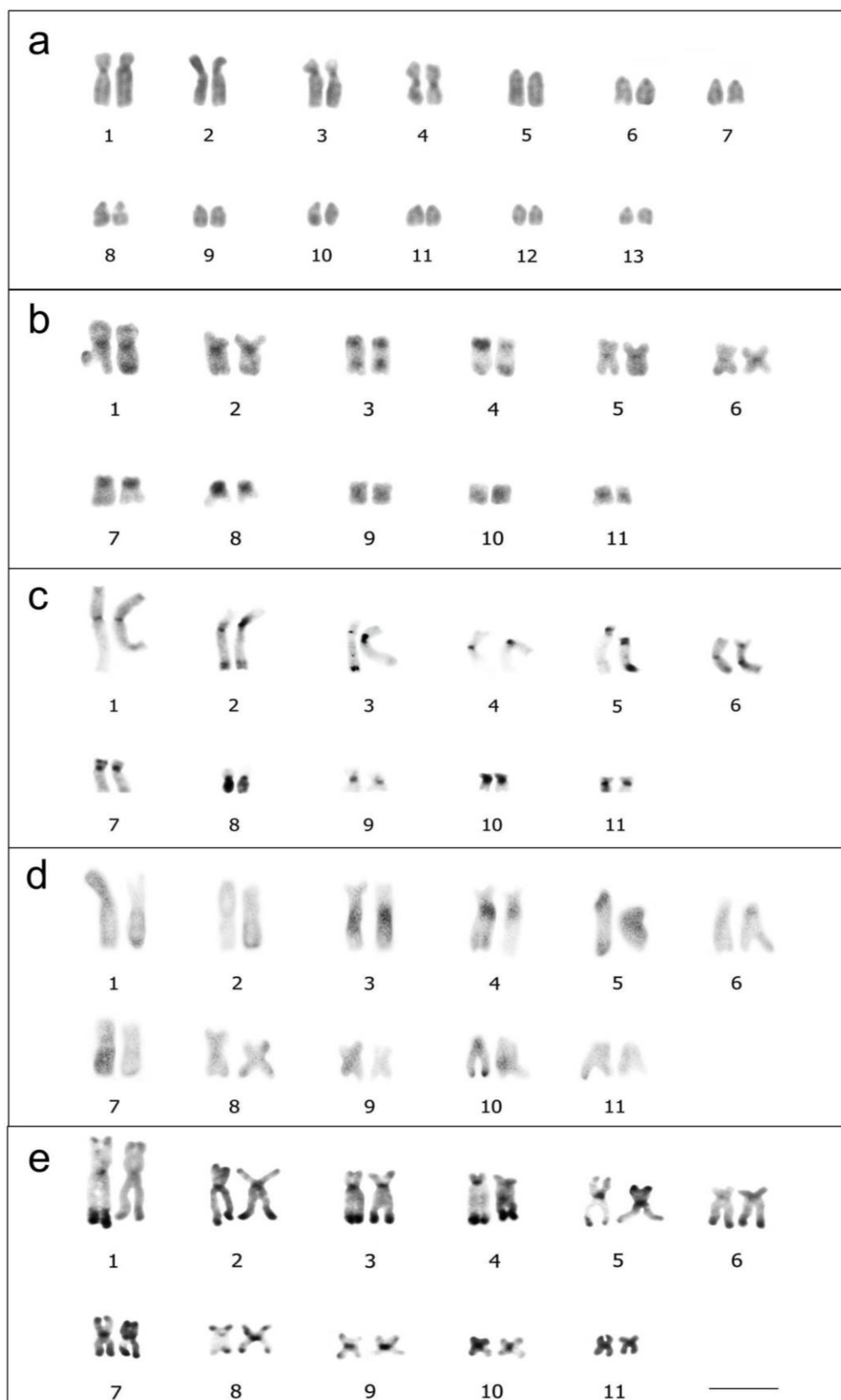
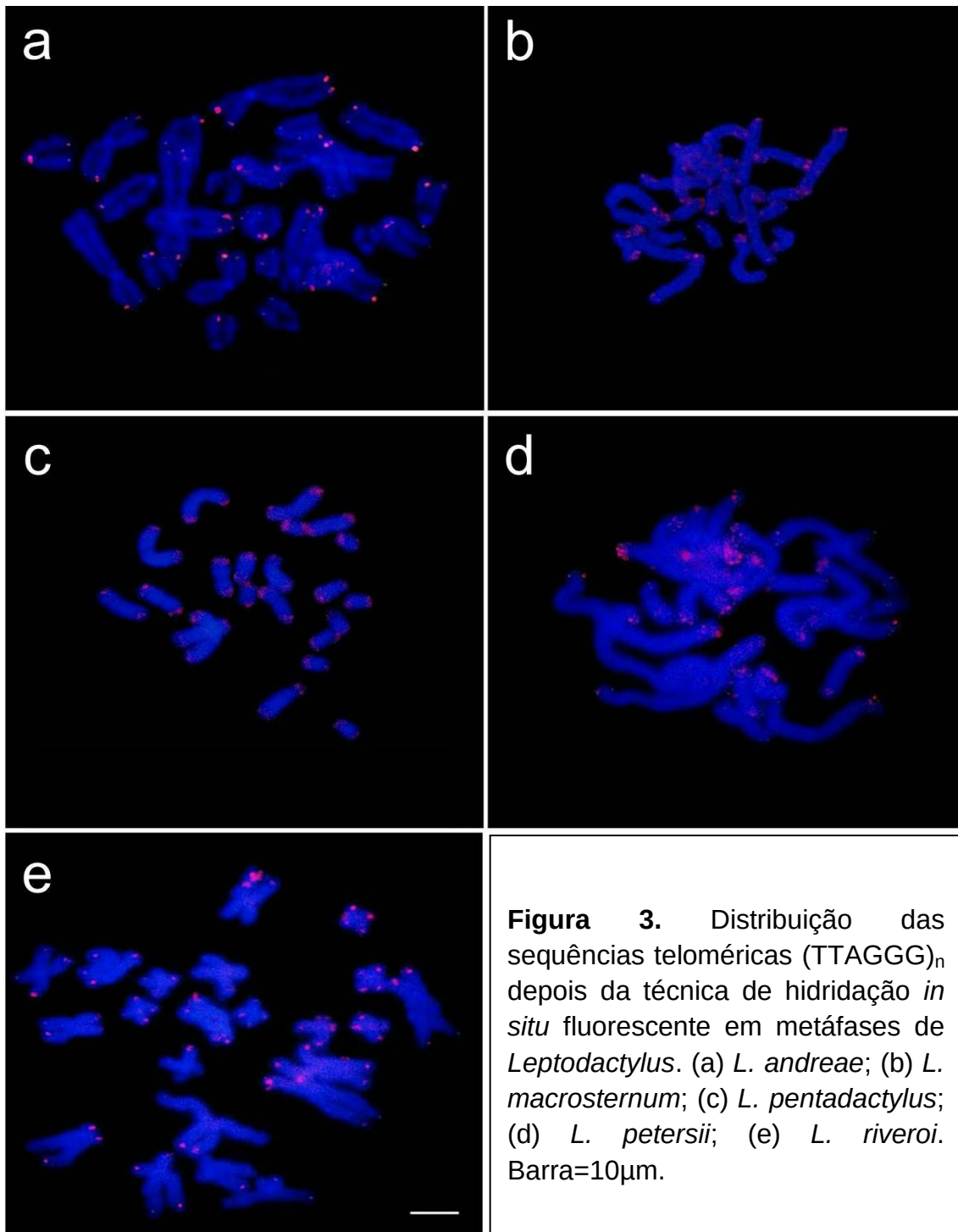


Figura 2. Padrão de bandamento C de *Leptodactylus*. (a) *L. andreae*, (b) *L. macrosternum*, (c) *L. pentadactylus*, (d) *L. petersii*, (e) *L. riveroi*. Barra=10µm.



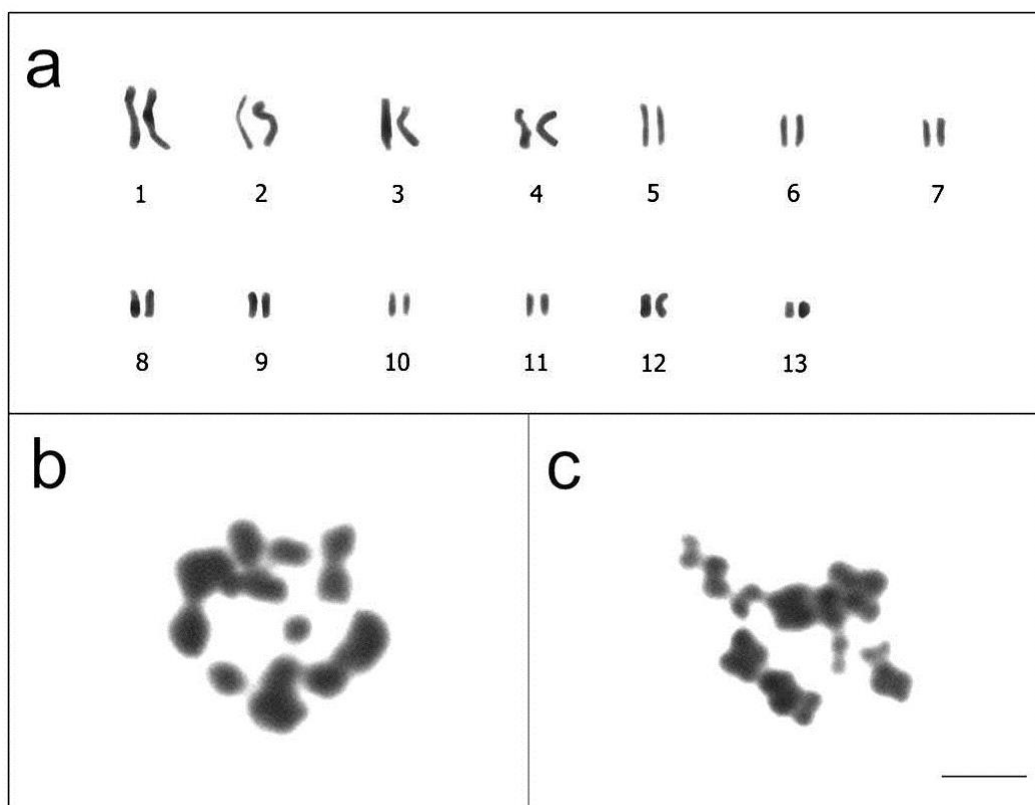


Figura 4. *Leptodactylus hylaedactylus* (a) Cariótipo em coloração convencional ($2n=26$), (b) Metáfase I mostrando 13 bivalentes, (c) Metáfase II mostrando 13 cromossomos. Barra=10 μ m.

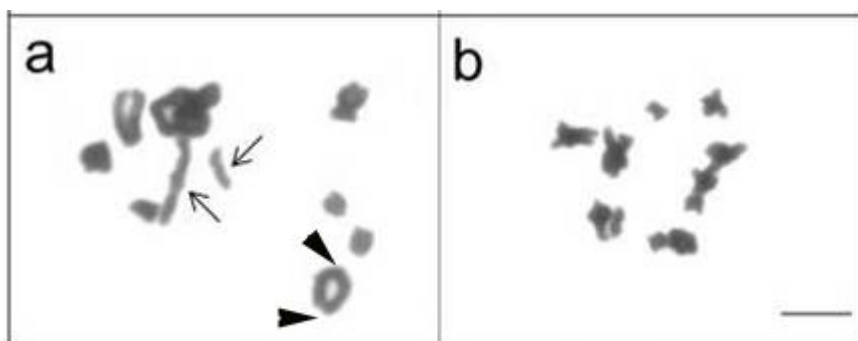


Figura 5. *Leptodactylus petersii* (a) Metáfase I mostrando 11 bivalentes, a maioria com dois quiasmas terminais (cabeça de seta). As setas indicam 1 bivalentes com 1 quiasma terminal. (b) Metáfase II mostrando 11 cromossomos. Barra=10 μ m.

Discussão

Desde o início da década de 70, acreditava-se que as espécies da família Leptodactylidae e de famílias mais derivadas como Dendrobatidae, Hylidae e Ranidae poderiam ter se originado a partir de um ancestral portador de um cariótipo semelhante ao encontrado em gêneros mais primitivos, com $2n=26$ cromossomos (Bogart 1973) e, neste caso, fusões cêntricas poderiam ter levado à redução do número cromossômico (Beçak 1968). Ainda, Morescalchi (1973) considerou a redução do número cromossômico uma tendência evolutiva para os anuros, dado que números elevados de cromossomos telocêntricos foram encontrados entre os anuros basais dentro da ordem. Contudo, não há consenso sobre o número diploide basal para o gênero *Leptodactylus*, pertencente à família Leptodactylidae.

De acordo com características morfológicas, ecológicas e reprodutivas, os *Leptodactylus* são divididos em cinco grupos, que refletem uma transição entre uma história de vida intimamente ligada à água para uma terrestre (Heyer 1969), sendo que o grupo *Leptodactylus ocellatus* apresenta características reprodutivas basais, *Leptodactylus marmoratus* características derivadas e as demais espécies dos outros três grupos apresentam características intermediárias (Heyer 1969).

Cariotipicamente, o grupo *Leptodactylus ocellatus* apresenta conservação do número diploide, sendo encontrado $2n=22$ cromossomos para todas as espécies analisadas. Este mesmo número diploide foi verificado também para os grupos *L. fuscus* e *L. pentadactylus*. Já, no grupo *L. melanonotus* além de $2n=22$ cromossomos, números diploides iguais a 20 e 24 cromossomos foram evidenciados. Para o grupo *L. marmoratus* nenhuma espécie apresentou $2n=22$, apenas 18, 23, 24 ou 26 cromossomos, sendo que para as espécies deste último grupo o número diploide, fórmula cariotípica e número fundamental podem ser considerados bons marcadores espécie-específicos, com algumas exceções (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; Silva *et al.* 2004; Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Silva *et al.* 2006; Arruda e Morielle-Versute 2008; Campos *et al.* 2009; Campos 2010; Oliveira *et al.* 2010; Suárez 2010; Zaracho e Hernando 2011; Gazoni *et al.* 2012).

Se considerarmos que o grupo *Leptodactylus ocellatus* apresenta a reprodução dependente de água e que esta é uma característica plesiomórfica (Heyer 1969), podemos assumir que região organizadora de nucléolo simples, com sítios de DNAr 18S localizados no 8º par cromossômico e $2n=22$ cromossomos seriam condições basais para o gênero, uma vez que todas as espécies deste grupo intragenérico apresentam estas características. Neste caso, cerca de 75% das espécies de *Leptodactylus* conservariam o número diploide ancestral e rearranjos cromossômicos não robertsonianos poderiam ter ocasionado as diferentes fórmulas cariotípicas. Porém, fissões e fusões cêntricas provavelmente teriam ocorrido em espécies dos grupos *L. melanonotus* e *L. marmoratus*, além dos rearranjos estruturais.

Os dados cromossômicos disponíveis para o grupo *L. marmoratus* demonstram tratar-se de um grupo cromossomicamente derivado, em função da variação do número diploide, posição das regiões organizadoras de nucléolo, diferentes fórmulas cariotípicas e presença de ITS (Bogart 1974; Campos *et al.* 2009; Suárez 2010; Zaracho e Hernando 2011; Gazoni *et al.* 2012, presente trabalho), corroborando a derivação proposta para os hábitos reprodutivos (Heyer 1969). Espécies do grupo *L. marmoratus* estão alocadas dentro do subgênero *Lithodytes* e a presença de cromossomos telocêntricos é evidente na maioria das espécies. Ainda, as espécies que possuem os maiores números de cromossomos telocêntricos são portadoras de maior número diploide (Bogart 1974; Campos *et al.* 2009; Suárez 2010; Zaracho e Hernando 2011), o que reforça a suposição de que esses conjuntos cromossômicos podem ter se originado de fissões, levando a um aumento do número diploide (Kuramoto e Allison 1989; Miura 1995; Busin *et al.* 2001).

Contudo, diferentes fórmulas cariotípicas estão presentes em indivíduos de diferentes populações de espécies do grupo *L. marmoratus*, tais como em *L. andreae* provenientes do Perú (Bogart 1974) e do Amazonas (presente trabalho), corroborando a existência de um complexo de espécies, cuja proposição embasou-se em padrões de vocalização e diferenças morfológicas (Angulo *et al.* 2003; Angulo e Icochea 2010). Outro complexo de espécies evidenciado cromossomicamente neste grupo é *L. hylaedactylus*, que apresenta diferentes fórmulas cariotípicas entre as populações (Bogart 1974;

Campos *et al.* 2009; presente trabalho). Porém, nenhuma conformação cromossômica meiótica que indique rearranjos cromossômicos foi evidenciada para as populações de Manaus, AM, já que $2n=13$ bivalentes típicos foram encontrados na meiose I. Além disso, as análises dos cromossomos mitóticos e meióticos de *L. andreae* e *L. hylaedactylus* não permitem o reconhecimento e distinção destes dois táxons (Bogart 1974; Campos *et al.* 2009; presente trabalho), uma vez que características cromossômicas robustas espécie-específicas não foram encontradas. Assim sendo, a delimitação destas espécies simpátricas podem ser efetuadas com maior eficiência pelos padrões de vocalização e por apresentarem segregação ecológica (Angulo *et al.* 2003).

O menor número diploide descrito para *Leptodactylus* ($2n=18$) foi evidenciado na espécie *L. lineatus* (Suárez 2010), que pertencem ao subgênero *Lithodytes* (que engloba as espécies do grupo *L. marmoratus*), mas que não se encaixa em nenhum dos grupos intragenéricos proposto por Heyer (1969). Provavelmente, eventos de fusões ocorreram nesta espécie, mas sítios teloméricos intersticiais (ITS) que são indicativos de rearranjos cromossômicos não foram evidenciados. Contudo, isto não significa que não ocorreram fusões, uma vez que as sequências teloméricas intersticiais podem ter sido perdidas durante processos de erosão molecular de DNAs repetitivos ou são sítios com poucos pares de bases e que não podem ser detectados pela FISH (Mandrioli *et al.* 1999). Esta pode ser a explicação para ITS não terem sido detectados para a maioria das espécies dos cinco grupos de *Leptodactylus* (Suárez 2010; presente trabalho), mesmo sendo evidente a presença de rearranjos cromossômicos com envolvimento do telômero, tais como as múltiplas translocações de *L. pentadactylus* (grupo *L. pentadactylus*) que originam uma cadeia cromossômica em anel na meiose dos indivíduos desta espécie (Gazoni *et al.* 2012).

Até o momento, sítios teloméricos intersticiais foram evidenciados apenas em *Leptodactylus podicipinus*, *Leptodactylus* sp. (aff. *podicipinus*) e *L. marmoratus*, sendo as duas primeiras pertencentes ao grupo *L. melanonotus* e a última ao grupo *L. marmoratus* (Gazoni *et al.* 2012). Os ITS de *Leptodactylus* sp. (aff. *podicipinus*) podem ter sido originados a partir de fusões, já que a espécie apresenta $2n=20$ cromossomos. Contudo, *Leptodactylus podicipinus*

apresenta $2n=22$ cromossomos e *L. marmoratus* $2n=24$ cromossomos, podendo estes ITS, estarem relacionados a rearranjos cromossômicos estruturais, que implicam no surgimento das diferentes fórmulas cariotípicas já descritas (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Campos 2010; Suárez 2010; Gazoni *et al.* 2012).

De um modo geral, dentro do grupo *Leptodactylus melanonotus* os números fundamentais e as fórmulas cariotípicas são variáveis entre as espécies e podem ser utilizados como marcadores espécie-específicos quando aliados a informações acerca da distribuição da heterocromatina constitutiva (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Campos 2010; Suárez 2010; Gazoni *et al.* 2012). As regiões organizadoras de nucléolo neste grupo são normalmente simples e evidenciadas nos cromossomos dos pares 4, 6 ou 8, coincidentes com os sítios ribossomais 18S (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Campos 2010; Suárez 2010; Gazoni *et al.* 2012), exceto em *Leptodactylus petersii*, onde marcações múltiplas foram evidenciadas nos pares 6 e 10 (presente trabalho). Entretanto, os sítios de DNAr 18S mostraram-se presentes apenas no par 6. Esta discordância provavelmente é em decorrência da presença de regiões heterocromáticas ácidas no par 10, as quais possuem afinidade pela prata, ou então esses sítios de DNAr 18S (par 10) podem ser muito pequenos, o que teria dificultado a sua identificação.

Ainda para *L. petersii*, diferentes padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva foram observados para indivíduos das diferentes populações. A heterocromatina normalmente é rica em sequências repetitivas, o que favorece o acúmulo de diferenças durante o processo evolutivo por estarem menos sujeitas às pressões seletivas, favorecendo o acúmulo de diferenças durante o processo evolutivo (Bohne *et al.* 2008). Porém, muitas vezes estas variações na quantidade e na distribuição da heterocromatina constitutiva podem ocorrer devido a mecanismos epigenéticos, os quais podem estar associados a mecanismos de regulação da expressão gênica, podendo desempenhar um papel importante na especiação e/ou adaptação (King 1991). As análises meióticas também foram conduzidas para *L. petersii* de diferentes populações.

Considerando os grupos intragenéricos *L. ocellatus* e *L. melanonotus*, algumas espécies estão alocadas como intermediárias entre os dois em virtude dos padrões reprodutivos e comportamentais, tais como *Leptodactylus riveroi* (Frost 2013). Com base nos padrões de bandamento C e de RON não é possível alocar *L. riveroi* em nenhum dos dois grupos, mas de acordo com as variações de fórmula cariotípica é possível sugerir uma maior proximidade da espécie com os representantes do grupo *L. ocellatus*, uma vez que não foram encontrados cromossomos do tipo telocêntrico.

As espécies do grupo *Leptodactylus pentadactylus* também apresentam conservação do número diploide ($2n=22$ cromossomos) e do número fundamental, sendo que todas apresentam apenas cromossomos com dois braços. Ainda, apesar de todas as espécies apresentarem RON simples, os pares são variáveis (2 ou 3 ou 8), concordantes com os sítios ribossomais 18S. Com relação ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, marcações espécie específicas são encontradas, sendo evidenciados blocos heterocromáticos em posições teloméricas, centroméricas e intersticiais, os quais variam de acordo com as espécies (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Amaro-Ghilardi *et al.* 2004; Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Arruda e Morielle-Versute 2008; Campos 2010; Oliveira *et al.* 2010; Suárez 2010; Gazoni *et al.* 2012; presente trabalho).

Ainda, diferenças intraespecíficas populacionais estão presentes no grupo, sendo encontradas diferentes fórmulas cariotípicas para *L. knudseni*, *L. labyrinthicus*, *L. pentadactylus*, *L. rhodomystax* (Tabela 1, presente estudo). Parte desta variação nas fórmulas cariotípicas pode estar relacionada à qualidade da preparação cromossômica analisada, ao padrão de compactação do DNA e na medida dos braços cromossômicos que geram divergência na interpretação do cariótipo. Porém, estudos recentes mostram que o centrômero heterocromático é rico em sequências repetitivas de DNA e devido a sua natureza repetitiva pode ser considerada uma porção cromossômica dinâmica, que têm capacidade de reposicionar-se devido a respostas epigenômicas, o que implicaria em diferentes fórmulas cariotípicas para uma mesma espécie (Rocchi *et al.* 2012). Contudo, rearranjos cromossômicos não podem ser descartados, visto que em *L. pentadactylus* coletados no município de

Paranaíba, MT, apenas os cromossomos 1, 2, 6, 7 e 8 podem ser emparelhados e os outros não têm homólogos reconhecíveis, mostrando que esta espécie apresenta uma constituição cromossômica complexa em decorrência de translocações múltiplas, reconhecidas inclusive na meiose (Gazoni *et al.* 2012).

O grupo *Leptodactylus fuscus* também apresenta número diploide conservado, sendo observado $2n=22$ cromossomos para todas as espécies e número fundamental igual a 44 para a maioria (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Silva *et al.* 2004; Campos 2010; Suárez 2010), excetuando *L. latinasus* que possui $NF=42$, em virtude de ser a única a apresentar cromossomos telocêntricos (Bogart 1974; Suárez 2010). Marcações heterocromáticas centroméricas são encontradas em todas as espécies, contudo marcações distais e intersticiais podem auxiliar na individualização dos táxons (Bogart 1974; Silva *et al.* 2000; Silva *et al.* 2004; Amaro-Ghilardi *et al.* 2006; Arruda e Morielle-Versute 2008; Campos 2010; Oliveira *et al.* 2010; Suárez 2010).

Diferentemente do que se pensava há poucos anos atrás, sabe-se que a heterocromatina está envolvida em funções celulares vitais, mantendo-se assim, a integridade do genoma (Grewal e Jia 2007). Em Amphibia, o aumento da heterocromatina constitutiva é tido como uma tendência evolutiva, ainda que não se descarte a possibilidade de que a cromatina tenha sido reduzida em alguns grupos. Para os anuros mais modernos (Neobatrachia) foi relatada uma grande diversidade interespecífica na quantidade/distribuição da heterocromatina e para o grupo dos anuros em geral foram sugeridos três processos evolutivos: adição de heterocromatina em sítios cromossômicos específicos; transformação de regiões eucromáticas em heterocromáticas; e ainda, a evolução conjunta de múltiplos sítios heterocromáticos (King 1991). Hoje, sabe-se que os elementos repetitivos podem funcionar como alvos para a formação da heterocromatina (Grewal e Jia 2007), contudo estudos envolvendo a composição gênica destas regiões heterocromáticas ainda são escassos.

Assim, apesar de ser possível verificar tendências cariotípicas dentro dos grupos intragenéricos, discutir padrões evolutivos com exatidão ainda não é possível e dados que relacionem os padrões genéticos e ecológicos para os diferentes grupos intragenéricos poderiam auxiliar na elucidação da história

evolutiva dessa família. Isso é evidente porque mesmo com a grande quantidade de informação disponível, ainda há discordância sobre as relações filogenéticas da família Leptodactylidae (Frost *et al.* 2006; Grant *et al.* 2006; Ponssa 2008; Pyron e Wiens 2011). Interessantemente, baseado nas características reprodutivas (Heyer 1969; Haddad e Prado 2005) as espécies do grupo *L. marmoratus* são consideradas derivadas, fato que é corroborado pelas características cromossômicas. Porém, isto não é suportado pelos dados filogenéticos propostos por Pyron e Wiens (2011).

Portanto, estes dados reforçam a ideia da complexidade existente dentro do gênero *Leptodactylus*, assim como nos diferentes grupos que compõem este táxon e indicam a necessidade de mais estudos englobando a ecologia e genética em relação às espécies, para que seja compreendida a história evolutiva do gênero.

Referências bibliográficas

As referências bibliográficas estão alocadas no tópico “referências bibliográficas gerais”.

IV Conclusões

As espécies do grupo *L. ocellatus* são consideradas basais do ponto de vista cromossômico, dado que todas as espécies do grupo analisadas até o momento, apresentam $2n=22$ e RON no par 8, como encontrado para *L. macrosternum* e para *L. riveroi*.

A espécie *L. riveroi*, considerada intermediária entre os grupos *L. melanonotus* e *L. ocellatus*, apresenta constituição cariotípica mais próxima do grupo *L. ocellatus* por não apresentar cromossomos telocêntricos.

Os representantes do grupo *L. marmoratus*, juntamente com *Leptodactylus lineatus*, todos pertencentes ao subgênero *Lithodytes*, apresentam uma constituição cariotípica variada ($2n=18, 23, 24, 26$).

Para os grupos *L. fuscus* e *L. pentadactylus*, o número diploide $2n=22$ é constante até o momento, porém variações de RON e diferentes padrões heterocromáticos são encontrados, assim como diferentes fórmulas cariotípicas em decorrência de rearranjos cromossômicos.

V Referências

- Almeida, A.P.; Angulo, A. 2006. A new species of *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) from the state of Espírito Santo, Brazil, with remarks on the systematic of associated populations. *Zootaxa*, 1334, 1-25.
- Amaro-Ghilardi, R.C.; Rodrigues, M.T.; Yonenaga-Yassuda, Y. 2004. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). *Caryologia*, 57: 53-65.
- Amaro-Ghilardi, R.C.; Skuk, G.; Sa, R.; Rodrigues, M.T.; Yonenaga-Yassuda, Y. 2006. Karyotypes of eight species of *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new karyotype for the genus. *Phyllomedusa*, 5: 119-133.
- Angulo, A.; Cocroft, R. B.; Reichle, S. 2003. Species identity in the genus *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Peru. *Herpetologica*, 59: 490-504.
- Angulo, A.; Icochea, J. 2010. Cryptic species complexes, widespread species and conservation: lessons from Amazonian frogs of the *Leptodactylus marmoratus* group (Anura: Leptodactylidae). *Systematics and Biodiversity*, 8(3): 357-370.
- Arruda, M.P.; 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: 161-176.
- Asahida, T.; Kobayashi, T.; Saitoh, K.; Nakayama, I. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science*, 62(5): 727-730.

Avila-Pires, T.C.S.; Hoogmoed, M.S.; Vitt, L.J. 2007. Herpetologia da Amazônia. In: Nascimento, L. B. & Oliveira, M. E. (Eds.). *Herpetologia no Brasil II*. Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte, Minas Gerais. p. 13-43.

Baldissera Jr, F.A.; Oliveira, P.S.L.; Kasahara, S. 1993. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Revista Brasileira de Genética*, 16: 335-345.

Beçak, M.L. 1968. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, 21: 191-208.

Bogart, J.P. 1970. Los cromosomas de anfibios anuros del género *Eleutherodactylus*. *Act IV Congr Latin Zool.*, 1: 65-78.

Bogart, J.P. 1973. Evolution of anuran karyotypes. In: Vial, J.L. (Ed.). *Evolutionary Biology of the Anurans: contemporary research on major problems*. University of Missouri Press, Columbia. p. 337-349.

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

Bohne, A.; Brunet, F.; Galiana-Arnoux, D.; Schulthesis, C.; Volff, J.N. 2008. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16: 203-215.

Busin, C.S.; Vinciprova, G.; Recco-Pimentel, S.M. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica*, 110: 131-141.

Campos, J.R.C.; Ananias, F.; Brasileiro, C.A.; Yamamoto, M.; Haddad, C.F.B.; Kasahara, S. 2009. Chromosome evolution in three brazilian *Leptodactylus*

species (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic considerations. *Hereditas*, 146: 104-111.

Campos, J.R.C. 2010. *Constituição cariotípica em leptodactídeos do gênero Leptodactylus e em espécies de famílias relacionadas à Leptodactylidae (Amphibia: Anura)*. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, São Paulo. 169 pp.

Cole, C.J.; Leavens, C.R. 1971. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol.*, 49: 102.

De Lucca, E.; Jim, J. 1974. Os cromossomos de alguns Leptodactylidae (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Biologia*, 34: 407-410.

Denaro, L. 1972. Karyotypes of Leptodactylidae Anurans. *Journal of Herpetology*, 6: 71-74.

Estoup, A.; Presa, P.; Krieg, F.; Vaiman, D.; Guyomard, R. 1993. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71: 488-496.

Ford, C.; Hamerton, J. 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 31: 247-251.

Frost, D.R. 1985. *Amphibians Species of the World. A Taxonomic and Geographical Reference*. Kansas: Allen Press, Inc, and The Association of Systematics Collection. 732 pp.

Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; De Sa, R.O. Channing A Wilkinson M Donnellan SC et al. 2006. The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297: 1-370.

Frost, D.R. 2013. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.5 (08 January, 2013). Eletronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA.

Gazoni, T.; Gruber, S.L.; Silva, A.P.Z.; Araújo, O.G.S.; Narimatsu, H.; Strüssmann, C.; Haddad, C.F.B.; Kasahara, S. 2012. Cytogenetic analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. *BMC Genetics*, 13: 109.

Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J. R.; Means, D.B.; Noonan, B.P.; Schargel, W.E.; Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematic of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 269: 1-262.

Green, D.M.; Sessions, S.K. 1991. Nomenclature for chromosomes. *In: Amphibian Cytogenetics and Evolution*. San Diego: Academic Press, 431-432.

Green, D.M.; Sessions, S.K. 2007. Karyology and Cytogenetics. *In: Amphibian Biology*, Volume 7. Systematics. Heatwole H, Tyler M (Eds). Surrey Beatty and Sons, 2756-2841 pp.

Grewal, S.I.; Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited *Nature Review Genetics*, 8(1): 35-46.

Gross, M.C.; Feldberg, E.; Cella, D.M.; Schneider, M.C.; Schneider, C.H.; Porto, J.I.R.; Martins, C. 2009. Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity*, 102(5): 435-441.

Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76: 1117-1127.

Haddad, C.F.B.; Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic forest of Brazil. *BioScience*, 55(3): 207-217.

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

Heyer, W.R. 1974. Relationships of the *marmoratus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) within the subfamily Leptodactylinae. *Contributions in Science of the Natural History Museum of Los Angeles County*, 253: 1-46.

Hickman, C.P.; Roberts, L.S.; Larson, A. 2004. Primeiros tetrápodes e anfíbios atuais. In: *Princípios Integrados de Zoologia* 11. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 510-529.

Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeder, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, 19(17): 4780.

King, M. 1991. The evolution of the amphibian genome. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego. p. 359-391.

Kuramoto, M.; Allison, A. 1989. Karyotypes of microhylid frogs of Papua New Guinea and their systematic implication. *Herpetologica*, 45: 250-259.

Lima, A.P.; Magnusson, W.E.; Menin, M.; Erdtmann, L.K.; Rodrigues, D.J.; Keller, C.; Hödl, W. 2012. *Guia de Sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central = Guide to the Frogs to Reseva Adolpho Ducke, Central Amazonia*. 2ª edição. INPA, Manaus, Amazonas. 187 pp.

Mandrioli, M.; Cuoghi, B.; Marini, M.; Manicardi, G. C. 1999. Localization of the (TTAGGG)_n telomeric repeat in the chromosomes of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Hamilton Buchanan) (Osteichthyes). *Caryologia*, 52: 155-157.

Miura, I.; Niishioka, M.; Bordikin, L.J.; Wu, Z. 1995. The origin of the brown frogs with 2n=24 chromosomes. *Experientia*, 51: 79-188.

Morescalchi, A. 1973. Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution. *In: Amphibia*. Chiarelli, A.B.; Capana, B. Academic Press, New York. p. 233-348.

Oliveira, H.H.P.; Souza, C.C.N.; Ribeiro, C.L.; Cruz, A.D.; Bastos, R.P.; Silva, D.M. 2010. Citogenética comparativa das famílias Leptodactylidae e Hylidae do cerrado Goiano. *Estudos, Goiânia*, 37: 725-735.

Paiva, C.R.; Nascimento, J.; Silva, A. P. Z.; Bernarde, P. S.; Ananias, F. 2010. Karyotypes and Ag-NORs in *Phyllomedusa camba* De La Riva, 199 and *P. rhodei* Mertens, 1926 (Anura, Hylidae, Phyllomedusine): cytotaxonomic considerations. *Italian Journal of Zoology*, 77: 116-121.

Pinkel, D.; Straume T.; Gray J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.

Ponssa, M.L. 2008. Cladistic analysis and osteological descriptions of the frog species in the *Leptodactylus fuscus* species group (Anura, Leptodactylidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 46: 249-266.

Pough, F.H.; Heiser, J.B.; McFarland, W.N. 2008. Salamandras, Anuros e Cecílias. In: *A Vida dos Vertebrados*. 4 ed. Atheneu, São Paulo, São Paulo. p. 220-263.

Pyron, A.; J.J. Wiens. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 543–583.

Rocchi, M.; Archidiacono, N.; Schempp, W.; Capozzi, O.; Stanyon, R. 2012. Centromere repositioning in mammals. *Heredity*, 108: 59–67.

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. I. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. p. 633-664.

Schmid, M.; Steinley, C.; Nanda, I.; Epplen, J.T. 1990. Chromosome banding in Amphibia: In: Olmo, E. (ed.), *Cytogenetics of amphibians and reptiles*, Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin. p. 21-45.

Segalla, M.V.; Caramaschi, U.; Cruz, C.A.G.; Garcia, P.C.A.; Grant, T.; Haddad, C.F.B.; Langone, J. 2012. *Brazilian amphibians – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Captured on *date of your online consult*.

Silva, A.P.Z.; Haddad, C.F.B.; Kasahara, S. 2000. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. *Cytobios*, 103: 25-38.

Silva, A.P.Z.; Garcia, P.C.A.; Martins, V.G.; Bacci, M.; Kasahara, S. 2004. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, L.

gracilis delattini, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. *Amphibia-Reptilia*, 25: 185-196.

Silva, A.P.Z.; Haddad, C.F.B.; Galassi, G.; Kasahara, S. 2006. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. *Genetica*, 127: 35-44.

Suárez, P. 2010. *Estudos cromossômicos em anuros das famílias Hylidae Rafinesque, 1815 e Leptodactylidae Werner, 1896 (Amphibia: Anura)*. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Zoologia – Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará, Pará. 145 pp.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 74: 304-306.

Vitt, L.J.; Caldwell, J.P. 2009. Frogs. In: *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 3 ed. Academic Press. p. 435-482.

Zaracho, V.H.; Hernando, A.B. 2011. The karyotype of *Adenomera diptyx* (Boettger 1885) (Anura, Leptodactylidae) from northeastern Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, 34(1): 84-87.

Wilkinson, M.; San Mauro, D.; Sherratt, E.; Gower, D.J. 2011. A nine-family classification of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Zootaxa*, 2874: 41-64.

VI Anexo

Material e métodos expandido

Espécies em estudo

Foram analisados citogeneticamente 22 exemplares de espécies pertencentes ao gênero *Leptodactylus*, sendo eles: 3 *Leptodactylus andreae*, 2 *Leptodactylus hylaedactylus*, 2 *Leptodactylus macrosternum*, 9 *Leptodactylus pentadactylus*, 4 *Leptodactylus petersii* e 2 *Leptodactylus riveroi*, todos coletados no estado do Amazonas, Brasil (Tabela 1; Figuras 2 e 3). As coletas foram feitas à noite, guiada pelo canto dos animais e a captura foi ativa, não tendo sido possível obter um número amostral constante para as espécies.

Após a morte com dose letal de xilocaína e retirada do fígado e da medula óssea dos fêmures, os exemplares foram fixados em formol 10% por 24 horas, conservados em álcool 70% e depositados na Coleção Zoológica Paulo Bührnheim (CZPB-UFAM), da Universidade Federal do Amazonas. Os anuros provenientes de Manaus e seus entornos (campus da UFAM, campus do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Reserva Florestal Adolpho Ducke e lago Catalão – confluência do rio Negro e Solimões) foram coletados entre os meses de novembro/2011 a agosto/2012, durante o período reprodutivo, sendo diferenciados machos e fêmeas, quando possível, pelos caracteres morfológicos externos. Estes indivíduos foram levados vivos para o Laboratório de Citogenômica Animal da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, onde foram realizadas as análises. As suspensões referentes aos animais coletados nos municípios de São Sebastião do Uatumã, Santa Isabel do Rio Negro e Tapauá, foram obtidas em campo durante expedições realizadas pelo projeto SISBIOTA, durante os meses de setembro e outubro/2011; março e abril/2012 e agosto/2012, respectivamente. Os animais foram identificados pela equipe de herpetologia vinculada ao projeto.

Todos os animais foram capturados com autorizações cedidas pelo ICMBio/SISBIO (Nº. 35424-1; Nº. 3678-1; Nº. 11323) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (no. 076/2012).

Tabela 1. Exemplares analisados de *Leptodactylus*, indicando as espécies, locais de coleta, sexo e número de tombo na Coleção Zoológica Paulo Bührnheim (CZPB-UFAM). Sendo: ♂ = macho; ♀ = fêmea; ? = sexo indeterminado; J = juvenil. Os locais de coleta são: a - Campus da UFAM, Manaus (03°06'4,3"S, 59°58'32"W); b - INPA, Manaus (03°5'21"S, 59°59'21"W); c - Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus (02°55'37"S, 59°53'31"W); d - lago Catalão, Iranduba (03°09'47"S, 059°54'29"W); e - rio Jatapu, São Sebastião do Uatumã (0°53'36"W, 58°51' W); f - rio Darahá, Santa Isabel do Rio Negro (0°24'24"N, 65°1'1"W); g - igarapé do Jacinto (rio Purus), Tapauá (04°50'20"S, 62°53'28"W).

Grupo (Frost et al. 2006)	Espécie	Local de coleta	Nº de espécimes/ Sexo	CZPB-UFAM
<i>Leptodactylus marmoratus</i>	<i>Leptodactylus andreae</i> Müller, 1923	b f	2? 1?	164-345
	<i>Leptodactylus hylaedactylus</i> (Cope, 1868)	a b	1♂ 1♀	162-340
	<i>Leptodactylus macrosternum</i> Miranda-Ribeiro, 1926	d	1♂ e 1♀	163-343
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	<i>Leptodactylus pentadactylus</i> (Laurenti, 1768)	a e f g	1♂ e 1♀ 1♀ 1♀ e 1J 4?	160-333
<i>Leptodactylus melanonotus</i>	<i>Leptodactylus petersii</i> (Steindachner, 1864)	a c d	2♂ 1♀ 1♂	161-335
Intermediário entre os representantes do grupo <i>Leptodactylus melanonotus</i> e <i>Leptodactylus ocellatus</i>	<i>Leptodactylus riveroi</i> Heyer e Pyburn, 1983	c	1♂ e 1♀	161-334

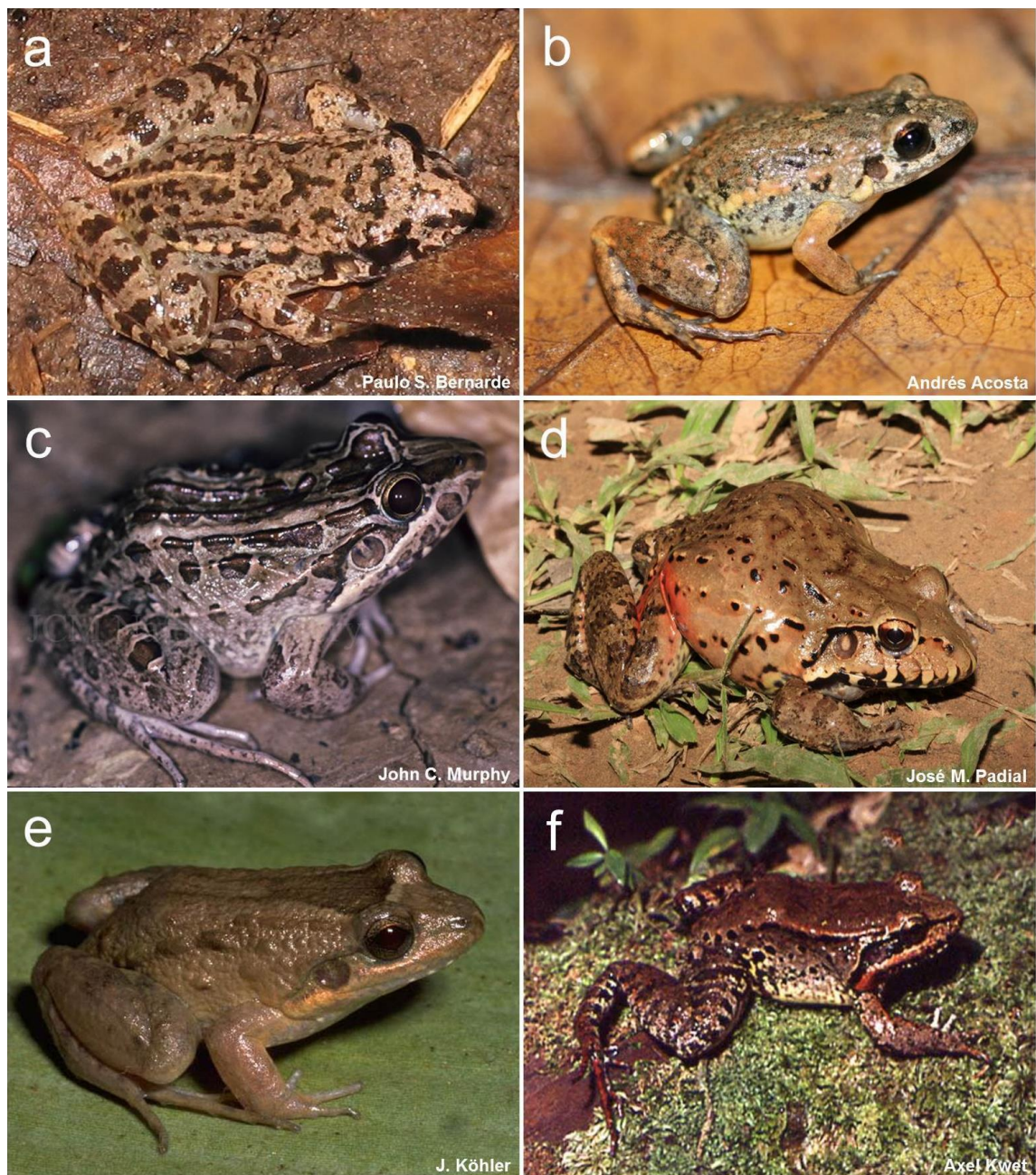


Figura 1. Espécies analisadas: (a) *Leptodactylus andreae*, (b) *Leptodactylus hylaedactylus*, (c) *Leptodactylus macrosternum*, (d) *Leptodactylus pentadactylus*, (e) *Leptodactylus petersii*, (f) *Leptodactylus riveroi*.

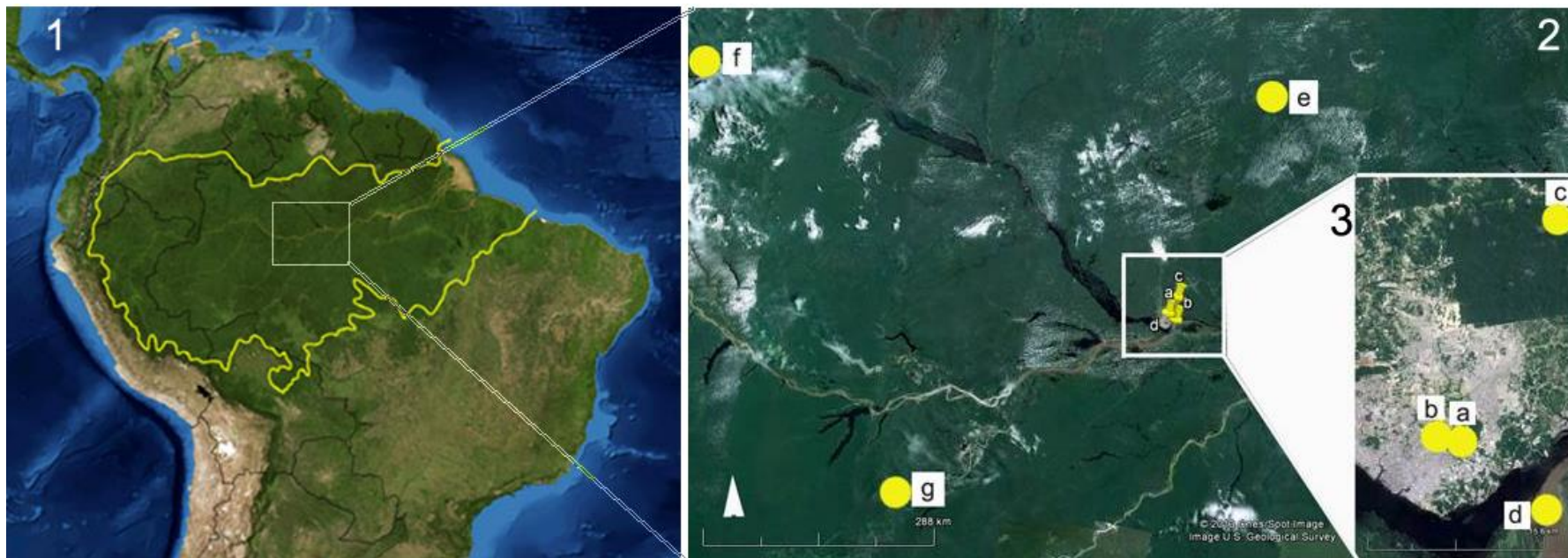


Figura 2. Mapa indicando a Amazônia central (1) e os locais de coleta (2). Em destaque à direita (3) os pontos amostrais de Manaus e seus entornos. a - Campus da UFAM, Manaus ($03^{\circ}06'4,3''\text{S}$, $59^{\circ}58'32''\text{W}$); b - INPA, Manaus ($03^{\circ}5'21''\text{S}$, $59^{\circ}59'21''\text{W}$); c - Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus ($02^{\circ}55'37''\text{S}$, $59^{\circ}53'31''\text{W}$); d - lago Catalão, Iranduba ($03^{\circ}09'47''\text{S}$, $059^{\circ}54'29''\text{W}$); e - rio Jatapu, São Sebastião do Uatumã ($0^{\circ}53'36''\text{W}$, $58^{\circ}51' \text{ W}$); f - rio Darahá, Santa Isabel do Rio Negro ($0^{\circ}24'24''\text{N}$, $65^{\circ}1'1''\text{W}$); g - igarapé do Jacinto (rio Purus), Tapauá ($04^{\circ}50'20''\text{S}$, $62^{\circ}53'28''\text{W}$). Fonte: *Google Earth*.

Indução de mitoses nos indivíduos amostrados

Para obtenção de um maior número de células em metáfase, foi utilizada a técnica para indução de mitoses, descrita por Cole e Leavens (1971) na qual uma solução de fermento biológico foi aplicada nos espécimes.

A solução de fermento biológico foi preparada com 0,3g de fermento biológico comercial, 0,3g de açúcar e 10mL de água destilada, sendo esta mantida em estufa (37°C) por um período de 15-20 minutos, e posteriormente injetada na região ventral do animal, na proporção de 1mL para cada 100g de peso corpóreo, sendo estes mantidos vivos de 48-72h (Paiva *et al.* 2010). Transcorrido este tempo, os animais foram tratados com injeção intraperitoneal de colchicina, na proporção de 0,1mL/10g de peso corporal, nas concentrações de 0,0125%, 0,1% ou 1%, por 12 horas (Baldissera Jr *et al.* 1993). Após este período, os animais foram eutanasiados com dose letal do anestésico xilocaína (5%). Em alguns indivíduos o tratamento com colchicina (0,1-1%) foi *in vitro*.

Obtenção de cromossomos mitóticos e meióticos

Para a obtenção dos cromossomos foram retirados de cada indivíduo a medula óssea dos dois fêmures e o fígado, de acordo com o protocolo de Ford e Hamerton (1956) e Baldissera Jr *et al.* (1993), com modificações. As células foram hipotonizadas com KCl a 0,075M contido em cubetas de vidro durante o período de 30 minutos, em estufa a 37°C. Em seguida o material foi ressuspensionado cuidadosamente com o auxílio de seringa de vidro e transferido para um tubo de centrífuga, utilizando-se uma pipeta *Pasteur*, sendo também efetuada a pré-fixação com a adição de 4 gotas de fixador *Carnoy I* (3 metanol : 1 ácido acético), recém preparado e gelado. O material foi centrifugado por 10 minutos a 900rpm, descartando em seguida o sobrenadante. Posteriormente foram adicionados 8mL 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 1,5mL de fixador e o material foi ressuspensionado com cuidado. Esta suspensão celular foi armazenada em tubos de 1,5mL e mantida em *freezer* a -10°C. Posteriormente, as suspensões foram gotejadas em lâminas limpas e imersas em água destilada aquecida à 60°C e coradas com Giemsa a 5%,

previamente diluído em tampão fosfato 0,06M (pH 6,8), por 10 minutos, lavadas em água de torneira e secas ao ar.

Para obtenção dos cromossomos meióticos, os testículos dos animais foram colocados em solução hipotônica de KCl 0,075M por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram fixados três vezes, em Carnoy I por 10 minutos cada e armazenados em Carnoy I em freezer a -10°C (Gross *et al.* 2009). Para a confecção das lâminas meióticas, pequenos fragmentos de testículo foram colocados sobre lâmina seca e limpa, em seguida acrescentou-se duas gotas de ácido acético a 50%, e o testículo foi macerado e espalhado por toda a superfície da lâmina. A lâmina foi seca em placa aquecedora a 40°C e corada com Giemsa (5%).

Caracterização da heterocromatina constitutiva (Banda 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 à 42°C por 2 minutos, e lavada com água destilada. Após isto, a lâmina foi incubada por 10 segundos em solução de Hidróxido de Bário a 5% (filtrada e recém-preparada à 42°C) para *L. riveroi* e 30 segundos para as demais espécies. 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 (Cloreto de Sódio à 0,3M e Citrato Sódico à 0,03M), pH 6,8. Este processo foi feito em banho-maria a 60°C por 15 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 5%, diluída em tampão fosfato 0,06M (pH 6,8) por 10 minutos e lavadas com água destilada.

Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs)

Para a detecção das RONs foi utilizado o protocolo descrito por Howell e Black (1980), com modificações. A técnica consistiu no gotejamento de uma solução coloidal contendo 1g de gelatina comercial sem aroma dissolvida em 50mL de água destilada com o acréscimo de 0,5mL de ácido fórmico e nitrato

de prata a 50% (1g de AgNO₃/1mL de água destilada) na proporção 1:2 sobre a lâmina contendo a suspensão celular. Foi colocada uma lamínula sobre a lâmina e em seguida, o material foi posto em câmara úmida a 60°C por 8 minutos. Após a lâmina atingir a coloração marrom dourada, foi lavada com água destilada e a lamínula foi retirada naturalmente com a lavagem.

Extração de DNA

Foram marcadas as sequências teloméricas e os sítios de DNAr 18S das espécies *L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus*, *L. petersii* e *L. riveroi*. Para a obtenção das sondas foi feita a extração de DNA a partir do tecido muscular das espécies *Leptodactylus fuscus* e *Leptodactylus riveroi* utilizando o protocolo básico de Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações. Para as espécies analisadas com exceção de *L. riveroi*, foram utilizadas sondas heterólogas das espécies das quais foi extraído o DNA. Para a realização deste procedimento, foram macerados aproximadamente 20mg de tecido muscular e transferido para um tubo de volume de 1,5mL. Adicionou-se 500µL de tampão de lise (Tris-HCl 10mM em pH 8,0, NaCl 0,3M, EDTA 10mM, Urea 4M, SDS 1%) de Estoup *et al.* (1993) e Asahida *et al.* (1996). Posteriormente foram acrescentados: 15µL de proteinase K (10mg/mL) e 6µL de RNase (10mg/mL). As amostras foram incubadas a 60°C por aproximadamente 2 horas para que o tecido fosse totalmente digerido. Adicionou-se 100µL de acetato de amônio 3M, 1 volume (600µL) de fenol-clorofórmio (1:1) e agitou-se por inversão, por alguns minutos. Centrifugou-se por 30 minutos a 14.000rpm em temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para um novo tubo, adicionou-se 600µL de clorofórmio e misturou-se, gentilmente, por alguns minutos, por inversão. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 14.000rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi acrescentado 100µL de acetato de amônio 3M, 1 volume (600µL) de isopropanol gelado e misturado gentilmente por inversão. Deixou-se precipitar a -20°C por 14 horas. O material foi retirado do *freezer* e centrifugado por 30 minutos a 14.000rpm, descartando o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 70% e centrifugado por 20 minutos a 14.000rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco em estufa a 55°C,

ressuspendido em água milli-Q e deixou-se eluindo por 14 horas. Para possibilitar a análise da quantidade e integridade do material, o DNA extraído foi quantificado por comparação com marcador de concentração conhecida, em eletroforese padrão (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 40 minutos) em gel de agarose 0,8% e corado com Gel Red (*Biotium*). A visualização e análise do DNA no gel foram feitas no fotodocumentador *Easy Doc 100* (*BioAgency*), o qual possui acoplado um transluminador de luz ultravioleta (260 nm). O DNA extraído foi utilizado para obtenção das sondas de DNA ribossomal por amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Amplificação de sequências teloméricas e DNAr 18S através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A sequência telomérica (TTAGGG)_n foi amplificada por reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo efetuado em um volume final de 25µL contendo tampão 10x com 1,5mM de MgCl₂, dNTPs (1mM), 0,2µL *primer* (TTAGGG)₅, 0,2µL *primer* (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.* 1991) e 2U de Taq DNA polimerase. A primeira parte da amplificação foi realizada com baixa estringência (4min a 94°C; seguidos por 12 ciclos de 1min a 94°C, 45s a 52°C e 1min 30s a 72°C), seguidos por 35 ciclos de alta estringência (1 min a 94°C, 1 min 30s a 60°C e 1 min 30 s a 72°C).

Para as sondas de DNAr 18S (família 45S) foram usados os *primers*: DNAr 18S (IpF 5'CCGCTTTGGTGACTCTTGAT e IpR 5'CCGAGGACCTCACTAAACCA) (Gross *et al.* 2010). O DNAr 18S foi amplificado por reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Saiki *et al.* 1988), sendo efetuado em um volume final de 25µL contendo tampão 10x com 1,5mM de MgCl₂, dNTPs (1mM), 0,2µL de cada um dos respectivos *primers* e 2U de Taq DNA polimerase. A primeira parte do processo foi de 2min a 94°C (desnaturação); seguida por 35 ciclos de 1min a 95°C, 30s a 55°C e 1min 40s a 72°C (amplificação) e 7min a 72°C (extensão).

A marcação das sondas de DNAr 18S das espécies *L. andreae*, *L. macrosternum*, *L. pentadactylus* e *L. riveroi* e da sonda telomérica de todas as espécies analisadas, incluindo *L. petersii*, foi feita utilizando o *Kit DIG-Nick*TM

Translation Mix da Roche. Para a marcação da sonda de DNAr 18S de *L. petersii* foi utilizado o *Kit BioNickTM Labeling System* da Invitrogen. A marcação das sondas foi efetuada seguindo as recomendações dos fabricantes.

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Para a localização física cromossômica das sequências teloméricas e dos sítios ribossomais 18S foram utilizadas as sondas obtidas por PCR e marcadas por *Nick translation*, sendo usadas sondas ribossomais homólogas e heterólogas. Para tanto, foi realizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), descrita por Pinkel *et al.* (1986), com alguns ajustes.

Tratamento das lâminas

As lâminas contendo preparações cromossômicas foram lavadas em tampão PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente desidratadas em série alcoólica, 70, 85 e 100%, 5 minutos cada e secas ao ar. As lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC, por 5 minutos cada e em PBS 1x pelo mesmo tempo. As lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida lavadas em PBS 1x por 5 minutos, sendo então desidratadas em série alcoólica gelada (70, 85, 100%), por 5 minutos cada.

Simultaneamente à desidratação da lâmina em série alcoólica, a solução de hibridação contendo formamida 100% (concentração final 50%), sulfato de dextrano 50%, 20xSSC (concentração final de 2xSSC), sonda marcada e água milli-Q foi desnaturada a 99°C por um período de 10 minutos, sendo passada imediatamente no gelo.

O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos e desidratado em etanol gelado 70, 85 e 100% por 5 minutos cada, secando ao ar. A solução de hibridação foi colocada sobre a lâmina com os cromossomos desnaturados e incubada em câmara úmida a 37°C por 18 horas.

Após o tempo de hibridação, as lâminas foram lavadas em formamida 15% a 42°C durante 10 minutos e posteriormente lavadas em solução *Tween* 0,5%, por 5 minutos. Para detecção do sinal as lâminas foram incubadas em

tampão NFDM por 15 minutos e lavadas 2 vezes com *Tween* 0,5% a temperatura ambiente por 5 minutos cada. As lâminas foram incubadas com os anticorpos específicos (antidigoxigenina ou avidina-FITC) por 60 minutos em câmara úmida a 37°C. Após este tempo as lâminas foram lavadas 3 vezes com *Tween* 0,5% (temperatura ambiente) por 5 minutos cada, desidratadas em série alcoólica gelada 70, 85 e 100% durante 5 minutos cada e após secas, montadas com *antifade* e DAPI, sendo cobertas com lamínulas.

Análise cariotípica

Após a análise e contagem de no mínimo 30 metáfases por indivíduo em microscópio de luz, foi estabelecido o número diploide modal. As melhores fases (mitose e meiose) obtidas com técnicas de citogenética clássica (coloração convencional, RON e banda C) tiveram suas imagens capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio trinocular (sistema de captura da Zeiss). As metáfases submetidas às técnicas moleculares (FISH) foram analisadas e tiveram suas imagens capturadas em fotomicroscópio de epifluorescência (*Olympus*® BX – 51), em objetiva de imersão.

A montagem dos cariótipos foi realizada utilizando *Adobe Photoshop* Cs4®. Cromossomos provenientes das imagens capturadas foram recortados e emparelhados. Os cromossomos foram medidos utilizando o programa livre *Image J*, sendo posteriormente colocados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com o critério de relação de braços ($RB=BM/Bm$, onde BM = braço maior e Bm = braço menor), segundo Green e Sessions (1991; 2007). Para o cálculo do número fundamental foram considerados como portadores de dois braços os cromossomos meta (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st), e os telocêntricos (t) como tendo apenas um braço (Green e Sessions 1991; 2007).