

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

Abordagem citogenética clássica e molecular de sete espécies amazônicas de
Hypsiboas (Lissamphibia, Anura, Hylidae)

Thais Lemos de Mattos

Manaus, Amazonas

Abril, 2013

Thais Lemos de Mattos

Abordagem citogenética clássica e molecular de sete espécies amazônicas de
Hypsiboas (Lissamphibia, Anura, Hylidae)

Orientadora: Maria Claudia Gross, Dra.

Coorientador: Marcelo Menin, Dr.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia 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, Amazonas

Abril, 2013

Relação banca julgadora

Dra. Eliana Feldberg (INPA)

(Titular)

Dr. Pedro Ivo Simões (INPA)

(Titular)

Dra. Daniele Aparecida Matoso (UFAM)

(Titular)

Dra. Débora Rabello Mesquita (IFAM)

(Suplente)

Dra. Miriam Silva Rafael (INPA)

(Suplente)

Ficha catalográfica

M435 Mattos, Thais Lemos de
Abordagem citogenética clássica e molecular de sete espécies amazônicas de *Hypsiboas* (Lissamphibia, Anura, Hylidae) / Thais Lemos de Mattos. --- Manaus : [s.n.], 2013. xvi, 72 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA / UFAM, Manaus, 2013.
Orientadora : Maria Cláudia Gross
Coorientador : Marcelo Menin
Área de Concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. *Hypsiboas* – Citogenética. 2. Sapos – Citogenética – Amazônia. 3. Telômero. 4. Mitose. I. Título.

CDD 19. ed. 597.8

Sinopse:

Sete espécies amazônicas de *Hypsiboas* (*Hypsiboas boans*, *Hypsiboas cinerascens*, *Hypsiboas geographicus*, *Hypsiboas lanciformis*, *Hypsiboas multifasciatus*, *Hypsiboas raniceps* e *Hypsiboas wavrini*) foram estudadas citogeneticamente, sendo estabelecido o número diploide, padrão de distribuição das regiões de heterocromatina, localização das regiões organizadoras de nucléolo e de sequências teloméricas em cromossomos mitóticos. Os resultados evidenciaram a possibilidade de rearranjos em pelo menos três espécies, bem como a redução do número diploide em uma das espécies.

Palavras-chave: mitose, banda C, RON, telômero

Dedico esta dissertação a minha família, pois sem ela não teria chegado até o final.

“O progresso é impossível sem a mudança, e quem não consegue mudar o que pensa, não consegue mudar nada.”

George Bernard Shaw

“A pessoa se torna velha quando a mente dela é mais ocupada com memórias do que com aspirações.”

Navin Kulkarni

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 Citogenética 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).

Ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio) e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) por terem concedido a licença de coleta (no. 11323-0) a mim e ao Dr. Marcelo Menin.

Ao Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEUA-UFAM) por ter concedido o no. de protocolo 075/2012.

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

Agradecimentos

À Deus por toda a força que tem me dado nos momentos difíceis e que sempre me estendeu a mão nas horas em que mais precisei;

À minha família: Neivaldo, Walderez, Thiago e Thamires pelo apoio, amor e paciência durante os dias cinzentos;

À Makoto Miyagawa pelo companheirismo durante estes anos e por sempre ter acreditado que eu iria alcançar meus objetivos;

Aos Lemos e aos Mattos por sempre terem acreditado que eu tinha “alma de bióloga”;

À Janaína Nogueira e Kamila Yuyama pelas trocas de experiência e amizade durante a graduação e pós-graduação;

A todos os meus amigos pelas palavras de perseverança;

À Park Joong Hyon, Brian e Fuko pelos dias felizes;

À Dra. Maria Claudia Gross pela amizade, pelos bons conselhos, pela dedicação em me orientar e por ter aceitado o “desafio” de trabalhar com os anuros;

Ao Dr. Marcelo Menin por ter estado sempre presente nos momentos em que recorri a ele e pelas suas orientações, especialmente durante as coletas, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho;

Aos doutores Pedro Ivo Simões, Cleiton Fantin, Daniele Matoso e Eliana Feldberg pelas sugestões ao projeto durante as aulas de qualificação e de defesa;

Aos meus amigos Ana Carolina Coelho, Jennifer Ferreira, Jose Gregorio e Júlia Leite pelo apoio, companheirismo e pelos maravilhosos momentos em que passamos juntos;

Aos meus colegas do Laboratório de Citogenômica Animal (LACA) na ordem alfabética: Camila Praxedes, Francijara Araújo, Karoline Costa, Marília Batista, Natália Carvalho, Rafael Ferreira e Renan Gabriel Gomes Junior;

Aos meus colegas de Mestrado do PPGGCBEV: Luciana Fé, Emmanuell Ribeiro, Henrique Bello, Guilherme Dias e Rita de Cássia;

Aos doutorandos Carlos Henrique Schneider e Maria Leandra Terencio por terem me ajudado nas práticas laboratoriais e pelas trocas de experiência;

Aos grandes companheiros de campo: Sérgio Vaz, David Telles, Rebeca McComb Pinto, Sarah Py-Daniel, Rodrigo Tiago, Leonardo Paz, Reysi Pegorini, Karla Silva, Alexandre Almeida, Patrick Viana e Ocério “Juruna”, sem os quais as coletas não teriam sido realizadas;

As equipes de citogenética e herpetologia do SISBIOTA - Amazônia;

As secretárias do PPGGCBEv que me auxiliaram no envio e recebimento de documentos referentes ao mestrado;

A todas *Hypsiboas* que foram utilizadas neste trabalho cuja morte não foi em vão;

À todos vocês que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muitíssimo obrigada!

Resumo

A família Hylidae é a mais diversa na região amazônica, porém não é endêmica. Dentro dos hilídeos, encontra-se a subfamília Hyliinae, que abriga o maior número de espécies de hilídeos e que foi revisada recentemente, com alocação de novos gêneros, tais como o gênero *Hypsiboas*, que foi dividido em sete grandes grupos, com base em caracteres morfológicos e moleculares: *H. benitezi*, *H. punctatus*, *H. semilineatus*, *H. pellucens*, *H. albopunctatus*, *H. faber* e *H. pulchellus*. Estudos citogenéticos relacionados às espécies pertencentes a estes grupos são escassos e até o momento não foram realizadas em espécies de *Hypsiboas* provenientes da região norte do Brasil. Deste modo, este trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente espécies de *Hypsiboas* pertencentes aos grupos *H. semilineatus* (*H. boans*, *H. geographicus* e *H. wavrini*), *H. punctatus* (*H. cinerascens*) e *H. albopunctatus* (*H. lanciformis*, *H. multifasciatus* e *H. raniceps*) coletadas no estado do Amazonas, região norte do Brasil, utilizando marcadores clássicos e moleculares, visando verificar se existe correlação citogenética entre espécies do mesmo grupo. Foram analisados 23 indivíduos adultos de sete espécies de *Hypsiboas* e os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de medula óssea e fígado após o tratamento com colchicina *in vitro* (1%) e *in vivo* (0,1%). As suspensões foram submetidas à coloração convencional com Giemsa (10%), impregnação por nitrato de prata por Ag-RON, bandeamento C, para detecção da heterocromatina, e hibridização *in situ* por fluorescência de sondas teloméricas. As melhores metáfases foram capturadas e os cromossomos foram recortados, emparelhados e medidos utilizando os programas *Image J* e *Adobe Photoshop Cs4®*, sendo posteriormente organizados em ordem decrescente de tamanho. Com relação aos resultados, estes foram apresentados na forma de artigo e evidenciaram que a espécie *Hypsiboas lanciformis* possui número diploide igual a 22 cromossomos e as espécies *H. boans*, *H. cinerascens*, *H. geographicus*, *H. multifasciatus*, *H. raniceps* e *H. wavrini* apresentaram 24 cromossomos, sem o indício de cromossomos sexuais e/ou supranumerários em nenhuma das espécies. Diferentes padrões de distribuição da heterocromatina foram evidenciados em: *H. cinerascens* (grupo *H. punctatus*) com blocos tênues; padrão centromérico com regiões pericentroméricas em *H. boans*, *H. wavrini* e *H. geographicus* (grupo *H. semilineatus*); o grupo *H. albopunctatus* apresentou três padrões diferentes de banda C: blocos tênues/ausentes (*H. raniceps*), centromérica (*H. lanciformis*) e intersticial (*H. multifasciatus*), facilitando a diferenciação dentro do grupo e entre os grupos de *Hypsiboas*. Com relação à RON, esta apresentou-se múltipla em *H. lanciformis* e aparentemente simples nas outras espécies. Além disso, as três espécies do grupo *H. semilineatus* (*H. boans*, *H. geographicus* e *H. wavrini*) apresentaram sítios teloméricos intersticiais sendo indicativos de rearranjos cromossômicos. Os dados encontrados neste trabalho reforçam a ideia da complexidade existente no gênero *Hypsiboas*, e demonstram que há a necessidade da realização de mais estudos na Amazônia brasileira; além disso, eles podem vir auxiliar outras áreas, como a taxonomia, contribuindo para um melhor entendimento deste grupo tão fascinante e ao mesmo tempo tão complexo e subestimado.

Abstract

The family Hylidae is the most diverse in the Amazon region, but it isn't endemic. Inside this family, there is a subfamily Hylinae, which houses the largest number of species of hylid and was reviewed recently with the allocation of new genres, such as genus *Hypsiboas*, which was divided into seven major groups, based on morphological and molecular characters: *H. benitezi*, *H. punctatus*, *H. semilineatus*, *H. pellucens*, *H. albopunctatus*, *H. faber* and *H. pulchellus*. Cytogenetic studies related to species belonging to these groups are scarce and so far haven't been performed in *Hypsiboas* species from northern Brazil. Thus, this study aimed to characterize cytogenetically *Hypsiboas* species belonging to the groups *H. semilineatus* (*H. boans*, *H. geographicus* and *H. wavrini*), *H. punctatus* (*H. cinerascens*) and *H. albopunctatus* (*H. lanciformis*, *H. multifasciatus* and *H. raniceps*) collected in Amazonas state, northern Brazil, using classical and molecular markers, to identify whether there are cytogenetics relationship among species of the same group. We analyzed 23 adults from seven species of *Hypsiboas* and mitotic chromosomes were obtained from bone marrow and liver after treatment with colchicine *in vitro* (1%) and *in vivo* (0.1%). The suspensions were subjected to conventional staining with Giemsa (10%), silver nitrate impregnation by Ag-RON, C-banding for detection of heterochromatin, and fluorescence *in situ* hybridization was used telomeric probes. The best metaphases were captured and chromosomes were cut, matched and measured using Image J and Adobe Photoshop Cs4® softwares, and then arranged in descending order of size. Regarding the results, they were presented in the form of paper and showed that the species has *Hypsiboas lanciformis* diploid number equal to 22 chromosomes and the species *H. boans*, *H. cinerascens*, *H. geographicus*, *H. multifasciatus*, *H. raniceps* and *H. wavrini* had 24 chromosomes, without the hint of sex chromosomes and/or supernumerary in either species. Different patterns of heterochromatin distribution were seen in *H. cinerascens* (*H. punctatus* group) with tenuous blocks; centromeric and pericentromeric regions in *H. boans*, *H. wavrini* and *H. geographicus* (*H. semilineatus* group), *H. albopunctatus* group showed three different patterns of banda C: tenuous block /absent (*H. raniceps*), centromeric (*H. lanciformis*) and interstitial (*H. multifasciatus*), which permitted the differentiation within the group and between groups of *Hypsiboas*. Regarding RON, this showed up in multiple *H. lanciformis* and deceptively simple in other species. Furthermore, the three species of the group *H. semilineatus* (*H. boans*, *H. geographicus* and *H. wavrini*) had interstitial telomeric sites being indicative of chromosomal rearrangements. The data found in this study reinforce the idea of the complexity existing in the genus *Hypsiboas*, and demonstrated that is needed for further research in the Brazilian Amazon, in addition, they may come assist other areas such as taxonomy, contributing to a better understanding of this group so fascinating and yet so complex and underestimated.

Sumário

1. Introdução geral	1
2. Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. Material e métodos	13
3.1 Espécies em estudo	13
3.2 Indução de mitose nos indivíduos amostrados	16
3.3 Obtenção de cromossomos mitóticos	17
3.4 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Banda C).....	18
3.5 Caracterização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs)	18
3.6 Utilização de sequências teloméricas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	18
3.7 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	19
3.8 Análise cariotípica	20
4. Resultados e discussão	20
4.1. Capítulo 1: Organização cariotípica de sete espécies amazônicas do gênero <i>Hypsiboas</i> (Anura; Hylidae)	22
Resumo.....	23
Introdução.....	24
Material e métodos	25
Resultados	27
Coloração convencional com Giemsa	27
Banda C e Região organizadora de nucléolos (RON)	30
Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH): sondas teloméricas	32
Discussão.....	32
Referências bibliográficas	39

5. Conclusões gerais.....	40
6. Referências bibliográficas gerais.....	41
Anexo	51
Apêndice	52

Lista de Figuras

Introdução geral

Figura 1 - Visão parcial da árvore consenso estabelecendo relações filogenéticas entre os sete grupos de *Hypsiboas* (Adaptado de Faivovich *et al.* 2005; pág. 79).....3

Material e métodos

Figura 2 - Exemplares machos de *Hypsiboas boans* (a) (Foto M. Rivera); *H. cinerascens* (b) (Foto T. Mattos); *H. geographicus* (c) (Foto J. Patton); *H. lanciformis* (d) (Foto T. Mattos), *H. multifasciatus* (e) (Foto R. Sawaby); *H. raniceps* (f) (Foto T. Mattos) e *H. wavrini* (g) (Foto C. Candido).....14

Figura 3 - Mapa de localização dos pontos de coleta das espécies de *Hypsiboas* no estado do Amazonas (AM). (Adaptado do *Google Maps*).....15

Capítulo 1

Resultados

Figura 1 - Cariótipos mitóticos em coloração convencional com Giemsa: *Hypsiboas lanciformis* (a) com $2n = 22$; *Hypsiboas boans* (b) com $2n = 24$; *Hypsiboas cinerascens* (c) com $2n = 24$; *Hypsiboas geographicus* (d) com $2n = 24$; *Hypsiboas multifasciatus* (e) com $2n = 24$; *Hypsiboas raniceps* (f) com $2n = 24$ e constrição secundária no par 11 (h); e *Hypsiboas wavrini* (g) com $2n = 24$. Escala da barra: 10 micrômetros.....29

Figura 2 - Padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva em *Hypsiboas lanciformis* (a); *Hypsiboas boans* (b); *Hypsiboas cinerascens* (c); *Hypsiboas geographicus* (d); *Hypsiboas multifasciatus* (e); *Hypsiboas raniceps* (f); e *Hypsiboas wavrini* (g). Os pares cromossômicos portadores da região organizadora de nucléolo estão destacados nas caixas. Escala da barra: 10 micrômetros.....31

Figura 3 - Cariótipos das espécies *Hypsiboas boans* (a), *Hypsiboas geographicus* (b) e *Hypsiboas wavrini* (c), mostrando sinais de hibridização com sonda telomérica (vermelho). Os cromossomos foram contra corados com DAPI. Escala da barra: 10 micrômetros.....32

Discussão

Figura 4 - Sobreposição de dados citogenéticos sobre a filogenia proposta para *Hypsiboas* por Faivovich *et al.* (2005), com ênfase na relação entre os grupos *H. punctatus*, *H. semilineatus* e *H. albopunctatus*. A não definição dos ramos do grupo *H. semilineatus* é em função de *H. wavrini* não ter sido incluída na filogenia original.....34

Anexo

Figura - Espécies de *Hypsiboas* sem ITS e com sonda telomérica evidenciada apenas na região terminal. (a) *H. lanciformis*; (b) *H. cinerascens*; (c) *H. raniceps* e (d) *H. raniceps*. Escala da barra: 10 micrômetros51

Lista de Tabelas

Introdução

Tabela 1 - Revisão de dados citogenéticos disponíveis na literatura para espécies do gênero *Hypsiboas*, alocados de acordo com o grupo (GR) ao qual pertencem. Na tabela está indicado local de coleta, número diploide (2n), fórmula cromossômica (FC), número fundamental (NF), padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (BC) e região organizadora de nucléolos (RONS). Para cálculo no número fundamental foram considerados como portadores de dois braços os cromossomos meta (m) e submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st). Para dados não indicados nas publicações foi utilizada a simbologia “--”7

Material e métodos

Tabela 2 - Espécies de *Hypsiboas* utilizadas no presente estudo contendo seus respectivos locais de coleta, número de indivíduos analisados e sexo dos mesmos.....16

Anexo

Tabela - Espécies de *Hypsiboas* coletadas indicando o número total de indivíduos e o número de indivíduos utilizados, cuja preparação mitótica encontrava-se em boa qualidade.....50

Lista de Abreviaturas

2n – Número diploide

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

Banda C - Técnica clássica em que detecta a heterocromatina constitutiva

FC - Fórmula cariotípica

FISH- Hibridização *in situ* fluorescente

FITC- Fluoresceína isotiocianato (fluorescein isothiocyanate)

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

SSC - Solução salina de citrato padrão

st - subtelocêntrico

t - telocêntrico

1. Introdução geral

Os Lissamphibia ou anfíbios atuais possuem o tegumento úmido e desprovido de estruturas externas de proteção como escamas, pelos ou penas, um requisito importante para a troca gasosa do meio interno com o externo. A pele permeável é uma das características compartilhadas dentro deste grupo (sinapormofia) e por isto, são considerados um grupo monofilético, ou seja, provenientes de um único ancestral comum (Pough *et al.* 1999). Dentre os vertebrados existentes, os Lissamphibia são representados por cerca de 7.040 espécies descritas em todo o globo (Frost *et al.* 2013), das quais 232 ocorrem na Amazônia brasileira (Avila-Pires *et al.* 2007).

Dentro dos Lissamphibia, a ordem Anura é a mais diversa, com 6.200 espécies descritas no mundo (Frost *et al.* 2013), sendo pelo menos 221 encontradas na Amazônia brasileira (Avila-Pires *et al.* 2007). Entretanto, esta riqueza pode estar subestimada, uma vez que há possibilidade de que muitas espécies não tenham sido descritas até o momento (Avila-Pires *et al.* 2007; Frost *et al.* 2013). Os anuros da Amazônia brasileira estão distribuídos em dez famílias e uma delas é a Hylidae, que é a mais diversa nessa região, com mais de 88 espécies conhecidas (Avila-Pires *et al.* 2007). No entanto, essa família não se restringe apenas à Amazônia, podendo ser encontrada nas Américas, Eurásia, ilhas japonesas, Austrália e Papua Nova Guiné (Frost *et al.* 2013). A maioria dos hílideos é arborícola e noturno, com dimorfismo sexual, onde as fêmeas normalmente são maiores que os machos. Ainda, este grupo possui discos adesivos nas pontas dos dedos, o que permite que escalem superfícies verticais (Pough *et al.* 1999; Lima *et al.* 2006).

A família Hylidae, de acordo com Faivovich *et al.* (2005), é composta atualmente por três subfamílias: Pelodyadinae, com distribuição na região da Austrália e Papua Nova Guiné, com cerca de 201 espécies descritas, Phyllomedusinae e Hylinae com ampla distribuição principalmente pela região Neotropical (desde o sul do México até o extremo sul da Argentina) com 58 e 667 espécies descritas, respectivamente (Frost *et al.* 2013).

Dentro dos hílideos, a subfamília Hylinae vem passando por um período de ativas revisões. Em 2005, mudanças foram propostas, com a alocação de 15 novos gêneros, dos quais: quatro já eram conhecidos, quatro foram revalidados e seis foram descritos. Esta divisão foi baseada em estudos filogenéticos envolvendo genes mitocondriais (12S, tval, 16S

e citocromo b), genes nucleares (rodopsina, tirosinase, RAG-1, *seventh in absentia* e 28S) e estudos morfológicos da musculatura do pé destes organismos (Faivovich *et al.* 2005). Deste modo, o gênero *Hyla* passou a ser restrito apenas aos grupos de *Hyla arborea*, *Hyla cinerea*, *Hyla eximia*, *Hyla femoralis* e *Hyla versicolor*, e os gêneros *Hypsiboas* e *Dendropsophus*, encontrados na região Neotropical de acordo com Frost *et al.* (2013), foram revalidados e acomodaram diversas espécies, as quais podem ser diferenciadas inclusive citogeneticamente, uma vez que o primeiro passou a abrigar espécies com número diploide em torno de 24 cromossomos (Duellman e Cole 1965; Beçak, 1968; León, 1970; Rabelo 1970) e o segundo com espécies portadoras de 30 cromossomos (Duellman e Cole 1965; Duellman 1967).

Utilizando aspectos morfológicos e genéticos, as espécies de *Hypsiboas* Wagler, 1830 foram alocadas em sete grupos, os quais estão representados por algumas de suas espécies (Fig. 1) (Faivovich *et al.* 2005). O grupo *H. benitezi* é composto por sete espécies (representado por seis espécies no clado) que compartilham uma característica comum: a presença de uma glândula mental plana em machos (Faivovich *et al.* 2005); o grupo *H. punctatus* é composto por oito espécies (representado por quatro espécies no clado) e de acordo com Cochran e Goin (1970), caracteriza-se por ser um grupo composto por pererecas pequenas, verdes e com membranas interdigitais reduzidas, apesar de Faivovich *et al.* (2005) não indicarem qualquer sinapormofia morfológica para este grupo. Para estes autores, as espécies foram agrupadas no grupo *H. punctatus* de acordo com características moleculares. O grupo *H. semilineatus* é composto por seis espécies (representado por três espécies no clado) e a possível sinapomorfia deste grupo é a presença de membranas reticuladas nas pálpebras, além das sinapomorfias moleculares encontradas por Faivovich *et al.* (2005); o grupo *H. pellucens* agrupa três espécies (representado por duas espécies no clado) que compartilham características em comum em relação aos marcadores moleculares, uma vez que não foram encontradas evidências morfológicas comuns para as espécies deste grupo (Faivovich *et al.* 2005); o grupo *H. albopunctatus* é composto por nove espécies (representado por sete espécies no clado) que compartilham as características: forma do corpo, falta do tubérculo do metatarso e presença de membranas interdigitais apenas na base dos dedos (Cochran 1955), apesar de Faivovich *et al.* (2005) encontrarem apenas características moleculares em comum para este grupo e nenhuma evidência de sinapomorfias morfológicas; o grupo *H. faber* envolve oito espécies (representado por cinco espécies no clado) que foram agrupadas de acordo com sinapomorfias moleculares (Faivovich *et al.*

2005); e o grupo *H. pulchellus*, com trinta espécies (representado por dezoito espécies no clado), é composto por espécies que possuem sua monofilia suportada por evidências moleculares Faivovich *et al.* (2005), apesar de Faivovich e Garcia (dados não publicados) sugerirem que este grupo compartilha uma característica em comum: a ausência do enxerto do músculo depressor mandibular que origina a face dorsal do músculo dorso-escapular e que está presente em quase todas as outras espécies de *Hypsiboas*.

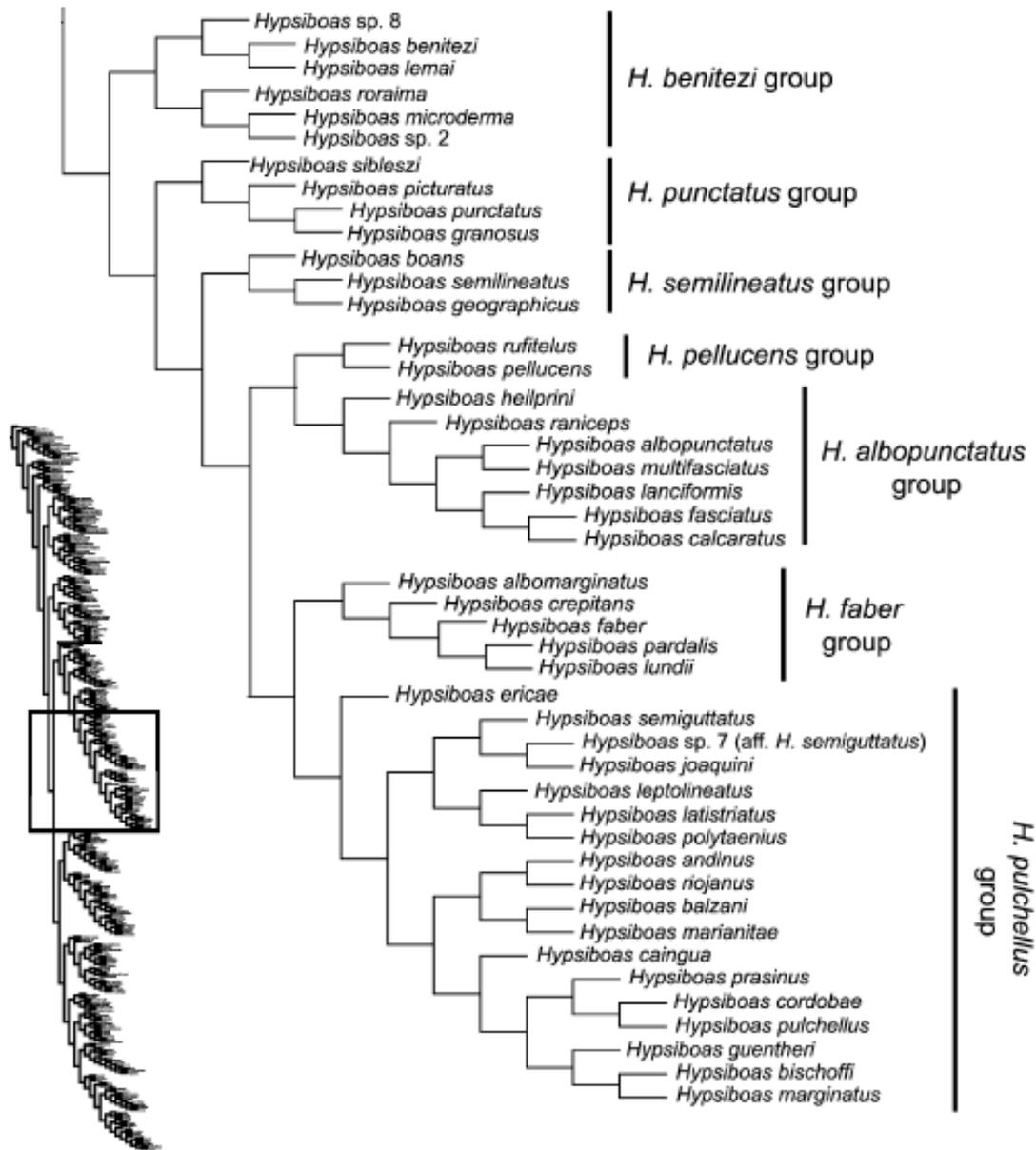


Figura 1 - Visão parcial da árvore consenso estabelecendo relações filogenéticas entre os sete grupos de *Hypsiboas* (Adaptado de Faivovich *et al.* 2005; pág. 79).

Dentre as espécies alocadas no grupo *H. semilineatus*, destacam-se *Hypsiboas boans*, *H. geographicus* e *Hypsiboas wavrini* (Faivovich *et al.* 2005). *Hypsiboas boans* (Linneaus, 1758) é conhecida como pertencente ao grupo das pererecas gladiadoras em função de espinhos no prepólex em machos e que tem a função de acasalamento ou defesa de território (Hoogmoed 1990). Esta espécie reproduz-se na estação seca (julho a dezembro); apresenta dimorfismo sexual evidente, sendo que os machos apresentam dorso marrom e as fêmeas marrom-alaranjado (Lima *et al.* 2006); ocorre no baixo rio Amazonas, alto rio Orinoco e bacia do rio Magdalena, além das Guianas, terras baixas da Colômbia e Equador, leste do Panamá e Trinidad (Frost *et al.* 2013). *Hypsiboas geographicus* (Spix, 1824) possui coloração do dorso variando de marrom-alaranjado à marrom, na parte superior das pernas existem listras claras e escuras; o ventre, na porção posterior, é amarelo-claro e na porção anterior é branco; os jovens de *H. boans* são facilmente confundidos com esta espécie, exceto pelo fato desta possuir uma membrana azul acima do olho (Lima *et al.* 2006); além da Amazônia brasileira, ocorre nos Andes e Trinidad (Frost *et al.* 2013). *Hypsiboas wavrini* (Parker, 1936) é conhecida como a “perereca-do-alto-orinoco” e esta espécie foi ressurgida por Hoogmoed (1990). Alguns autores afirmam que esta espécie é sinônima de *H. boans* (Cochran e Goin, 1970) mas Lynch e Suárez-Mayorga (2001) encontraram esta espécie em simpatria com *H. boans* na Colômbia; ocorre nas baixas elevações amazônicas do sudeste da Colômbia, sudeste da Venezuela e Amazônia central brasileira (Frost *et al.* 2013).

Hypsiboas cinerascens (Spix, 1824), pertencente ao grupo *H. punctatus* (Faivovich *et al.* 2005), é encontrada principalmente em áreas encharcadas, próximas aos igarapés; os indivíduos desta espécie possuem o dorso verde-transparente, com pequenas manchas puntiformes amareladas e vermelhas (Lima *et al.* 2006). É superficialmente semelhante com *H. punctatus* (Kok 2006); ocorre nas Guianas e bacia Amazônica do Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Bolívia (Frost *et al.* 2013).

Já as espécies *H. lanciformis*, *H. multifasciatus* e *H. raniceps* pertencem ao grupo *H. albopunctatus* (Faivovich *et al.* 2005). *Hypsiboas lanciformis* Cope, 1871 é caracterizada pelo dorso variando de amarelo escuro à marrom claro e faixas transversais escuras (Lima *et al.* 2006). O que a diferencia morfológicamente das outras espécies de pererecas é a presença de uma faixa branca labial e o primeiro e/ou segundo artelho anterior também de coloração branca (Lima *et al.* 2006); é uma espécie característica de áreas abertas, perturbadas e de bordas de floresta (Lima *et al.* 2006; Menin *et al.* 2008; Tovar-Rodríguez, *et al.* 2009); além

disso, é comumente encontrada em poças, lagos e igarapés, sendo considerada um importante indicador de fragmentação florestal (Lima *et al.* 2006; Tovar-Rodríguez *et al.* 2009); é distribuída na média e alta bacia Amazônica, abrangendo Brasil, Equador, Bolívia, Colômbia e região norte da Venezuela (Frost *et al.* 2013). *Hypsiboas multifasciatus* (Günther, 1859) ocorre nas baixas terras do leste da Venezuela, através das Guianas e na bacia Amazônica (Frost *et al.* 2013). *Hypsiboas raniceps* Cope, 1862 conhecida como “perereca-do-chaco”, tem o dorso variando de marrom-claro a amarelo pardo, o corpo alongado e delgado, além de faixas transversais escuras na parte interna da coxa (Uetanabaro *et al.* 2008); encontra-se distribuída pela Amazônia colombiana, Amazônia brasileira, Venezuela, Guiana Francesa, Paraguai e Argentina (Frost *et al.* 2013); além do Cerrado e Caatinga (Guimarães e Bastos 2003).

Estudos cromossômicos envolvendo as espécies *H. cinerascens*, *H. geographicus*, *H. multifasciatus* e *Hypsiboas raniceps* já foram efetuados (Tabela 1), contudo nenhum dado cariotípico está disponível para *H. boans*, *H. lanciformis* e *H. wavrini*, o que é um reflexo da escassez de informações citogenéticas envolvendo anfíbios da subfamília Hyliinae, considerando-se o grande número de espécies deste táxon.

A maior parte das abordagens citogenéticas para *Hypsiboas* limita-se à caracterização do número diploide e refere-se a indivíduos coletados fora da região Amazônica brasileira, sendo 24 cromossomos o número diploide modal mais frequente nos táxons (Tabela 1). Contudo, é possível evidenciar a presença de rearranjos cromossômicos ao se comparar a fórmula cromossômica, número fundamental e a posição da região organizadora de nucléolo entre espécies e/ou populações (Tabela 1). Número diploide inferior a 24 cromossomos já foi descrito para algumas espécies, como em *Hypsiboas albopunctatus* (grupo *H. albopunctatus*) e acredita-se que a evolução cariotípica foi em direção a uma redução do número de cromossomos de $2n = 24$ a $2n = 22$ por meio de fusões cromossômicas (Bogart 1973; Gruber *et al.* 2007). Ainda, em *Hypsiboas albopunctatus* a presença de cromossomos supranumerários também produz variação numérica, resultando em número diploide ímpar (Gruber *et al.* 2007). Porém, a localização de sequências teloméricas em cromossomos destes indivíduos ainda não foi efetuada e poderia auxiliar na compreensão dos rearranjos que ocorreram durante a evolução.

Desta forma, as análises citogenéticas podem ser utilizadas em muitas outras abordagens além da delimitação de táxons, tais como estudos evolutivos e elucidação de

polimorfismos. Para tanto, é necessário o uso da coloração convencional por Giemsa somada às técnicas de bandeamentos cromossômicos diferenciais, que permitem a identificação da heterocromatina constitutiva (banda C), a impregnação por nitrato de prata (Ag-RON) para evidenciar as regiões organizadoras de nucléolo ativas e o mapeamento de sequências específicas de DNA utilizando a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Medeiros *et al.* 2003; Kasahara 2009).

Com relação às regiões organizadoras de nucléolo, a maioria das famílias da ordem Anura apresenta RON simples, com sítios ribossomais ativos em apenas um par de cromossomos por genoma diploide (King 1990). Contudo, este caráter não é conservado em *Hypsiboas*, existindo variações nos pares envolvidos com a RON entre as espécies analisadas até o momento (Tabela 1). Já a heterocromatina constitutiva tem sido evidenciada na região centromérica dos cromossomos da maioria das espécies, porém blocos intersticiais são típicos de alguns pares de cromossomos, o que implica que esta informação pode ser utilizada como um marcador espécie-específico, auxiliando na diferenciação dos táxons e no entendimento dos processos que ocorreram durante a evolução dos mesmos (Gruber *et al.* 2007; Bohne *et al.* 2008; Nunes e Fagundes 2008).

Análises citogenéticas clássicas e moleculares até o momento não foram realizadas em espécies de *Hypsiboas* provenientes da região norte do Brasil e esta abordagem é de fundamental importância, uma vez que as espécies que apresentam ampla distribuição podem estar sofrendo diferentes pressões seletivas, que podem implicar a longo prazo, em diferenciação dos táxons. Deste modo, é importante a elucidação das identidades citogenéticas destas espécies ao longo de sua distribuição geográfica, verificando se há variação intraespecífica entre indivíduos provenientes de diferentes populações, por meio de comparações com dados disponíveis na literatura.

Tabela 1 – Revisão de dados citogenéticos disponíveis na literatura para espécies do gênero *Hypsiboas*, alocados de acordo com o grupo (GR) ao qual pertencem. Na tabela está indicado local de coleta, número diploide (2n), fórmula cromossômica (FC), número fundamental (NF), padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (BC) e região organizadora de nucléolos (RONs). Para cálculo no número fundamental foram considerados como portadores de dois braços os cromossomos meta (m) e submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st). Para dados não indicados nas publicações foi utilizada a simbologia "--".

GR	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	BC	RON (par)	Autores	No. de indivíduos analisados
Grupo <i>H. albopunctatus</i>	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Rio Claro (SP) Pirenópolis (GO)	22 22 + 1B	6m+ 6sm + 10st 6m + 6sm + 10st + 1B 10m + 4sm + 8sm	44 45 44	Centromérica na maioria dos cromossomos	8	Beçak (1968) Bogart (1973) Gruber <i>et al.</i> (2007) Oliveira <i>et al.</i> (2010)	-- -- 17♂ 08
	<i>Hypsiboas multifasciatus</i>	Serranópolis (GO)	24	14m + 8sm + 2st	48	--	--	Oliveira <i>et al.</i> (2010)	03
	<i>Hypsiboas raniceps</i>	Brasilândia (MT) Tangará da Serra (MT) Rio Verde (GO)	24	8m + 10sm + 6st 8m + 14sm + 2st 14m + 6sm + 4st	48	Quase ausente na maioria dos cromossomos, proximal no par 11 e intersticial nos pares 6 e 7	1 e 11	Rabelo (1970) Rabelo <i>et al.</i> (1971) Gruber <i>et al.</i> (2007) Carvalho <i>et al.</i> (2008a) Oliveira <i>et al.</i> (2010)	-- -- 01♀ 05 04

GR	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	BC	RON (par)	Autores	
Grupo <i>H. faber</i>	<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	Bertioga; (SP) Picinguaba (SP) Cariacica (ES) Anchieta (ES)	24	18m + 6sm	48	Centromérica na maioria dos cromossomos	2	Beçak (1968) Gruber (2002) Nunes e Fagundes (2008) Carvalho <i>et al.</i> (2009b)	-- -- 06 03♂ 11♂
	<i>Hypsiboas crepitans</i>	Piranhas (AL)	24	8m + 4sm + 10st	48	Telomérica na maioria dos cromossomos	11	Duellman e Cole (1965) Rabelo (1970) Bogart (1973) Nunes (2006) Gruber <i>et al.</i> (2007)	-- -- -- -- 02♂
	<i>Hypsiboas faber</i>	Mogi das Cruzes (SP) Biritiba- Mirim (SP) Pedra Azul (ES)	24	14m + 10sm	48	--	11	Beçak (1968) Nunes e Fagundes (2008) Carvalho <i>et al.</i> (2009b)	-- 03♂ 03♂
	<i>Hypsiboas lundii</i>	Pirenópolis (GO)	24	14m + 6sm + 4st	48	--	--	Oliveira <i>et al.</i> (2010)	02
	<i>Hypsiboas pardalis</i>	Cariacica (ES)	24	10m + 10sm + 4st	48	--	11	Bogart (1973) Nunes e Fagundes (2008)	-- 04♂

	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	--	24	--	--	--	--	León (1970)	--
GR	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	BC	RON (par)	Autores	
Grupo <i>H. pellucens</i>	<i>Hypsiboas rufitelus</i>	--	24	--	--	--	--	Duellman (1967)	--
Grupo <i>H. pulchellus</i>	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Rancho Queimado (SC)	24	--	--	--	10	Beçak (1968) Foresti (1972) Raber <i>et al.</i> (2004)	-- -- --
	<i>Hypsiboas caingua</i>	--	24	--	--	--	--	Ananias (1996)	--
	<i>Hypsiboas guentheri</i>	Rancho Queimado (SC)	24	--	--	--	10	Raber <i>et al.</i> (2004)	--
	<i>Hypsiboas joaquina</i>	--	24	--	--	--	--	Ananias (1996)	--
	<i>Hypsiboas marginatus</i>	São Francisco de Paula (RS)	24	10m + 10sm + 4st	48	Centromérica na maioria dos cromossomos	10	Ananias <i>et al.</i> (2004)	--
	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Santa Teresa (ES)	24	--	--	--	--	Rabelo (1970) Rabelo <i>et al.</i> (1971) Bogart (1973)	-- -- --

								Nunes e Fagundes (2008)	
	<i>Hypsiboas prasinus</i>	Serra do Japi (SP)	24	--	--	Centromérica na maioria dos cromossomos	9 e 12	Beçak (1968) Baldissera-Jr <i>et al.</i> (1993) Ananias (1996)	--
GR	Espécie	Localidade	2n	FC	NF	BC	RON (par)	Autores	
Grupo <i>H. pulchellus</i>	<i>Hypsiboas pulchellus</i>	--	24	--	--	--	--	Saez e Brum (1960) Beçak (1968) Bogart (1973) Ananias (1996)	-- -- -- --
	<i>Hypsiboas semiguttatus</i>	Camabará do Sul (SC) São Francisco de Paula (RS) Piraquara (PR)	24	10m + 10sm + 4st	48	Centromérica na maioria dos cromossomos e telomérica no par 1	1	Foresti (1972) Ananias <i>et al.</i> (2004)	--
Grupo <i>H. punctatus</i>	<i>Hypsiboas cinerascens</i>	--	24	--	--	--	--	Bogart (1973)	--
	<i>Hypsiboas punctatus</i>	--	24	--	--	--	--	Bogart e Bogart (1971) Foresti (1972) Bogart (1973) Anderson (1991)	-- -- -- --
Grupo <i>H. semilineatus</i>	<i>Hypsiboas geographicus</i>	--	24	--	--	--	--	Foresti (1972)	--
	<i>Hypsiboas gr. geographicus</i>	--	24	--	--	--	--	Bogart e Bogart (1971)	--

	<i>Hypsiboas semilineatus</i>	Santa Teresa (ES)	24	10m + 6sm + 8st	48	--	11	Nunes e Fagundes (2008)	04
--	-----------------------------------	----------------------	----	-----------------	----	----	----	----------------------------	----

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Caracterizar citogeneticamente as espécies *Hypsiboas* coletadas no estado do Amazonas, região norte do Brasil, utilizando marcadores clássicos e moleculares, e inferir sobre a evolução cariotípica dos táxons.

2.2 Objetivos Específicos:

- Determinar o número diplóide de indivíduos coletados e reconhecidos como pertencentes ao gênero *Hypsiboas*;
- Estabelecer padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolo em cromossomos mitóticos dos indivíduos coletados;
- Verificar a localização física cromossômica de sequências teloméricas;
- Verificar se existe variação entre indivíduos pertencentes à mesma espécie morfológica, mas provenientes de diferentes populações, por meio de comparações com dados disponíveis na literatura;
- Verificar se os táxons mais relacionados apresentam maior similaridade cariotípica.

3. Material e métodos

3.1 Espécies em estudo

Foram estudados, citogeneticamente, 23 espécimes de sete espécies pertencentes ao gênero *Hypsiboas* (Fig. 2), contudo a amostragem foi maior, tendo sido efetuada a preparação cromossômica de 02 indivíduos de *H. boans*, 15 indivíduos de *H. cinerascens*, 09 indivíduos de *H. geographicus*, 07 indivíduos de *H. lanciformis*, 07 indivíduos de *H. raniceps* e 02 indivíduos de *H. wavrini*, porém estes materiais não apresentaram material de qualidade para os bandeamentos cromossômicos sendo excluídos das análises cromossômicas, mas ressaltasse que os tecidos musculares destes indivíduos foram retirados para serem realizadas futuras análises moleculares.

Os 23 indivíduos do presente trabalho foram coletados no estado do Amazonas, Brasil, nas seguintes localidades (Fig. 3): fragmento florestal urbano do Campus da Universidade Federal do Amazonas (Manaus) e seus arredores (lago Acariquara) (03°04'34"S; 59°57'30"W); lago Catalão (confluência dos rios Negro e Solimões, Iranduba) (03°09'47"S; 059°54'29"W); florestas nas margens do rio Jatapu, município de São Sebastião do Uatumã (0°50';01°55'S e 58°50';60°10'W); e nas margens dos rios Darahá e Ayuanã, ambos no município de Santa Isabel do Rio Negro (0°24'24"N; 65°1'1"W). As espécies e o número de indivíduos analisados encontram-se discriminadas na Tabela 2. O número amostral não é constante por estar relacionado à disponibilidade e abundância das espécies nas referidas localidades. As coletas foram realizadas no período noturno, durante períodos chuvosos e secos no Amazonas, de junho de 2011 a junho de 2012. Os animais foram capturados com autorizações cedidas pelo ICMBio/SISBIO e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os indivíduos testemunhos foram depositados na Coleção Zoológica Paulo Paulo Bührnheim, da Universidade Federal do Amazonas (CZPB/UFAM) e na Coleção de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia (INPA-H).

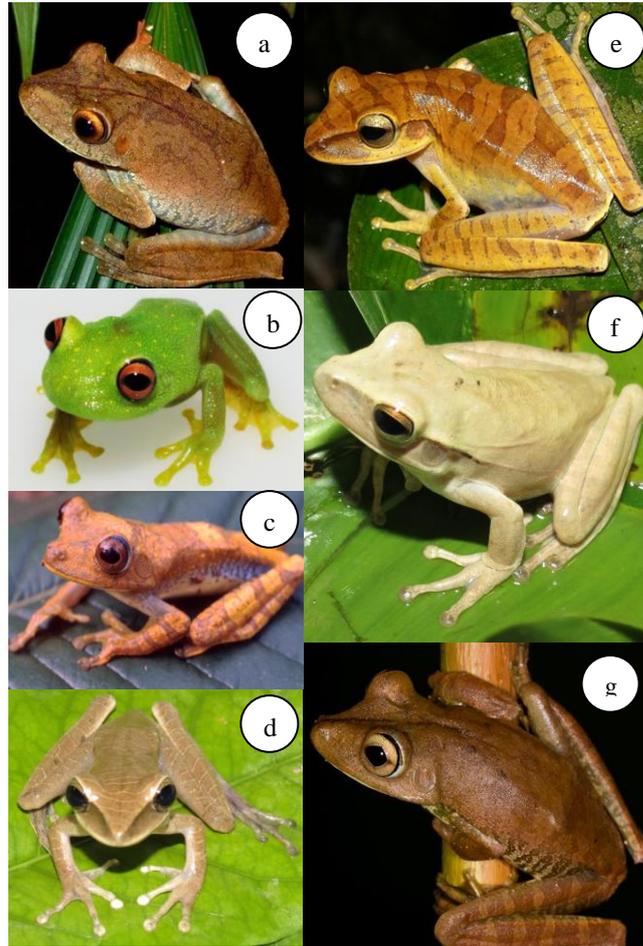


Figura 2 - Exemplos machos de *Hypsiboas boans* (a) (Foto M. Rivera); *H. cinerascens* (b) (Foto T. Mattos); *H. geographicus* (c) (Foto J. Patton); *H. lanciformis* (d) (Foto T. Mattos), *H. multifasciatus* (e) (Foto R. Sawaby); *H. raniceps* (f) (Foto T. Mattos) e *H. wavrini* (g) (Foto C. Candido).

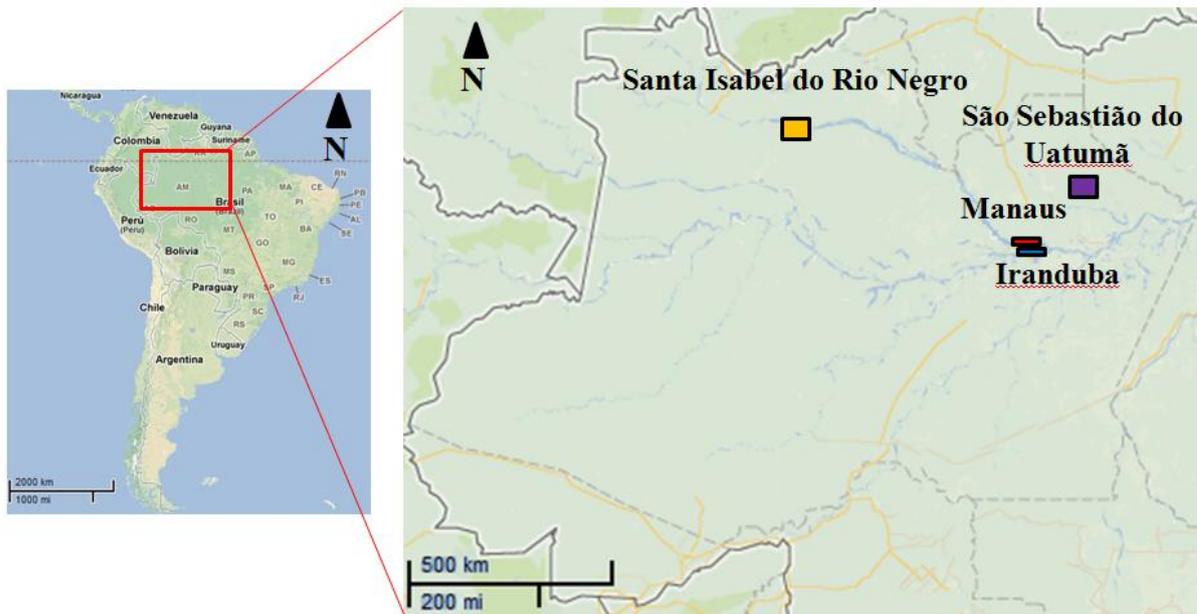


Figura 3 - Mapa de localização dos pontos de coleta das espécies de *Hypsiboas* no estado do Amazonas (AM). (Adaptado do *Google Maps*).

Tabela 2 - Espécies de *Hypsiboas* utilizadas no presente estudo contendo seus respectivos locais de coleta, número de indivíduos analisados e sexo dos mesmos.

Espécie / Grupo	Localidade	No. de indivíduos	Sexo	Tombo
<i>H. boans</i> Grupo <i>H. semilineatus</i>	São Sebastião do Uatumã	01	01 macho	INPA-H 31443
<i>H. cinerascens</i> Grupo <i>H. punctatus</i>	Manaus	04	04 machos	CZPB/UFAM 153-315 CZPB/UFAM 154-315-318
<i>H. geographicus</i> Grupo <i>H. semilineatus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	05	02 fêmeas 03 machos	INPA-H 31445- 31448
<i>H. lanciformis</i> Grupo <i>H. albopunctatus</i>	Manaus	03	03 machos	CZPB/UFAM 155-319 CZPB/UFAM 159-331 CZPB/UFAM 159-333
<i>H. multifasciatus</i> Grupo <i>H. albopunctatus</i>	Irاندuba	01	01 fêmea	CZPB/UFAM 156-320
<i>H. raniceps</i> Grupo <i>H. albopunctatus</i>	Irاندuba	06	02 fêmea 04 machos	CZPB/UFAM 154-324 - 329
<i>H. wavrini</i> Grupo <i>H. semilineatus</i>	São Sebastião do Uatumã Santa Isabel do Rio Negro	03	01 fêmea 02 machos	INPA-H 31444 INPA-H 31441 INPA-H 31442

3.2 Indução de mitose nos indivíduos amostrados

Para se obter um maior número de células em metáfase, foi utilizada a técnica para indução de mitoses, descrita por Oliveira *et al.* (1987), na qual uma solução de fermento biológico foi aplicada nos espécimes coletados.

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 a solução, deixada à temperatura ambiente para evitar o choque térmico com o animal, injetada na região femural da perereca (em alguns espécimes a injeção foi intraperitoneal), na proporção de 1mL para cada 100g de peso do animal, sendo mantidos vivos de 48-72h (Paiva *et al.* 2010). Transcorrido este tempo, foi injetado colchicina *in vivo* a (1%) na região intraperitoneal do animal (Ford e Hamerton 1956; Kasahara 2009). Após no mínimo oito horas e no máximo doze horas, o animal foi eutanaziado com dose letal de anestésico xilocaína a 5% na região ventral. Em alguns indivíduos o tratamento com colchicina (0,1%) foi *in vitro*.

3.3 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para a obtenção dos cromossomos foi retirada medula óssea dos dois fêmures e o fígado de acordo com o protocolo de Ford e Hamerton (1956) com algumas modificações. As células foram hipotonizadas com KCl a 0,075M contido em cubetas de vidro durante o período mínimo de 20 minutos e máximo de 1h, em estufa a 37 °C. Em seguida o material foi ressuspenso 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 3:1 (metanol:ácido acético), recém preparado e gelado. O material foi centrifugado por 10 minutos a 900rpm, descartando em seguida o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado no máximo 8mL de fixador, o material foi ressuspenso 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 ressuspenso com cuidado. Esta suspensão celular foi armazenada em tubos de 1,5mL, mantidas em freezer a 4 °C, para posteriormente, após um período mínimo de 24h, serem gotejadas em lâminas limpas e imersas em água destilada aquecida à 60 °C e coradas com Giemsa a 10% diluído em tampão fosfato 0,06M (pH 6,8) por 10 minutos, lavadas em água de torneira e secas ao ar.

3.4 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 a 15 segundos em solução de Hidróxido de Bário a 5% (filtrada e recém-preparada à 42 °C). A ação do Hidróxido de Bário foi interrompida com a imersão rápida em solução de HCL 0,2N à temperatura ambiente. A lâmina foi lavada em água destilada e incubada em solução 2xSSC, contendo 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 à 5%, diluída em tampão fosfato 0,06M (pH 6,8) por 10 minutos e lavadas com água destilada.

3.5 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 tratamento das lâminas com HCl à temperatura ambiente por 8 minutos, lavadas com água destilada e secas ao ar; em seguida, houve o 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 suspensão celular. Foi colocada uma lamínula por cima e em seguida, o material foi posto em uma câmara úmida a 60 °C por cerca de 3 a 8 minutos. Após a lâmina atingir a coloração marrom dourada, ela foi lavada com água destilada e a lamínula foi retirada naturalmente com a lavagem.

3.6 Utilização de sequências teloméricas 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 (1 mM), 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 (1min a 94 °C, 1 min 30s a 60 °C e 1min 30s a 72 °C). Este produto da PCR foi utilizado como sonda na hibridização *in situ* por fluorescência. Estas sondas foram marcadas por *Nick translation* (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante.

3.7 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Para a localização física cromossômica das sequências teloméricas foi realizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (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 hibridização contendo formamida 100% (concentração final 50%), sulfato de dextrano 50%, 20xSSC (concentração final de 2 x SSC), sonda marcada e água ultrapura foi desnaturada a 99 °C por um período de 10 minutos, sendo passada imediatamente ao 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 durante aproximadamente 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% temperatura ambiente por 5 minutos cada. As lâminas foram incubadas com os anticorpos específicos (antidigoxigenina) por 1h 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.

3.8 Análise cariotípica

Após a análise e contagem de no mínimo 15 metáfases por indivíduo em microscópio óptico, foi estabelecido o número diploide modal. As melhores metáfases 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 à técnicas moleculares (FISH) foram analisadas e tiveram suas imagens capturadas em fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus® BX – 51), em objetiva de imersão.

Para a montagem dos cariótipos foi utilizado um *software* (Adobe Photoshop Cs4®), onde os 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, segundo Green e Sessions (1991). Para cálculo no número fundamental foram considerados como portadores de dois braços os cromossomos meta (m) e submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st).

Hibridizações de sequências teloméricas em posições cromossômicas intersticiais foram consideradas ITS (sítios teloméricos intersticiais) quando sinais estavam presentes em todas as metáfases analisadas.

4. Resultados e discussão

Os resultados obtidos com base na análise das técnicas de citogenética clássica e molecular das sete espécies de *Hypsiboas* são apresentados sob a forma de capítulo, o qual se refere ao artigo que está em processo de submissão ao periódico *Genetica*.

4.1. Capítulo 1: Organização cariotípica de sete espécies amazônicas do gênero *Hypsiboas* (Anura; Hylidae)

Capítulo 1

Mattos, T. L.; Coelho, A. C.; Schneider, C. H.; Telles, D. O. C.; Menin, M. Gross, M. C.
Organização cariotípica de sete espécies amazônicas do gênero *Hypsiboas* (Anura; Hylidae).

Resumo

Os hilídeos são os mais diversos dentro da ordem Anura, compreendendo cerca de 80 espécies registradas na Amazônia brasileira, sendo que a maioria não possui estudos citogenéticos clássicos ou moleculares. O objetivo principal deste estudo foi caracterizar citogeneticamente sete espécies do gênero *Hypsiboas* (*Hypsiboas boans*, *Hypsiboas cinerascens*, *Hypsiboas geographicus*, *Hypsiboas lanciformis*, *Hypsiboas multifasciatus*, *Hypsiboas raniceps* e *Hypsiboas wavrini*) que ocorrem na região amazônica, mas precisamente no estado do Amazonas, utilizando marcadores clássicos e moleculares. Foram utilizadas coloração convencional em Giemsa (10%) para estabelecer o número diplóide, nitrato de prata para evidenciar as regiões organizadoras de nucléolo (RON), técnica de bandeamento C para localizar as regiões heterocromáticas e sequências teloméricas para a identificação de possíveis rearranjos cromossômicos. O número diplóide encontrado para as espécies foi de 24 cromossomos, com exceção de *Hypsiboas lanciformis*, que apresentou 22 cromossomos. Diferentes padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva e localização da RON foram evidenciados entre as espécies, assim como sítios teloméricos intersticiais, o que indica presença de rearranjos cromossômicos nas espécies deste grupo.

Palavras-chave: Anura, cromossomos, banda C, RON, telômero

Introdução

A família Hylidae é considerada a família mais diversa entre os anuros, com 926 espécies descritas (Frost *et al.* 2013), das quais 88 são conhecidas na Amazônia brasileira (Avila-Pires *et al.* 2007). Contudo, estudos citogenéticos recentes em espécies desta família mostraram que há variação: a) intrapopulacional, como o polimorfismo da RON encontrado em *Dendropsophus nanus* (Medeiros *et al.* 2003); b) intraespecífica, como a variação do número diplóide de $2n=24$ cromossomos e $2n=22$ cromossomos em *Hypsiboas albopunctatus* (Gruber *et al.* 2007) e presença de cromossomos supranumerários (Ferro *et al.* 2012); c) intragenérico, como a localização do par da RON em *Hypsiboas albomarginatus* (par 2) e *Hypsiboas faber* (par 11) (Carvalho *et al.* 2009b). Desta forma, os polimorfismos cariotípicos podem servir para identificar táxons, revelar espécies crípticas e embasar estudos de evolução cromossômica, sendo estas abordagens adotadas também para outros grupos de anuros (Fávero *et al.* 2011).

De acordo com uma compilação de dados citogenéticos para hílideos, o número diplóide básico é de 26 cromossomos (Duellman e Trueb 1986), mas algumas linhagens apresentam uma redução ou aumento no número diplóide em consequência de rearranjos cromossômicos do tipo fusão e fissão, respectivamente (Morescalchi 1973; Bogart 1973; Gruber *et al.* 2007). Dentre as linhagens de hílideos que apresentam número diplóide inferior a 26 cromossomos destacam-se as espécies do gênero *Hypsiboas*, com a maioria tendo 24 cromossomos (Duellman e Cole 1965; Beçak 1968; Rabelo 1970; Faivovich *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2009b; Oliveira *et al.* 2010). Contudo, a organização cariotípica das espécies de *Hypsiboas* não pode ser considerada conservada, uma vez que há variações intrer e intraespecíficas nas fórmulas cromossômicas, na posição da região organizadora de nucléolo e na distribuição da heterocromatina constitutiva (Duellman e Cole 1965; Beçak 1968; León 1970; Rabelo 1970; Rabelo *et al.* 1971; Bogart 1973; Gruber 2002; Ananias *et al.* 2004; Nunes 2006; Gruber *et al.* 2007; Nunes e Fagundes 2008; Carvalho *et al.* 2009b; Oliveira *et al.* 2010). Além disso, a espécie *H. albopunctatus* apresenta redução no número diplóide considerado padrão para o gênero, sendo evidenciado 22 cromossomos no complemento cromossômico e presença de um cromossomo B em algumas metáfases mitóticas (Gruber *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2010).

As espécies do gênero *Hypsiboas* têm sido separadas em sete grandes grupos, sendo eles: grupo *H. albopunctatus*, grupo *H. benitezi*, grupo *H. faber*, grupo *H. pellucens*, grupo *H.*

pulchellus, grupo *H. punctatus* e grupo *H. semilineatus* (Faivovich *et al.* 2005; Catroli e Kasahara 2009). Esta classificação tem sido efetuada em função de caracteres morfológicos, principalmente da coloração, membranas interdigitais, espinhos nos metatarsos dos machos (Cochran 1955; Faivovich *et al.* 2004; Cochran e Goin 1970) e também por sinapomorfias dos marcadores moleculares (Faivovich *et al.* 2005). De acordo com a árvore consenso descrita por Faivovich *et al.* (2005), o grupo *H. punctatus* e *H. benitezi* são mais próximos filogeneticamente do que *H. faber*, *H. pellucens* e *H. pulchellus*. Como se acredita que os grupos são monofiléticos (Faivovich *et al.* 2005), deduz-se que haja uma concordância em relação aos cariótipos dentro dos grupos.

O gênero *Hypsiboas* é bastante diverso na Amazônia Central, sendo registradas até espécies em uma mesma área de coleta. Entretanto, para a maioria das espécies, não há informações citogenéticas disponíveis. A existência de variações inter e intra-específicas de características dos cariótipos de espécies deste gênero são praticamente desconhecidas na Amazônia; desta forma, a organização cariotípica da maioria das espécies de *Hypsiboas* que ocorrem na Amazônia ainda não foi elucidada, sendo o objetivo deste estudo caracterizar citogeneticamente sete espécies do gênero *Hypsiboas*, pertencentes a três grupos: uma espécie do grupo *H. punctatus* (*H. cinerascens*); três espécies do grupo *H. semilineatus* (*H. boans*, *H. geographicus* e *H. wavrini*) e três espécies do grupo *H. albopunctatus* (*H. lanciformis*, *H. multifasciatus*, *H. raniceps*) que ocorrem no estado do Amazonas, Brasil.

Material e métodos

Espécies e locais de coleta

Foram analisados 23 indivíduos adultos: 01 macho de *Hypsiboas boans* (INPA H-31443), 04 machos de *Hypsiboas cinerascens* (CZPB/UFAM 153-315; CZPB/UFAM 154-315-318), 02 fêmeas e 03 machos de *Hypsiboas geographicus* (INPA H-31445-31448), 03 machos de *Hypsiboas lanciformis* (CZPB/UFAM 155-319; CZPB/UFAM 159-331; CZPB/UFAM 159-333), 01 fêmea de *Hypsiboas multifasciatus* (CZPB/UFAM 156-320), 02 fêmeas e 04 machos de *Hypsiboas raniceps* (CZPB/UFAM 154-324-329) e 01 fêmea e 02 machos de *Hypsiboas wavrini* (INPA H-31441-31442; INPA H-31444). *Hypsiboas cinerascens* e *H. lanciformis* foram coletadas em um fragmento florestal urbano da cidade de Manaus, Amazonas, localizado no campus da Universidade Federal do Amazonas e arredores (lago Acariquara) (03°04'34"S; 59°57'30"W), município de Manaus, Amazonas. *Hypsiboas*

multifasciatus e *H. raniceps* foram coletadas no lago Catalão, na confluência do rio Negro e Solimões, município de Iranduba, Amazonas (03°09'47"S; 059°54'29"W). O único indivíduo de *H. boans* foi coletado nas florestas das margens do rio Jatapu, município de São Sebastião do Uatumã, Amazonas, (0°50' e 1°55'S; 58°50' e 60°10'W). *Hypsiboas geographicus* foi coletada nos rios Darahá e Ayuanã, ambos no município de Santa Isabel do Rio Negro (Amazonas) (0°24'24"N; 65°1'1"W) e *H. wavrini* foi coletada rio Jatapu, município de São Sebastião do Uatumã, Amazonas, (0°50' e 1°55'S; 58°50' e 60°10'W) e no rio Ayuanã no município de São Sebastião do Uatumã, Amazonas (0°24'24"N; 65°1'1"W). As coletas foram realizadas durante o período de junho de 2011 a junho de 2012, durante o período chuvoso e seco; os animais foram capturados de acordo com a disponibilidade das espécies e com autorização cedida pelo ICMBio/SISBIO.

Os animais foram mortos com dose letal do anestésico xilocaína 5%. Após a retirada dos órgãos utilizados para a análise mitótica, eles foram fixados em formol 10% e conservados em álcool 70°GL. Os indivíduos testemunhos foram depositados na Coleção Zoológica Paulo Bührnheim, da Universidade Federal do Amazonas (CZPB/UFAM) e na Coleção de Anfíbios e Répteis do Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia (INPA-H). Ressalta-se que este trabalho teve autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Análises cromossômicas

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de medula óssea e fígado após o tratamento com colchicina *in vitro* (1%) e *in vivo* (0,1%) (Ford e Hamerton, 1956; Kasahara 2009). Alguns espécimes tiveram previamente sua divisão celular induzida por meio de injeção de fermento biológico na proporção de 0,1mL/10g do peso do animal sendo mantidos vivos de 48-72h (Oliveira *et al.* 1987; Paiva *et al.* 2010).

As suspensões foram submetidas à coloração convencional com Giemsa (10%), impregnação por nitrato de prata por Ag-RON (Howell e Black 1980), bandeamento C para detecção da heterocromatina constitutiva (Sumner 1972) e hibridização *in situ* por fluorescência (Pinkel *et al.* 1986) de sondas teloméricas amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Ijdo *et al.* 1991).

As melhores metáfases 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 a técnicas moleculares (FISH) tiveram suas imagens capturadas em fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus® BX – 51), em objetiva de imersão. Os cromossomos provenientes das imagens capturadas foram recortados, emparelhados e medidos utilizando o programa livre *Image J*, sendo posteriormente organizados em ordem decrescente de tamanho com o uso do Adobe Photoshop Cs4®. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com o critério de relação de braços, segundo Green e Sessions (1991). Para cálculo no número fundamental foram considerados como portadores de dois braços os cromossomos meta (m) e submetacêntricos (sm) e subtlocêntricos (st). Hibridizações de sequências teloméricas em posições cromossômicas intersticiais foram consideradas ITS (sítios teloméricos intersticiais) quando sinais estavam presentes em todas as metáfases analisadas. Para a determinação da fórmula cariotípica foram analisados tanto os cromossomos submetidos a coloração convencional, quanto os submetidos ao tratamento com hidróxido de bário para a evidênciação da heterocromatina.

Resultados

Coloração convencional com Giemsa

A espécie *Hypsiboas lanciformis* apresentou número diploide igual a 22 cromossomos e as espécies *H. boans*, *H. cinerascens*, *H. geographicus*, *H. multifasciatus*, *H. raniceps* e *H. wavrini* apresentaram 24 cromossomos, sem o indício de cromossomos sexuais e/ou supranumerários (Fig. 1).

Hypsiboas lanciformis apresentou 8m+6sm+8st, NF = 44, sendo os pares 1, 7, 8 e 10 metacêntricos; 2, 3 e 9 submetacêntricos e 4, 5, 6 e 11 subtlocêntricos (Figs. 1a; 2a). Em algumas metáfases, foi possível identificar uma constrição secundária no braço longo dos homólogos do par 11.

Hypsiboas boans apresentou 8m+6sm+10st, NF = 48, sendo os pares 1, 7, 11 e 12 metacêntricos; 2, 3 e 10 submetacêntricos e 4, 5, 6, 8 e 9 subtlocêntricos (Figs. 1b; 2b). Não foram visualizadas constrições secundárias nas metáfases analisadas.

Hypsiboas cinerascens apresentou 6m+12sm+6st, NF = 48, sendo os pares 1, 8 e 11 metacêntricos; 2, 4, 5, 9, 10 e 12 submetacêntricos e 3, 6 e 7 subtlocêntricos (Figs. 1c; 2c). Em algumas metáfases, foi possível identificar constrições secundárias no braço longo dos homólogos do par 11.

Hypsiboas geographicus, *Hypsiboas multifasciatus* e *Hypsiboas raniceps* apresentaram $10m+6sm+8st$ e $NF = 48$. Contudo, na primeira espécie os pares 1, 2, 10, 11 e 12 são metacêntricos; 4, 7 e 9 submetacêntricos e 3, 5, 6 e 8 subtelocêntricos (Figs. 1d; 2d), na segunda os pares 1, 2, 8, 9 e 11 são metacêntricos; 4, 5, 7 submetacêntricos e 3, 6, 10 e 12 subtelocêntricos (Figs. 1e; 2e) e na terceira os pares 1, 2, 9, 11 e 12 são metacêntricos; 6, 7 e 10 submetacêntricos e 3, 4, 5 e 8 subtelocêntricos (Figs. 1f; 2e). Em algumas metáfases de *H. multifasciatus* e *H. raniceps* foi possível identificar constrições secundárias nos braços curtos dos homólogos do par 11.

Hypsiboas wavrini apresentou $10m+6sm+8st$, $NF = 48$, sendo os pares 1, 9, 10, 11 e 12 metacêntricos; 2, 3 e 7 submetacêntricos, e 4, 5, 6 e 8 subtelocêntricos (Figs. 1g; 2g). Não foram encontradas constrições secundárias nas metáfases analisadas.

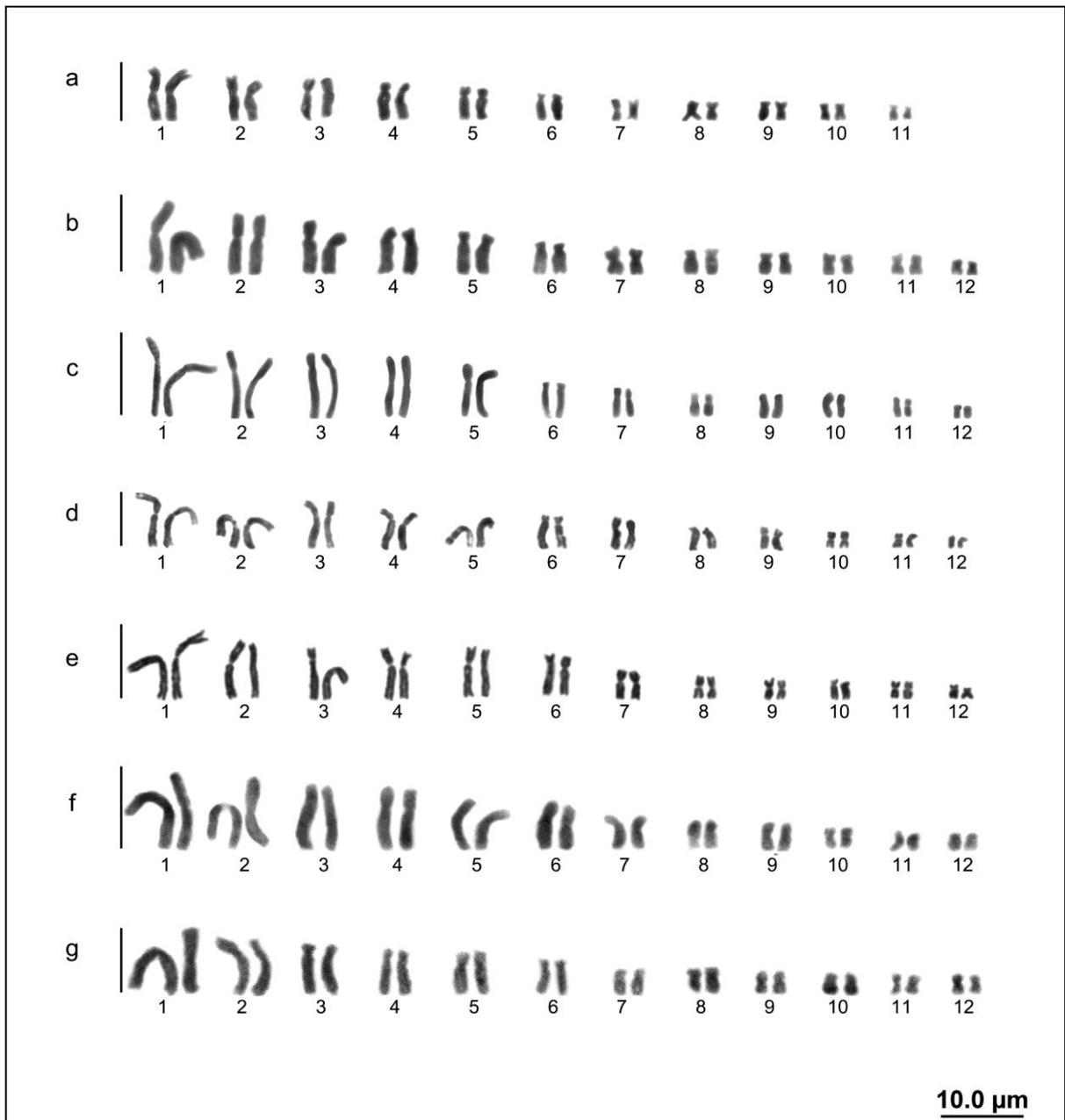


Figura 1 - Cariótipos mitóticos em coloração convencional com Giemsa: *Hysiboas lanciformis* (a) com $2n = 22$; *Hysiboas boans* (b) com $2n = 24$; *Hysiboas cinerascens* (c) com $2n = 24$; *Hysiboas geographicus* (d) com $2n = 24$; *Hysiboas multifasciatus* (e) com $2n = 24$; *Hysiboas raniceps* (f) com $2n = 24$ e constrição secundária no par 11 (h); e *Hysiboas wavrini* (g) com $2n = 24$. Escala da barra: 10 micrômetros.

Banda C e Região organizadora de nucléolos (RON)

Diferentes padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva foram evidenciados entre as espécies de *Hypsiboas* analisadas. O primeiro padrão foi evidenciado em *H. lanciformis*, cuja heterocromatina apresentou-se distribuída preferencialmente na região centromérica da maioria dos cromossomos, com alguns blocos invadindo a região pericentromérica (tais como nos pares 1 e 3), por vezes englobando todo o braço curto (pares 4 e 11) e alguns cromossomos sem heterocromatina evidente (par 7) (Fig. 2a).

No segundo padrão a heterocromatina constitutiva foi evidenciada como grandes blocos conspícuos na região centromérica e pericentromérica de todos os cromossomos *H. boans* (Fig. 2b), *H. geographicus* (Fig. 2d) e *H. wavrini* (Fig. 2g), com exceção de ambos homólogos dos pares 6 e 7 de *H. geographicus* que não apresentaram padrão heterocromático distinguível.

Em *Hypsiboas cinerascens*, as porções heterocromáticas são consideradas pouco visíveis (Fig. 2c). Contudo, em alguns pares cromossômicos a região centromérica apresentou-se como uma faixa clara, tais como os pares 1, 2, 3, 5, 6 e 8 (Fig. 2c). Em *Hypsiboas multifasciatus*, a banda C se apresentou de forma intersticial distribuída ao longo dos braços curtos e longos da maioria dos cromossomos, bem como ao longo do braço longo dos pares 11 e 12 (Fig. 2e).

Nos indivíduos de *Hypsiboas raniceps*, a heterocromatina constitutiva esteve ausente na maioria dos cromossomos, contudo blocos heterocromáticos conspícuos foram evidenciados na região pericentromérica do par 5 (Fig. 2f).

Com exceção de *H. lanciformis*, que possui múltiplas marcações de RONs (região centromérica do par 1 e subterminal do braço longo do par 11 - caixa da Fig. 2a), as demais espécies possuem apenas um par cromossômico marcado pelo AgNO₃. O par cromossômico 11 foi o portador da RON em *H. boans*, *H. cinerascens*, *H. multifasciatus*, *H. raniceps* e *H. wavrini* (caixa das Figs. 2 b, c, e, f, g). Já em *H. geographicus* a RON foi observada centromericamente no primeiro par cromossômico (caixa da Fig. 2d). Contudo, variação no número de sítios ativos foram encontradas inter e intraindividualmente em todas as espécies.

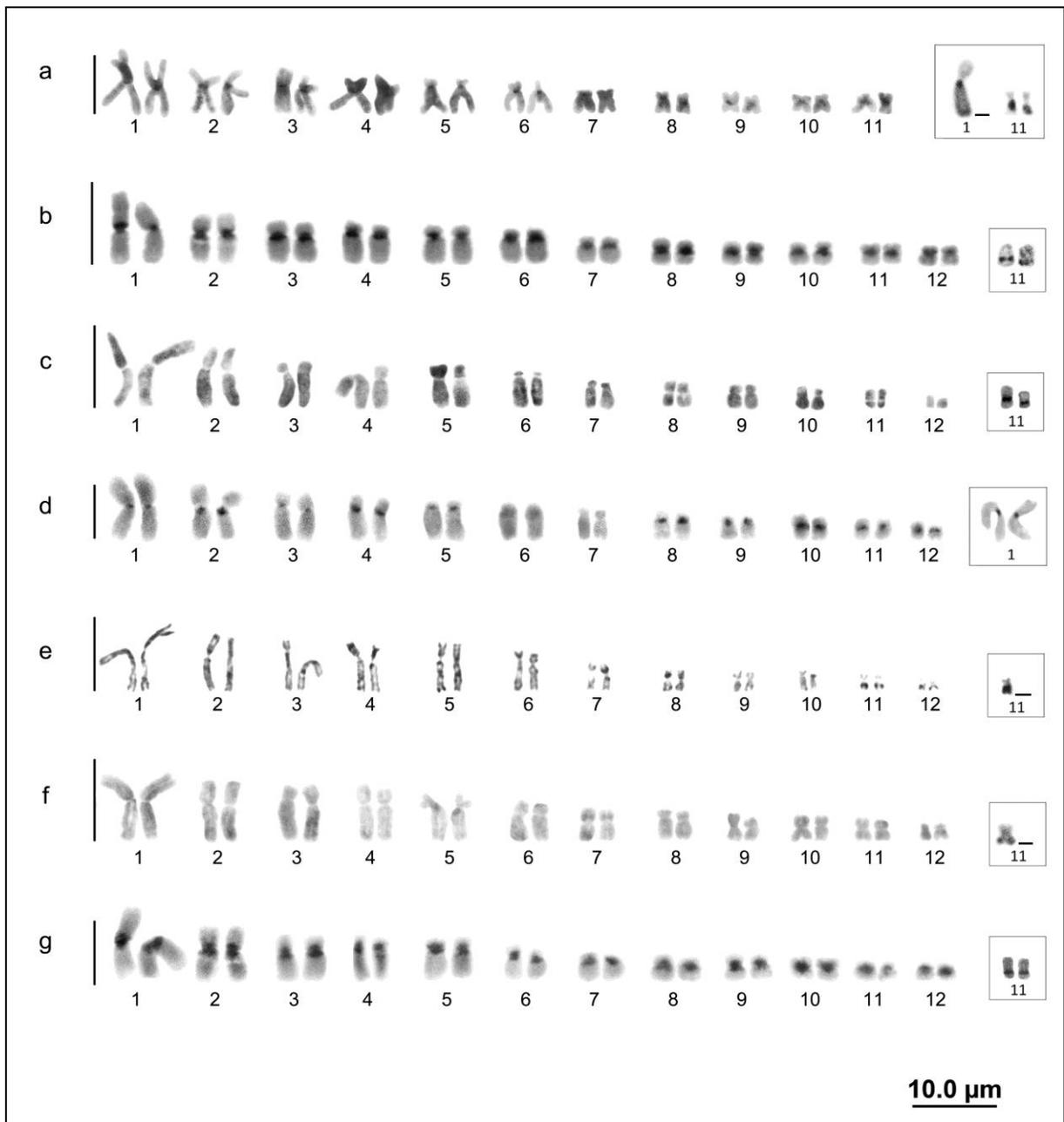


Figura 2 - Padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva em *Hypsiboas lanciformis* (a); *Hypsiboas boans* (b); *Hypsiboas cinerascens* (c); *Hypsiboas geographicus* (d); *Hypsiboas multifasciatus* (e); *Hypsiboas raniceps* (f); e *Hypsiboas wavrini* (g). Os pares cromossômicos portadores da região organizadora de nucléolo estão destacados nas caixas. Escala da barra: 10 micrômetros.

Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH): sondas teloméricas

A hibridização *in situ* por fluorescência de sondas teloméricas detectou sítios nas regiões terminais de todos os cromossomos de todas as espécies, contudo sítios teloméricos intersticiais (ITS) foram detectados em três espécies: *Hypsiboas boans*, *Hypsiboas geographicus* e *Hypsiboas wavrini* (Figs. 3a, b, c, respectivamente). Em *H. boans* (Fig. 3a) e *H. wavrini* (Fig. 3c) ITS foram verificados no braço curto de ambos os homólogos do par 2 e em ambos os homólogos do par 5 no braço longo. Já em *H. geographicus* ITS centroméricos foram observados em ambos os homólogos dos pares 1 e 5 (Fig. 3b).

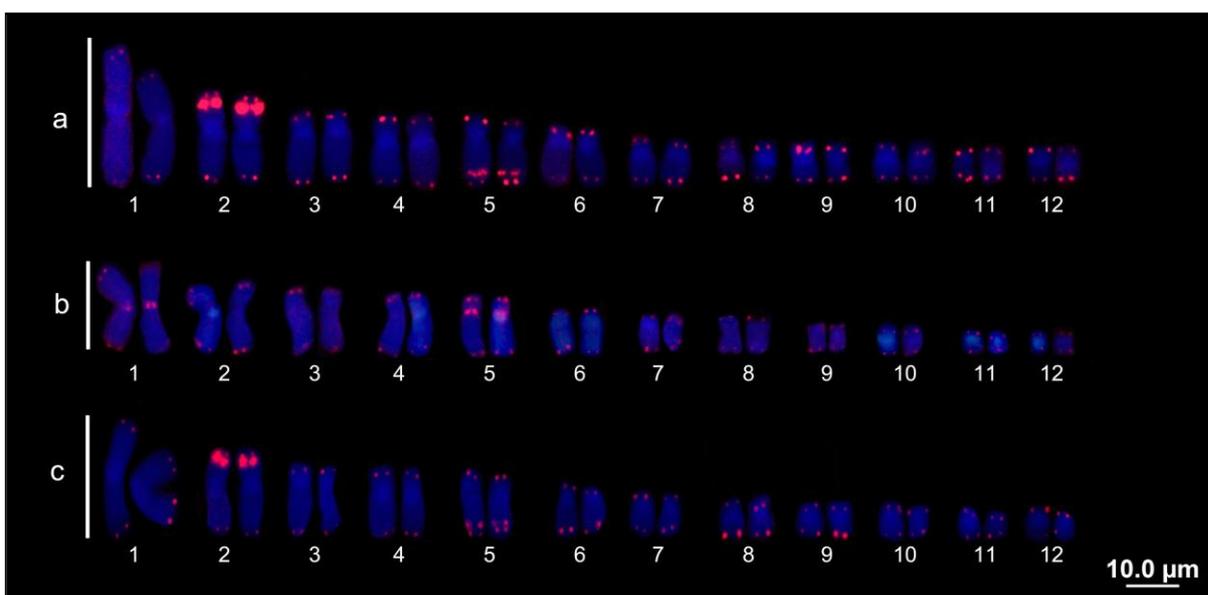


Figura 3 - Cariótipos das espécies *Hypsiboas boans* (a), *Hypsiboas geographicus* (b) e *Hypsiboas wavrini* (c), mostrando sinais de hibridização com sonda telomérica (vermelho). Os cromossomos foram contra corados com DAPI. Escala da barra: 10 micrômetros.

Discussão

As espécies da família Hylidae variam quanto ao número diploide de 18 a 30 cromossomos. Por exemplo, espécies do gênero *Dendropsophus* possuem 30 cromossomos (Medeiros *et al.* 2003; Gruber *et al.* 2005), *Phyllomedusa* 26 cromossomos (Paiva *et al.* 2010), *Aplastodiscus* de 18 a 24 cromossomos (Carvalho *et al.* 2009b) e a maioria das espécies de *Hypsiboas* 24 cromossomos (Beçak 1968; Raber *et al.* 2004; Gruber *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2008^a; Nunes e Fagundes 2008; Oliveira *et al.* 2010). Para os hílídeos,

acredita-se que o cariótipo basal é constituído de 26 cromossomos e os demais números diploides teriam se originado a partir dele, por meio de rearranjos robertsonianos do tipo fusão e fissão (Medeiros 2000).

Assim sendo, os cariótipos das espécies de *Hypsiboas* seriam derivados de um ancestral com $2n=26$ cromossomos, que teria sofrido fusões para originar $2n=24$. Este número diploide está presente na maioria das espécies, com exceção de *H. albopunctatus* (Beçak 1968; Bogart 1973, Gruber *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2010) e *H. lanciformis* (presente trabalho), ambas do grupo *H. albopunctatus*, que apresentam $2n=22$ cromossomos e teriam sofrido nova fusão para haver uma redução de 24 para 22. Sítios teloméricos intersticiais (ITS) são indicativos de rearranjos cromossômicos numéricos do tipo fusão; contudo, para todas as espécies de *Hypsiboas* analisadas no presente estudo, apenas *H. boans*, *H. geographicus* e *H. wavrini* apresentaram sequências teloméricas fora das regiões terminais. Isso não significa que a hipótese de que os *Hypsiboas* são derivados de um ancestral com 26 cromossomos esteja equivocada, uma vez que cromossomos oriundos de eventos de fusões podem apresentar pequenos sítios teloméricos que não podem ser detectados pela FISH, ou podem apresentar ausência de ITS devido a perda destas sequências durante processos de erosão molecular de DNAs repetitivos (Mandrioli *et al.* 1999).

Considerando os grupos de *Hypsiboas* propostos por Faivovich *et al.* (2005), o grupo *H. punctatus* seria irmão do clado que engloba *H. semilineatus* e *H. albopunctatus*, sendo estes, dois grupos irmãos. Grande variação na organização do genoma das espécies entre grupos é encontrada, especialmente no que se refere ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (Figura 4).

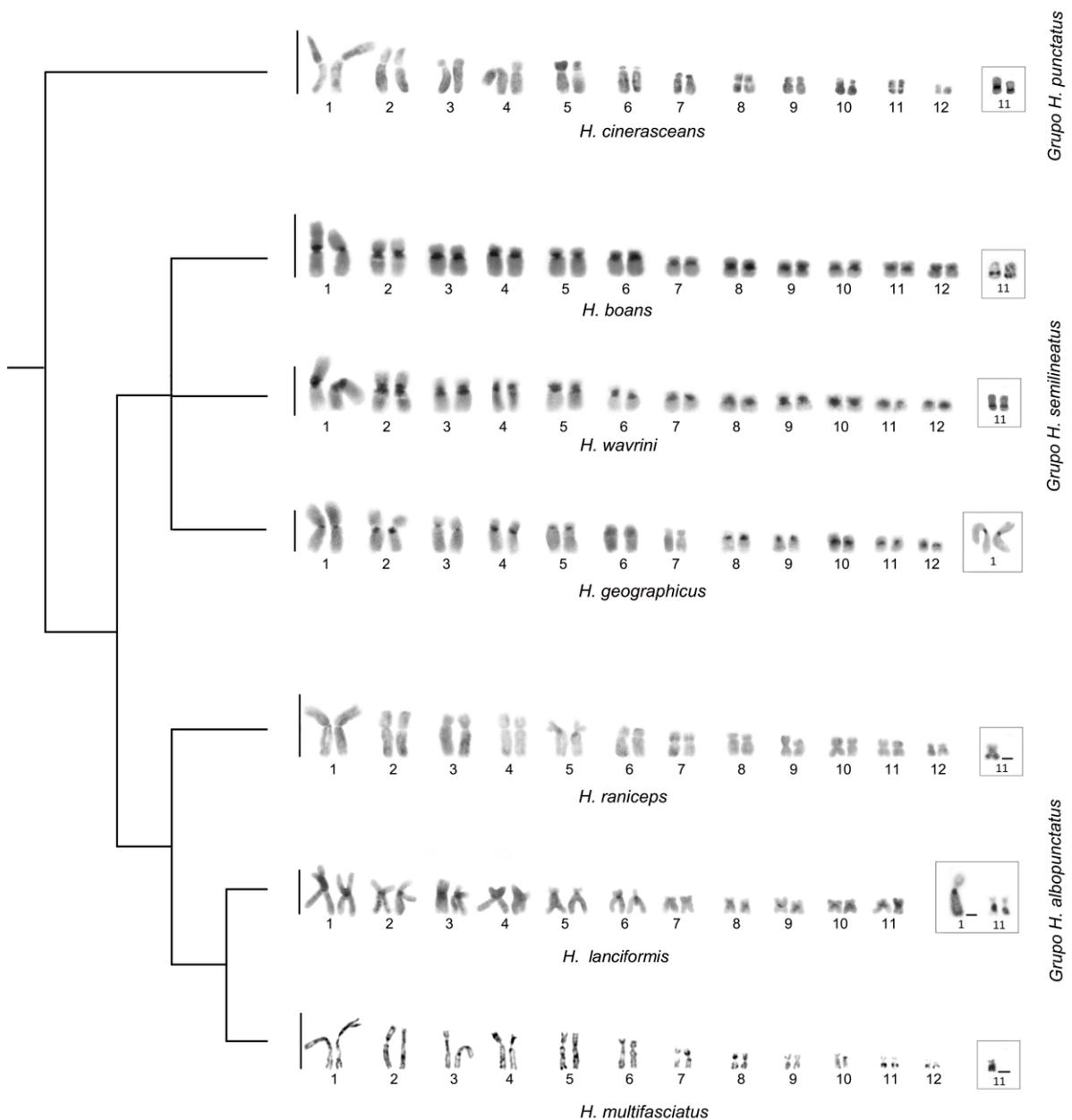


Figura 4 - Sobreposição de dados citogenéticos sobre a filogenia proposta para *Hypsiboas* por Faivovich *et al.* (2005), com ênfase na relação entre os grupos *H. punctatus*, *H. semilineatus* e *H. albopunctatus*. A não definição dos ramos do grupo *H. semilineatus* é em função de *H. wavrini* não ter sido incluída na filogenia original.

A espécie *H. cinerascens* (grupo *H. punctatus*) apresenta características citogenéticas basais dentre os *Hypsiboas*, com número diploide igual a 24 cromossomos, heterocromatina constitutiva pouco visível e região organizadora de nucléolo ativa no par 11 (Bogart 1973;

presente trabalho). Dentro deste grupo está alocada também a espécie *H. punctatus*, cuja informação cariotípica restringe-se ao número diploide igual a 24 cromossomos (Bogart e Bogart 1971; Foresti 1972; Bogart 1973; Anderson 1991), não permitindo comparações mais profundas sobre os padrões cariotípicos para o grupo.

As espécies *H. boans*, *H. geographicus* e *H. wavrini* pertencem ao grupo *H. semilineatus* (Faivovich *et al.* 2005). Estas três espécies apresentam blocos heterocromáticos bem evidentes na região centromérica/pericentromérica da maioria dos cromossomos, tendo provavelmente sofrido um processo de acúmulo de heterocromatina ou heterocromatinização durante a evolução. Ainda, se considerarmos estas características cariotípicas, é possível inferir que *H. boans* e *H. wavrini* estariam mais próximas filogeneticamente, uma vez que o padrão heterocromático é similar entre elas, bem como as RONS ativas estão localizadas nos homólogos do par 11 e sítios de ITS foram evidenciados nos pares 2 e 5 de ambas.

Proximidade entre *H. wavrini* e *H. boans* também pode ser verificada na grande semelhança morfológica e reprodutiva presente entre elas (Hoogmoed 1990; Martins e Moreira 1991), o que implica em uma grande dificuldade em diferenciar as duas espécies nas coletas em campo devido a semelhanças fenotípicas, apesar delas se diferenciarem pelo canto (Lynch e Suárez-Mayorga 2001) e pelos períodos de reprodução (Martins e Moreira 1991). Por este motivo, alguns autores definem *H. wavrini* como sinônimo de *H. boans* (Cochran e Goin 1970). Contudo, foi relatado na Colômbia que *H. wavrini* ocorre em simpatria com *H. aff. boans* (Lynch e Suárez-Mayorga 2001). Considerando a grande semelhança cariotípica, incluindo o padrão de heterocromatina, número e posição das RONS e a presença de ITS em porções similares entre os dois táxons, podemos levantar algumas suposições: a) as espécies *H. wavrini* e *H. boans* apresentam realmente padrões similares de organização cariotípica e, se realmente existirem em simpatria, possivelmente não teriam mecanismos cromossômicos de isolamento reprodutivo. Sendo assim, para que não houvesse hibridização entre as duas espécies seria necessário a existência de diferentes comportamentos reprodutivos e/ou ecológicos, sendo os diferentes padrões de vocalização uma evidência disso; b) devido à grande semelhança morfológica, pode estar havendo um equívoco na identificação de *H. wavrini* e *H. boans*, o que implicaria em erros na descrição cariotípica.

Na espécie *H. geographicus*, pertencente ao grupo *H. semilineatus*, os blocos heterocromáticos são mais pontuais se comparados com as duas espécies anteriores e nem todos os cromossomos apresentam estas marcações (Fig. 4). Além disso, em *H. geographicus*

a RON está localizada na região centromérica do par 1, sendo coincidente com ITS nesta região. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de existência RONS múltiplas (pares 1 e 7) no grupo *H. semilineatus*, uma vez que a técnica de impregnação por nitrato de prata permite identificar apenas os sítios ativos, não revelando o número exato de genes ribossomais da família 45S, o qual só pode ser efetuado pela FISH utilizando como sonda genes desta família (Howell e Black 1980; Boisvert *et al.* 2007). Mas vale ressaltar que em *H. semilineatus*, provenientes do sudeste brasileiro, os sítios ribossomais apresentam-se apenas no par 11 (Nunes e Fagundes 2008), confirmando um sistema de RON simples.

Com relação aos ITS encontrados nos cromossomos de *H. boans*, *H. geographicus* e *H. wavrini*, estes provavelmente são em decorrência de rearranjos robertsonianos e não-robertsonianos, já que para haver a redução de 26 para 24 cromossomos, cuja fusão estaria vinculada ao surgimento do cariótipo basal do *Hypsiboas*, apenas um par deveria ter se fusionado a outro, sendo esperado apenas um par de ITS em cada espécie. Considerando que estas três espécies não se encontram no clado basal e como dois pares com ITS foram encontrados, pelo menos mais um tipo de rearranjo cromossômico precisa estar presente nas três espécies. Como não houve alteração no número diploide, acredita-se que o segundo evento refere-se a um rearranjo não-robertsoniano envolvendo a região terminal. Além disso, como o par 1 de *H. geographicus* apresenta o ITS na mesma região da RON, possivelmente estes estejam associados com diferentes classes de DNA satélite/repetitivo, o que poderia explicar a amplificação destas sequências teloméricas na região intersticial dos cromossomos, uma vez que os sinais são mais conspícuos que os encontrados nos telômeros. Contudo, seria interessante efetuar, em um trabalho futuro, análises citogenéticas adicionais para identificação destas sequências.

Múltiplos sítios ativos da região organizadora de nucléolo foram evidenciados por impregnação por nitrato de prata nas espécies *H. lanciformis* (presente trabalho) e *H. raniceps* (Gruber *et al.* 2007), pertencentes ao grupo *H. albopunctatus* (Faivovich *et al.* 2005), que também abriga, dentre outras espécies, *H. multifasciatus* e *H. albopunctatus*. Contudo, ressalta-se que sondas de DNA ribossomal 45S confirmaram RON simples em *H. albopunctatus* (Ferro *et al.* 2012), o que indica que os genes ribossomais estão envolvidos nos processos de evolução cariotípica, não existindo um padrão típico para cada grupo, havendo a presença de RONS simples e múltipla entre as espécies dos táxons.

Além da diferença no número e localização das RONS, dois números diploides e diferentes fórmulas cariotípicas estão presentes no grupo *H. albopunctatus*. Contudo, apesar de *H. lanciformis* e *H. albopunctatus* apresentarem 22 cromossomos, as demais espécies do grupo apresentam $2n=24$ (Beçak 1968; Rabelo 1970; Rabelo *et al.* 1971; Gruber *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2009b; Oliveira *et al.* 2010), não sendo uma característica do grupo a redução do número diploide para 22. Apesar de haver diminuição do número diploide para $2n=22$ cromossomos em *H. lanciformis*, sítios teloméricos intersticiais não foram encontrados, provavelmente em decorrência de erosão genética destas sequências.

Um fator interessante relacionado a *H. lanciformis* é que esta espécie é encontrada tipicamente em áreas fragmentadas e bordas de floresta (Lima *et al.* 2006; Menin *et al.* 2008; Tovar-Rodríguez *et al.* 2009), ou seja, estariam mais susceptíveis a ações antrópicas, as quais poderiam ter favorecido rearranjos cromossômicos numéricos. O mesmo poderia estar acontecendo em *H. albopunctatus*, amplamente encontrada em áreas perturbadas (Moraes *et al.* 2007), já que além de apresentar $2n=22$ cromossomos esta espécie ainda apresenta indivíduos com cromossomos supranumerários e cuja origem é atribuída a uma duplicação completa ou parcial do cromossomo do par 8, havendo uma degeneração e perda do homólogo e eliminação da RON (Gruber *et al.* 2007). Contudo, apesar de Carvalho *et al.* (2008a) afirmarem que apenas dois anos de fragmentação florestal provocadas por ação humana e/ou catástrofes naturais podem ocasionar diferenças cromossômicas em relação ao número diploide, fórmula cariotípica e número fundamental em anuros, a redução do número diploide destes táxons pode apenas estar relacionada à história evolutiva dos mesmos.

Além da presença de dois números diploides diferentes no grupo *H. albopunctatus*, a organização do genoma destas espécies é diferente, sendo facilmente verificada pela distribuição dos blocos heterocromáticos. *Hypsiboas lanciformis* apresenta blocos heterocromáticos na região centromérica da maioria dos cromossomos (presente trabalho), assim como *H. albopunctatus* (Gruber *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2010). Já *H. raniceps* e *H. multifasciatus* apresentam poucos blocos heterocromáticos tênues e distribuídos em apenas alguns pares de cromossomos (Figura 4). Ainda, diferenças claras no padrão de distribuição de heterocromatina foram evidenciadas entre populações de *H. raniceps*, já que nos indivíduos do norte do Brasil blocos heterocromáticos tênues são evidenciados nas regiões teloméricas do par 2 e intersticialmente nos pares 3 e 7, além de um bloco centromérico no par 5, enquanto que nos provenientes na região central do Brasil nenhuma marcação

telomérica foi evidenciada (Rabelo 1970; Rabelo *et al.* 1971; Gruber *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2008a; Oliveira *et al.* 2010). As variações na quantidade e na distribuição da heterocromatina constitutiva são características importantes que podem diferenciar populações devido a mecanismos epigenéticos, os quais podem estar associados a mecanismos de regulação da expressão gênica (King 1990). Ainda, considerando que a heterocromatina normalmente é rica em sequências repetitivas, estas podem desempenhar um papel importante na especiação e/ou adaptação por estarem menos sujeitas às pressões seletivas, favorecendo o acúmulo de diferenças durante o processo evolutivo (Martins 2007; Bohne *et al.* 2008; Ferreira e Martins 2008).

Com relação as descrições cariotípicas disponíveis para as espécies do grupo *H. albopunctatus*, está ocorrendo uma confusão na nomenclatura adotada pelos autores para diferentes táxons, o que implica em divergência nas informações citogenéticas. De acordo com Ferro *et al.* (2012) apenas as espécies *H. albopunctatus*, *H. fasciatus* e *H. raniceps* haviam sido cariotipadas, mas segundo Catroli e Kasahara (2009) não há nenhum registro citogenético em relação à *H. fasciatus*. Ainda, segundo estes autores, *H. multifasciatus* fora descrita citogeneticamente primeiramente por Beçak (1968), sendo esta informação concordante com a encontrada em King (1990). Entretanto, Beçak (1968) não descreveu *H. multifasciatus* e sim *H. bischoffi*, pertencente ao grupo *H. pulchellus* e semelhante à *H. multilineatus* (De Sá 1996). Estes dados indicam que o grupo *H. albopunctatus* pode estar abrigando complexos de espécies (De Sá 1996), o que explicaria a existência de vários citótipos que vêm sendo descritos para uma mesma espécie, tais como *H. multifasciatus* provenientes do estado do Amazonas (Brasil) e provenientes do estado de Goiás (Brasil), uma vez que os primeiros apresentam 10m+6sm+ 8st (presente trabalho) e os segundos 14m + 8sm + 2st (Oliveira *et al.* 2010). O mesmo ocorre em *H. raniceps*, que apresenta três fórmulas cariotípicas distintas (8m+10sm+6st; 8m+14sm+2st; 14m+6sm+4st) em indivíduos provenientes dos estados Mato Grosso e Goiás, centro-oeste brasileiro (Rabelo 1970; Rabelo *et al.* 1971; Gruber *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2008a; Oliveira *et al.* 2010) e mais uma (10m+6sm+8st) no Amazonas, região norte do Brasil (presente trabalho). Parte desta variação pode estar relacionada a qualidade da preparação cromossômica analisada, ao padrão de compactação do DNA e a erros na medida dos braços cromossômicos que geram divergência na interpretação do cariótipo. Mas estudos recentes mostram que o centrômero, cuja posição é utilizada para determinar o tipo cromossômico, é uma porção cromossômica

dinâmica, que normalmente possui acúmulo de DNAs repetitivos e que têm capacidade de reposicionar-se devido a respostas epigenômicas, podendo assim modificar a fórmula cariotípica sem reposicionamento de genes (Rocchi *et al.* 2012). Esta pode ser parte da explicação para a existência de diferentes fórmulas cariotípicas relatadas para indivíduos da mesma espécie do grupo *H. albopunctatus* provenientes de diferentes localidades, uma vez que sua distribuição é ampla (Frost *et al.* 2013).

Sendo assim, os dados encontrados neste trabalho reforçam a ideia da complexidade existente dentro no gênero *Hypsiboas*, assim como nos diferentes grupos que compõe este táxon. Entretanto, mais estudos em relação ao grupo devem ser realizados abrangendo uma maior área de amostragem, principalmente na Amazônia brasileira, contribuindo para um melhor entendimento deste grupo tão fascinante ao mesmo tempo tão complexo e subestimado.

Referências bibliográficas

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

5. Conclusões gerais

Os números diplóides encontrados para as sete espécies de *Hypsiboas* amazônicas, permitiu que *H. lanciformis* se diferenciasse das demais por meio dos marcadores citogenéticos, com exceção de *H. wavrini* e *H. boans*, que possuem características cromossômicas similares.

A evolução cromossômica das espécies do gênero *Hypsiboas* envolve rearranjos cromossômicos robertsonianos e não robertsonianos, fato evidenciado por diferentes fórmulas cariotípicas, posição das RONS e presença de sítios teloméricos interciais em algumas espécies.

As três espécies do grupo *H. semilineatus* (*H. boans*, *H. wavrini* e *H. geographicus*) se diferenciam das demais por apresentarem heterocromatina constitutiva distribuída em grandes blocos pericentroméricos, indicando processo de heterocromatinização ou adição de heterocromatina ao longo da evolução cariotípica.

Número diploide inferior a 24 cromossomos são encontrados em espécies do grupo *H. albopunctatus*, porém não há tendência em redução no número diploide no grupo. Ainda, variação intraespecífica foi evidenciada em espécies do grupo *H. albopunctatus*, havendo diferenças na fórmula cariotípica e padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva entre indivíduos reconhecidos morfológicamente como pertencentes à mesma espécie, mas provenientes de diferentes populações.

6. Referências bibliográficas gerais

Ananias, F. 1996. *Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo H. pulchella (Amphibia, Anura, Hylidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 101pp.

Ananias, F.; Garcia, P. C. A.; Recco-Pimentel, S. M. 2004. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas*, 40: 42-48.

Anderson, K. 1991. Chromosome evolution in Holoartic *Hyla treefrog*. In: Green, D. M.; Sessions, S. K (Eds.) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, United States of America, p. 299-331.

Avila-Pires, T. C.; Hoogmoed, M.S.; Vitt, L. J. 2007. *Herpetofauna da Amazônia*. In: Nascimento, L.B.; Oliveira, M. E. (Eds.). *Herpetologia do 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 case of supranumerary 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.; Bogart, J. E. 1971. Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. *Herpetologica*, 27:229-235.

Bogart, J. P. 1973. Evolution of anurans karyotypes. In: Vial, J. L. (Ed.) *Evolutionary Biology of the anurans*. University of Missouri Press, Columbia, United States of America, p. 337-349.

- 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.
- Boisvert, F. M.; Koningsbruggen, S. V.; Navascués, J.; Lamons, A. L. 2007. The multifunctional nucleolus. *Molecular Cell Biology*, 8: 574-585.
- Carvalho, F. K.; Fernandes, A.; Barth, A.; Custódio, R. J. 2008a. *Tempo ou antropismo como fatores causadores de alterações cromossômicas para uma população de Hypsiboas raniceps (Anura: Hylidae) (Cope, 1862)*. In: IV Congresso de Iniciação Científica, Resumos Tangará da Serra. 4pp.
- Carvalho, K. A.; Garcia, P. C. A.; Recco-Pimentel, S. M. 2009b. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Genetic and Molecular Research*, 8(4): 1498 - 1508.
- Catrolí, G. F.; Kasahara, S. 2009. Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. *Publicação Universidade Estadual de Ponta Grossa Ciências Biológicas e Saúde*, 15: 67-86.
- Cochran, D. M. 1955. Frogs of southeastern Brazil. *Bulletin of the United States National Museum*, 206: 1-423.
- Cochran, D. M.; Goin, C. J. 1970. Frogs of Colombia. *Bulletin of the United States National Museum*, 288: 1-655.
- De Sá, R.O. 1996. *Hyla multifasciata*. Catalogue of American Amphibians and Reptiles. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles*, 624:1-4.
- Duellman, W. E.; Cole, C. J. 1965. Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Systematic Zoology*, 14: 139-143.

Duellman, W. E. 1967. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Systematic Zoology*, 16: 38-43.

Duellman, W. E.; Trueb, L. 1986. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York, United States of America. 696pp.

Faivovich, J.; Garcia, P. C. A.; Ananias, F.; Lanari, L.; Basso, N. G.; Wheeler, W. C. 2004. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 938-950.

Faivovich, J.; Haddad, C. F.B.; Garcia, P. C. A.; Frost, D. R.; Campbell, J. A.; Wheeler, W. C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, New York, United States of America, 240pp.

Fávero, E. R.; Veiga-Menoncello, A. C. P.; Rossa-Feres, D. C.; Strüssmann, C.; Giaretta, A. A.; Andrade, G. V.; Colombo, P.; Recco-Pimentel, S. M. 2011. Intrageneric karyotypic variation in *Pseudopaludicola* (Anura: Leiuperidae) and its taxonomic relatedness. *Zoological Studies*, 50: 826-836.

Ferreira, I.A.; Martins, C. 2008. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39:411-418.

Ferro, J. M.; Marti, D. A.; Bidau, C. J.; Suarez, P.; Nagamachi, C.; Pieczarka, J.; Baldo, D. 2012. B chromosomes in the treefrog *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae). *Herpetologica*, 68: 482-490.

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

Foresti, F. 1972. *Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura)*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 80pp.

Frost, D. R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C. F. B.; Sá, R. O. de; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S. C.; Raxworthy, C. J.; Campbell, J. A.; Blotto, B. L.; Moler, P.; Drewes, R. C.; Nussbaum, R. A.; Lynch, J. D.; Green, D. M.; Wheller, W. C. 2013. *Amphibian species of the world: an Online Reference*. Bulletin of the American Museum of Natural History, New York, USA (<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>). Acesso em 01/04/13.

Green, D.; Sessions, S. K. 1991. Nomenclature for chromosomes. In: *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, United States of America, 456pp.

Gruber, S. L. 2002. *Estudos citogenéticos em espécies do gênero Hyla (Anura, Hylidae) dos grupos com 2n=24 e 2n=30, com técnicas de coloração diferencial*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 132pp.

Gruber, S. L.; Haddad, C. F. B.; Kasahara, S. 2005. Evaluating the karyotypic diversity in 336 species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with 2n=30 chromosomes based on the analysis of ten species. *Folia Biologica*, 51: 68-75.

Gruber, S. L.; Haddad, C. F. B.; Kasahara, S., 2007. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of 2n = 24 to 2n = 22 in the genus. *Genetica*, 130: 281-291.

Guimarães, L. D.A.; Bastos, R. P. 2003. Vocalizações e interações em *Hyla raniceps* (Anura, Hylidae) durante a atividade reprodutiva. *Iheringia Série Zoológica*, 93: 149-158.

Hoogmoed, M. S. 1990. Resurrection of *Hyla wavrini* Parker (Amphibia: Anura: Hylidae), a gladiator frog from northern South America. *Zoologische Medelingen*, 64: 71-93.

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.; Reeders, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, 19: 4780.
- Kasahara, S. 2009. *Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados*. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo, São Paulo, 160pp.
- King, M. 1990. *Amphibia*. In: John, B. (Ed.) *Animal cytogenetics*. Borntraeger, Berlin/Stuttgart. p. 1-241.
- Kok, P. J. R. 2006. A new species of *Hypsiboas* (Amphibia: Anura: Hylidae) from Kaieteur National Park, eastern edge of Pakaraima Mountains, Guyana. *Biologie*, 76:181-200.
- León, P. E. 1970. Report of the chromosome numbers of some Costa Rica anurans. *Revista de Biologia Tropical*, 17:119-124.
- Lima, A. P.; Magnusson, W. E.; Menin, M.; Erdtmann, L. K.; Rodrigues, D. J.; Keller, C.; Höld, W. 2006. *Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central = Guide to the frogs to Reserva Adolpho Ducke, Central Amazonia*. Attema, Manaus, Amazonas, 168pp.
- Lynch, J. D.; Suárez-Mayorga, A. M. 2001. The distribution of the gladiator frogs (*Hyla boans* group) in Colombia with comments on size variation and sympatry. *Caldasia*, 23:491-507.
- Mandrioli, M.; Cuoghi, B.; Marini, M.; Mancardi, 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.
- Martins, M.; Moreira, G. 1991. The nest and the tadpole of *Hyla wavrini*, Parker (Amphibia, Anura). *Memorando Instituto Butantan*, 53: 197-204.

Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds) *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, New Hampshire, United States of America. p. 421-453.

Medeiros, L. R. 2000. *Estudo citogenético das espécies de Hyla nana e Hyla sanborni (Anura, Hylidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 77 pp.

Medeiros, L. R.; Rossa-Feres, D. C.; Recco-Pimentel, S. M. 2003. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae), with description of NOR polymorphism in *H. nana*. *Journal of Heredity*, 94:149-154.

Menin, M.; Waldez, F.; Lima, A. P. 2008. Temporal variation in the abundance and number of species of frogs in 10.000ha of a forest in central Amazonia, Brazil. *Journal of Herpetology*, 3: 68-81.

Moraes, S.; Knoll-Gellida, A.; André, M.; Barthe, C.; Babin, P. J. 2007. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase I in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. *Physiology Genomics*, 28:239-252.

Morescalchi, A. 1973. *Amphibia*. In: Chiarelli, A. B.; Capanna, G. (Ed.). *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, London, England, p. 233-348.

Nunes, R. R. A. 2006. *Citogenética de anfíbios da família Hylidae do Espírito Santo*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 71 pp.

Nunes, R. R. A.; Fagundes, V. 2008. Cariótipo de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu Biológico Mello Leitão*, 23: 21-26.

Oliveira, C. 1987. *Estudos citogenéticos no gênero Corydoras (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae)*. Dissertação, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 154 pp.

- Oliveira, H. P.; Souza, C. C. N.; Ribeiro, C. L.; Cruz, A. D. Bastos, R. P.; Melo e Silva, D. 2010. Citogenética comparativa das famílias Leptodactylidae e Hylidae do cerrado goiano. *Estudos*, 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 Natural Academy of Science*, 83:2934-2938.
- Pough, F. H.; Janis, C. M.; Heiser, J. B.; 1999. *A vida dos vertebrados*. Atheneu, São Paulo, São Paulo, 684pp.
- Rabelo, M. N. 1970. Chromosome studies in Brazilian anurans. *Caryologia*, 23:45-59.
- Rabelo, M. N.; Beçak, M. L.; Beçak, W. 1971. Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. *Arquivos do Museu Nacional*, 54:285-286.
- Raber, S. C.; Carvalho, K. A.; Garcia, P. C. A.; Vinciprova, G.; Recco-Pimentel, S. M. 2004. Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). *Phyllomedusa*, 3: 43-49.
- Rocchi, M.; Archidiacono, N.; Schempp, W.; Capozzi, O.; Stanyon, R. 2012. Centromere repositioning in mammals. *Heredity*, 108:59–67.
- Saez, F. A.; Brum, N. 1960. Chromosomes of South American amphibians. *Nature*, 185-945.

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

Tovar-Rodríguez, W. T.; Chacón-Ortiz, A.; Durán, R. D. J. 2009. Abundancia, disposición espacial e historia natural de *Hypsiboas lanciformis* (Anura: Hylidae) al suroeste de los Andes Venezuelanos. *Revista Académica Colombiana Científica*, 127:193-200.

Uetanabaro, M.; Prado, C.P.A.; Rodrigues, D. J.; Gordo, M.; Campos, Z. 2008. *Guia de campo dos anuros do Pantanal e planaltos de entorno = Field guide to the anurans of the Pantanal and surrounding Cerrados*. Universidade Federal de Cuiabá FMS, Cuiabá, Mato Gross do Sul, 196pp.

Anexo

Tabela - Espécies de *Hypsiboas* coletadas indicando o número total de indivíduos e o número de indivíduos utilizados, cuja preparação mitótica encontrava-se em boa qualidade.

Espécie / Grupo	No. de indivíduos coletados	Indivíduos que deram certo
<i>H. boans</i> Grupo <i>H. semilineatus</i>	03	01
<i>H. cinerascens</i> Grupo <i>H. punctatus</i>	19	04
<i>H. geographicus</i> Grupo <i>H. semilineatus</i>	14	05
<i>H. lanciformis</i> Grupo <i>H. albopunctatus</i>	10	03
<i>H. multifasciatus</i> Grupo <i>H. albopunctatus</i>	01	01
<i>H. raniceps</i> Grupo <i>H. albopunctatus</i>	13	06
<i>H. wavrini</i> Grupo <i>H. semilineatus</i>	05	03
Total de indivíduos	65	23

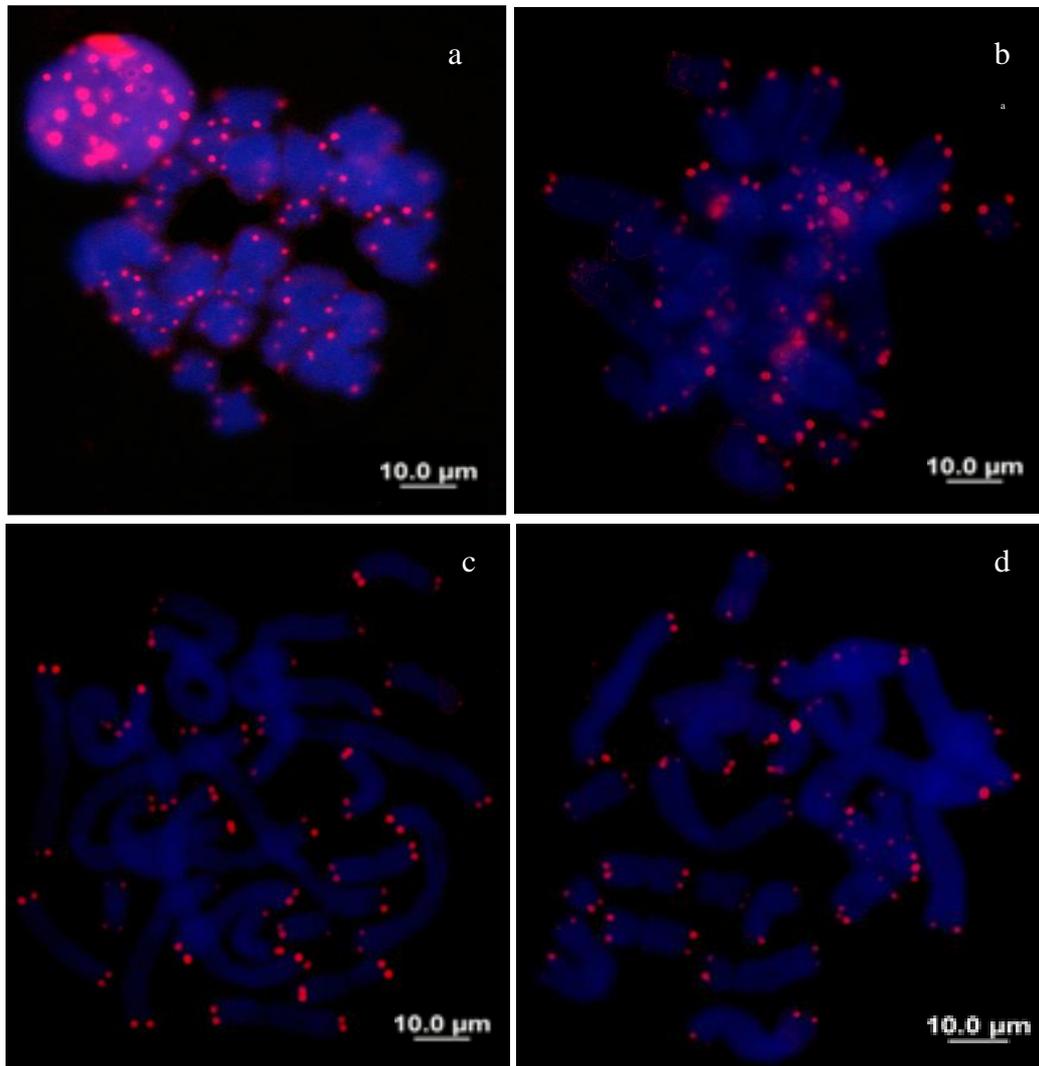


Figura - Espécies de *Hypsiboas* sem ITS e com sonda telomérica evidenciada apenas na região terminal. (a) *H. lanciformis*; (b) *H. cinerascens*; (c) *H. raniceps* e (d) *H. multifasciatus*. Escala da barra: 10 micrômetros.

Apêndice



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)

Ofício N° 016/2012

Manaus, 17 de abril de 2012.

DECLARAÇÃO

Atendendo a solicitação da Professor Marcelo Menin declaro para os devidos fins que o projeto intitulado “Abordagem Citogenômica clássica e molecular de espécie de *Hypsiboas* (*Lissamphibia*, *Anura*) provenientes dos arredores de Manaus, AM. ” foi recebido sob o protocolo CEUA n° 075/ 2012. Declaramos ainda que, em virtude dos processos de finalização da análise do formulário, o parecer sobre a adequação do referido projeto com as legislações pertinentes (Lei 11.794, decreto n° 6899, resolução n° 035/2008) será emitido posteriormente.

Atenciosamente,

Prof. Fábio Tonissi Moroni
Presidente da CEEA-UFAM



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que se fizerem necessários que a aluna **THAIS LEMOS DE MATTOS**, do Programa de **GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA (PPGGCBEv)** do **INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS NA AMAZÔNIA (INPA)**, nível **MESTRADO**, depositou, na Coleção Zoológica Paulo Bührnheim da Universidade Federal do Amazonas (CZPB), **material biológico** utilizado em seu trabalho de dissertação, intitulado: "**ABORDAGEM CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE SETE ESPÉCIES AMAZÔNICAS DE *Hypsiboas* (LISSAMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE)**", com nos. de tombamento: CZPB/UFAM 153-315, CZPB/UFAM 154 – 316 -318, CZPB/UFAM 155 – 319, CZPB/UFAM 158 – 324-329, CZPB/UFAM 159- 331, CZPB/UFAM 159-333.

Manaus (AM), aos 03 de ABRIL de 2013

CRISTINA MOTTA BÜHRNHEIM

Nome do Curador

Cristina Motta Bührnheim

Assinatura

Ciente:

Maria Claudia Gon

Nome da Orientadora

Maria Claudia Gon

Assinatura

Marcelo M. S. M. S.

Nome do Coorientador

Marcelo M. S. M. S.

Assinatura

DECLARAÇÃO

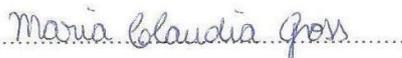
Declaramos para os devidos fins que se fizerem necessários que a aluna **THAIS LEMOS DE MATTOS**, do Programa de **GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA (PPGGCBEv)**, nível **MESTRADO**, depositou, na Coleção do INPA, material biológico utilizado em seu trabalho de dissertação, intitulado: "**ABORDAGEM CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE SETE ESPÉCIES AMAZÔNICAS DE *Hypsiboas* (LISSAMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE)**", com nos. de tombamento: INPA-H 31441- 31448 e INPA-H 31450.

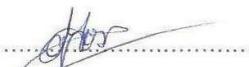
Manaus (AM), aos 03 de ABRIL de 2013


Nome do Curador

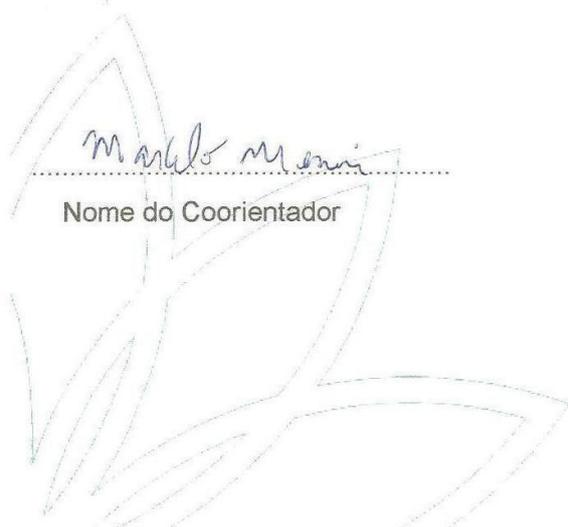

Assinatura

Ciente:


Nome da Orientadora


Assinatura


Nome do Coorientador




Assinatura