

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

SEBASTIÃO VENANCIO NETO

ESTUDO CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Boana* (HYLIDAE, ANURA):  
DIVERSIDADE CARIOTÍPICA E DISTRIBUIÇÃO DE DNAs REPETITIVOS

PONTA GROSSA

2019

SEBASTIÃO VENANCIO NETO

ESTUDO CROMOSSÔMICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Boana* (HYLIDAE, ANURA):  
DIVERSIDADE CARIOTÍPICA E DISTRIBUIÇÃO DE DNAs REPETITIVOS

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste para defesa como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Nogaroto Vicari.  
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto.

PONTA GROSSA

2019

N469 Neto, Sebastião Venancio  
Estudo cromossômico em espécies do gênero *Boana* (Hylidae, Anura):  
diversidade cariotípica e distribuição de DNAs repetitivos / Sebastião Venancio  
Neto. Ponta Grossa, 2019.  
67 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração:  
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Bueno Noletto.

1. Anfíbios. 2. Elementos transponíveis. 3. Evolução cariotípica. 4. Fish. I.  
Vicari, Viviane Nogaroto. II. Noletto, Rafael Bueno. III. Universidade Estadual de  
Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 597



## Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 03/2019

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **Sebastião Venâncio Neto**.

Aos vinte e dois dias do mês de fevereiro de dois mil e dezenove, no auditório do Programa, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Rafael Bueno Noleto em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Sebastião Venâncio Neto**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Rafael Bueno Noleto, Dr. Roberto Laridondo Lui (UNIOESTE) e Dr<sup>a</sup> Michelle Orane Schemberger (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Estudo Cromossômico em Espécies do Gênero *Boana* (*Hylidae*, *Anura*): *Diversidade Cariotípica e Distribuição de DNAs Repetitivos*". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 90 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.**

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de dois mil e dezenove.

Prof. Dr. Rafael Bueno Noleto (UNESPAR) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Roberto Laridondo Lui (UNIOESTE) \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michelle Orane Schemberger (UEPG) \_\_\_\_\_

Dedico esse trabalho aos meus amigos  
Ernani Miguel Cecchin, Heron Diego Madureira  
e Kathleen Evelyn de Marchi  
(*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, principalmente ao meu pai João, minha mãe Salete e minha irmã Fabiula, por todo o apoio emocional e estrutural que foram fundamentais para o desenvolvimento não só deste trabalho, mas o meu como pessoa. Eu amo vocês família.

Agradeço imensamente à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Nogaroto Vicari e ao Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari por abrirem as portas e sempre me darem o suporte necessário para conclusão do trabalho. Por serem mais que professores, estarem sempre dispostos a ajudar e por todas as contribuições científicas e pessoais. Muito obrigado por todos os ensinamentos e conselhos, e por acreditarem em mim, vida longa!

Ao meu mentor, coorientador e amigo Prof. Dr. Rafel Bueno Noletto, não posso dizer pela paciência, mas sim persistência em acreditar em mim. Agradeço não só por possibilitar a realidade do meu sonho de continuar na academia, mas também por ser admiração e inspiração em todos os momentos, se um dia eu for uma fração do que és, serei realizado. Muito obrigado.

Aos meus amigos que o laboratório possibilitou Michelle O., Michele A., Alain, Carol, Kaline, Rafael e Matheus por toda a paciência e disposição em me esclarecer as dúvidas, que não foram poucas. Os nossos almoços corridos, porém necessários, as festas, as risadas e o apoio de vocês foram fundamentais.

O Lucas, a Larissa, a Geize e a Thaís, por serem quem são e me auxiliarem ativamente durante os procedimentos. Por serem minha família durante o desenvolvimento do trabalho, vocês são sem palavras. Em especial a Viviane, que se mostrou como uma irmãzona para mim, te admiro muito e desejo o melhor para você, você merece.

Agradeço aos meus amigos dos grupos “Pruu – Mascote – Loucomelos – Traidores”, por darem a felicidade e alegria diária necessária para enfrentar tudo com coragem e um sorriso no rosto. A melhor virtude de uma pessoa são seus amigos. Amo vocês.

Agradeço aos meus eternos amigos Ernani Miguel Cecchin, Heron Diego Madureira e Kathleen Evelyn de Marchi, que fizeram a passagem cedo demais e levaram um pedaço de mim, fazendo com que eu me reconstruísse e fosse ainda mais forte. Vocês serão lembrados eternamente e dedico este trabalho exclusivamente à vocês. A saudade é contínua, o amor também.

Ao Bruno e ao Jorge por tornarem a caminhada mais leve.

Aos meu amigos, mesmo que distantes, sempre próximos, Felipe e Alexandre.

Ao Matheus e ao Rodrigo por me apresentarem à Biologia e todo o suporte e apoio desde sempre.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa e à Universidade Estadual de Paraná, *campus* União da Vitória por toda a estrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG e todo seu corpo docente.

A todos que colaboraram direta e indiretamente, meu muito obrigado!

Ho‘oponopono

“Eu agradeço pela vida e a coragem, ao Universo pela oportunidade. E a minha vida eu dedico com amor ao sonho vivo da nossa humanidade. Sou mensageiro, sou cometa, sou indígena. Eu sou filho da nação do Arco Íris, com meus irmãos eu vou ser mais um guerreiro na nobre causa do Inka Redentor.”

Guerreiro da paz

Orestes Grokar

“Faço de mim parte do segredo do universo...”.

Forfun

“Sempre fui sonhador, é isso que me mantém vivo...”

Racionais MC’s



## RESUMO

A ordem anura, composta pelos popularmente conhecidos rãs, sapos e pererecas, vem sofrendo uma forte ameaça à sua conservação, com relatos de extinções recentes. Hylidae é a mais diversa família da ordem, composta por três subfamílias: Hylinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae. A tribo Cophomantini (uma das tribos de Hylinae) é um clado diverso de anuros neotropicais composta por cinco gêneros, dentre os quais, *Boana*, retirado inicialmente da sinonímia de *Hyla* e posteriormente chamado de *Hypsiboas*, mudanças estas que refletem as intensas reorganizações filogenéticas sofridas pelo gênero. Sabendo-se da vasta diversidade do grupo, estudos que aliam marcadores moleculares juntamente com outros caracteres têm sido importantes para compreender a evolução do clado, buscando assim melhor agrupá-los. Adicionalmente, estudos citogenéticos têm sido bastante usados para enriquecer o cenário e melhor resolver incertezas taxonômicas e sistemáticas, diante da importância ecológica que o grupo apresenta. Logo, o objetivo deste trabalho foi utilizar marcadores de citogenética clássica e mapeamento de DNAs repetitivos em três espécies do gênero *Boana*, alocadas em três grupos taxonômicos diferentes, todas provenientes da Mata Atlântica paranaense. Os cariótipos estudados apresentaram diferença entre si, sendo que *B. faber* e *B. prasina* apresentaram  $2n = 24$  cromossomos invariavelmente, e *B. albopunctata* apresentou  $2n = 22$  cromossomos com eventual presença de cromossomo B. Bandas heterocromáticas foram predominantes encontradas em regiões pericentroméricas em todas as espécies, embora bandas C adicionais sobre regiões teloméricas e/ou intersticiais se mostraram parcialmente espécie específicas. As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) se restringiram em apenas um par do complemento, padrão este bastante conservado em anuros como um todo. O DNA repetitivo *U2 snDNA* foi localizado *in situ* em *B. albopunctata* (pares 3 e 7) e em *B. prasina* (pares 4 e 10). O sequenciamento nucleotídico dos genes do *U2 snDNA* mostrou uma similaridade de 92% ao gene do *U2 snDNA* de *Xenopus laevis*. O elemento transponível (TE) *Tc1-Mariner* apresentou marcações dispersas em todos os cromossomos das três espécies estudadas. O cariótipo  $2n = 24$  cromossomos é uma característica do gênero *Boana*, que pode apresentar algumas oscilações. Esse número diploide ( $2n$ ) teria se originado do  $2n = 26$  cromossomos, a partir de fusões cromossômicas, fusões estas, que juntamente com outros tipos de rearranjos, como inversões pericêntricas ou ainda reposicionamentos centroméricos, podem vir a explicar a variação na localização e na quantidade de marcadores cromossômicos. A estrutura e a origem de sequências repetitivas podem explicar a organização atual dos genomas, com a ocorrência de uma parcela dos genes em múltiplas cópias. Em eucariotos, os TEs, em sua maioria, são resultantes de processos degenerativos, que acumulam mutações e perdem sua identidade quando inativados. Vale lembrar que o mapeamento *in situ* das sequências repetitivas apresentadas aqui são inéditas para a família Hylidae, sendo mais uma ferramenta a questionar a ideia de cariótipo conservado em anuros, diante das variações aqui apresentadas.

Palavras chave: Anfíbios; Elementos transponíveis; Evolução cariotípica; FISH

## ABSTRACT

The anura order, composed of the popularly known frogs, toads and treefrogs, has been suffering a strong threat to its conservation, with reports of recent extinctions. Hylidae is the most diverse family of the order, composed of three subfamilies: Hylinae, Pelodyadinae and Phyllomedusinae. The Cophomantini tribe (one of the tribes of Hylinae) is a diverse clade of neotropical anurans composed of five genus, among which, *Boana*, originally taken from the *Hyla* synonymy and later called *Hypsiboas*, changes that reflect the intense phylogenetic reorganizations undergone by genus. Knowing the wide diversity of the group, studies that combine molecular markers along with other characters have been important to understand the evolution of the clade looking like this better group them. In addition, cytogenetic studies have been widely used to enrich the scenario and to better solve taxonomic and systematic uncertainties, given the ecological importance that the group presents. Therefore, the objective of this work was to use classical cytogenetic markers and repetitive DNA mapping in three species of the genus *Boana*, located in three different taxonomic groups, all from the Mata Atlântica paranaense. The studied karyotypes showed differences between them, *B. faber* and *B. prasina* presented  $2n = 24$  chromosomes invariably, and *B. albopunctata* presented  $2n = 22$  chromosomes with possible presence of chromosome B. Heterochromatic bands were predominant founds in pericentromeric regions in all species, although additional C bands on telomeric and / or interstitial regions showed to be partially species specific. The nucleoli organizing regions (NORs) were restricted in only one pair of the complement, a pattern well conserved in anurans as a whole. U2 snDNA was located *in situ* in *B. albopunctata* (pairs 3 and 7) and in *B. prasina* (pairs 4 and 10). Nucleotide sequencing of the U2 snDNA genes showed a 92% similarity to the U2 snDNA gene of *Xenopus laevis*. The Tc1- Mariner transposable element (TE) showed scattered markers on all chromosomes of the three species studied. The karyotype  $2n = 24$  chromosomes is a characteristic of the genus *Boana*, which may present some oscillations. This diploid number ( $2n$ ) would have originated from  $2n = 26$  chromosomes, from chromosomal fusions, these fusions, which together with other types of rearrangements, like pericentric inversions or even centromeric repositions, may explain the variation in the location and quantity of chromosomal markers. The structure and origin of repetitive sequences may explain the current organization of genomes, with the occurrence of a portion of the genes in multiple copies. In eukaryotes, the TEs are mostly the result of degenerative processes, which accumulate mutations and lose their identity when inactivated. It is worth remembering that the *in situ* mapping of the repetitive sequences presented here is unheard of for the Hylidae family, being another tool to question the idea of karyotype preserved in anurans, given the variations presented here.

Keywords: Amphibian; Transposable elements; Karyotype evolution; FISH

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem de espécies do genero *Boana* analisadas no presente estudo. (A) *B. albopunctata* (Fonte: GRANATO, 2018); (B) *B. faber* (Fonte: O Autor); (C) *B. prasina*.....30
- Figura 2.** Cariótipos submetidos à coloração convencional com giemsa a 5%. (A) *B. albopunctata* com  $2n = 22$  cromossomos, com eventual presença de cromossomo B.; (B) *B. faber* com  $2n = 24$  cromossomos; (C) *B. prasina* com  $2n = 24$  cromossomos. Barra =  $10 \mu\text{m}$ .....44
- Figura 3.** Cariótipos de exemplares de *Boana* submetidos à técnica de bandamento C, demonstrando os padrões de heterocromatina constitutiva e a detecção de RONS (flechas). (A) *B. albopunctata*; (B) *B. faber*; (C) *B. prasina*. Barra =  $10 \mu\text{m}$ .....44
- Figura 4.** Cariótipos submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda de genes *snDNA U2* (em vermelho). (A) *B. albopunctata* ( $2n = 22$  cromossomos + cromossomo B) e (B) *B. prasina* ( $2n = 24$  cromossomos). Barra =  $10 \mu\text{m}$ .....45
- Figura 5.** Cariótipos submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda do TE *Tc1-Mariner* (em vermelho). (A) *B. albopunctata* ( $2n = 22$  cromossomos + cromossomo B), (B) *B. faber* ( $2n = 24$  cromossomos) e (C) *B. prasina* ( $2n = 24$  cromossomos). Barra =  $10 \mu\text{m}$ .....45
- Figura 6.** Idiogramas mostrando a distribuição de marcadores clássicos e de duas classes de DNA repetitivo: (A) *B. albopunctata*, (B) *B. faber* e (C) *B. prasina*.....46
- Figura 7.** Comparação da morfologia dos cromossomos Bs nas populações de *Boana albopunctata* analisadas por (A) GRUBER et al. (2014); (B) Presente estudo; (C) FERRO et al. (2012). Barra  $10 = \mu\text{m}$ .....47
- Figura 8.** Origem hipotética interespecífica do(s) cromossomo(s) B(s) em *B. albopunctata*..... 47

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ag – *Prata*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CEUA – *Comissão de Ética do Uso de Animal*

CTAB – *Cetyltrimethylammonium Bromide*

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DD – *Data Deficient*

DNA - *Ácido Desoxirribonucleico*

FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*

INPE – *Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais*

ITS – *Interstitial Telomeric Sequences*

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*

KCl – *Cloreto de Potássio*

LINE – *Long Interspersed Nuclear Elements*

LTR – *Long Terminal Repeats*

M – *Metacêntricos*

MITEs -*Miniature Transposable Elements*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NF – *Número Fundamental*

PBS – *Tampão fosfato-salino*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PLEs – *Penelope*

RNA - *Ácido Ribonucleico*

RON – *Região Organizadora de Nucléolo*

RPM – *Rotação Por Minuto*

SINE – *Short Interspersed Nuclear Elements*

SM – *Submetacêntricos*

ST - *Subtelocêntricos*

snDNA – *Small Nuclear DNA*

SSC – *Citrato de Sódio Salino*

TE – *Transposable Element*

TIRs – *Terminal Inverted Repeats*

UV-B – *Radiação Ultravioleta B*

## SUMÁRIO

<b>1 REVISAO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ANUROS .....	12
1.2 O BIOMA MATA ATLÂNTICA .....	13
1.3 A FAMÍLIA HYLIDAE: ASPECTOS GERAIS E ESTUDOS CROMOSSÔMICOS .....	14
1.4 DNAs REPETITIVOS .....	16
<b>2 OBJETIVOS E METAS</b> .....	19
2.1 OBJETIVOS .....	19
2.2 METAS .....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	20
3.2 PREPARAÇÕES CITOGENÉTICAS E ISOLAMENTO DOS DNAs REPETITIVOS .....	20
3.3 HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i> FLUORESCENTE (FISH - <i>fluorescence in situ</i> <i>hybridization</i> ) .....	21
3.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS .....	22
<b>4 RESULTADOS</b> .....	23
4.1 ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Boana</i> (HYLIDAE, ANURA): MAPEAMENTO FÍSICO DE DNAs REPETITIVOS E EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA .....	23
4.1.1 Introdução .....	25
4.1.2 Material e Métodos .....	26
4.1.3 Resultados .....	28
4.1.4 Discussão .....	31
4.1.5 Considerações finais .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46
<b>ANEXOS</b> .....	59

## 1 REVISAO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ANUROS

A ordem Anura, pertencente à classe dos anfíbios, apresenta uma diversidade de 6778 espécies descritas, alocadas em 55 famílias, distribuídas por quase todos os continentes, exceto na Antártida (FROST, 2017). Têm sido constantes as alterações na classificação deste grupo, como por exemplo as realizadas por Faivovich et al. (2005), quando baseado em marcadores moleculares, algumas espécies do gênero *Hyla* foram realocadas para o gênero *Hypsiboas*, atualmente chamado de *Boana* (DUBOIS, 2018).

No Brasil, é registrada a ocorrência de 1039 espécies de anuros, segundo a lista de anfíbios brasileiros divulgada pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2017). Segundo Gazoni (2011), estes números vêm aumentando nos últimos anos (15% na última década) e este fato, associado a grande similaridade morfológica que os anuros apresentam, faz com que sejam necessários mais estudos a fim de se esclarecer a taxonomia e sistemática do grupo. Representantes deste grupo são popularmente denominados como sapos, rãs e pererecas, sendo em geral diferenciados por meio das especializações morfológicas do seu sistema de locomoção (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Os anfíbios constituem um grupo animal de alta importância ecológica, seja por sua posição central em redes tróficas, por serem caracterizados como um grupo de ligação entre sistemas, i. e. aquático e terrestre, ou até mesmo por sua vasta diversidade, abrangendo uma ampla gama de microhabitats dulcícolas e terrestres (GARCIA et al., 2009). Apesar disto, os anuros vêm enfrentando uma pungente ameaça à sua conservação, já que as populações estão sofrendo declínio elevado. É considerado o grupo animal mais ameaçado da atualidade, com aproximadamente 40% das espécies ameaçadas de extinção (MONASTERSKY, 2014), incluindo diversos relatos de extinções recentes (GRANDINETTI; JACOBI, 2005). Adicionalmente, é também o grupo com mais espécies sem informação classificados na categoria de dados insuficientes ou *Data Deficient* (DD) na plataforma online da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (FODEN et al., 2013; IUCN, 2018). Vários fatores têm sido apontados como causas para esse declínio, tais como a introdução de espécies exóticas, a poluição, a alteração do equilíbrio entre predador e presa, o aumento da radiação ultravioleta B (UV-B), a exploração de espécies, as chuvas ácidas e principalmente a

perda e fragmentação de habitats, que ganha lugar de destaque no declínio das populações de anfíbios (BLAUSTEIN; KATS, 2003; COLLINS; STORFER, 2003).

Outro fator alarmante relacionado a esse declínio é a dispersão de doenças infecciosas, com destaque para a quitridiomiose (DASZAK et al., 2004), uma doença infecciosa emergente causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (BERGER et al., 2005; BECKER; ZAMUDIO, 2011). Essa doença vem sendo disseminada pelo mundo dizimando populações, e já foi mencionada como “a pior doença infecciosa já documentada entre os vertebrados em termos de número de espécies impactadas, e sua propensão em levá-las à extinção” (FISHER; GARNER; WALKER, 2009). Atualmente, o fungo *Bd* encontra-se amplamente distribuído, sendo documentado em todos os cinco continentes, tendo sido registrado em no mínimo 71 países e em 50% das espécies de anfíbios analisadas até 2014 (OLSON; RONNENBERG, 2014).

O declínio de anfíbios, associado à quitridiomiose, tem sido essencialmente observado em áreas de reserva de florestas primárias ou pouco alteradas, em locais montanhosos da região neotropical (LIPS et al., 2008; POUND et al., 2006).

## 1.2 O BIOMA MATA ATLÂNTICA

Mata Atlântica é o nome popular dado à floresta tropical que ocupa a fachada da costa brasileira, banhada pelo oceano Atlântico, e grande parte da bacia do Paraná (PEREIRA, 2009). Quando se fala em Mata Atlântica é necessário lembrar que estamos falando de um conjunto de formações florestais, além de campos naturais, restingas, manguezais e outros tipos de vegetação, formando diversos cenários (BRASIL, 2017). É a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, que originalmente estendia-se de forma homogênea ao longo da costa brasileira (TABARELLI et al., 2005). Antigamente, cobria mais de 1,5 milhão de km<sup>2</sup>, abrangendo uma porção de 92% no Brasil (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2002; GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003). A ação antrópica devastou quase que completamente este bioma e a Mata Atlântica corresponde a menos de 8% de sua extensão original, a qual estende-se desde o Ceará até o Rio Grande do Sul (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2002), atualmente esses dados são ainda mais alarmantes. Ela apresenta uma variedade de formações florestais, entre elas: Ombrófila mista, ombrófila densa, ombrófila aberta, estacional semidecidual, estacional decidual e estepe (BRASIL, 2017).

Atualmente, a Mata Atlântica apresenta a maior diversidade e riqueza de espécies de anuros. Abriga cerca de 543 espécies, sendo que 472 são endêmicas, mas devido à alta devastação que este bioma vem sofrendo, é considerado como um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo, caracterizando um *hotspot* de biodiversidade (DUELLMAN, 1999; MORELLATO; HADDAD, 2000). O alto grau de devastação desta floresta pode influenciar na riqueza da anurofauna, uma vez que os integrantes do grupo são considerados bons bioindicadores de qualidade ambiental e integridade de ecossistemas. As características de história de vida dos anuros são influenciadas e associadas ao ambiente e por conta disso demonstram sinais de condições adequadas de habitats. Geralmente, estão relacionados ao meio aquático e apresentam alta sensibilidade a variações na qualidade da água (GASCON, 1991), além disso, a maioria das espécies se relacionam intensamente com a vegetação das proximidades dos corpos d'água, onde a manutenção das populações é dependente da qualidade da estrutura da paisagem (PARRIS, 2004).

O município de União da Vitória (26°13'48"S e 51°05'09"W) está localizado na Mata Atlântica sul paranaense, a 237 km da capital Curitiba e possui 731,72 km<sup>2</sup>. O clima é subtropical úmido e mesotérmico, sempre com alta umidade relativa do ar, sendo a temperatura média anual de 23,3°C (MAACK, 1981; HORT, 1990).

### 1.3 A FAMÍLIA HYLIDAE: ASPECTOS GERAIS E ESTUDOS CROMOSSÔMICOS

Hylidae é um grupo monofilético de pererecas com distribuição quase mundial e uma das mais diversas famílias da ordem Anura, com 969 espécies reconhecidas (FROST, 2017). Seus representantes estão agrupados nas subfamílias Hylinae (composta pelas tribos Cophomantini, Dendropsophini, Hylini e Lophyohylini), Pelodyadinae e Phyllomedusinae (FAIVOVICH et al., 2005). Estudos filogenéticos em larga escala são bastante compatíveis em termos de relações de Hylinae (WIENS et al., 2005; DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016). A tribo Cophomantini é um clado diverso de anuros neotropicais composto pelos gêneros *Aplastodiscus*, *Boana*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus* e *Myersiohyla*. (FERRO et al., 2018).

Em geral, apresentam cabeça e olhos grandes e frequentemente cintura afinada, com membros alongados, também possuem diversos tamanhos corporais distintos, apresentando indivíduos que podem medir apenas 1,7 cm e outros que podem chegar até 14 cm de comprimento (OLIVEIRA, 2012). Os hílideos apresentam diversas outras variáveis, porém não muito resolutivas filogeneticamente, entretanto, a presença de discos adesivos arredondados nas pontas dos dedos é uma característica comum descrita na maioria das espécies, o que pode,



eventualmente, diferenciá-los facilmente das demais famílias (LIMA et al., 2006). Apresentam uma grande diversidade de modos reprodutivos, atualmente 12 descritos, sendo que 11 são restritos a Mata Atlântica (HADDAD; SAWAYA, 2000). Esta diversidade está relacionada com o microhabitat de oviposição, pois os ovos podem ser depositados diretamente na água, em ninhos de espuma em câmaras subterrâneas ou sobre rochas, em folhas suspensas na vegetação sobre a água, ou mesmo carregados pelo adulto (DUELLMAN; TRUEB, 1994; HADDAD; PRADO, 2005; WELLS, 2007).

A família Hylidae tem passado nos últimos anos por uma progressiva reorganização filogenética. Segundo Frost (2017), esta família apresenta 969 espécies já descritas, agrupadas em três subfamílias: Phyllomedusinae (61 espécies), Pelodyadinae (211 espécies) e Hylinae (697 espécies). Desde a revisão inicial feita por Faivovich et al. (2005), o conhecimento taxonômico e as hipóteses filogenéticas disponíveis de gêneros dentro do Cophomantini aumentaram bastante. Conforme Faivovich et al. (2005), o gênero *Boana* contém sete grupos de espécies de acordo com dados genéticos, morfológicos, comportamentais e ecológicos: *B. albopunctata*, *B. benitezi*, *B. faber*, *B. pulchella*, *B. pellucens*, *B. punctata* e *B. semilineata*, para os quais, 22 novas espécies foram descritas após a análise. As relações desses grupos de espécies foram abordadas por amostragem de táxons distintos, com foco no grupo de *B. pulchella* (DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016; FAIVOVICH et al., 2004; KÖHLER et al., 2010), no grupo de *B. albopunctata* (CAMINER; RON, 2014) e no grupo de *B. semilineata* (FOUQUET et al., 2016).

Considerando todas as mudanças taxonômicas dos últimos anos, o gênero *Boana* compreende 92 espécies (FROST, 2017). De acordo com Ribeiro, Egito e Haddad (2005), o gênero abrange as espécies popularmente conhecidas como rãs-gladiadoras, devido às disputas corporais que ocorrem quando um macho invade o território de outro. Sabendo que o gênero *Boana* é dividido em sete grupos taxonômicos diferentes, e tais agrupamentos são suportados por sinapomorfias morfológicas que são úteis para definir unidades monofiléticas, ainda, há algumas espécies que possuem caracteres que dificultam sua alocação em qualquer um dos grupos atualmente reconhecidos (FAIVOVICH et al., 2005).

O táxon é descrito com dois modos reprodutivos conhecidos: desova depositada diretamente na água e larvas aquáticas exotróficas e, ovos depositados em bacias naturais ou construídas e girinos exotróficos, em ambiente lêntico ou lótico (HADDAD; PRADO 2005). No entanto, casais de *Boana pardalis* já foram observados desovando em bromélias terrestres, se assemelhando ao modo reprodutivo no qual ovos são depositados em plantas aéreas (MOURA; MOTTA; FEIO, 2011). Este fato demonstra que as espécies de *Boana* podem exibir

modos alternativos, ou até mesmo modos de reprodução ainda não descritos (TOLEDO et al., 2012).

Apesar dos esforços contínuos para esclarecer a sistemática de Hylidae, dados cariotípicos são limitados quando comparados aos de peixes e mamíferos. Por muitos anos, os anfíbios têm sido rotulados como um grupo de vertebrado caracterizado por cariótipos altamente conservados. No entanto, com a aplicação de métodos de bandamento cromossômico e citogenética molecular, uma notável variabilidade na microestrutura cromossômica tem sido revelada, o que permitiu melhor identificar espécies e suas variantes geográficas, servindo assim como uma ferramenta confiável para estudos taxonômicos (KASAHARA et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2004).

Os dados sobre a citogenética dos hílídeos, com cerca de 340 espécies cariotipadas, fazem com que seja um dos grupos mais estudados entre os anuros (CATROLI; KASAHARA, 2009; PAIVA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2016) Cromossomos sexuais são considerados raros em Hylidae, restritos exclusivamente a subfamília Hyalinae. Eles foram descritos citogeneticamente em *Hyla femoralis*, *H. immaculata* (como *H. suweonensis*), *H. japonica*, *H. squirella* (YU; LEE, 1990; ANDERSON, 1991), e em *Pseudis tocantins* (GATTO; BUSIN; LOURENÇO, 2016).

Os cariótipos consistem principalmente de cromossomos com dois braços (KING, 1990), e variações no número de cromossomos têm sido consideradas como apomorfias (CATROLI, 2008). Uma exceção é o gênero *Dendropsophus*, separado do gênero *Boana* para compor espécies com 30 cromossomos, apesar de seu diagnóstico morfológico incipiente, o que mostra a importância da citogenética para a sistemática neste grupo (CHEK et al., 2001). Dentro dos *Boana*, dados citogenéticos foram mostrados para apenas 16% das espécies, a maioria delas descritas com base em apenas coloração cromossômica convencional, o que torna subexploradas algumas inferências sobre a evolução cromossômica no grupo (RABER et al., 2004; ANANIAS et al., 2004; GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007; NUNES; FAGUNDES, 2008; CARVALHO et al., 2009).

#### 1.4 DNAs REPETITIVOS

Sequências de DNA de múltiplas cópias, também referidos como “DNAs repetitivos” representam grande parte do genoma dos eucariotos (SUMNER, 2003). Estes geralmente são divididos em dois principais grupos: *i*) repetições *in tandem*; *ii*) repetições dispersas, compostas por elementos transponíveis (TEs) (CHARLESWORTH; SNIÉGOWSKI; STEPHAN, 1994).

As sequências repetidas *in tandem* podem ser não codificantes (DNA satélite, minissatélite e microssatélite), ou codificantes, conhecidas como famílias gênicas (genes de histonas, *small nuclear ribonucleoprotein particles* - snRNPs, RNA ribossômico - RNAr, entre outros) (HARDMAN, 1986; SHAPIRO; STERNBERG, 2005; BISCOTTI et al., 2015).

As sequências repetitivas são também classificadas como dispersas, sendo representadas por sequências saltatórias do genoma – os denominados TEs. TEs são classificados de acordo com o intermediário utilizado durante o processo de transposição: RNA (classe I ou retrotransposon) ou DNA (classe II ou transposon) (WICKER et al., 2007). Os retrotransposons movem-se pelo genoma por meio do mecanismo denominado “copia e cola”, onde a cada ciclo de transposição é feita uma cópia da sequência original, e esta é inserida em uma nova região do genoma, aumentando assim a sua quantidade no genoma hospedeiro. Sua classificação abrange cinco ordens: retrotransposons LTR (*long terminal repeats*), elementos semelhantes a DIRS, elementos semelhantes a Penelope (PLEs), LINEs (*long interspersed nuclear elements*) e SINEs (*short interspersed nuclear elements*) (WICKER et al., 2007). Já os transposons movem-se geralmente por meio do mecanismo denominado “corta e cola”, onde a cada ciclo de transposição a sequência original é recortada, retirada de seu local originário e inserida em outra região do genoma hospedeiro. Desta maneira, o aumento no número de cópias destas sequências só ocorre se, durante a duplicação do DNA, o transposon sair de um local onde o DNA já foi duplicado e se instalar em uma região à frente da forquilha de replicação. A classificação dos transposons envolve primeiramente a divisão em duas subclasses, sendo que posteriormente a classificação fica mais extensa, e pode ser conhecida pelo trabalho desenvolvido por WICKER et al. (2007).

As sequências repetitivas dispersas têm sido associados com a reorganização do genoma, atuando como uma importante fonte de mudanças evolutivas, por meio da recombinação homóloga de regiões após eventos de transposição de elementos repetitivos, entre cromátides irmãs ou cromossomos homólogos, como visto em células diploides de leveduras (ARGUESO et al., 2008). Ainda, Finnegan (1989) ressaltou que grandes rearranjos cromossômicos são estimulados principalmente por TEs, sendo resultado da recombinação entre cópias de elementos espalhados pelo genoma. TEs também estão associados com o surgimento de sistemas de regulação gênica transcricional e pós-transcricional, servindo como uma fonte altamente rica de matéria-prima para a formação de complexas redes regulatórias (FESCHOTTE, 2008).

Diversos táxons apresentam em seu genoma a superfamília *Tc1-Mariner*, a qual faz parte dos TEs de Classe II, estes elementos são classificados por apresentarem repetições

terminais invertidas (TIRs – *terminal inverted repeats*) e uma extensão entre 1000 e 5000 bp (PLASTERK; IZSVÁK; IVICS, 1999). Entretanto, podem vir a se tornarem pequenos elementos com repetições invertidas e não autônomos, denominados TEs miniaturas ou MITEs (*miniature transposable elements*), isso caso sofram processo de intensa degradação, o que não é raro, pois estão descritos em vários grupos taxonômicos e se apresentam em grandes quantidades nos genomas (FERNÁNDEZ-MEDINA et al., 2012).

As famílias multigênicas são um conjunto de genes originados por duplicação e variação de algum gene ancestral. A duplicação gênica é considerada um processo essencial na diversificação e com potencial para adaptações biológicas (WENDEL, 2000; BENNETZEN, 2002; KELLIS; BIRREN; LANDER, 2004). A família multigênica *U snDNA* é composta de pequenos genes de RNAs que compõem a maquinaria do spliceosomo e está estreitamente envolvida no processo de *splicing* (SASHITAL et al., 2007). No que se refere ao mapeamento da sequência *U2 snDNA*, embora adequado para utilização como sonda FISH, pouco tem sido explorado (QIN et al., 2015). O mapeamento físico das sequências *U snDNA* em diferentes organismos como gafanhotos, crustáceos e peixes, evidenciou que estas sequências podem ser ligadas à outras famílias multigênicas (ANJOS et al., 2015; PELLICCIA et al., 2001; MANCHADO et al., 2006). Adicionalmente, estes genes podem apresentar padrões distintos de organização cromossômica (ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; MERLO et al., 2012; BARDELLA; FERNANDES; CABRAL-DE-MELLO, 2016), podem estar presentes em cromossomos sexuais (UTSUNOMIA et al., 2014) ou em cromossomos supranumerários (BUENO; PALACIOS-GIMENEZ; CABRAL-DE-MELLO, 2013).

## 2 OBJETIVOS E METAS

### 2.1 OBJETIVOS

Embora seja relevante o estudo deste grupo visto sua importância ecológica, como já descrito anteriormente, as informações acerca dos aspectos citogenéticos com o uso de marcadores cromossômicos ainda são muito escassas, as quais poderiam contribuir para o entendimento das relações evolutivas no grupo. Assim, o objetivo principal deste trabalho é caracterizar citogeneticamente três espécies do gênero *Boana*, pertencentes a três grupos taxonômicos diferentes. Para isso, os estudos são baseados tanto em marcadores cromossômicos clássicos, mas principalmente na análise de DNAs repetitivos, buscando assim melhores subsídios para inferências a respeito da evolução cromossômica no grupo. Para tanto, foram utilizadas técnicas que permitam a obtenção de classes de DNAs repetitivos, sua caracterização e, por fim, o mapeamento cromossômico destas sequências sobre o cariótipo das espécies provenientes da Mata Atlântica sul paranaense.

### 2.2 METAS

1. Coleta dos exemplares na natureza - localidade: União da Vitória – PR (Mata Atlântica paranaense);
2. Caracterização dos cariótipos utilizando-se de marcadores cromossômicos convencionais (heterocromatina constitutiva e coloração com nitrato de prata);
3. Isolamento e caracterização de sequências repetitivas de DNA *in tandem* (famílias multigênicas) e TEs, presentes no genoma de espécies do gênero *Boana*;
4. Localização por hibridização fluorescente *in situ* dos DNAs repetitivos encontrados;
5. Comparação dos padrões de organização cromossômica dos DNAs repetitivos entre as espécies.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram estudados 12 exemplares da família Hylidae (gênero *Boana*), coletados na Mata Atlântica paranaense (localidade de União da Vitória – PR): 4 indivíduos de *Boana albopunctata*, 4 indivíduos de *Boana faber* e 4 indivíduos de *Boana prasina*. A partir da localização visual e/ou auditiva, os indivíduos foram capturados manualmente, ou com auxílio de puçás, e armazenados em recipientes adaptados. Em laboratório, os espécimes foram submetidos à uma overdose anestésica com Xilocaína 5%. Imediatamente, os espécimes foram protocolados com número e procedência, sendo então tombados no acervo do laboratório de biologia da Universidade Estadual do Paraná, *campus* União da Vitória como testemunho. O presente estudo é respaldado pela Comissão de Ética do Uso de Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Processo CEUA 016/2018) (Anexo 1).

#### 3.2 PREPARAÇÕES CITOGENÉTICAS E ISOLAMENTO DOS DNAs REPETITIVOS

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de medula óssea, utilizando-se o método de Baldissera Jr.; Oliveira e Kasahara (1993) (Anexo 2). O material foi corado com giemsa 5% (Anexo 3) e para a detecção da heterocromatina constitutiva foi aplicada a técnica de bandeamento C, segundo Sumner (1972) (Anexo 4). A localização das Regiões Organizadores de Nucléolo (RONs) foi realizada a partir da impregnação por nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por Howell e Black (1980) (Anexo 5), com modificações.

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram fotografadas em microscópio de campo claro e epifluorescência Carl Zeiss AxioLab A1 acoplado à câmera CCD AxioCam ICc 1 de 1,4 megapixel capturadas através do software ZEN. Os cromossomos provenientes das imagens capturadas foram recortados, emparelhados e organizados em ordem decrescente de tamanho utilizando-se o *software* Adobe Photoshop® 7.0. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com o critério de relação de braços, segundo Green e Sessions (1991). Para cálculo do número fundamental foram considerados como portadores de dois braços os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelocêntricos (st). Para a determinação da fórmula cariotípica foram analisados tanto os cromossomos submetidos à coloração

convencional, quanto os submetidos ao tratamento com hidróxido de bário para a detecção da heterocromatina.

Porções de tecido muscular foram armazenadas e utilizadas para extração de DNA genômico, utilizando-se o método *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (MURRAY; THOMPSON, 1980) (Anexo 6). Após verificada a integridade do DNA por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, o mesmo foi utilizado como molde para as reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), quando foram utilizados oligonucleotídeos específicos para amplificação de DNAs repetitivos, tais como *snDNA U2* e o TE *Tc1-Mariner* (Tabela 1).

**Tabela 1** – Relação de *primers* e temperatura de anelamento para amplificação das sequências repetitivas isoladas neste estudo.

Classes	<i>Primers</i> (5'→3')	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
<i>snDNA U2</i>	F: ATCGCTTCTCGGCCTTATG R: TCCCGGCGGTACTGCAATA	61	BUENO et al. (2013)
<i>Tc1-Mariner</i>	CACTCACCGGCCACTTTATTA	60	SCHEMBERGER et al. (2016)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 50 uL compostas por 100 ng de DNA genômico, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de reação 1x (200 mM de Tris, pH 8,4, 500 mM de KCl), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM dos *primers* e 1,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). O termociclador (Eppendorf) foi programado da seguinte maneira: 7 min 95 °C; 35 ciclos: 95 °C 30 s, (temperatura de anelamento variável, de acordo com cada oligonucleotídeo – Tabela 1) 45 s, 72 °C 1 min e 20 s; extensão final a 72 °C 5 min.

Os fragmentos corretamente amplificados foram isolados e ligados em vetores plasmidiais comerciais, e, em seguida, transformados em cepas de *Escherichia coli* DH5α CaCl<sub>2</sub> competentes. Os clones recombinantes do *snDNA U2* foram então submetidos ao sequenciamento nucleotídico para caracterização das sequências e, posteriormente, juntamente com o TE *Tc1-Mariner*, utilizados como sondas em hibridização *in situ* fluorescente.

### 3.3 HIBRIDIZAÇÃO *in situ* FLUORESCENTE (FISH - *fluorescence in situ hybridization*)

As sondas do *snDNA U2* foram marcadas por PCR, com as mesmas condições respectivas citadas anteriormente. Nas reações de marcação de sondas não foram utilizados o mix de dNTPs, mas sim nucleotídeos separados nas concentrações de 0,05 mM de dATP, dCTP e dGTP, 0,035 mM de dTTP e 0,03 mM de dUTP, acoplado a molécula repórter de digoxigenina

(Roche *Applied Science*). Já as sondas do TE *Tc1-Mariner* foram marcadas com o *Kit Nick Translation System* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, com a incorporação do nucleotídeo digoxigenina 11-dUTP (Roche *Applied Science*).

As lâminas contendo preparações cromossômicas foram submetidas à técnica de FISH, de acordo com o procedimento geral descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986) (Anexo 7), com modificações. Para a detecção das sondas foi utilizado o anticorpo anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche *Applied Science*). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole* – 0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados utilizando-se o software ZEN de captura digital de imagens acoplado ao microscópio Carl Zeiss AxioLab A1.

### 3.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas e editadas com o auxílio do software *Geneious* 8.1.9 (KEARSE et al., 2012) e, posteriormente submetidas a uma análise de identidade utilizando os bancos de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), presente no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).



## 4 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico.

### 4.1 ESTUDO CROMOSSÔMICO EM TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Boana* (HYLIDAE, ANURA): MAPEAMENTO FÍSICO DE DNAs REPETITIVOS E EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA

#### Resumo

A família Hylidae, que detém a mais ampla distribuição e o maior número de espécies dentro da ordem Anura, tem passado por diversas reorganizações filogenéticas. Espécies do gênero *Boana* têm sido organizadas em sete grupos taxonômicos, sendo que a maioria das espécies não possui informações citogenéticas e, quando presentes, grande parte das descrições é baseada em marcadores cromossômicos clássicos. No presente estudo, foram realizadas análises citogenéticas convencionais (Bandas C e Ag-RONs) e moleculares, como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), quando foram prospectadas duas classes de DNAs repetitivos, nas espécies *B. albopunctata*, *B. faber* e *B. prasina*, provenientes da Mata Atlântica paranaense. O objetivo foi buscar marcadores cromossômicos capazes de distinguir as espécies dos grupos taxonômicos discutindo-os sob o enfoque evolutivo. As espécies *B. faber* e *B. prasina* apresentaram  $2n = 24$  cromossomos, número diploide mais frequente no gênero, enquanto que *B. albopunctata* apresentou  $2n = 22$  cromossomos, com eventual presença de um cromossomo B. No geral, o bandamento C evidenciou heterocromatinas pericentroméricas nos cromossomos de todas as espécies, com bandas C adicionais sobre regiões teloméricas em *B. albopunctata* e intersticiais em *B. prasina*. As RONS se mostraram nos menores pares do complemento, padrão este frequente no gênero. A sonda de *U2 small nuclear RNA (U2 snRNA)* foi localizada nos pares 3 e 7 de *B. albopunctata*, assim como nos pares 4 e 10 de *B. prasina*. O TE *Tc1-Mariner* apresentou marcações dispersas em praticamente todos os pares cromossômicos das três espécies analisadas. O cariótipo  $2n = 24$  cromossomos é uma característica do gênero *Boana*, que pode apresentar algumas oscilações e teria se originado do  $2n = 26$  cromossomos, a partir de fusões cromossômicas, que juntamente com outros tipos de rearranjos como inversões pericêntricas ou ainda reposicionamentos centroméricos, podem vir a explicar a variação na localização e na quantidade de marcadores cromossômicos. O mapeamento cromossômico

destas classes de DNAs repetitivos é inédito na família Hylidae e vem ser mais uma ferramenta a questionar a ideia de organização cariotípica conservada em anuros.

Palavras chave: Cromossomos de anfíbios, transposon, snRNA, evolução cariotípica.

### Abstract

The Hylidae family, which has the widest distribution and largest number of species within the order Anura, has undergone several phylogenetic reorganizations. Species of the genus *Boana* have been organized into seven taxonomic groups, and most species do not have cytogenetic information and, when present, most of the descriptions are based on classical chromosomal markers. In the present study, conventional cytogenetic analyzes (Bands C and Ag-NORs) and molecular were performed, such as fluorescence in situ hybridization (FISH), were carried out when two classes of repetitive DNA were investigated in *B. albopunctata*, *B. faber* and *B. prasina*, from the Mata Atlântica Paranaense. The objective was to search for chromosomal markers capable of distinguishing species from taxonomic groups by discussing them under the evolutionary approach. The *B. faber* and *B. prasina* species presented  $2n = 24$  chromosomes, the most frequent diploid number in the genus, whereas *B. albopunctata* presented  $2n = 22$  chromosomes, with the possible presence of a B chromosome. In general, band C showed pericentromeric heterochromatin in chromosomes of all species, with additional C bands on telomeric regions in *B. albopunctata* and interstitial in *B. prasina*. The RONS were shown in the smallest pairs of the complement, the pattern being frequent in the genus. The U2 small nuclear RNA probe (U2 snRNA) was located in pairs 3 and 7 of *B. albopunctata*, as well as pairs 4 and 10 of *B. prasina*. The TE Tc1- Mariner presented scattered markers on practically all the chromosomal pairs of the three species analyzed. The karyotype  $2n = 24$  chromosomes is a characteristic of the genus *Boana*, which may present some oscillations and would have originated from  $2n = 26$  chromosomes, from chromosomal fusions, which together with other types of rearrangements such as pericentric inversions or even centromeric repositions may to explain the variation in the location and amount of chromosomal markers. The chromosomal mapping of these classes of repetitive DNA is unheard of in the Hylidae family and is yet another tool to question the idea of karyotype organization preserved in anurans.

Keywords: amphibian chromosomes, transposon, snRNA, karyotype evolution.

#### 4.1.1 Introdução

A família Hylidae tem passado nos últimos 10 anos por uma progressiva reorganização filogenética sendo dividida em três subfamílias: Phyllomedusinae, Pelodyadinae e Hyalinae (FROST, 2017). Apesar dos esforços contínuos para esclarecer as relações sistemáticas em Hylidae, poucos relatos cariotípicos estão disponíveis. Dados citogenéticos estão disponíveis para 230 espécies de Hyalinae, seguido por 80 de Pelodyadinae e 26 de Phyllomedusinae, que representam 33%, 38% e 43% das espécies em cada clado, respectivamente. A maioria das pelodyadines e phyllomedusines compartilham o número básico de  $2n = 26$  cromossomos, enquanto que em hiliinos, cariótipos com  $2n = 24$  são frequentemente observados (DUELLMAN, 2001; FAIVOVICH et al., 2005). A posição filogenética de Hyalinae, clado irmão do composto por Pelodyadinae e Phyllomedusinae sugere uma possível sinapomorfia do  $2n = 24$  cromossomos para a subfamília, mas como mencionado por Faivovich et al. (2005) a distribuição deste caráter nas linhagens mais divergentes das tribos de Hyalinae requer estudo.

Em eucariotos, uma considerável porção do genoma é constituída por segmentos que se mantêm condensados durante todo o ciclo celular, denominados de heterocromatina constitutiva (JOHN, 1988; CHAVES et al., 2004), sequências essas que são consideradas extremamente dinâmicas e repetitivas, com característica de se replicar mais lentamente na fase S e quando submetidas a determinados tratamentos apresentam uma tendência a corar diferencialmente (PIECZARKA; MATTEVI, 1998; PONS; GILLESPIE, 2003; KANTEK et al., 2009).

As unidades de repetições *in tandem* são um tipo de sequências repetitivas geralmente organizadas em clusters, localizadas frequentemente em regiões teloméricas ou pericentroméricas, presentes em um ou em vários pares cromossômicos. Tais sequências podem ser não transcritas (DNA satélite, minissatélite e microssatélite), ou transcritas, conhecidas como famílias gênicas (genes de histonas, *small nuclear ribonucleoprotein particles* – snRNPs, RNA ribossômico - RNAr, entre outras) (HARDMAN, 1986; SHAPIRO; STERNBERG, 2005; BISCOTTI et al., 2015). O processo de acúmulo de genes duplicados (especialmente via erro de recombinação homóloga e duplicações genômicas) e a divergência evolutiva entre as cópias podem vir a explicar a origem de famílias multigênicas (WENDEL, 2000; BENNETZEN, 2002; KELLIS et al., 2004). Estas sequências podem estar em clusters e localizados em um único cromossomo ou situados em inúmeros sítios no conjunto cariotípico (EIRÍN-LÓPEZ et al., 2004).

Cada vez mais frequente tem sido a utilização de marcadores de caráter molecular para reconhecimento de sítios cromossômicos, como os pequenos DNAs nucleares, também conhecidos como *small nuclear DNA* (*snDNA*) (UTSUNOMIA et al., 2014; ANJOS et al., 2015; BARDELLA; FERNANDES; CABRAL-DE-MELLO, 2016). Em eucariotos, a família multigênica *U snDNA* é intrinsicamente relativa ao processo denominado *splicing* (SASHITAL et al., 2007), composta por genes abundantes em uridina (GREEN, 1989; RIO, 1992; WEST, 2012). Spliceossomo é a denominação dada ao complexo macromolecular que é responsável pelo processo de *splicing*, este complexo é formado pelos *snRNAs* (U1, U2, U4, U5 e U6), juntamente com mais de trezentas proteínas associadas (VALADKHAN, 2005; WEST, 2012).

Os TEs são sequências repetitivas dispersas, que são capazes de se transportar para diferentes locais do genoma. Estes elementos podem ser identificados de acordo com sua organização estrutural e seu mecanismo de transposição, constituindo a principal fonte de mutação no genoma (BÖHNE, 2008).

Já que constantes reorganizações filogenéticas são realizadas na família Hylidae (FROST, 2017), abordagens envolvendo espécies de hílideos e o mapeamento de DNAs repetitivos darão subsídios para construir um cenário mais rico na evolução cromossômica do grupo. Assim, a utilização de marcadores cromossômicos é uma ferramenta promissora, permitindo dar coesão às interpretações sobre a evolução cromossômica e estabelecer claramente hipóteses sobre a mesma. Desta forma, tendo em vista os poucos estudos de citogenética molecular no grupo, o objetivo deste trabalho é compreender a distribuição cromossômica de duas classes de DNAs repetitivos a partir da localização *in situ* em três espécies do gênero *Boana*.

#### 4.1.2 Material e Métodos

##### *Preparações citogenéticas e obtenção de DNA genômico*

Foram analisados quatro indivíduos adultos de cada uma das seguintes espécies do gênero *Boana*: *B. albopunctata* ([Figura 1A](#)), *B. faber* ([Figura 1B](#)) e *B. prasina* ([Figura 1C](#)), coletados no município de União da Vitória, Paraná, Brasil (26°13'48"S e 51°05'09"W). Os procedimentos utilizados no estudo foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Processo CEUA 016/2018).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de medula óssea, utilizando-se o método de Baldissera Jr., Oliveira e Kasahara (1993). O bandeamento C foi realizado como

descrito por Sumner (1972) e impregnação por nitrato de prata conforme Howell e Black (1980). A extração de DNA genômico foi realizada a partir de porções de tecido muscular, utilizando-se o método *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (MURRAY; THOMPSON, 1980).

**Figura 1.** Imagem de espécies do genero *Boana* analisadas no presente estudo. (A) *B. albopunctata* (Fonte: GRANATO, 2018); (B) *B. faber* (Fonte: O Autor); (C) *B. prasina*



(Fonte: O Autor).

#### *Isolamento e caracterização das sequências nucleotídicas*

O DNA genômico extraído das espécies foi utilizado como molde em reações de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a amplificação dos DNAs repetitivos *snDNA* U2 (BUENO et al., 2013) e TE *Tcl-Mariner* (SCHEMBERGER et al., 2016). As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 50 uL compostas por 100 ng de DNA genômico, 2 mM de  $MgCl_2$ , tampão de reação 1x (200 mM de Tris, pH 8,4, 500mM de KCl), 0,2 mM de dNTPs, 0,5  $\mu$ M dos *primers* e 1,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). O termociclador (Eppendorf) foi programado da seguinte maneira: 7 min 95 °C; 35 ciclos: 95 °C 30 s, (temperatura de anelamento variável, de acordo com cada oligonucleotídeo) 45 s, 72 °C 1 min e 20 s; extensão final a 72 °C 5 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%.

Os fragmentos corretamente amplificados foram isolados e ligados em vetores plasmidiais comerciais, e, em seguida, transformados em cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$   $CaCl_2$  competentes. Os clones recombinantes do *snDNA* U2 foram então submetidos ao sequenciamento nucleotídico para caracterização das sequências e, posteriormente, juntamente com o TE *Tcl-Mariner*, utilizados como sondas em hibridização *in situ* fluorescente.

### *Localização cromossômica in situ*

As sondas *snDNA* U2 foram marcadas por PCR com concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter, a digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). As sondas *Tc1-Mariner* foram marcadas utilizando-se o *Kit Nick Translation System* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, com a incorporação do nucleotídeo digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estringência próxima a 77%, de acordo com o método descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986), com modificações. Para o reconhecimento do sinal de fluorescência para as sondas marcadas foi utilizado o composto anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos então foram contracorados com 0,2 µg/mL de *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI), em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados utilizando-se o software ZEN de captura digital de imagens acoplado ao microscópio Carl Zeiss AxioLab A1.

#### 4.1.3 Resultados

##### *Marcadores de citogenética clássica*

O usual cariótipo dos hilídeos com  $2n = 24$  cromossomos, foi encontrado em duas das três espécies estudadas. Para a espécie *B. albopunctata* estudada aqui, ao todo foram analisadas 63 metáfases mitóticas onde foram encontrados dois citótipos distintos, apresentando variação inter e intraindividual, com metáfases com  $2n = 22$  cromossomos e com  $2n = 22+1B$  ([Figura 2A](#)), sendo caracterizados com cinco pares metacêntricos (1, 2, 8, 9 e 11) e os demais submetacêntricos (3, 4, 5, 6, 7 e 10), apresentando  $NF = 44$  (46 se B é presente). O cromossomo B quando presente se mostrou como um metacêntrico de tamanho pequeno. O bandejamento C evidenciou bandas heterocromáticas nos centrômeros, telômeros (pares 1 e 2), intersticiais, além de blocos conspícuos em regiões proximais ([Figura 3A](#)). O cromossomo Bse mostrou quase que totalmente heterocromático, com uma aparente amplificação da heterocromatina em um dos braços, cujo padrão não se observou em nenhum dos cromossomos do complemento A. Quanto às RONS, estas também se mostraram heterocromáticas elocalizadas pela coloração com prata na região terminal do braço curto do par 8 ([Figura 3A – setas](#)).

Em *B. faber*, o cariótipo é composto por cinco pares de cromossomos metacêntricos (pares 1, 2, 8, 10 e 12), cinco pares submetacêntricos (3, 4, 5, 9 e 11), e dois pares de

cromossomos subtelocêntricos (6 e 7), apresentando  $NF = 48$  (Figura 2B). O bandejamento C evidenciou além de centrômeros, grandes blocos pericentroméricos sobre os pares 3, 4, 5 e 7, além de bandas intersticiais no braço longo dos pares 2 e 3 (Figura 3B). As RONS também se mostraram heterocromáticas coincidindo em localização com constrições secundárias em posição subterminal no braço longo do par 10 (Figura 3B – setas).

*Boana prasina* se mostrou composto por dois pares metacêntricos de tamanho grande (1 e 2), cinco pares metacêntricos de tamanho pequeno (8, 9, 10, 11 e 12), quatro pares submetacêntricos de tamanho médio (3, 5, 6 e 7) e o par 4 subtelocêntrico, apresentando  $NF = 48$  (Figura 2C). A técnica de detecção da heterocromatina constitutiva evidenciou bandas heterocromáticas em todos os centrômeros, além de sutis marcações intersticiais nos pares 1, 3, 4 e 5 e bandas teloméricas presentes nos pares 1, 3, 5 e 11. Uma quantidade maior de heterocromatina que se estende do centrômero ao braço longo foi observada nos pares 4, 7, 10 e 11 (Figura 3C). As RONS. Também heterocromáticas, foram encontradas na região terminal do braço longo do par cromossômico 12 (Figura 3C – setas). Um idiograma mostrando a distribuição dos marcadores de citogenética clássica em todas as espécies é mostrado na Figura 6.

Quanto à frequência do cromossomo B na espécie *B. albopunctata*, a análise interindividual apresentou o citótipo  $2n = 22$  cromossomos com 25% de frequência, onde apenas um espécime era portador desta constituição. O citótipo  $2n = 22+1B$  apareceu em 75% dos indivíduos analisados. Nas análises de frequência intraindividual, os Bs também mostraram alta incidência, atingindo uma frequência superior à 68% em três dos quatro indivíduos estudados aqui (espécimes nº 40, 44, 45 e 47). Apenas um indivíduo apresentou exclusivamente o  $2n = 22$  cromossomos (Tabela 2).

**Tabela 2** – Frequência de B nas metáfases mitóticas dos quatro espécimes de *B. albopunctata* analisadas no presente estudo.

Espécime	Nº de metáfases mitóticas analisadas	Frequência de B
40	22	68%
44	21	91%
45	8	87,5%
47	12	0%
<b>Total = 63</b>		<b>Média = 61,625%</b>

## Mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos

### *U2 snDNA*

Em *B. albopunctata*, a localização *in situ* do gene *U2 snDNA* foi detectada na região pericentromérica do par 3 e intersticialmente no braço curto do par 8 (Figura 4A). Já em *B. prasina*, sítios de *U2 snDNA* foram encontrados na região pericentromérica do par 4, além de um grande cluster no braço longo do par 10 (Figura 4B). Tais marcações em ambas as espécies se mostraram co-localizadas com heterocromatina constitutiva. (Figura 6). O mapeamento dessa classe de DNA repetitivo em *B. faber* está em vias de ser obtido, em virtude de insucessos em hibridizações anteriores.

### *Tc-1 Mariner*

A FISH utilizando-se a sonda do TE *Tc1-Mariner* evidenciou marcações dispersas pelos cromossomos nas 3 espécies de *Boana* analisadas neste estudo. Em *B. albopunctata* as marcações se apresentaram quantitativamente similares em todos os cromossomos, entretanto, os pares 1, 3, 4 e 6 juntamente com o cromossomo supranumerário ou B se destacaram por possuírem quantidade superior de sinais (Figura 5A). Na espécie *B. faber*, as marcações foram menos intensas, mas também distribuídas em todos os cromossomos, com quantidades mais significativas no par 1 e mais sutis no par 12 (Figura 5B). Em *B. prasina*, manteve-se o padrão disperso em todos os cromossomos como visto nas outras espécies, apresentando marcações mais acentuadas no par 6 e mais fracas, quase imperceptíveis, nos pares 5, 7 e 11 (Figura 5C). Igualmente como observado para *U2 snDNA*, em algumas regiões o *Tc1-Mariner* se mostrou co-localizado com certas regiões de heterocromatina constitutiva. (Figura 6).

## Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico do *U2 snDNA* de *B. faber* retornou com 186 pb e com similaridade de 92% ao gene *U2 snDNA* de *Xenopus laevis* (acession number X00093.1).



#### 4.1.4 Discussão

Sabe-se que estudos cariotípicos associados às informações de sequenciamento de DNA, têm subsidiado melhores inferências para a construção de filogenias mais robustas de certos grupos da anurofauna brasileira (AGUIAR JR. et al., 2007; LOURENÇO et al., 2008; TARGUETA et al., 2010). Visto que a família Hylidae tem passado por constantes reorganizações filogenéticas (FROST, 2017), como por exemplo espécies do gênero *Hyla*, realocadas para *Hypsiboas* e, atualmente renomeadas *Boana*, estudos citogenéticos vêm contribuir na elaboração de cenários mais ricos da evolução cromossômica em anuros.

#### *Número Diploide e RONS*

As espécies da família Hylidae apresentam uma variação de 18 a 30 cromossomos em seu número diploide. Espécies do gênero *Aplastodiscus* possuem de 18 - 24 cromossomos (CARVALHO et al., 2009), espécies do gênero *Dendropsophus* possuem 30 cromossomos (MEDEIROS; ROSSA-FERES; RECCO-PIMENTEL, 2003; GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2005), e as espécies do gênero *Boana* apresentam em sua grande maioria, um  $2n = 24$  cromossomos (BEÇAK, 1968; RABER et al., 2004; GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007; CARVALHO et al., 2008; NUNES; FAGUNDES, 2008; OLIVEIRA et al., 2010). Esse cariótipo de  $2n = 24$  predominante no gênero *Boana*, seria uma condição derivada de um ancestral com  $2n = 26$  cromossomos que sofrera redução em seu  $2n$  a partir de uma fusão. *Boana albopunctatus* (BOGART, 1973; GRUBER et al. 2007; OLIVEIRA et al. 2010) e *B. lanciformis* (MATTOS, 2013), ambas do grupo *B. albopunctatus*, as quais apresentam  $2n = 22$  cromossomos, possivelmente teriam sofrido uma fusão cromossômica subsequente.

Em relação à redução do  $2n$  no cariótipo de *B. albopunctata*, tal constituição cariotípica tem sido muito discutida, embora seja consenso a ocorrência de eventos de fusão na redução do  $2n$  e uma provável origem interespecífica do cromossomo B (GRUBER et al., 2014). A redução do usual  $2n = 24$  para 22 cromossomos é invariavelmente baseada em fusões cromossômicas, porém, estas parecem não ter sido cêntricas, mas sim *in tandem* envolvendo os dois menores pares (11 e 12). Gruber et al. (2014) também argumentam que a ocorrência de um cromossomo supranumerário relatado nesta espécie, poderia ser indicativa da presença anterior de 24 cromossomos em *B. albopunctata*. Esta hipótese é atrativa diante da ausência do 12º par no cariótipo de *B. albopunctata*. Guber, Haddad e Kasahara (2007) encontraram padrões de bandas

de replicação bastante parecidos comparando os maiores e médios pares de *B. prasina* e *B. raniceps*, enquanto que os menores pares do complemento se mostraram divergentes quanto a este marcador. Tais resultados fortalecem a ideia do rearranjo envolver os menores pares, possivelmente o 11° par portador das RONS, alterando a posição desse marcador para o par 8 no cariótipo com  $2n = 22$  cromossomos (*B. albopunctata*) (GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007; MATTOS, 2013; presente estudo).

De acordo com a hipótese de fusão cromossômica, era esperado que haveria sítios teloméricos intersticiais (ITS) nos cromossomos, pois são indicativos de rearranjos cromossômicos numéricos, como fusões. Entretanto, trabalhos mostram que muitas espécies do gênero *Boana* não apresentam ITS consideráveis (MATTOS, 2013). Tal fato não é suficiente para refutar a hipótese de fusão cromossômica, já que cromossomos que sofrem rearranjos muito cedo, podem sofrer redução na quantidade de repetições teloméricas intersticiais durante um processo denominado erosão molecular, o qual deleta sequências repetitivas de DNA ativas promovendo uma maior compactação do genoma, ocasionando perda ou diminuição destas sequências, impossibilitando a detecção por hibridização (MANDRIOLI *et al.*, 1999).

O cariótipo com  $2n = 24$  cromossomos representa uma das principais sinapomorfias dentro da subfamília Hyalinae (irmã do clado composto por Pelodyadinae e Phyllomedusinae), visto que gêneros distintos dentro do táxon apresentam cariótipos muito similares (DUELLMAN, 2001; FAIVOVICH *et al.*, 2005). Segundo Faivovich *et al.* (2005), a distribuição do caráter de  $n = 12$  cromossomos nas linhagens mais divergentes das tribos de Hyalinae, requer estudos mais aprofundados.

Além da diferença na região de detecção das RONS, dois números diploides e distintas fórmulas cariotípicas foram visualizados nas espécies do presente estudo. O grupo taxonômico *B. albopunctata* é composto por nove espécies (FAIVOVICH *et al.*, 2005), sendo que destas, apenas *B. alfaroi* ( $2n = 22$ ), *B. leucocheila* e *B. albopunctata* ( $2n = 22 + 1B$ ) apresentam número diploide diferente das outras espécies do grupo, as quais apresentam  $2n = 24$ , portanto, a redução para  $2n = 22$  não é uma característica geral do respectivo grupo (BOGART; BOGART, 1971; BOGART, 1973; GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007; FERRO *et al.*, 2018). Entretanto, Ferro *et al.* (2018), inferem que *B. lanciformis* (também integrante do grupo *B. albopunctata*) possui  $2n = 24$  cromossomos, o que diverge do resultado apresentado por Mattos (2013), na qual considera que *B. lanciformis* detêm a característica de  $2n = 22$  cromossomos. Este fato pode estar relacionado à nomeação errônea adotada por alguns autores para diferentes táxons, implicando em informações de números diploides discrepantes, podendo indicar que o grupo abriga complexos de espécies (DE SÁ, 1996).

Um fato interessante relacionado a *B. lanciformis* e *B. albopunctata* (ambas citadas com  $2n = 22$  cromossomos) (Presente estudo; MATTOS, 2013), é que estas espécies são geralmente encontradas em áreas de bordas florestais, áreas fragmentadas e em áreas perturbadas, ou seja, estariam mais susceptíveis a ações antrópicas, as quais poderiam ter favorecido alguns rearranjos cromossômicos numéricos (LIMA et al., 2006; MORAES et al., 2007; MENIN; WALDEZ; LIMA, 2008; TOVAR-RODRÍGUEZ; CHACÓN-ORTIZ; DURÁN, 2009). Isso se faz mais consistente quando falamos de *B. albopunctata*, já que além de apresentar  $2n = 22$  cromossomos ainda apresenta indivíduos com cromossomos supranumerários, os quais a origem, por vezes, 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; HADDAD; KASAHARA, 2007). Carvalho et al. (2008) inferiram que apenas dois anos de fragmentação florestal provocadas por ação humana e/ou catástrofes naturais, podem ocasionar diferenças cromossômicas numéricas e estruturais em anuros.

Adicionalmente, diante da uniformidade do número diploide ( $2n = 24$ ), variações na morfologia dos cromossomos são observadas entre espécies e populações, e podem ser atribuídas a qualidade da preparação cromossômica analisada, ao padrão de compactação do DNA, a erros na medida dos braços cromossômicos que geram divergência na interpretação do cariótipo, às inversões pericêntricas, ou ainda reposicionamento centromérico. O reposicionamento centromérico trata-se de um tipo de rearranjo cromossômico capaz de mudar a posição do centrômero sem perturbar os grupos de ligação (ROCCHI et al. 2012). Portanto, todas essas possibilidades podem explicar a variabilidade de morfologia cromossômica observada frequentemente em anuros, responsáveis por modelar os cariótipos sem alterar o  $2n$  (MATTOS, 2013; WINKELMANN; NOLETO, 2015). Esta pode ser parte da explicação para a existência de diferentes fórmulas cariotípicas relatadas para indivíduos da mesma espécie, porém de diferentes localidades, frente a ampla distribuição geográfica do gênero (ANANIAS, 1996; ANANIAS; GARCIA; RECCO-PIMENTEL, 2004; RABER et al., 2004; VIEIRA, 2004; NUNES; FAGUNDES, 2008; BARAQUET; SALAS; MARTINO, 2013; FROST, 2006).

Foram detectados rDNA 45S (RONS) em diferentes pares entre as três espécies de *Boana* citadas aqui. Estes representam um marcador citotaxonômico para melhor identificar as respectivas populações das espécies do presente estudo. As RONS foram localizadas em apenas um par do cariótipo de cada espécie, o que vem de encontro com os resultados já obtidos para a maioria dos anuros, sendo esta uma característica primitiva para o táxon (SCHMID, 1982; KING; CONTRERAS; HONEUCUTT, 1990). Schmid et al. (1995) descrevem esta característica como válida tanto para anuros mais basais quanto para espécies mais derivadas.

King, Contreras e Honeucutt (1990), em uma abordagem mais geral, inferem que a presença de um só par de RONS nos cariótipos diploides pode ser vista como uma condição ancestral em vertebrata, e que múltiplos pares cromossômicos portadores de RONS são caracterizados como condições derivadas.

No gênero *Boana*, o par 11 é encontrado com a maior frequência como portador de RONS, localizadas nos braços longos dos cromossomos. Mas também são encontradas RONS nos braços longos dos pares 1, 7, 10 e 12 e nos braços curtos dos pares 2 e 8 (MATTOS, 2013). Em uma análise da espécie *B. raniceps* foram encontradas RONS múltiplas, além do par 11, também, de forma mais sutil e próxima ao centrômero, em um dos cromossomos do par 1, padrão este também encontrado em *B. lanciformis* (CARVALHO et al., 2009).

Em *B. prasina*, as RONS foram encontradas na região terminal do braço longo do par cromossômico 12. Este padrão foi o mesmo encontrado por Ananias (1996), e semelhante a Baldissera Jr., Oliveira e Kasahara, (1993) que indica a presença de RONS nos pares 9 e 12, para esta espécie. Para algumas espécies do grupo *B. pulchella* (grupo taxonômico o qual *B. prasina* está inserido), segundo dados descritos anteriormente na literatura, a RON foi localizada no par cromossômico 12 em *B. pulchella*; *B. semiguttata* (ANANIAS, 1996); *B. polytaenia* (NUNES; FAGUNDES, 2008); no par 10 em *B. bischoffi*; *B. guentheri* (RABER et al., 2004); *B. marginatta* (ANANIAS; GARCIA; RECCO-PIMENTEL, 2004); *B. polytaenia* (VIEIRA, 2004); no par 7 em *B. caingua* (ANANIAS, 1996) e no par 1 em *B. joaquinii* (ANANIAS, 1996); *B. semiguttata* (ANANIAS et al., 2004).

Segundo Schmid (1978, 1982), as RONS em grande parte das espécies do mesmo grupo, ou em grupos de espécies relacionadas, ocorrem na mesma localização cromossômica nos cariótipos, desde que não haja rearranjos. Em *B. prasina*, a localização no par 12 é considerada plesiomórfica, de modo que a variação deste padrão (adicional no par 9) seria a condição derivada, como mencionado anteriormente. O caráter dinâmico destas sequências pode ser resultado de alguns mecanismos envolvidos na distribuição das RONS no genoma de anuros, que podem incluir rearranjos inter-cromossômicos, i.e. inversões e translocações envolvendo segmentos cromossômicos contendo RONS, transposições por TEs e erros de reinserção durante as ampliações (KAISER et al., 1996; LOURENÇO; GARCIA; RECCO-PIMENTEL, 2000).

Em geral, a detecção de RONS é um marcador citogenético útil em anfíbios, e o número e a localização desses locais permanecem constantes na maioria das espécies de anuros (LOURENÇO et al., 1998). Por outro lado, as RONS em espécies e populações de *Boana* são variáveis, embora a maioria das espécies apresente RONS únicas localizadas intersticialmente em braços longos de cromossomos com tamanho médio a pequenos (pares 7, 10 e 11)

(ANANIAS; GARCIA; RECCO-PIMENTEL, 2004; GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007; FERRO et al., 2008; NUNES; FAGUNDES, 2008; presente estudo). Além da variação interespecífica, as populações de *B. crepitans* (FERRO et al., 2018; GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007) também diferiram em relação ao par em que as RONS se encontram. Estes dados indicam que as RONS não são marcadores cromossômicos consistentes para identificação de espécies do gênero *Boana*, pelo menos quando utilizadas separadamente de outras técnicas, alternativamente, podem indicar a presença de espécies crípticas. No entanto, RONS localizadas nos maiores cromossomos (pares 1 e 2) foram restritas a determinados grupos, servindo como marcadores específicos de espécie, como em *B. albomarginatus* e *B. semiguttatus* (ANANIAS; GARCIA; RECCO-PIMENTEL, 2004; NUNES; FAGUNDES 2008).

Não foi detectada a presença de cromossomos sexuais nos cariótipos das espécies analisadas. Cromossomos sexuais são considerados raros em Hylidae, restritos exclusivamente à subfamília Hylinae e descritos citogeneticamente em poucas espécies, como *B. femoralis*, *B. immaculata*, *B. japonica*, *B. squirella* (YU; LEE, 1990; ANDERSON, 1991), e em *Pseudis tocantins* (GATTO; BUSIN; LOURENÇO, 2016).

#### *Heterocromatina Constitutiva e Mapeamento Cromossômico*

De acordo com Schmid et al. (1990), as regiões centroméricas são os locais preferenciais da heterocromatina constitutiva. A técnica do bandeamento C é considerada um marcador interessante para estudos de citogenética comparativa, tanto que comparações interespecíficas de padrões de heterocromatina constitutiva são de importância substancial para estudos citotaxonômicos, como citado anteriormente (SCHMID, 1978; SCHMID et al., 1990; BALDISSERA; OLIVEIRA; KASAHARA, 1993). As espécies estudadas aqui demonstraram um padrão considerado conservado de heterocromatina em regiões centroméricas e/ou pericentroméricas em quase todos os pares cromossômicos, além de bandas teloméricas intersticiais e associadas às RONS, características bastante conservadas para anuros hílideos (MEDEIROS; ROSSA-FERES; RECCO-PIMENTEL, 2003; ANANIAS; GARCIA; RECCO-PIMENTEL, 2004; CAMPOS et al. 2008). Em hílideos, o caráter de grande diversidade na distribuição de heterocromatina, como observado no cariótipo de *B. prasina*, é considerado um caráter derivado. Noleto et al. (2011) notaram que os padrões de distribuição de heterocromatina são um excelente marcador de linhagem para o gênero *Cycloramphus*, de modo que também para o gênero *Boana*, pode representar uma boa ferramenta citotaxonômica.

O padrão heterocromático em *B. prasina* pode ser considerado o mais rico do gênero, pela presença de bandas intersticiais e teloméricas, uma vez que a maioria das espécies cariotipadas até então, tem este componente genômico restrito aos centrômeros (MATTOS et al., 2014). Ainda que muitos anfíbios compartilhem uma similaridade na morfologia e no número de cromossomos, pode ocorrer diferença na quantidade e na localização de heterocromatina (SCHMID, 1978; SCHMID et al., 1990).

Em *B. albopunctata*, o cromossomo B se mostrou com uma relevante quantidade de heterocromatina, inclusive aparentando um possível acúmulo progressivo no braço longo (Figura 3A). No sentido de neutralizar a dispersão de parasitas genômicos, a heterocromatinização em cromossomos B possivelmente co-evoluiu como um mecanismo de defesa do genoma hospedeiro, uma vez que a metilação do DNA nestas regiões pode identificar e manter o estado heterocromático, assim permitindo um aumento na taxa mutacional (degradação) de sequências parasitas (YODER; WALSH; BESTOS, 1997).

O *snDNA* U2 faz parte de uma família multigênica denominada U *snDNA*. Essa família multigênica pode ter surgido a partir de duplicação e variação de algum gene ancestral (WENDEL, 2000; BENNETZEN, 2002; KELLIS; BIRREN; LANDER, 2004). Este processo evolutivo explica, pelo menos em parte, a organização atual dos genomas eucarióticos com a ocorrência de uma parcela dos genes em múltiplas cópias (LESPINET et al., 2002; LYNCH, 2002). As regiões de hibridização da sonda do U2 *snDNA* em *B. albopunctata* e *B. prasina* são coincidentes com heterocromatina, a qual representa uma grande parte do genoma dos eucariotos e que na maioria das vezes é composta por DNA satélite (JOHN, 1988; CHAVES; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2004). Essas sequências podem ser usadas como marcadores em estudos de diversificação genômica e relações filogenéticas. Considerando a evolução extremamente dinâmica destas sequências, elas podem fornecer informações úteis tanto para estudos microevolutivos como este ou no caso de DNA satélite espécies-específico ou cromossomo-específico (UGARKOVIC; PLOHL, 2002), como em abordagens filogenéticas (DNA satélite compartilhado por espécies em um determinado grupo) (KANTEK et al., 2009; PONS; GILLESPIE, 2003).

Alguns TEs já foram encontrados em anfíbios anuros. Um retrotransposon do tipo SINE (*short interspersed nucleotide elements*) foi descrito em *Rana* por Bucci et al. (1999). Plötner et al. (2009) encontraram um elemento do tipo LINE (*long interspersed nucleotide elements*) chamado *CR-1* em espécies de *Rana* e *Xenopus*. Ainda, no gênero *Xenopus* foram identificados elementos do tipo *Tc-1* (LAM et al., 1996; SINZELLE et al., 2005). A mesma família de transposon foi observada para o gênero *Rana* por Pontecorvo et al. (2000) e *Tc1-Mariner* foi

caracterizado em *Rana pipiens* por Miskey et al. (2003). Ainda que assimilamos uma correlação entre a diversidade de TEs e o tamanho do genoma (FRESCHOTTE; PRITHAM, 2007), a abundância e a distribuição de transposons em eucariotos são ainda pouco esclarecidas (PRITHAM, 2009). Porém, algumas observações fornecem dados que nos permitem constatar que há diferença na atividade e na diversidade dessas sequências nos vertebrados. Tal diferença parece decorrer de mecanismos variados de defesa dos hospedeiros em resistência à atividade dos TEs sobre esses genomas (ABRUSANE; KROMBERK, 2006).

Em eucariotos, a maioria dos TEs (i.e. *Tc1-Mariner*) se apresentam como cópias não autônomas resultantes do processo de degeneração, uma vez que quando inativados passam a acumular mutações e acabam perdendo identidade. Sabe-se que o desenvolvimento, a manutenção e a propagação de um TE se dá pela invasão do genoma do hospedeiro, aumento do seu número de cópias, sua inativação e, finalmente, sua eliminação (KIDWELL, 2001), o que pode vir a corroborar para os padrões dispersos observados nas metáfases de *B. albopunctata*, *B. faber* e *B. prasina*. Além disso, alguns TEs mutados podem passar a fazer parte do genoma de maneira atuante, adquirindo funções genômicas a favor do hospedeiro, a partir de um processo evolutivo denominado domesticação molecular (SINZELLE; IZSVAK; IVICS, 2009), passando a, por exemplo, agir na tradução ou na regulação gênica a nível transcricional (geração de sítios de ligação a fatores de transcrição) e pós-transcricional (atuação na tradução ou edição de RNAs) (FESCHOTTE, 2008).

Mesmo que os TEs estejam frequentemente silenciados, a manutenção destas seqüências está estreitamente vinculada à manutenção da variabilidade genética (MANSOUR, 2007), logo, devido à posição polimórfica dos TEs, eles acabam gerando uma maior variabilidade genética e fenotípica entre indivíduos, podendo ocasionar fenômenos conhecidos como variação e mosaicismos. Os TEs são regularmente encontrados em vários mecanismos epigenéticos e, os papéis cromossômicos correlacionados à regulação epigenética da expressão genética, sugere que esse tipo de regulação tem como alvo principal os próprios TEs (SLOTKIN; MARTIENSSEN 2007). De fato, ao longo de toda história evolutiva dos organismos, os TEs chegaram à um equilíbrio dinâmico entre efeitos negativos a nível individual e efeitos positivos a nível de genoma (KAZAZIAN JR., 2007).

Os TEs têm uma organização diferente entre as espécies e estão dispersos pelo genoma, podendo ocupar várias regiões eucromáticas, como já observado em humanos e insetos (VOLFF et al, 2003), sendo que o padrão disperso também foi observado no presente estudo. Lippman et al. (2004) inferem que os TEs aparentemente utilizam a heterocromatina como abrigo, já que a pressão seletiva é menor nestas regiões.

Sabendo disso, a localização destes TEs em regiões coincidentes de eucromatina pode ter sido importante na evolução genômica das espécies, uma vez que quando inseridas em regiões eucromáticas (ricas em genes), podem gerar mutações, afetam os níveis de padrões de recombinação e expressão genética e interferem na organização da arquitetura genômica (KIDWELL; LISCH 2000; HUA-VAN et al., 2005).

Os TEs apresentam uma dinâmica evolutiva distinta nos diferentes grupos de espécies. Os genomas de mamíferos, por exemplo, possuem grande variedade de tipos de linhagens de TEs, enquanto peixes e *Drosophila* mostram cepas desses elementos genômicos tipicamente menos abundantes, mas aparentemente mais deletérias. Nestes dois últimos grupos, famílias de diferentes cepas de TEs, com um número consideravelmente baixo de cópias, permaneceram ativas por um bom período de tempo (VOLFF et al, 2003; EICKBUSH; FURANO, 2002). O que causa essa variação na atividade e diversidade destas sequências entre genomas distintos é a diferença dos mecanismos de defesa do genoma do hospedeiro, em oposição às atividades dos TEs.

Adicionalmente, além desse tipo de sequência poder colaborar para o desenvolvimento de genes novos e alguns RNAs que não transcrevem (LONG et al., 2003), também pode servir como provedor de novas combinações de *splicing* (MARINO-RAMIREZ et al., 2005).

Vale lembrar que o presente estudo apresenta a primeira descrição de mapeamento *in situ* do *snDNA* U2 e do TE *Tc1-Mariner* na família Hylidae.

#### *Cromossomo B em B. albopunctata*

Em *B. albopunctata*, embora o número diploide seja de 22 cromossomos, algumas populações do sudeste do Brasil (GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007; GRUBER et al., 2014), bem como a do presente estudo, apresentam um elemento adicional, o qual mostra características de um cromossomo supranumerário.

Variações nos números básicos de cromossomos foram relatados para Hylidae, como condições derivadas, o que pode explicar a redução para  $2n = 22$  cromossomos e a presença de cromossomos supranumerários ou B, como observado em *B. albopunctata*, e já descritos em outras 6 espécies de hilitos (RABELLO, 1970; HERNÁNDEZ-GUZMÁN; ARIAS-RODRIGUEZ; INDY, 2011; SUÁREZ, 2013). Cromossomos supranumerários não seguem as leis mendelianas da herança, e *B. albopunctata* faz parte das aproximadamente 1685 espécies descritas com este elemento até 2017, mais comumente observado em plantas, sendo que apenas 32% desse total são correspondentes de grupos animais (JONES, 2017).



Adicionalmente, os cromossomos Bs são considerados dispensáveis já que sua presença é documentada em apenas alguns indivíduos e estes ainda variam na sua frequência tanto intra como interindividual, apresentam comportamento irregular durante a divisão celular e possuem natureza majoritariamente heterocromática, apresentando configuração diferente do complemento A (CAMACHO et al., 2000). Quando esses elementos se encontram presentes em números baixos, geralmente têm pouca ou nenhuma influência nos genomas hospedeiros. Contudo, em grandes números, Bs causam diferenças fenotípicas e podem reduzir a fertilidade (BOUGOURD; JONES, 1997; JONES; HOUBEN, 2003).

Na maioria das espécies que possuem como característica a presença do cromossomo B, a transmissão mitótica de Bs durante o crescimento e desenvolvimento é considerado regular, logo, todas as células carregam o mesmo número de Bs dentro do indivíduo. Porém, existem exceções nas quais os Bs estão presentes em números variáveis, devido à instabilidade mitótica, algumas vezes sua presença é restrita à tecidos e/ou órgãos diferentes e específicos. Um exemplo é o encontrado por Mendelson e Zohary (1972) e Ohta (1996), que relatam que nas gramíneas *Aegilops speltoides* e *Aegilops mutica*, Bs são ausentes nas raízes e se encontram presentes em órgãos aéreos. No presente estudo, foi documentada a variação na presença de B em metáfases do mesmo tecido do indivíduo, isso pode estar relacionado ao fato de que foram analisadas metáfases obtidas a partir da medula óssea do fêmur, células caracterizadas pela sua função de diferenciação entre os tecidos. Em gafanhotos, foi observado que também há variação na presença Bs, e que isso ocorre especificamente entre os folículos do testículo (NUR, 1969), podendo estar associado com a não disjunção das cromátides irmãs do cromossomo B durante a anáfase da mitose, o que resulta na ausência de B em uma célula filha e acúmulo na outra.

Em relação à origem do cromossomo B em *B. albopunctata*, ainda existem hipóteses procurando explicá-la. A primeira hipótese propõe uma origem intraespecífica (CABRERO et al. 1999; CAMACHO; SHARBEL; BEUKBOOM, 2000), onde os cromossomos Bs surgiram do complemento padrão A, porém seguiram um caminho evolutivo independente. A segunda hipótese, propõe uma origem interespecífica (CAMACHO; SHARBEL; BEUKBOOM, 2000; PERFECTTI & WERREN, 2001), onde os cromossomos B surgiram a partir de acasalamentos interespecíficos pelo processo de hibridização.

Gruber, Haddad e Kasahara (2007) sugerem que este cromossomo extra teria se originado da duplicação parcial ou completa do par 8 do complemento A, subsequentemente degenerando, e perdendo a homologia com seu precursor, atestando assim a hipótese da origem intraespecífica. Esta hipótese é plausível, mas as evidências atuais são insuficientes para especular sobre esta origem particular dos cromossomos Bs (FERRO et al., 2012).

Adicionalmente, a falta de homologia molecular entre cromossomos A e B sugere uma origem interespecífica nesta espécie. A ausência de homologia também é confirmada pelas análises meióticas em *B. albopunctata*, mostrando o cromossomo B como um univalente, o que corrobora com a origem interespecífica. Gruber et. al (2014), com microdissecção do cromossomo B de *B. albopunctata* e posterior hibridização fluorescente *in situ* (FISH), não encontraram homologia entre o B e algum cromossomo do complemento A da espécie. Por outro lado, a mesma hibridização, porém nos cromossomos de *B. raniceps*, exibiu um padrão disperso, com marcações em todos os cromossomos, a qual possui  $2n = 24$  e ausência de cromossomo B. Curiosamente, a hibridização reversa do genoma de *B. raniceps* sobre os cromossomos de *B. albopunctata* não pinta o cromossomo supranumerário em toda sua extensão. É sabido da simpatria e sintopia entre *B. raniceps* e *B. albopunctata*, e isto vêm a favor da hipótese de uma origem interespecífica, frente a possível hibridização entre estas espécies.

Comparando os resultados de Gruber et al. (2014) e Ferro et al. (2012), é notável uma ligeira diferenciação de tamanho dos Bs, o que também pode ser visualizado no presente estudo, já que quanto mais ao sul da América do sul os indivíduos são coletados, se torna mais notável uma diminuição no tamanho de tais cromossomos. Também é possível verificar a presença de mais de um cromossomo B nas populações analisadas (FERRO et al. 2012) ([Figura 7](#)).

Os dados do presente trabalho apoiam a hipótese de origem interespecífica em virtude da exclusividade do padrão heterocromático presente no cromossomo B de *B. albopunctata*, proveniente do sul do estado do Paraná. Concordamos que a hibridização entre espécies seja o estopim da origem desse cromossomo extra por falta de homologia entre determinados pares entre as duas espécies. As diferenças de tamanho e padrões heterocromáticos dos cromossomos Bs de diferentes populações de *B. albopunctata* já estudadas, nos levam a crer que os pares envolvidos sejam os menores dos cariótipos, 8 à 12 no caso de *B. raniceps* e 8 à 11 para *B. albopunctata*. Depois de ocorrida a hibridização, a falta de homologia entre determinados pares das espécies parentais ocasiona a origem de cromossomo(s) B(s), diante da eliminação ou não de cromossomos envolvidos na não homologia ([Figura 8](#)). Este cenário é observado em populações brasileiras com apenas um cromossomo B (eliminação de um dos não homólogos) e em populações argentinas, quando da ocorrência de um a três cromossomos Bs (mais de um par envolvido e manutenção de cromossomos sem homologia = Bs). Posteriormente à origem do cromossomo B, ele segue um caminho evolutivo independente acumulando ou não classes de DNAs repetitivos. No presente estudo, o padrão heterocromático do cromossomo B sugere um avanço da heterocromatina centromérica em direção ao braço longo.

#### 4.1.5 Considerações finais

Vários estudos têm demonstrado que diferentes espécies, mesmo que próximas filogeneticamente, podem apresentar grande variabilidade cromossômica, permitindo análises entre os distintos cariótipos, pela identificação de diferentes fórmulas cariotípicas e/ou números diploides e padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva.

De acordo com os marcadores cromossômicos apresentados, as espécies de anuros analisadas no presente estudo apresentaram variação, contrariando o conceito de cariótipo conservado em anuros. Assim, apesar de compartilhar um padrão cariotípico semelhante, a microestrutura cromossômica dentro de *Boana* é altamente variável e pode ser usada para diferenciar espécies e suas variantes geográficas.

Os estudos em hilídeos ainda são escassos quando comparados a de outros grupos animais e, portanto, representam um promissor objeto de estudo para o entendimento das forças que modelaram seus respectivos cariótipos. O mapeamento *in situ* das sequências repetitivas apresentadas aqui são inéditas para a família Hylidae e pode fornecer subsídios para melhor compreender a evolução genômica no grupo. Além disso, outros estudos acerca dos anuros se fazem de suma importância, visto o grande número de espécies ainda não estudadas e a pungente ameaça que o grupo vem sofrendo.

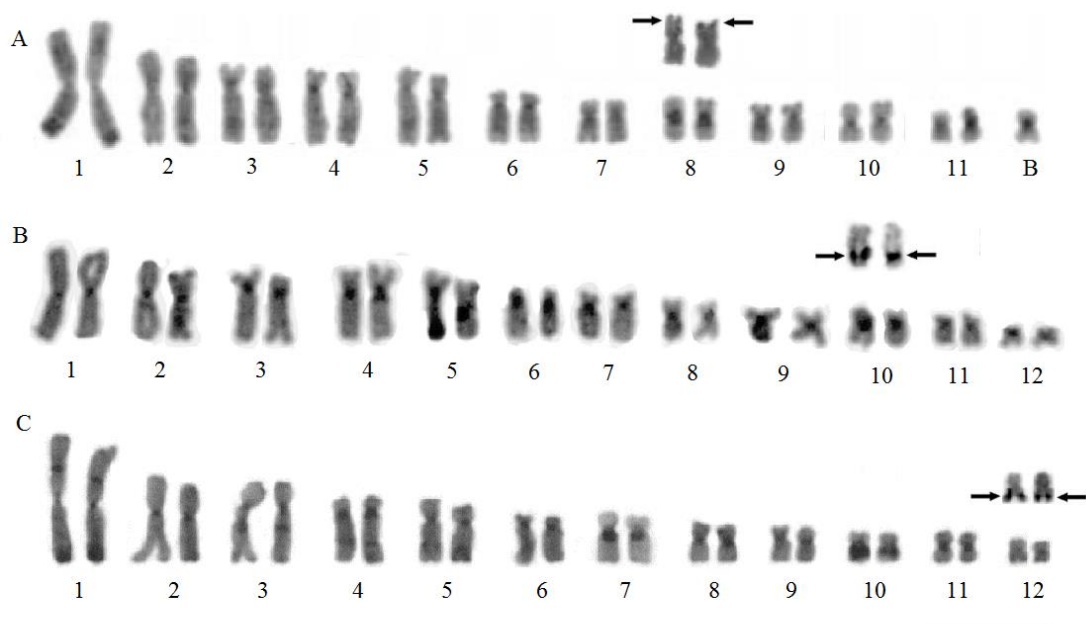
O gênero *Boana* oferece um rico cenário no qual muitas questões ainda não foram pesquisadas. Novos padrões citogenéticos tendem a emergir, principalmente quando envolvendo diferentes localidades e populações, trazendo evidências para interpretações inéditas a respeito da evolução do grupo. Assim, abordagens complementares envolvendo um maior número de espécies e/ou populações e o mapeamento de outras classes de DNAs repetitivos, representam novas frentes de pesquisa e darão subsídios para construir cenários mais consistentes da evolução cromossômica neste grupo.

## Figuras

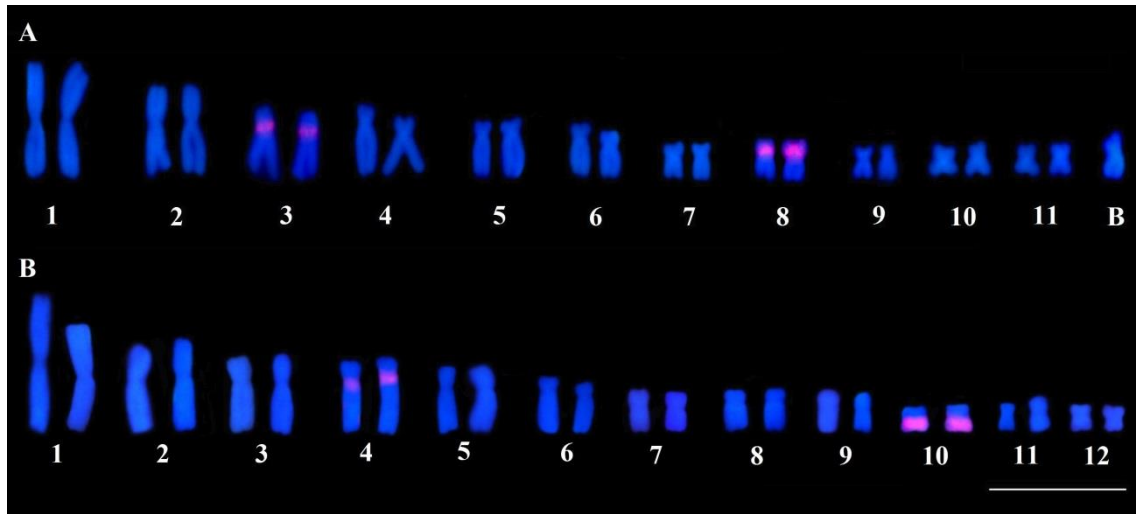
**Figura 2.** Cariótipos submetidos à coloração convencional com giemsa a 5%. (A) *B. albopunctata* com  $2n = 22$  cromossomos, com eventual presença de cromossomo B.; (B) *B. faber* com  $2n = 24$  cromossomos; (C) *B. prasina* com  $2n = 24$  cromossomos. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



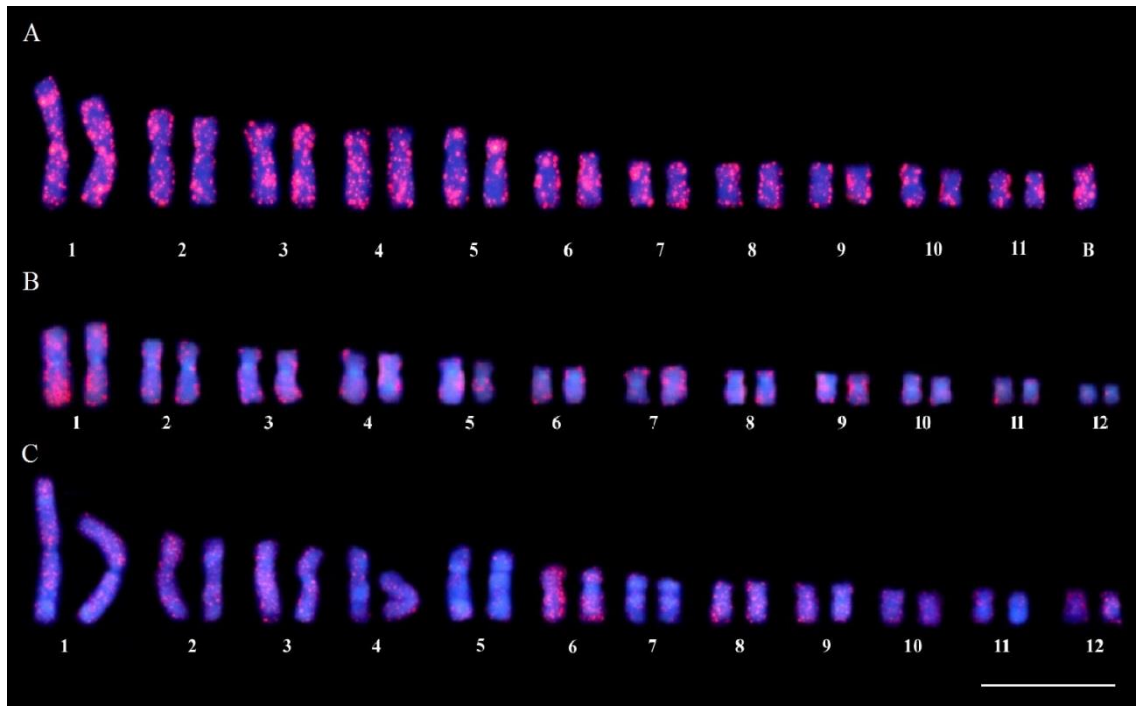
**Figura 3.** Cariótipos de exemplares de *Boana* submetidos à técnica de bandamento C, demonstrando os padrões de heterocromatina constitutiva e a detecção de RONS (flechas). (A) *B. albopunctata*; (B) *B. faber*; (C) *B. prasina*. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



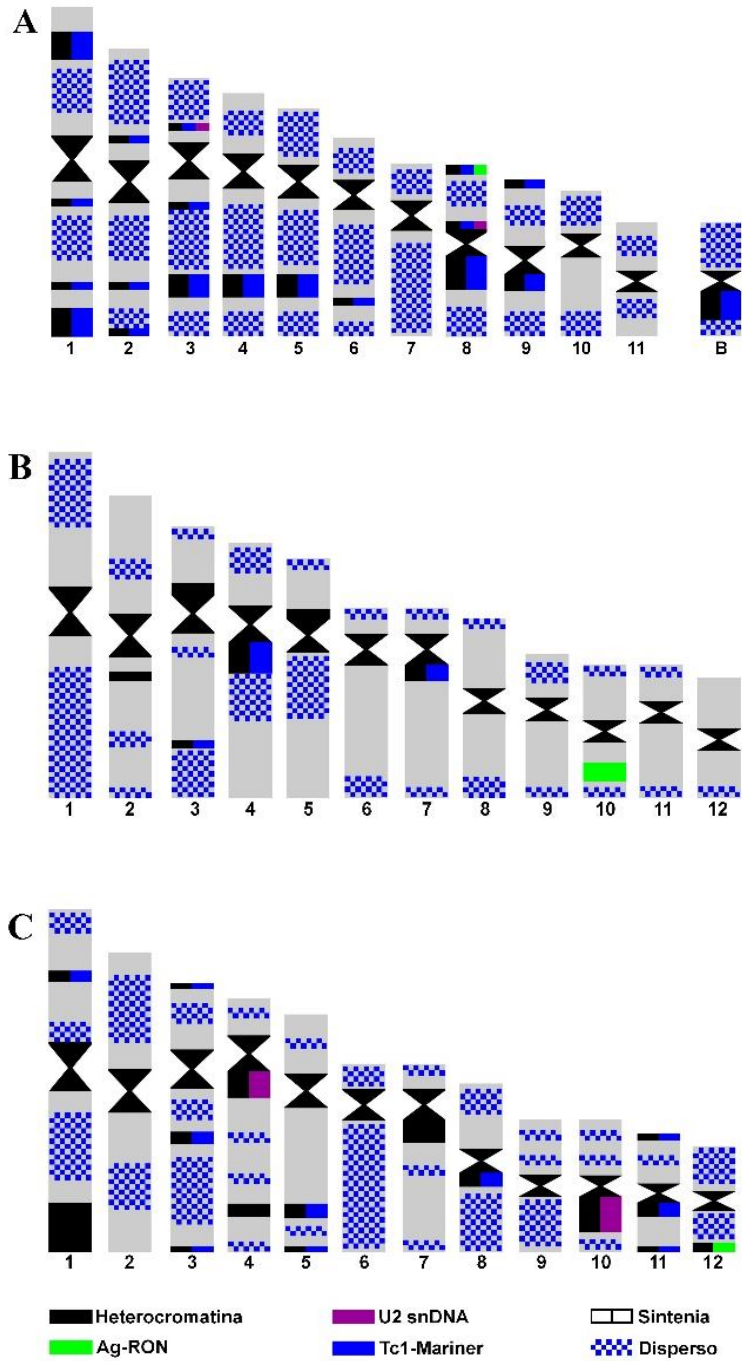
**Figura 4.** Cariótipos submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda de genes *snDNA* U2 (em vermelho). (A) *B. albopunctata* ( $2n = 22$  cromossomos + cromossomo B) e (B) *B. prasina* ( $2n = 24$  cromossomos). Barra =  $10\ \mu\text{m}$ .



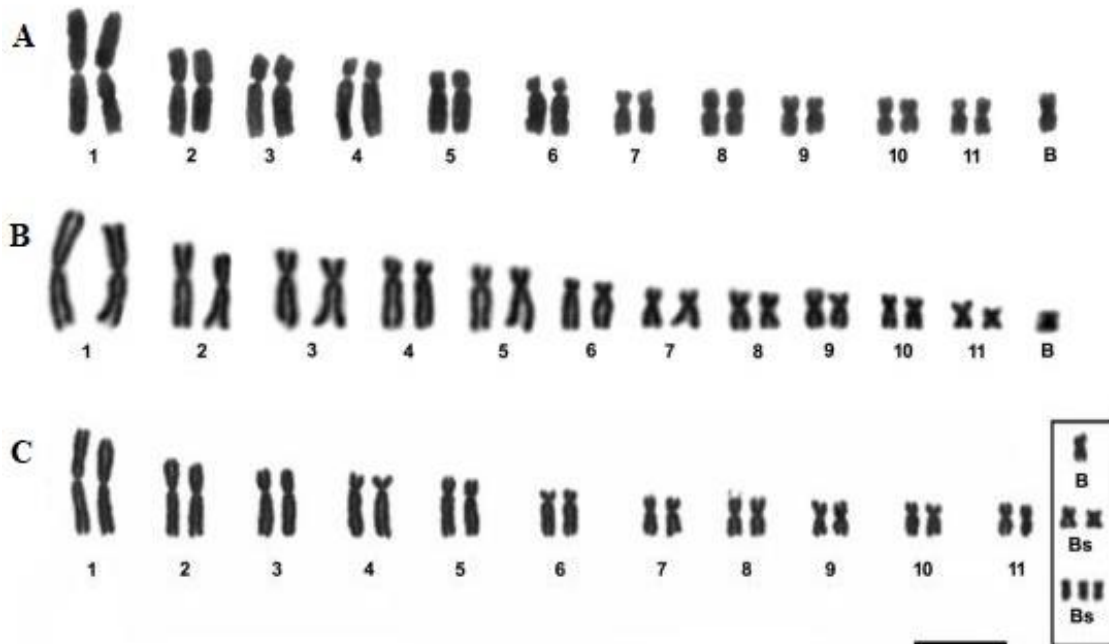
**Figura 5.** Cariótipos submetidos à hibridização *in situ* fluorescente com sonda do TE *Tc1-Mariner* (em vermelho). (A) *B. albopunctata* ( $2n = 22$  cromossomos + cromossomo B), (B) *B. faber* ( $2n = 24$  cromossomos) e (C) *B. prasina* ( $2n = 24$  cromossomos). Barra =  $10\ \mu\text{m}$ .



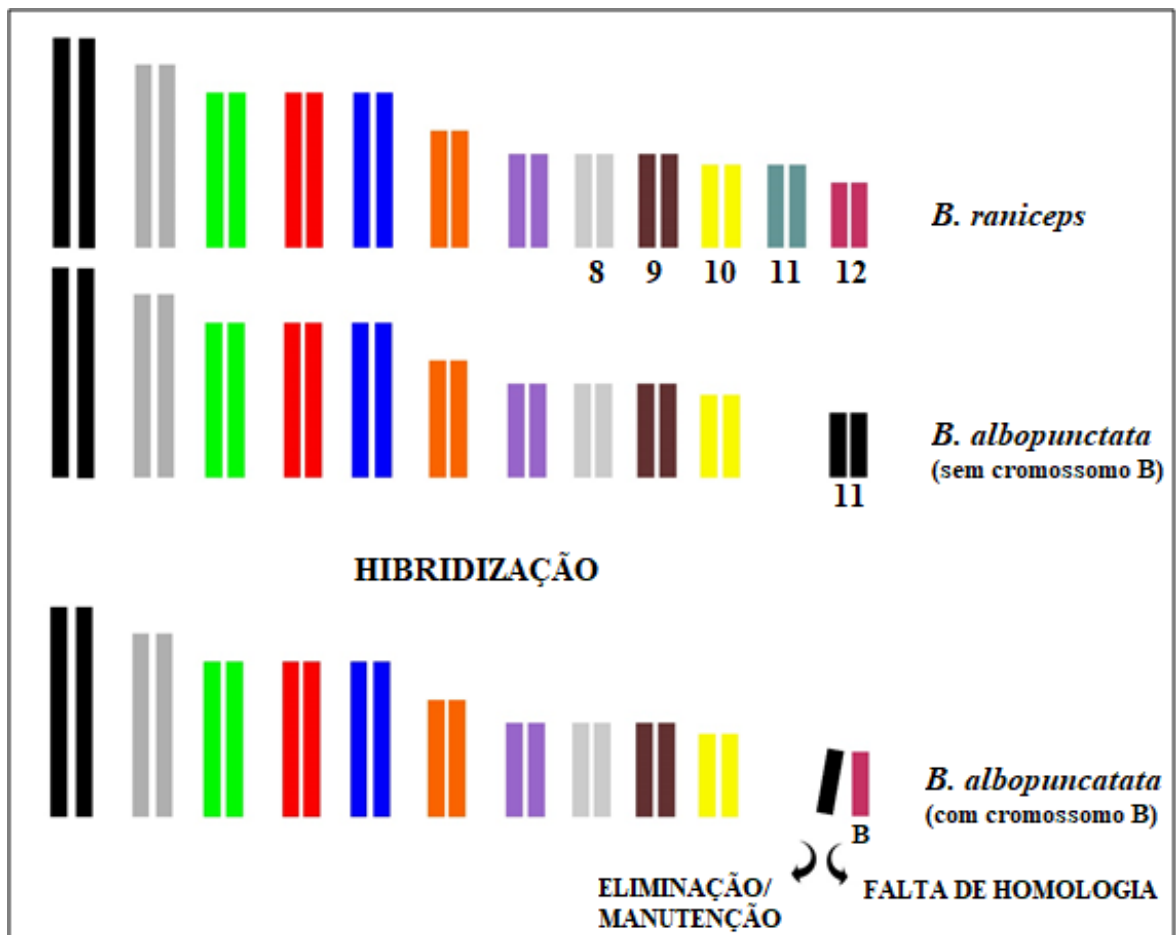
**Figura 6.** Idiogramas mostrando a distribuição de marcadores clássicos e de duas classes de DNA repetitivo: **(A)** *B. albopunctata*, **(B)** *B. faber* e **(C)** *B. prasina*.



**Figura 7.** Imagem de espécies do genero *Boana* analisadas no presente estudo. (A) *B. albopunctata* (Fonte: GRANATO, 2018); (B) *B. faber* (Fonte: O Autor); (C) *B. prasina*



**Figura 8.** Origem hipotética interespecífica do(s) cromossomo(s) B(s) em *B. albopunctata*.



## REFERÊNCIAS

- ABRUSAN, G.; KRAMBECK, H. J. Competition may determine the diversity of transposable elements. **Theoretical Population Biology**, v. 70, p. 364–75, 2006.
- AGUIAR-JR, O.; BACCI-JR, M.; LIMA, A. P.; ROSSA-FERES, D. C.; HADDAD, C. F. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Phylogenetic Relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics**, v. 23, p. 455-463, 2007.
- ANANIAS, F. **Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo *H. pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Dissertação (Mestrado em biologia celular) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1996.
- ANANIAS, F.; GARCIA, P. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, v. 140, p. 42-48, 2004.
- ANDERSON, K. Chromosome evolution in Holartic *Hyla* treefrogs. In: GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. Amphibian Cytogenetics and Evolution. San Diego, **Academic Press.**, p. 299-331, 1991.
- ANJOS, A.; RUIZ-RUANO, F. J.; CAMACHO, J. P. M.; LORETO, V.; CABRERO, J.; de SOUZA, M. J.; CABRAL-de-MELLO, D. C. U1 snDNA clusters in grasshoppers: chromosomal dynamics and genomic organization. **Heredity**, v. 114, p. 207-219, 2015.
- ARGUESO, J. L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P. A; GAWEL, M.; PETES, T. D.; RESNICK, M. A. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11845-11850, 2008.
- BALDISSERA Jr., F. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with supernumerary chromosomes. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 335-345, 1993.
- BARAQUET M.; SALAS N. E.; MARTINO A. L. C-banding patterns and meiotic behavior in *Hypsiboas pulchellus* and *H. cordobae* (ANURA, HYLIDAE). **Journal of Basic & Applied Genetics**, vol. 24, p. 32-39, 2013.
- BARDELLA, V. B.; FERNANDES, J. A. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal evolutionary dynamics of four multigene families in Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) true bugs. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, p. 1919–1925, 2016.
- BECKER, C. G.; ZAMUDIO, K. R. Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 24, p. 9893-9898, 2011.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**, v. 21, p. 191-208, 1968.
- BENNETZEN, J. The rice genome. Opening the door to comparative plant biology. **Science**, v. 296, p. 60-63, 2002.
- BERGER, L., MARANTELLI, G., SKERRATT, L. F.; SPEARE, R. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, p. 47-50, 2005.



- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, p. 415-420, 2015.
- BLAUSTEIN, A. R.; KATS, L. B. Amphibians in a very bad light. **Bioscience**, v. 11, p. 1028-1029, 2013.
- BOGART, J. P.; BOGART, J. E. Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. **Herpetologica**, v. 27, p. 229-235, 1971.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. *Evolutionary Biology of Anurans*. **University of Missouri Press**, v. 3, p. 337-349, 1973.
- BÖHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C.; VOLFF, J. N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**, v. 16, p. 203-215, 2008.
- BOUGOURD, S. M.; JONES, R. N. B chromosomes: a physiological enigma. **New Phytologist**, v. 137, p. 43-54, 1997.
- BRASIL, (Ministério do Meio Ambiente). **Subprograma do PPG7 para a Mata Atlântica**. Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília, Brasil. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/pnf/n2respla.html>>. Acesso em: 06 de setembro de 2017.
- BUCCI, S. M.; RAGGHIANI G.; MANCINO, G.; PETRONI, G.; GUERRINI, F.; GIAMPAOLI, S. Rana/PolIII:A family of SINE-like sequences in the genomes of western Palearctic water frogs. **Genome**, v. 42, p. 504-511, 1999.
- BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Abracrisflavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly H3 histone spreading. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 466-532, 2013.
- CABRERO, J.; LÓPEZ-LÉON, M. D.; BAKKALI, M.; CAMACHO, J. P. M. Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, v. 82, p. 435-439, 1999.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc.**, London, v. 355, p. 163-178. 2000
- CAMINER, M. A.; RON, S. R. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. **Zookeys**, v. 370, p. 1-68, 2014.
- CAMPOS, J. R. C.; ANANIAS, F.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae). **Micron**, v. 39, p. 151-159, 2008.
- CARVALHO, F. K.; FERNANDES, A.; BARTH, A.; CUSTÓDIO, R. J. Tempo ou antropismo como fatores de alterações cromossômicas para uma população de *Hypsiboas raniceps* (Anura: Hylidae) (Cope, 1862). **Anais do IV Congresso de Iniciação Científica, resumos Tangará da Serra**, p. 1-4, 2008.
- CARVALHO, K. A.; GARCIA, P. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1498-1508, 2009.

- CATROLI, G. F. **Cariótipo de seis espécies de *Bokermannohyla* dos grupos de *B. circumdata* e *B. pseudopseudis* (Anura, Hylidae)**. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.
- CATROLI, G. F.; KASAHARA, S. Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. Publication UEPG: **Biological and Health Science Ponta Grossa**, v. 15, p. 67–86, 2009.
- CHARLESWORTH, B.; SNIÉGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.
- CHAVES, R.; SANTOS, S.; GUEDES-PINTO, H. Comparative analysis (Hippotragini versus caprini, Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by *in situ* restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. **Genetica**, v. 121, p. 315-325, 2004.
- CHEK, A. A.; LOUGHEED, S.; BOGART, J. P.; BOAG, P. T. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 18, p. 370-38, 2001.
- CHILDS, G.; MAXSON, R.; COHN, R.H.; KEDES, L. ORPHONS. Dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eukaryotes. **Cell Press**, v. 23, p. 651-663, 1981.
- COLLINS, J. P, STORFER, A. A global amphibian declines: sorting the hypothesis. **Diversity and distributions**, v. 9, p. 89-98, 2003.
- DASZAK, P., STRIEBY, A., CUNNINGHAM, A. A., LONGCORE, J. E., BROWN, C. C.; PORTER, D. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. **Herpetological Journal**, v. 14, p. 201-207, 2004.
- DE SÁ, R. O. *Hyla multifasciata*. Catalogue of American Amphibians and Reptiles. **Society for the study of Amphibians and Reptiles**, v. 624, p. 1-4, 1996
- DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. **Journal of Herpetology**, v. 6, p. 71-74, 1972.
- DUBOIS, A. The nomenclatural status of Hysaplesia, Hylaplesia, Dendrobates and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. **Bionomina**, v. 11, p. 1–48, 2017.
- DUELLMAN, W. E. Global distribution of amphibians: patterns, conservation and future challenges. In: DUELLMAN, W.E. (Ed.). Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. **Baltimore: Johns Hopkins University Press**, v. 1, p. 1-30, 1999.
- DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**, v. 4140, p. 001-109, 2016.
- DUELLMAN, W. E. The hylid frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. **Ithaca**, v. 1, p. 1159, 2001.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. Biology of Amphibians. **New York: McGrawHill**, 1994.
- EICKBUSH, T. H.; FURANO, A. V. Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. **Current Opinion In Genetics & Development**, v. 12, p. 669-674, 2002.

- EIRÍN-LÓPEZ, J. M.; RUIZ, M. F.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A. M.; MARTÍNEZ, A.; SÁNCHEZ, L.; MÉNDEZ, J. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphon” features. **Journal of Molecular Evolution**, v. 58, p. 131-144, 2004.
- FAIVOVICH, J.; GARCIA, P. C. A.; ANANIAS, F.; LANARI, L.; BASSO, N. G.; WHEELER, W. C. A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, p. 938-950, 2004.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyalinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 29, n. 294, p. 1-240, 2005.
- FERNÁNDEZ-MEDINA, R. D.; RIBEIRO, J. M. C.; CARARETO, C. M. A.; VELASQUE, L.; STRUCHINER, C. J. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. **BioMed Central Genomics**, v. 13, p. 272, 2012.
- FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 397-405, 2008.
- FERRO, J. M.; MARTI, D. A.; BIDAU, C. J.; SUARÉZ, P.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; BALDO, D. B. Chromosomes in the Tree Frog *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae). **BioOne**, v. 68, p. 482-490, 2012.
- FERRO, J. M.; CARDOZO, D. E.; SUARÉZ, P.; BOERIS, J. M.; BLASCO-ZUÑIGA, A.; BARBERO, G.; GOMES, A.; GAZONI, T.; COSTA, W.; NAGAMACHI, C. Y.; RIVERA, M.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; WILEY, J. E.; PIECZARKA, J. C.; HADDAD, C. F. B.; FAIVOVICH, J.; BALDO, D. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). **Plos One**, v. 13, p. 1-29, 2018.
- FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 103-107, 1989.
- FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J.; WALKER, S. F. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 291–310, 2009.
- FODEN, W. B.; BUTCHART, S. H. M.; STUART, S. N.; VIÉ, J.-C.; AKÇAKAYA, H. R.; ANGULO, A.; VANTIER, L. M. D.; GUTSCHE, A.; TURAK, E.; CAO, L.; DONNER, S. D.; KATARIYA, V.; BERNARD, R.; HOLLAND, R. A.; HUGHES, A. F.; O’HANLON, S. E.; GARNETT, S. T.; ŞEKERCIOĞLU, Ç. H.; MACE, G. M.; Identifying the world’s most climate change vulnerable species: A systematic trait-based assessment of all birds, amphibians and corals. **Plos One**, v. 8, p. 1371-1379, 2013.
- FORESTI, F. **Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura)**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.
- FOUQUET, A.; MARTINEZ, Q.; ZEIDLER, L.; COURTOIS, E. A.; GAUCHER, P.; BLANC, M. Cryptic diversity in the *Hypsiboas semilineatus* species group (Amphibia, Anura) with the description of a new species from the eastern Guiana Shield. **Zootaxa**, v. 4084, p. 79-104, 2016.

FRECHOTTE, C.; PRITHAM, J. E. DNA transposons and evolution of eukaryotic genomics. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331-369, 2007.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: on online Reference**. Version 6. American Museum of Natural History, New York, USA, 2017. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>>. Acesso em: 06 set. 2017.

FROST, D. R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F. B.; DE SÁ, R. O.; 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.; WHEELER, W. C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 22, p. 1-370, 2006.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados**. Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo. 2002.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Atlantic forest hotspots status. The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. **Center for Applied Biodiversity Science e Island Press**, v. 29, p. 3-112003.

GARCIA, P. C. A. et al. Anfíbios. **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. 2009.

GASCON, C. Population and community level analyses of species occurrences of central Amazonian rainforest tadpoles. **Ecology**, v. 72, p. 1731-1746, 1991.

GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the Sex Chromosome Heteromorphism of the Paradoxical Frog *Pseudis tocantins*. **PLoS ONE**, v. 11, p. 67-121, 2016.

GAZONI, T. **Marcadores Citológicos no Cariótipo de Espécies de *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) Analisado com Técnicas de Citogenética Clássica e Molecular**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, 2011.

GRANATO, M. **Photo Database**. Disponível em <[https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?enlarge=0000+0000+0618+0107](https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0618+0107)>. Acesso em: 03 e novembro e 2018

GRANDINETTI, L.; JACOBI, C. M. Distribuição estacional e espacial de uma taxocenose de anuros (amphibia) em uma área antropizada em Rio Acima – MG. **Lundiana**, v. 6, p. 21-28, 2005.

GRANT, T; FROST, D. R.; CALDWELL, J. P.; GAGLIARDO, R.; HADDAD, C. F. B.; KOK, P. J. R.; MEANS, D. B.; NOONAN, B. P.; SCHARGEL, W. E.; WHEELER, W. Phylogenetic systematic of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 269, p. 1-262, 2006.

GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. Amphibian Cytogenetics and Evolution. **Academic Press**, v. 1, p. 431-432, 1991.

GREEN, M. R. Pre-mRNA processing and mRNA nuclear export. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 1, p. 519-525, 1989.

- GRUBER, S. L.; DINIZ, D.; SOBRINHO-SCUDELER, P. E.; FORESTI, F.; HADDAD, C. F.; KASAHARA, S. Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridization. **Comparative Cytogenetics**, v. 8, n. 3, p. 185-97, 2014.
- GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F.; KASAHARA, S. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hyliinae), 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**, v. 130, p. 281-291, 2007.
- GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F.; KASAHARA, S. Evaluating the karyotypic diversity in 336 species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with  $2n = 30$  chromosomes based on the analysis of ten species. **Folia Biologica**, v. 51, p. 68-75, 2005.
- HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **Bioscience Journal**, v. 55, p. 207-217, 2005.
- HADDAD, C. F. B.; SAWAYA, R. J. Reproductive modes of Atlantic Forest Hylid frogs: A general overview and the description of a new mode. **Biotropica**, v. 32, p. 862-871, 2000.
- HARDMAN, N. Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 234, p. 1-11, 1986.
- HEDGES, S. B.; DUELLMAN, W. E.; HEINICKE, M. P. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. **Zootaxa**, v. 1737, p. 1-182, 2008.
- HERNÁNDEZ-GUZMÁN, J.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; INDY, J. R.; Los cromosomas meióticos de la rana arborícola *Smilisca baudinii* (Anura: Hylidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 59, p. 355–362, 2011.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.
- HORT, J. Geografia do município de União da Vitória. **FAFI e UNIPORTO**, União da Vitória, Brasil, v. único, p. 51, 1990.
- HUA-VAN, A.; LE ROUZIC, A.; MAISONHAUTE, C.; CAPY, P.; Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 426-440, 2005.
- IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://iucnredlist.org>>. Acesso em: 28 jun. 2018.
- JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R. S. Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects. **Cambridge University Press**, v. 1, p. 15-23 1988.
- JONES, N.; HOUBEN, A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 417-423, 2003.
- JONES, N. New species with B chromosomes discovered since 1980. **Nucleus**, v. 60, p. 263-281, 2017.
- KAKAZIAN JR, H. H. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science**, v. 303, p. 1626-1632, 2004.

- KAISER, H.; MAIS, C.; BOLAÑOS, F.; STEINLEIN, C.; FEICHTINGER, W.; SCHMID, M. Chromosomal investigation of three Costa Rica frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica**, v. 98, p. 95-102, 1996.
- KASAHARA, S.; ZAMPIERI SILVA, A. P.; GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. **Cytogenetic Genome Research**, v. 103, p. 155-162, 2003.
- KANTEK, D. L. Z.; VICARI, M. R.; PERES, W. A.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 408–421, 2009.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1647-1649, 2012.
- KELLIS, M.; BIRREN, B. W.; LANDER, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 428, p. 617-624, 2004.
- KIDWELL, M. G.; LISH, D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, v. 55, p. 1-24, 2001.
- KIDWELL, M. G.; LISH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, p. 95-99, 2000.
- KING, M.; CONTRERAS, S. N.; HONEYCUTT, R. L. Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. **Genetica**, v. 80, p. 17– 29, 1990.
- KÖHLER, J.; KOSCINSKI, D.; PADIAL, J. M.; CHAPARRO, J. C.; HANDFORD, P.; LOUGHEED, S. C.; De la RIVA, I. Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). **Zoologica Scripta**, v. 39, p. 572-590, 2010.
- KURAMOTO, M. A list of chromosome number of anuran amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education**, v. 39, p. 83–127, 1990.
- LAM, W. L.; SEO, P.; ROBISON, K.; VIRK, S.; GILBERT, W. Discovery of Amphibian Tc1-like Transposon Families. **Journal of Molecular Biology**, v. 257, p. 359-366, 1996.
- LESPINET, O.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. The role of lineage-specific gene family expansion in the evolution of eukaryotes. **Genome Research**, v. 12, p. 1048-1059, 2002.
- LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMANN, L. K.; RORIGUES, D. J.; KELLER, C.; HÖDL, W. Guia de sapos da reserva Adolpho Ducke. Amazônia Central. **Edição Attema**, v. 1, p. 1-14, 2006.
- LIPPMAN, Z.; GENDREL, A. V.; BLACK, M.; VAUGHN, M. W.; DEDHIA, N.; MCCOMBIE, W. R.; LAVINE, K.; MITTAL, V.; MAY, B.; KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C.; DOERGE, R. W.; COLOT, V.; MARTIENSSEN, R. **Nature**, v. 430, p. 471-476, 2004.

- LIPS, K. R.; DIFFENDORFER, J.; MENDELSON, J. R.; SEARS M. W. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian decline. **PLoS Biology**, v. 6, p. 441-454, 2008.
- LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v 49, p. 727-764. 1980.
- LONG, M; BETRÁN, E; THORNTON, K; WANG, W The origin of new genes: glimpses from the young and old. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 865-875, 2003.
- LOURENÇO, L. B.;BACCI-JR, M.; MARTINS, V. G.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; HADDAD, C. F. B. Molecular Phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). **Genetica**, v. 132, p. 255-266, 2008.
- LOURENÇO, L. B.; GARCIA, P. C. A.; RECCO-PIMENTEL, S. H. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. **Hereditas**, v. 133, p. 201–209, 2000.
- LOURENÇO, L. B; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence in situ hybridization. **Chromosome Research**, v. 6, p. 621–628, 1998.
- LUCCA, E.J.; JIM, J.; FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia**, v.27, p. 183-192, 1974.
- LYNCH, M. Gene duplication and evolution. **Science**, v. 297, p. 945-947, 2002.
- MAACK, R. Geografia Física do Paraná. **Olympio**, Rio de Janeiro, Brasil, v. único, p.442, 1981.
- MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Soleasenegalensis*: a new linkage to the *U1*, *U2*, and *U5 small nuclear RNA* genes. **Genome**, v. 49, p. 79-86, 2006.
- MANDRIOLI, M.; CUOGHI, B.; MARINI, M.; MANCARDI, G. C. Localization of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric repeat in the chromosomes of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Hamilton Buchanan)(Osteichthyes). **Caryologia**, v. 52, p. 155-157, 1999.
- MANSOUR, A. Epigenetic activation of genomic retrotransposons. **Journal of Cellular and Molecular**, v. 6, p. 99-107, 2007.
- MARINO-RAMIREZ, L.; LEWIS, K.C.; LANDSMAN, D.; JORDAN, I.K. Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 333–341, 2005.
- MATTOS, T. L. **Abordagem citogenética clássica e molecular de sete espécies amazônicas de *Hypsiboas* (Lissamphibia, Anura, Hyliidae)**. Dissertação (Mestrado em genética, conservação e biologia evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia (INPA), Manaus, 2013.

- MATTOS, T. L., COELHO, A. C., SCHNEIDER, C. H., TELLES, D. O., MENIN, M., GROSS, M. C. Karyotypic diversity in seven Amazonian anurans in the genus *Hypsiboas* (Family Hylidae). **BioMed Central**, v. 15, p. 1-13, 2014.
- MAXON, R.; COHN, R.; KEDES, L. Expression and organization of histone genes. **Annual Review of Genetics**, v. 17, p. 239–277, 1983.
- MEDEIROS, L. R.; ROSSA-FERES, D. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla snborni* (Anura, Hylidae), with description of NOR polymorphism in *H. nana*. **Journal of Heredity**, v. 94, p. 149-154, 2003.
- MENDELSON, D.; ZOHARY, D. Behavior and transmission of supernumerary chromosome in *Aegilops speltoides*. **Heredity**, v. 29, p. 329-339, 1972.
- MENIN, M.; WALDEZ, F.; LIMA, A. P. Temporal variation in the abundance and number of species of frogs in 10.000ha of a forest in central Amazonia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 3, p. 68-81, 2008.
- MERLO, M. A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J. L.; ÚBEDA-MANZANARO, M.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. **BioMed Central Evolutionary Biology**, v. 12, p. 201, 2012.
- MISKEY, C.; IZSVÁK, Z.; PLASTERK, H. R.; INVICS, Z. The frog Prince: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells. **Nucleic Acid Research**, v. 31, p. 6873-6881, 2003.
- MONASTERSKY, R. Life – a status report. **Nature**, v. 516, p. 158-161, 2014.
- MORAES, S.; KNOLL-GELLIDA, A.; ANDRÉ, M.; BARTHE, C.; BABIN, P. J. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase I in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. **Physiology Genomics**, v. 28, p. 239-252, 2007.
- MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic forest. **Biotropica**, v. 32, p. 786-792, 2000.
- MORESCALCHI, A.; CHIARELLI, A. B.; CAPANNA, E. Cytotaxonomy and vertebrate evolution. **Academic Press**, v. 32, p. 233-248, 1973.
- MOURA, M. R.; MOTTA, A. P.; FEIO, R. N. An unusual reproductive mode in *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). **Zoologia**, v. 28, p. 142-144, 2011.
- MURRAY, G. M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.
- NOLETO, R. B.; AMARO, R. C.; VERDADE, V. K.; CAMPOS, J.R.C.; GALLEGO, L. F. K.; LIMA, A. M. X.; RODRIGUES, M. T.; TOLEDO, L. F. Comparative cytogenetics of eight species of *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 250, p. 205-2014, 2011.
- NUNES, R. R. A.; FAGUNDES, V. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species group. **Genetic Molecular Biology**, v. 31, p. 982-987, 2008.
- NUR, U. Mitotic instability leading to an accumulation of B chromosomes in grasshoppers. **Chromosoma**, v. 27, p. 1-19, 1969.



- OLIVEIRA, H. P.; **Diversidade genética de híldeos do Brasil Central**. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- OLIVEIRA, H. P.; SOUZA, C. C. N.; RIBEIRO, C. L.; CRUZ, A. D.; BASTOS, R. P.; MELO-SILVA, D. Citogenética comparativa das famílias Leptodactylidae e Hylidae do cerrado goiano. **Estudos Vida e Saúde**, v. 37, p. 725-735, 2010.
- OLIVEIRA, N. L.; CABRAL-de-MELLO, D. C.; ROCHA, M. F.; LORETO, V.; MARTINS C.; MOURA, R. C. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. **Molecular Cytogenetics**, v. 10, p. 4-24, 2011.
- OLSON, D. H.; RONNENBERG, K. L. Global *Bd* mapping project: 2014 update. **FrogLog**, v. 111, p. 17-21, 2014.
- OHTA, S. Mechanisms of B-chromosome accumulation in *Aegilops mutica* Boiss. **Genes & Genetic Systems**, v. 71, p. 23-29, 1996.
- PAIVA, C. R.; NASCIMENTO, J.; SILVA, A. P. Z.; BERNARDE, P. S.; ANANIAS F. Karyotypes and Ag-NORs in *Phyllomedusa camba* De La Riva, 1999 and *P. rhodei* Mertens, 1926 (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae): cytotaxonomic considerations. **Italian Journal of Zoology**, v. 77, p.116–121, 2010.
- PARRIS, K. M. Environmental and spatial variables influence the composition of frog assemblages in sub-tropical eastern Australia. **Ecography**, v. 27, p. 392-400, 2004.
- PEREIRA, A. B. Mata atlântica: Uma abordagem geográfica. **Nucleus**, v. 1, p. 27-53, 2009.
- PERFECTTI, F.; WERREN, J. H. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. **Evolution**, v. 55, p. 1069-1073, 2001.
- PELLICCIA, F.; BARZOTTI, R.; BUCCIARELLI, E.; ROCCHI, A. 5S ribosomal and *U1 small nuclear RNA* genes: a new linkage type in the genome of a crustacean that has three different tandemly repeated units containing 5S ribosomal DNA sequences. **Genome**, v. 44, p. 331-335, 2001.
- PIECZARKA, J. C.; MATTEVI, M. Heterocromatina constitutiva. Série Monografias. **Sociedade Brasileira de Genética**, v. 7, p. 248, 1998.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of national Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938. 1986.
- PLASTERK, R. H.; IZSVÁK, Z.; IVICS, Z. Resident aliens: the Tc1/Mariner superfamily of transposable elements. **Trends in genetics**, v. 15, p. 26-332, 1999.
- PONS, J.; GILLESPIE, R. G. Common origin of the satellite DNAs of Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. **Gene**, v. 313, p. 169–177, 2003.
- PONTECORVO, G.; DE FELICE, B.; CARFAGNA, M. A novel repeated sequence DNA originated from a TC-1 like transposon in water green frog *Rana esculenta*. **Gene**, v. 261, p. 205-210, 2000.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M; HEISER, J. B. Salamandras, Anuros e Cecílias. A vida dos vertebrados. **Atheneu Editora**, v. 8, p. 220-263, 2008.

- POUNDS, J. A.; BUSTAMANTE, M. R.; COLOMA, L. A.; CONSUEGRA, J. A.; FOGDEN, M. P. L. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature**, v. 439, p.161-167, 2006.
- PLÖTNER, J.; KÖHLER, F.; UZZELL, T.; SCHREIBER, P. B. R.; GASTON-DENIS, G.; HOTZ, H. Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 50 truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia) **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, p. 784–791, 2009.
- PRITHAM, E.J. Transposable elements and factors influencing their success in eukaryotes. **Journal of Heredity**, v. 100, p. 648-655, 2009.
- QIN, Q.; WANG, J.; WANG, Y.; LIU, Y.; LIU, S. J. Organization and variation analysis of 5S rDNA in gynogenetic offspring of *Carassius auratus* red var. (♀) × *Megalobrama amblycephala* (♂). **BioMed Central Genetics**, v. 16, p. 26, 2015.
- RABELLO, M.N.; BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W. Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. **Arquivos do Museu Nacional**, v.54, p. 285-286, 1971.
- RABELLO, M. N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, v. 23, p. 45–59, 1970.
- RABER, S. C.; CARVALHO, K. A.; GARCIA, P. C.; VINCIPROVA, G.; RECCOPIMENTEL, S. M. Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). **Phyllomedusa**, v. 3, p. 43-49, 2004.
- RIBEIRO, R. S.; EGITO, G. T. B. T.; HADDAD, C. F. B. Chave de Identificação: Anfíbios Anuros da Vertente de Jundiá da Serra do Japi, Estado de São Paulo - **Biota Neotropica**, v. 5, p. 1-36, 2005.
- RIO, D. C. RNA processing. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 4, p. 444-452, 1992.
- ROCCHI, M.; ARCHIDIACONO, N.; SCHEMPP, W.; CAPOZZI, O.; STANYON, R. Centromere repositioning in mammals. **Heredity**, v. 108, p. 59–67, 2012.
- SASHITAL, D. G.; VENDITTI, V.; ANGERS, C. G.; CORNILESCU, G.; BUTCHER, S. E. Structure and thermodynamics of a conserved *U2 snRNA* domain from yeast and human. **RNA**, v. 13, p. 328-338, 2007.
- SBH. Brazilian amphibians – **List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2017. Disponível em: <[www.http://sbhepatologia.org.br/](http://sbhepatologia.org.br/)>. Acesso em: 6 de setembro de 2017.
- SCHEMBERGER, M. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C. MOREIRA-FILHO, O.; CESTARI, M. M.; VICARI, M. R.. Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). **Gene**, v. 593, p. 308-314, 2016.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I: Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, v. 66, p. 361-388. 1978.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia VII: Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, v. 87, p. 327-344. 1982.
- SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; NANDA, I.; EPPLER, J. T. Chromosome banding in Amphibia. Birkhauser Verlag. **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**, v. 101, p. 21-45, 1990.

- SCHMID, M.; BOGART, J. P.; HEDGES, S. B. The chromosomes of Terraranan frogs: Insights into vertebrate cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 1, p. 130-131, 2010.
- SHAPIRO, J.A.; STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological Reviews**, v. 80, p. 227-250, 2005.
- SIMPSON, R. T. Structure of chromosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. **Biochemistry**, v. 17, p. 5524-5531, 1978.
- SINZELLE, L.; IZSVAK, Z., IVICS, Z. Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 1073-1093, 2009.
- SINZELLE, L.; POLLET, N.; BIGOT, Y.; MAZABRAUD, A. Characterization of multiple lineages of TC1-Like elements within the genome of the amphibian *Xenopus tropicalis*. **Gene**, v. 349, p. 187-196, 2005.
- SIQUEIRA, S.; ANANIAS, F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of three species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) from southeastern Brazil. **Genetic Molecular Biology**, v. 27, p. 363-372, 2004.
- SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSEM, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 272-285, 2007.
- SUÁREZ, P.; CARDOZO, D.; BALDO, D.; PEREYRA, M. O.; FAIVOVICH, J.; ORRICO, V. G. D.; CATROLI, G. F.; GRABIELE, M.; BERNARDE, P. S.; NAGAMACHI, C. Y.; HADDAD, C. F. B.; PIECZARKA, J. C. Chromosome evolution in *Dendropsophini* (Amphibia, Anura, Hylinae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, p. 295-308, 2013.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUMNER, A. T. Chromosomes: organization and function. **Blackwell Publishing**, v. 1, p. 304, 2003.
- TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 132-138, 2005.
- TARGUETA, C. P.; RIVERA, M.; SOUZA, M. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; LOURENÇO, L. B. Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura; Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetic relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 709-725, 2010.
- TEIXEIRA, L. S. R.; SEGER, K. R.; TARGUETA, C. P.; ORRICO, V. G. D.; LOURENÇO, L. B. Comparative cytogenetics of tree frogs of the *Dendropsophus marmoratus* (Laurenti, 1768) group: conserved karyotypes and interstitial telomeric sequences. **Comparative Cytogenetics**, v. 10, p. 753-767, 2016.
- TOLEDO, L. F.; GAREY, M. V.; COSTA, T. R. N.; LOURENÇO-DEMORAES, R.; HARTMANN, M. T.; HADDAD, C. F. B. Alternative reproductive modes of Atlantic forest frogs. **Journal of Ethology**, v. 30, p. 331-336, 2012.
- TOVAR-RODRÍGUEZ, W. T.; CHACÓN-ORTIZ, A.; DURÁN, R. D. J. Abundancia, disposición espacial e historia natural de *Hypsiboas lanciformis* (Anura: Hylidae) al suroeste

de los Andes Venezuelanos. **Revista Académica Colombiana Científica**, v. 127, p. 193-200, 2009.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M. A.; PALAZÓN, J. L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA) n and *U2 snRNA* gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**, v. 138, p. 787-794, 2010.

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **EMBO Journal**, v. 21, p. 5955–5959, 2002.

UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, C. O. F. Comparative chromosome mapping of *U2 snRNA* and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. **Cytogenetic Genome Research**, v. 142, p. 286-292, 2014.

VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysts of premRNA splicing. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 603-608, 2005.

VIEIRA, S. C. **Caracterização cromossômica de espécies do grupo de *Hyla polytaenia* (Anura, Hylidae)**. Dissertação (Mestrado em biologia celular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

VOLFF, J. N.; BOUNEAU, L.; OZOUF-COSTAZ, C.; FISHER, C. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **Trends in Genetics**, v. 19, p. 674-678, 2003.

WELLS, K. D. The ecology and behavior of amphibians. **The University of Chicago Press**, v. 1, p. 26-102, 2007.

WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 225-249, 2000.

WEST, S. The increasing functional repertoire of *U1 snRNA*. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, p. 846-849, 2012.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 973–982, 2007.

WIENS, J. J.; FETZNER, J. W.; PARKINSON, C. L.; REEDER, T. W. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. **Systematic Biology**, v. 54, p. 716-748, 2005.

WINKELMANN, L.; NOLETO, R. B. Caracterização cariotípica de *Phyllomedusa tetraploidea* (Anura, Hylidae), proveniente da Mata Atlântica paranaense. **Revista Luminária**, v. 1, n. 1, p. 146-157, 2015.

YODER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOS, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends in Genetics**, v. 13, p. 335-340, 1997.

YU, S. L.; LEE, H.Y. Comparative karyological analysis of the Korean tree frogs, *Hyla japonica* and *Hyla suweonensis* (Anura, Hylidae). **Korean Journal of Zoology**, v. 33, p. 1-5, 1990.

**ANEXOS**

## ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

### CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 016/2018

Protocolo UEPG – 8182/2018

Título – Projeto de pesquisa “Isolamento, caracterização e mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em espécies da família Hylidae”.

Interessada: Profa. Viviane Nogaroto Vicari (DEBIOGEM, [vivianenogaroto@uepg.br](mailto:vivianenogaroto@uepg.br))

Data de Entrada – 21/05/2018

Prezada Professora Viviane

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da utilização de até 30 anfíbios da família Hylidae.

Dionizia Xavier Scomparin  
Coordenadora CEUA

Ponta Grossa, 22 de junho de 2018.

**ANEXO B: OBTENÇÃO DE METÁFASES MITÓTICAS, SEGUNDO BALDISSERA, OLIVEIRA E KASAHARA (1993), COM ADAPTAÇÕES.**

- Injeção abdominal intraperitoneal de solução aquosa de fermento biológico e dextrose na proporção 1:2;
- Após 48 h, injeção abdominal intraperitoneal de solução de colchicina 0,1 % (0,1 mL / 10g de massa corporal);
- Após 4 h, anestésiar o espécime com lidocaína 5 % e extrair a medula óssea;
- Tratar com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075 M;
- Desagregar o tecido até a obtenção de uma solução homogênea e deixar descansar por 40 min na solução de KCl a 37°C;
- Pingar três gotas de fixador (metanol e ácido acético na proporção 3:1) e deixar em descanso por 10 min;
- Centrifugar por 10 min à 6000 rpm (rotações por minuto) e descartar o sobrenadante;
- Completar com solução de fixador, re-suspender o material;
- Centrifugar por 10 min a 6000 rpm, descartar o sobrenadante
- Completar com solução de fixador, re-suspender o material;
- Repetir esse processo mais duas vezes e armazenar 2 mL do material no congelador.

**ANEXO C: COLORAÇÃO CONVENCIONAL COM GIEMSA.**

- Pingar duas gotas da solução em lâmina limpa sobre vapor de banho-maria a 50°C, aguardando até a completa secagem do material;
- Corar com solução de Giemsa 5 % em tampão fosfato com pH 6,8, durante 10 min;
- Retirar o excesso de corante com água destilada e aguardar a completa secagem antes de analisar.



**ANEXO D: TÉCNICA DE BANDAMENTO C PARA DETECÇÃO DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA, DESCRITA POR SUMNER (1972), COM MODIFICAÇÕES.**

- Após a montagem as lâminas envelheceram por 1 dia à 45°C e então foram mergulhadas em de solução 0,2 M de ácido clorídrico (HCl) durante 15 min à 25°C e depois lavadas com água destilada;
- Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de hidróxido de bário  $Ba(OH)_2$  5 % à 25°C, permanecendo por 3 min e 10 s;
- Após esse tempo o material foi lavado em solução de HCl 1 M e em seguida em água destilada;
- As lâminas seguiram então para mergulho em solução salina 2 x SSC à 50°C, durante 25 min;
- Finalmente foram então lavadas com água destilada e coradas com Giemsa 5 % por 10 min para posterior análise.

**ANEXO E: DETECÇÃO DE REGIÃO ORGANIZADORA DE NUCLÉOLO POR ARGENTON, DESCRITA POR HOWELL E BLACK (1980), COM MODIFICAÇÕES.**

- Após o preparo das lâminas, pingar uma gota solução de gelatina incolor e duas gotas de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) à 50 %;
- Cobrir cuidadosamente com lamínula e levar para incubar em câmara úmida à 60 °C por 3 min ou até a solução adquirir coloração castanho-dourado;
- Lavar com água destilada e deixar secar naturalmente.

**ANEXO F: EXTRAÇÃO DE DNA SEGUNDO O MÉTODO CTAB, DESCRITO POR MURRAY E THOMPSON (1980), COM MODIFICAÇÕES.**

- Adicionar em um tubo de 1,5 mL ~ 0,2 g de tecido muscular juntamente com 240 µl de tampão CTAB (concentração final: 5 % de CTAB; 5 M de NaCl; 0,5 M EDTA; 1 M TrisHCl pH8), 13 µl de proteinase K (10 mg/mL) e 5 µl de β-mercaptoetanol;
- Incubar à 60 °C em banho-maria, 16 h ou até o tecido ser totalmente digerido;
- Em seguida adicionar 600 µl de clorofórmio e homogeneizar suavemente durante 5 min;
- Centrifugar por 5 min à 8000 rpm, retirar o sobrenadante e transferir para um tubo novo;
- Adicionar 600 µL de etanol absoluto e deixar a -20 °C por 1 h;
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 min e descartar o sobrenadante;
- Lavar o *pellet* com 500 µl de etanol 70 % e centrifugar novamente a 14000 rpm por 2 min, retirar o sobrenadante e deixar o tubo com o DNA secando na estufa a 37 °C;
- Resuspender o *pellet* com 15µL de H<sub>2</sub>O, adicionar 5 µL de RNase e deixar 2 h à 37 °C;
- Por fim, deixar 15 min à 65°C.

**ANEXO G: HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) DESCRITO POR PINKEL, STRAUME E GRAY (1986), COM MODIFICAÇÕES.**

Preparação das Lâminas e Hibridação

- Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min., em temperatura ambiente;
- Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada;
- Incubar as lâminas em 100 µl de RNase (0,4 % RNase/2xSSC) a 37°C por 1 h em câmara úmida com água milli-Q;
- Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC;
- Lavar durante 5 min em PBS 1x;
- Incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10 mM HCl), a 37°C ;
- Lavar em PBS 1x durante 5 min (shaker) em temperatura ambiente;
- Fixar em paraformaldeído 4% durante 10 min em temperatura ambiente;
- Lavar em PBS 1x por 5 min;
- Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70,85, 100 %) por 5 min cada, voltar cada álcool em seu frasco;
- Simultaneamente a desidratação em série alcoólica, desnaturar a solução de hibridação à 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo;
- Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC, a 70°C por 4 min;
- Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada;
- Preparar a câmara úmida a 37°C ;
- Montar cada lâmina com 40 µl de solução de hibridação, cobrir com lamínulae deixar overnight a 37°C;

Lavagens

- Lavar 4 vezes em formamida 15 %/0,2xSSC pH 7.0 à 42 °C durante 5 min cada;
- Lavar durante 5 min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, temperatura ambiente;

#### Detecção e amplificação do Sinal

- Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 min;
- Lavar 2 x 5 min com Tween 0,5%/4xSSC, em temperatura ambiente;
- Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1 µl FITC/100 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;
- Lavar 3 x 5 min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
- Incubar com 90 µl de antidigoxigenina conjugada com rodamina (0,5 µl /100 µl de NFDM) durante 1 h em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;
- Lavar 3 x 5 min com Tween 0,5%/4xSSC em temperatura ambiente;
- Desidratar em álcool 70 (descartar), 85 e 100%, 5 min. cada;

#### Montagem da Lâmina

- Misturar 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI - 4'-6 diamidino - 2 - phenilindole (50 µg/ml);
- Colocar a solução e cobrir com lamínula;
- Guardar no escuro.