

CRISTINA ROSA

ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Megaelosia (ANURA, HYLODINAE)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>Cristina Rosa</i>	e aprovada pela Comissão Julgadora.
--	-------------------------------------

Shirlei Maria Recco-Pimentel

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

UNIDADE SDC
 V. CHAMADA: T/ UNICAMP
R71e
 V. 16 E. 893
 TOMBO B. 16-892/01
 PROC. 16-892/01
 C ☐ D ☒ X
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 02/11/01
 N.º CPD

CM00161213-1

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Rosa, Cristina

R71e Estudo citogenético em espécies do gênero *Megaelosia* (Anura, hylodinae)/Cristina Rosa. -- Campinas, SP:[s.n.], 2001
56f.:ilus.


Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Cromossomos. 2. Cariótipos. 3. Citogenética. I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da Defesa: 12/ 07 / 2001

Banca Examinadora

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Mithitaka Soma


Assinatura

Prof. Dr. Maurício José Lopes Vaz do Amaral


Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

À minha mãe, sempre presente.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pela oportunidade, excelente orientação e grande paciência;

Aos Profs. Drs. Mithitaka Soma, Maurício José Lopes Vaz do Amaral, Mary Anne Heidi Dolder, pelas sugestões na análise inicial deste trabalho;

Ao Odair Aguiar Junior, pela amizade e pelo imprescindível auxílio prestado na realização deste trabalho;

À Luciana Bolsoni Lourenço, pelas preciosas sugestões oferecidas durante a realização da tese;

À Klélia Aparecida de Carvalho, pelo apoio técnico, importante para a realização deste trabalho;

À Vinicius Bonato, Glaucio Machado e Cláudio Patto, pela coleta dos exemplares de *M. massarti*;

Ao Prof. Dr. Ariovaldo Antônio Giaretta, pela colaboração nos trabalhos de campo, e valiosas sugestões, essenciais para a concretização deste trabalho;

Aos Profs. do Departamento de Biologia Celular, pelos ensinamentos oferecidos e agradável convivência;

Aos amigos do laboratório, Ana Cristina, Odair, Luciana, Lilian, Klélia, Fernando, Maurício, Marta e Aline, pela amizade, pela agradável convivência e principalmente pelo auxílio nos momentos difíceis;

Aos amigos da pós-graduação Arnaldo, Patrícia, Francisco, Bel, Sílvia e João Marcos, pela descontração e amizade;

À Lilian, secretária do Departamento de Biologia Celular, essencial na finalização deste trabalho;

Aos amigos do laboratório do Hospital Municipal de Americana, Hospital Municipal Dr. Mário Gatti, especialmente ao Alberto, Adauton Guidolin e Dra. Helenice H. K. Rígitano, grandes incentivadores deste trabalho;

Aos colegas da Clínica Nova Veneza, Márcia, Rose, Gislaine e Luzia, pela paciência em dias difíceis;

À grande amiga Daisy Campos, pelo carinho, amizade, paciência e principalmente pela ajuda indispensáveis para a realização deste trabalho;

À amiga Flávia e ao Leonardo, pela grande ajuda, convivência e paciência em dias ruins;

Ao meu pai, minha mãe (*in memoriam*), aos meus irmãos e ao querido Lucas, pela atenção e carinho;

Ao Fábio pelo amor incondicional e pela paciência dedicados no decorrer deste trabalho;

E finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	8
Abstract.....	10
1. Introdução.....	12
1.1. A Subfamília Hylodinae e o Gênero <i>Megaelosia</i>	12
1.2. Citogenética de <i>Hylodinae</i>	14
1.3. Heterocromatina.....	15
1.4. Região Organizadora do Nucléolo	17
1.5. Cromossomos B.....	18
1.6. Fotos	21
1.7. Justificativa.....	22
1.8. Objetivos	23
1.9. Referências bibliográficas	24
2. Artigo	31
Abstract.....	32
Introduction.....	33
Materials and Methods.....	34
Results.....	35
Discussion.....	36
Legends.....	42
Figures	43
References	51
3. Conclusões gerais.....	56

Resumo

O gênero *Megaelosia*, subfamília Hylodinae, ocorre na Mata Atlântica da região sudeste do Brasil. Há poucos estudos realizados com este gênero, principalmente, devido à dificuldade de captura dos exemplares e à sua raridade. As espécies de *Megaelosia* apresentam características morfológicas e comportamentais peculiares dentro da subfamília, tais como a presença de indivíduos quatro a cinco vezes maiores em relação aos outros Hylodinae e o fato de sua vocalização nunca ter sido ouvida. Neste trabalho foram analisadas citogeneticamente as espécies *M. massarti*, *M. boticariana* e *M. lutzae* com o objetivo de contribuir com novos caracteres para o estudo das relações intergenéricas na subfamília Hylodinae e desta com outros anuros. As preparações cromossômicas foram obtidas por suspensão celular do epitélio intestinal, e submetidas à coloração convencional por Giemsa e às técnicas de Ag-NOR e bandamento C. Foram confirmados os números anteriormente descritos, de $2n=28$ cromossomos para *M. massarti*, (Paranapiacaba, SP) e de $2n=30$ para *M. boticariana* (Atibaia, SP). Um novo número cromossômico foi encontrado em *M. lutzae* (Pindamonhangaba, SP) que apresentou $2n=32$ cromossomos. Dois tipos de cromossomos supernumerários foram encontrados em dois espécimes de *M. massarti*: um cromossomo pequeno totalmente heterocromático e um grande contendo apenas heterocromatina telomérica. As três espécies de *Megaelosia* estudadas mostraram número cromossômico maior em relação aos outros Hylodinae, *Hylodes* e *Crossodactylus*, que possuem número modal $2n=26$ cromossomos. A NOR foi localizada no par 3 nos cariótipos de *M. massarti* com $2n=28$ e $2n=29$ cromossomos. Em *M. boticariana*, a NOR localiza-se no par 1 enquanto em *M. lutzae* ela se encontra no par 15. Todas as NORs coincidiram com uma constrição secundária e com um bloco de heterocromatina. Nas três espécies também foi detectada heterocromatina em quase todos os telômeros e centrômeros, além de um grande bloco pericentromérico no braço curto do par 10, características também observadas nos cariótipos que apresentaram cromossomos supernumerários. Rearranjos cromossômicos, do tipo fusão e/ou fissão cêntrica, inversões e translocações parecem ter tido um importante papel na evolução e na origem da variabilidade detectada nos cariótipos dessas espécies. Os resultados obtidos mostram que as espécies de *Megaelosia* aqui estudadas diferem bastante citogeneticamente das espécies de *Hylodes* e *Crossodactylus*, o

que sugere uma revisão cuidadosa da relação de parentesco dentro da subfamília Hylodinae. Além disso, os cariótipos de *Megaelosia* não parecem contribuir com caracteres importantes para corroborar a hipótese de relação desta subfamília com dendrobatídeos.

Abstract

The genus *Megaelosia* (Leptodactylidae, Hylodinae) is endemic to the Atlantic forest of southeastern Brazil, but is still poorly studied, mainly because of the limited numbers of specimens available and the difficulty in collecting new ones. Peculiar morphological and behavioral features distinguish this genus from the other Hylodinae. These features include the largest body size within the subfamily and the absence of announcement call. In this work, specimens of *M. massarti*, *M. boticariana* and *M. lutzae* were karyotyped in order to study their intergeneric relationships, as well as the Hylodinae/Dendrobatidae affiliations. Chromosome preparations were obtained from a suspension of intestinal cells and stained conventionally with Giemsa or were processed for C-banding and Ag-NOR staining. *M. massarti* (from Paranapiacaba, SP) and *M. boticariana* (from Atibaia, SP) had $2n=28$ and $2n=30$ chromosomes, respectively, in agreement with previous data. In contrast, *M. lutzae* (from Pindamonhangaba, SP) had $2n=32$ chromosomes, a new diploid number for this genus. Two specimens of *M. massarti* had one supernumerary or B chromosome with morphotypes that differed from each other. The marked variation in chromosome number and morphology in the species studied here, differentiates *Megaelosia* from the genera *Hylodes* and *Crossodactylus*, which have more conservative karyotypes. Ag-NOR labeling showed that the NOR was on the short arm of pair 3 in *M. Massarti*, on pair 1 in *M. boticariana* and on the telocentric pair 15 in *M. lutzae*. The secondary constriction where the NOR was located was homeologous among the three karyotypes. They also shared a conspicuous heterochromatic block coincident with the NOR and a large C-block on the short arm of pair 10. Heterochromatin was found mainly in the telomeric and centromeric regions of most chromosomes in the three species. No additional homologies were detected by C-banding analysis. The small B chromosome of *M. massarti* was fully heterochromatic, while only weak telomeric C-bands were found in the large B. The A chromosome complement of the 29-chromosome karyotypes showed the same banding pattern as in the standard karyotype. Fusion and/or fission mechanisms, as well as other rearrangements, probably contributed to the karyotypic differentiation in *Megaelosia*. The karyotypic data represent a further characteristic for distinguishing *Megaelosia* from *Hylodes* and *Crossodactylus*, and suggest the need for a careful

reassessment of the classification of this genus within the subfamily Hylodinae. In addition, the karyotypical features of the three species of *Megaelosia*, studied here, contribute little to the elucidation of Hylodinae/Dedrobatidae relationships.

1 - INTRODUÇÃO

1.1. A Subfamília Hylodinae e o Gênero *Megaelosia*

A ordem Anura apresenta atualmente 29 famílias e cerca de 4.200 espécies descritas (Frost, 2000), sendo a mais numerosa dentro da Subclasse Lissamphibia, a qual conta ainda com as ordens Caudata (salamandras) e Gymnophiona (cecílias) (Duellman & Trueb, 1986). Os anfíbios anuros estão distribuídos pelo mundo todo e ocupam uma grande diversidade de habitats, sendo que pelo menos 1.600 espécies vivem na América do Sul (Zug, 1993; Duellman & Rodríguez, 1994).

A família Leptodactylidae possui 49 gêneros e 710 espécies agrupados em 4 subfamílias (Frost, 2000; Duellman & Trueb, 1986). A subfamília Hylodinae está dividida em três gêneros: *Hylodes* (17 spp), *Crossodactylus* (10 spp) (Frost 2000) e *Megaelosia* (5 spp) (Giaretta *et al.* 1993). Esta subfamília abriga espécies de rãs de hábitos diurnos, principalmente de riachos serranos do sudeste e sul do Brasil e norte da Argentina (Lutz, 1931; Lynch, 1971).

Atualmente, o gênero *Megaelosia* é constituído por 5 espécies: *Megaelosia goeldii* (Baumann, 1912), *M. massarti* (De Witte, 1930) (Foto 1), *M. lutzae* (Izecksohn & Gouvêa, 1985), *M. bocainensis* (Giaretta *et al.*, 1993) e *M. boticariana* (Giaretta & Aguiar-Jr., 1998) (Foto 2).

O gênero *Megaelosia* é endêmico da Mata Atlântica, sudeste do Brasil. Poucos estudos foram realizados com este gênero, devido à grande raridade de espécimes e dificuldade de coleta. Os indivíduos adultos são encontrados em riachos de água corrente, permanecendo escondidos a maior parte do tempo e mergulham rapidamente quando perturbados (Giaretta *et al.*, 1993).

Megaelosia difere dos demais gêneros desta subfamília por apresentar indivíduos com um tamanho quatro a cinco vezes maior. Os girinos também são grandes, podendo-se incluir os indivíduos deste gênero no grupo dos anfíbios gigantes (Cochran, 1955). Em indivíduos adultos nota-se dimorfismo sexual, pois a fêmea apresenta o dobro do tamanho do macho (Miranda-Ribeiro, 1923). Na Serra da Bocaina (SP), *M. goeldii* e *M. bocainensis* ocorrem em simpatria, sendo esta a única localidade conhecida onde ocorrem duas espécies

de *Megaelosia* (Giaretta *et al.*, 1993).

Apesar de *Megaelosia* possuir esqueleto diferente, maxilar e dentes maiores do que os espécimes dos outros gêneros de Hylodinae, Lynch (1971) manteve o gênero *Megaelosia* nesta subfamília, devido à presença de um par de sacos vocais laterais em *M. lutzae* e *M. massarti*, similares aos encontrados em *Hylodes*. Apesar da presença dos sacos vocais, o canto de *Megaelosia* nunca foi ouvido, sugerindo que esta espécie vocalize raramente ou não vocalize (Giaretta *et al.*, 1993). O comportamento reprodutivo de *Megaelosia* nunca foi observado (Giaretta *et al.*, 1993).

1.2. Citogenética de *Hylodinae*

Os dados citogenéticos de *Hylodinae* restringem-se basicamente à análise da morfologia dos cromossomos de poucas espécies. As espécies dos gêneros *Hylodes* e *Crossodactylus*, apresentam um conjunto diplóide típico de 26 cromossomos (Kuramoto, 1990; Bogart, 1991), à exceção de *Hylodes nasus* com $2n = 24$ cromossomos (Beçak, 1968; Bogart, 1970, 1991; Denaro, 1972; De Lucca & Jim, 1974; Carvalho *et al.*, in prep.; Aguiar-Jr *et al.*, in prep.).

Apenas duas espécies do gênero *Megaelosia* foram analisadas citogeneticamente: *M. massarti* que apresenta $2n = 28$ cromossomos (Melo *et al.*, 1995) e *M. boticariana* com $2n = 30$ cromossomos (Giaretta & Aguiar-Jr, 1998).

A única espécie de *Megaelosia* em que se conhece a localização da região organizadora do nucléolo é *M. massarti*, a qual coincide com uma constrição secundária no par 3 (Melo *et al.*, 1995). Nas espécies de *Hylodes* e *Crossodactylus*, constrições secundárias foram observadas nos pares 1 e 8, respectivamente (Beçak, 1968; Bogart, 1970, 1991; Denaro, 1972; De Lucca & Jim, 1974; Carvalho *et al.*, in prep.; Aguiar-Jr *et al.*, in prep.) e coincidem com NOR nas espécies *H. asper* (Carvalho *et al.* in prep.), *H. phylodes*, *Crossodactylus* sp 1, *Crossodactylus* sp 2 (Aguiar-Jr *et al.*, in prep.).

1.3. Heterocromatina

O termo heterocromatina foi introduzido por Heitz em 1928 (apud John, 1988) e foi utilizado para descrever a cromatina que permanece condensada durante todo o ciclo celular, descondensando apenas para a replicação do DNA. Embora a heterocromatina apresente a propriedade de heteropiconose, ou seja, propriedade de um determinado segmento cromossômico de apresentar condensação diferenciada em relação ao restante da cromatina (Schulz-Schaeffer, 1980; John, 1988), esta característica não é exclusividade sua, nem as propriedades heterocromáticas são limitadas à heteropiconose. Segundo John (1988), a heteropiconose pode ser devida a (1) eucromatina condensada, (2) a heterocromatina facultativa, termo que caracteriza as situações em que um dos cromossomos do par estaria condensado e parcialmente inativo, e, (3) a heterocromatina constitutiva, que contém seqüências de DNA repetitivas não codificantes e são permanentemente não transcritas. As heterocromatinas constitutivas estão localizadas nos centrômeros e telômeros, mas podem ser detectados também em regiões intersticiais dos cromossomos.

As principais características da heterocromatina constitutiva são sua universalidade, sua diversidade em relação à composição de bases de seu DNA e sua variabilidade quanto às mudanças na quantidade de heterocromatina do cariótipo (Sumner, 1990).

A variação da heterocromatina em espécies animais tem se mostrado importante na especiação. Espécies muito próximas podem diferir na quantidade de heterocromatina no genoma e também no número, localização e propriedades de coloração das bandas de heterocromatina (King, 1991).

Para sua detecção utiliza-se, geralmente, o método de bandamento C de Sumner (1972), que consiste na incubação do material em uma solução ácida para depuração do DNA, depois em uma solução alcalina, causando a quebra dos sítios apurínicos e desnaturando o DNA, seguida de uma solução salina aquecida, para retirar os resíduos das fases anteriores. Além do bandamento C, podem ser empregadas outras técnicas para a detecção da heterocromatina, com o uso de fluorocromos, enzimas de restrição e hibridação *in situ*. A análise de bandas C em Anura sugere um alto nível de variação interespecífica entre grupos taxonomicamente relacionados, que compartilham a mesma morfologia e o mesmo número cromossômico. É muito raro se encontrar duas espécies que tenham a

morfologia cromossômica idêntica em termos de distribuição e organização da heterocromatina (King, 1990). Os padrões da distribuição heterocromática no cariótipo permitem, muitas vezes, inferir o parentesco evolutivo entre espécies e podem ser também utilizados como um importante caráter sistemático, já que possibilitam inferir os rearranjos cromossômicos ocorridos durante a evolução do grupo (King, 1980, 1990). John (1988) atribui a heterocromatina constitutiva a função de facilitar o pareamento meiótico. Portanto, variações na heterocromatina poderiam causar problemas de pareamento provocando não-disjunções e produzindo uma barreira reprodutiva (John, 1988). Segundo Sumner (1990), o aparecimento de novas bandas heterocromáticas pode estar relacionado com: (1) translocação ou inversão de bandas já existentes, (2) transformação da eucromatina e (3) amplificação de seqüências de DNA.

1.4. Região organizadora do nucléolo (NOR)

A região organizadora do nucléolo é o sítio cromossômico que contém os genes de RNAr o qual é transcrito e processado no nucléolo. Esses genes estão repetidos e arrançados *in tandem* e estão separados por seqüências espaçadoras não transcritas (Long & David, 1980). Cada unidade repetida contém, em eucariotos, os genes de RNAr 28S, 18S e 5,8S, separados por seqüências transcritas que são eliminadas no processamento pós-transcricional.

Esses sítios podem ser detectados por métodos de impregnação por prata, os quais revelam os sítios onde estão localizados os genes que estiveram ativos no ciclo celular precedente. A técnica mais utilizada é a de Howell & Black (1980) que consiste em adicionar a uma solução aquosa de nitrato de prata a 50%, uma solução coloidal contendo gelatina diluída e ácido fórmico e incubar as lâminas em estufa a 65° C. Há evidências de que uma reação com proteínas não histônicas ricas em grupos sulfidril e dissulfito associadas as NORs ativas reduzam os sais de Ag à prata metálica, que então precipita nesses locais (Buys & Osinga, 1980).

A grande maioria dos anuros apresenta apenas um par de NOR, porém, a presença de NORs múltiplas foi detectada em algumas espécies como *Litoria raniformis* (King, 1980, Schmid, 1982, Schmid *et al.*, 1995). O tamanho das NORs é extremamente variável e heteromorfismos em NORs homólogas podem ser detectados em um grande número de animais. Schmid (1982) analisou 260 espécies de anuros e verificou que 67% dos indivíduos apresentavam NORs heteromórficas. A maioria desses heteromorfismos são atribuídos à duplicação, triplicação de um dos cístrons, deleção parcial ou trocas desiguais entre cromátides irmãs de uma das duas NORs (Schmid, 1982). Pode também ocorrer amplificação do rDNA em um dos cromossomos homólogos (King, 1990). Indivíduos com tamanhos diferentes de NORs possuem geralmente dois nucléolos de tamanhos diferentes no núcleo celular. O estudo das NORs tem contribuído para a melhor compreensão das relações filogenéticas e evolução cromossômica em várias espécies de anuros (King, 1991).

1.5. Cromossomos B

Os cromossomos B, também conhecidos como supernumerários ou cromossomos acessórios, são cromossomos adicionais que estão presentes em alguns indivíduos de algumas populações em determinadas espécies (Camacho & Parker, apud in Beukeboom, 1994). Esses cromossomos representam uma das maiores causas de variação cromossômica numérica existente em plantas e animais. Já foram descritos em mais de 1300 espécies de plantas e em cerca de 500 espécies de animais (Jones & Rees, 1982; Jones & Puertas, 1993).

Os cromossomos B foram descritos pela primeira vez por Wilson (1907) em hemípteros. Longley (1927) e Randolph (1928) detectaram supernumerários em *Zea mays* e os denominaram cromossomos B, para diferenciá-los do complemento A.

Algumas características permitem distinguir os cromossomos B dos demais. Os cromossomos B caracterizam-se pela ausência de emparelhamento com cromossomos do complemento A, não têm homologia no genoma e diferem morfologicamente daqueles do complemento A, sendo menores que aqueles na maioria das espécies. Em milho, os cromossomos B são distinguíveis devido à grande quantidade de heterocromatina (Beukeboom, 1994).

Os cromossomos B são extremamente variáveis em seus efeitos, morfologia e padrão de herança. Esses cromossomos apresentam herança não mendeliana. Em muitos casos, apresentam não-disjunção na anáfase da mitose, e por isso, apresentam frequência variável de um órgão para outro em um mesmo indivíduo. Os seus efeitos são usualmente cumulativos, dependendo de seu número e não de sua presença ou ausência. Em alguns organismos esses cromossomos têm sido relacionados à diminuição da fertilidade e redução do crescimento (Müntzing, 1974; Jones, 1975; Jones & Rees, 1982; Hewitt *et al.*, 1987; Suja *et al.*, 1986). O número máximo de cromossomos B que uma espécie é capaz de suportar é variável. Em algumas plantas foram encontrados 34 cromossomos B, envolvendo um aumento significativo no conteúdo de DNA (155%) (Jones & Rees, 1982). Em *Allium schoenoprasum* foram encontrados 20 cromossomos B (Bougourd *et al.*, 1995). Em anfíbios endêmicos da Nova Zelândia, pertencentes à espécie *Leiopelma hochstetteri*, foram evidenciados 15 cromossomos B mitoticamente estáveis (Green *et al.*, 1993). No

gafanhoto *Myrmeliotettix maculatus*, os cromossomos B desenvolvem lentamente, e não mais que três são toleráveis (Harvey & Hewitt, 1979). Os cromossomos B apresentam ainda polimorfismo de tamanho e de banda, como ocorre no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, que apresenta cerca de 14 cromossomos supernumerários diferentes.

A hipótese mais aceita para explicar a origem dos cromossomos B é a de que eles provêm do grupo autossômico normal (Jones & Rees, 1982), sendo considerados portanto, como um simples produto de evolução do cariótipo padrão. Assim, um cromossomo B poderia derivar de cromossomos A trissômicos, de fragmentos cêntricos, de fusão dos cromossomos A ou ainda por amplificação de regiões paracentroméricas na fragmentação de cromossomos A. A primeira evidência a favor da última hipótese foi obtida por Keyl & Hägele (1971), que demonstraram que o padrão de banda no cromossomo B do díptero *Chironomus plumosus* é similar ao padrão encontrado próximo ao centrômero do cromossomo 4.

Em alguns casos, cromossomos sexuais foram propostos como ancestrais de cromossomos B (Hewitt, 1973). Um exemplo dessa origem é o cromossomo B2 em gafanhoto, *E. plorans*, onde o arranjo de duas seqüências de DNA (180 pb repetidos *in tandem* e DNA ribossomal) coincide especificamente com o centrômero do cromossomo X (López-Leon *et al.*, 1994). Segundo estes autores, isto sugere que o cromossomo B em *E. plorans* foi derivado a partir da região paracentromérica do cromossomo X, com subsequente amplificação de dois tipos de seqüências ali presentes. Em *L. hochstetteri*, o cromossomo B parece ser derivado de um cromossomo sexual univalente W (heteromórfico), baseado na comparação de seqüências de DNA (Sharbel *et al.*, 1998) e similaridades morfológicas com o univalente cromossomo W (Green *et al.*, 1993).

Acreditava-se que os cromossomos B, por serem heterocromáticos em muitas espécies, seriam elementos geneticamente inertes. Entretanto, alguns cromossomos mostraram atividade transcricional, como é o caso do cromossomo em estado plumoso de *Leiopelma hochstetteri* (Green, 1988) ou ainda no estado politênico no mosquito *Simulium juxtacrenobium* (Green, 1991). Em alguns casos também foram encontrados cromossomos B carregando genes ribossomais (Green, 1990; Beukeboom, 1994; Jones, 1995).

A presença do cromossomo B pode também influenciar a expressão de NORs nos cromossomos A do gafanhoto *E. plorans*, isso ocorre devido à fusão cêntrica espontânea

entre o supernumerário B2 e o autossomo L1, interferindo na atividade da NOR, sendo esta menos ativa do que em um indivíduo sem nenhum cromossomo B (Cabrero *et al.*, 1987). Em anfíbios como *Dicamptodon tenebrosus* e *Scaphiophus hamondii*, os cromossomos B possuem genes para a região organizadora do nucléolo (Green, 1991). Foi também descrito que em *Avena sativa*, os genes presentes no cromossomo B conferem resistência para a ferrugem (Dherawattana & Sadanaga, 1973).

1.6. Fotos



Fotografia 1 – Espécime de *Megaelosia massarti*, coletado em Paranapiacaba (SP) (Foto de Ariovaldo Antônio Giaretta).



Fotografia 2 – Espécime de *Megaelosia boticariana*, coletada em Atibaia, (SP) (Foto de Ariovaldo Antônio Giaretta).

1.7. Justificativa

Dos três gêneros da Subfamília Hylodinae, o que foi menos estudado é *Megaelosia*, pois os espécimes são raros em coleções de museus e os adultos são de difícil captura, pois são diurnos e mergulham rapidamente na água corrente quando percebem qualquer movimento, ainda que discreto.

As espécies deste gênero apresentam diferenças morfológicas, comportamentais e ecológicas (Lynch, 1971; Giaretta *et al.*, 1993) marcantes em relação a *Hylodes* e *Crossodactylus*, embora a presença de sacos vocais semelhantes aos encontrados em *Hylodes* tenha justificado a sua permanência na sub-família Hylodinae. Lynch (1971) sugere também que certas características morfológicas são mais parecidas com as de Telmatobiinae. Além disso, a análise citogenética prévia de duas espécies mostrou outras diferenças, já que *Megaelosia* apresenta um número maior de cromossomos do que *Hylodes* e *Crossodactylus*, variação interespecífica deste número e cariótipos diferentes. Portanto, o conhecimento mais aprofundado deste gênero contribuirá com o entendimento das relações filogenéticas dentro da subfamília Hylodinae.

Por outro lado, estes estudos também poderão ser úteis para a análise das relações filogenéticas entre Hylodinae e Dendrobatidae, já que esta hipótese foi levantada com base, principalmente, nas características morfológicas de *Hylodes* e de *Crossodactylus*. Em contrapartida à hipótese de origem dos dendrobatídeos a partir dos ranóídeos (Petroedetinae), defendida por alguns pesquisadores (Griffiths, 1963; Ford, 1993; Ford & Cannatella, 1993) a hipótese de que os dendrobatídeos teriam se originado dos hylodíneos foi levantada com base em características da musculatura superficial que parecem ocorrer apenas em Hylodinae, Dendrobatidae, *Hemisus*, *Zachaenus parvulus* e Sooglossidae (Burton, 1998) e apoiada por dados cariotípicos (Bogart, 1991). Segundo Ford (1993) e Grant *et al.* (1997), muitos dados ainda são necessários, de Hylodinae e Petroedetinae, para se poder colocar os dendrobatídeos mais convincentemente dentro da filogenia dos Neobatrachia. Nesse sentido, o conhecimento citogenético do gênero *Megaelosia*, contribuirá com novos caracteres também para esta análise.

1.8. Objetivos

- Caracterizar citogeneticamente algumas espécies do gênero *Megaelosia*.
- Contribuir com dados citogenéticos para o entendimento das relações filogenéticas dentro da subfamília Hylodinae e desta com os dendrobatídeos.

1.9. Referências Bibliográficas

- BAUMANN, F. Brasilianische Batrachier des Berner Naturhistorischen Museums. Zool. Jahrb., **Abt. F. Syst.**, **33**: 87-131, 1912.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of anura. **Caryologia** **21**(3): 191-208, 1968.
- BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B chromosome conference. **Heredity** **73**: 328-336, 1994.
- BOGART, J. P. Systematic problems in the amphibian Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. **Cytogenetics** **9**: 369-83, 1970.
- BOGART, J. P. The influence of the life history on karyotypic evolution in frogs. In: Green, D. M. & Sessions, S. K., eds. **Amphibian cytogenetics and evolution**. Academic Press, San Diego, pp. 233-258, 1991.
- BOUGOURD, S. M.; PLOWMAN, A. B.; PONSFORD, N. R.; ELIAS, M. L.; HOLMES, D. S. & TAYLOR, S. The case for unselfish B-chromosomes: evidence from *Allium schoenoprasum*. In: Brandham, P. E. & Bennet, M. D., eds. **Kew Chromosome Conference IV**. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, pp. 21-34, 1995.
- BURTON, T. C. Pointing the way: The distribution and evolution of some characters of the finger muscles of frogs. **American Museum of Natural History**. **3229**: 13, 1998.
- BUYS, C. H. C. M. & OSINGA, J. Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfite groups at chromosomal nucleolus organizing regions. A cytochemical study on the selective silver staining of NORs. **Chromosoma** **77**: 1-11, 1980.

- CABRERO, J.; ALCHÉ, J. D. & CAMACHO, J. P. M. Effects of B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* on nucleolar organizer regions activity. Activation of a latent NOR on a B chromosome fused to an autosome. **Genome** **29**: 116- 121, 1987.
- COCHRAN, D. M. Frogs of Southeastern of Brazil. **U.S. National Bulletin** **206**. Smithsonian Institution . pp. 333-335, 1955.
- DE LUCCA, E. J. & JIM, J. Os cromossomos de alguns Leptodactylidae (Amphibia-Anura). **Rev. Bras. Biol.** **34**(3): 407-410, 1974.
- DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae Anurans. **J. Herpetol.** **6**(1): 71-74, 1972.
- DE WITTE, G. F. Liste des reptiles et batraciens récoltés au Brésil par la mission Massart (1922-23) et description de sept nouvelles espèces. In: R. Bouillenne, P. Ledoux, P. Brien, and A. Navez, eds. **Une mission biologique belge au Brésil**, pp. 213-230 + 8 plates. Imprimerie Medicale et Scientifique (Soc. An.), Bruxelles, 1930.
- DERAWATTANA, A. & SADANAGA, K. Cytogenetics of a crown rust-resistant hexaploid oat with 42 + 2 fragment chromosomes. **Crop. Sci.** **13**: 591– 594, 1973.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill. New York, 1986.
- DUELLMAN, W. E.; & RODRÍGUEZ, L. O. **Guide to the Frogs of the Iquitos Region, Amazonian Peru**. University of Kansas Printing Service Lawrence, Kansas, 1994.
- FORD, L. S. The phylogenetic position of the dart-poison frogs (Dendrobatidae) among anurans: an examination of the competing hypotheses and their characters. **Ethol. Ecol. & Evol.** **5**: 219-231, 1993.

- FORD, L. S. & CANNATELLA, D. C. The major clades of frogs. **Herpetol. Monog.** 7: 94-117, 1993.
- FROST, D. R. **Amphibian Species of the World**. An online references. V2. 20, 2000.
- GIARETTA, A. A., BOKERMANN, W. C. A. & HADDAD, C. F. B. A review of the genus *Megaelosia* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new species. **J. Herpetol.** 27(3): 276-285, 1993.
- GIARETTA, A. A. & AGUIAR-JR., O. A new *Megaelosia* (Anura, Leptodactylidae-Hylodinae) from the Mantiqueira Range, Southeastern Brazil. **J. Herpetol.** 32(1): 80-83, 1998.
- GRANT, T.; HUMPREY, E. C. & MYERS, C. W. The median lingual process of frogs: A bizarre character of Old World ranoids discovered in South American dendrobatids. **American Museum of Natural History** 3212: pp. 40, 1997.
- GREEN, D. M. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: Extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. **Chromosoma** 95: 55-70, 1988.
- GREEN, D. M. Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome** 33: 818- 824, 1990.
- GREEN, D.M. Supernumerary chromosomes in amphibians. In: Green, M. G. & Sessions, S. K., eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. pp. 333-358, 1991.
- GREEN, D. M.; ZEYL, C. W. & SHARBEL, T. F. The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. **J. Evol. Biol.** 6: 417-441, 1993.

- GRIFFITHS, I. The phylogeny of the Salientia. **Biological Reviews** **38**: 241-292, 1963.
- HARVEY, A. W. & HEWITT, G. M. B-chromosomes slow development in a grasshopper. **Heredity** **42**: 397-401, 1979.
- HEWITT, G. M. Evolution and maintenance of B chromosomes. **Chromosomes Today** **4**: 351 – 369, 1973.
- HEWITT, G. M.; EAST, T. M. & SHAW, M. W. Sperm dysfunction produced by B-chromosomes in the grasshopper *Myrmeliotettix maculatus*. **Heredity** **58**: 59-68, 1987.
- HOWELL, W. M. & BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Experientia** **36**: 1014-1015, 1980.
- IZECKSOHN, E. & GOUVEA, E. Nova espécie de *Megaelosia*, de Itatiaia, Estado do Rio de Janeiro (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arq. Univ. Fed. Rural Rio de Janeiro**, Itaguaí, **8** (1-2): 17-22, 1985.
- JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: R. S. Verma, ed. **Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects**. pp. 1-128, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1988.
- JONES, R. N. B chromosome systems in flowering plants and animals. **Int. Rev. Cytol.** **40**: 1-100, 1975.
- JONES, R. N. & REES, H. B chromosomes. New York. Academic Press, 1982.
- JONES, R. N. Tansley review no. 85: B chromosomes in plants. **New Phytol.** **131**: 411-434, 1995.

- JONES, R. N. & PUERTAS, M. J. The B chromosomes of rye (*Secale cereale* L.). In: Dhir, K. K. & Sareen, T. S., eds. **Frontiers in plant science research**. pp 81- 112. Delhi: Bhagwati Enterprises, 1993.
- KEYL, H. G. & HÄGELE, K. B chromosomen bei *Chironomus*. **Chromosoma** **35**: 403 – 417, 1971.
- KING, M. C-banding studies on Australian hylid frogs. Secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** **94**, 45-58, 1980.
- KING, M. In: John, B.; Gwent, C., eds., **Animal Cytogenetics 4, Chordata 2, Amphibia**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1990.
- KING, M. Evolution of heterochromatin in the Amphibia genome. In: Green, M. G. & Sessions, S. K., eds., **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. pp. 359-391, 1991.
- KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. Educ.** **39**, 83- 127, 1990.
- LONG, E. O. & DAVID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Biochem.** **49**: 727-764, 1980.
- LONGLEY, A. E. The origin of diminutive B-type chromosomes in maize. **Am. J. Bot.** **43**: 18-22, 1927.
- LÓPEZ-LEON, M. D.; NEVES, N.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, T. S.; HEWITT, G. M. & CAMACHO, J. P. M. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Res.** **2**: 87- 92, 1994.

- LUTZ, A. Contribution to the knowledge of Brazilian batrachians. Taxonomy and biology of the Elosiinae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 24: 223-249, 1931.
- LYNCH, J. D. Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. **Univ. Kans. Mus. Nat. Hist. Misc. Publ.**, 53: 1-238, 1971.
- MELO, A. S., RECCO-PIMENTEL, S. M. & GIARETTA, A. A The karyotype of the stream dwelling frog *Megaelosia massarti* (Anura, Leptodactylidae, Hylodinae). **Cytologia** 60: 49-52, 1995.
- MIRANDA-RIBEIRO, A. *Elosia*, Tsch. e os gêneros correlatos. **Rev. Mus. Paulista** 12: 813-821, 1923.
- MORESCALCHI, A. Amphibia. In: Chiarelli, A.; Capanna, E., eds. **Cytotaxonomy and vertebrate evolution**. Academic Press, New York. pp. 233-248, 1973.
- MÜNTZING, A. Accessory chromosomes. **Ann. Rev. Genet.** 8: 243-266, 1974.
- RANDOLPH, L. F. Types of supernumerary chromosomes in maize. **Anat. Rec.** 41: 102, 1928.
- SHARBEL, T. F.; GREEN, D. M. & HOUBEN, A. B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome evolution. **Genome** 41: 14- 22, 1998.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87: 327-344, 1982.
- SCHMID, M.; FEICHTINGER, W.; WEIMER, R.; MAIS, C. BOLAÑOS, F. & LÉON, P. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus

- organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** **69**: 18-26, 1995.
- SCHULZ-SCHAEFFER, J. Cytogenetics, plants, animals, humans. 1 st ed. Vol 1. Springer-Verlag, New York, pp. 444 1980.
- SUJA, J. A.; GOSALVEZ, J.; LOPEZ-FERNANDEZ, C. & RUFUS, J. S. A cytogenetic analysis in *Psophus stridulus* (L.) (Orthoptera: Acrididae): B chromosomes and abnormal spermatid nuclei. **Genetica** **70**: 217-224, 1986.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell. Res.** **75**: 304-306, 1972.
- SUMNER, A.T. C-banding and related methods. In: **Chromosome banding**. Unwin Hyman, Ed. London, pp. 39-69, 1990.
- WILSON, E. B. The supernumerary chromosomes of Hemiptera. **Science** **26**: 870-871, 1907.
- ZUG, G. R. Amphibians. In: **Herpetology – An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, Inc. Washington, DC, 1993.

2. ARTIGO

Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B chromosome in a leptodactylid frog

¹Rosa, C.; ¹Aguiar-Jr., O.; ²Giaretta, A. A. & ¹Recco-Pimentel, S. M.

¹*Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, CP 6109, Campinas, São Paulo, Brasil.*

²*Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.*

ABSTRACT

Three species of the genus *Megaelosia* were studied karyotypically using conventional Giemsa staining, C-banding and NOR techniques. The karyotypes of *M. massarti* and *M. boticariana* agreed with data in the literature. *M. lutzae* had $2n=32$ chromosomes, a new diploid number for this genus and for the subfamily Hylodinae. Two morphotypes of B chromosomes were found in two specimens of *M. massarti*. The C-banding patterns and NOR location varied among the species. Nevertheless, some chromosome pairs, as well as the NOR-bearing secondary constriction and the large pericentromeric C-block on the short arm of chromosome 10, were homeologous among the three species. Fusion and/or fission events, as well as other rearrangements, probably contributed to the karyotypic differentiation in these species. These chromosomal data indicate that *Megaelosia* differs markedly from other Hylodinae and do not contributed to the assessment of the Hylodinae-Dendrobatidae affiliation.

Key words: *Megaelosia*; Hylodinae; B chromosomes; cytogenetics; karyotypes; C-band; Ag-NOR.

Send correspondence to: S. M. R. P. - Fone: +55-19-3788-6128

Fax: +55-19-3788-6111

E-mail: shirlei@unicamp.br

Running title: Cytogenetics of *Megaelosia*

INTRODUCTION

The subfamily Hylodinae (Leptodactylidae) includes diurnal anurans distributed in southern and southeastern Brazil and northern Argentina (Frost, 2000). The 32 species currently recognized in this subfamily are grouped into three genera: *Hylodes* (17 spp.), *Crossodactylus* (10 spp.) and *Megaelosia* (5 spp.) (Frost, 2000).

Megaelosia differs markedly from the other hylodines in morphology. However, the presence of paired lateral vocal sacs (considered a derived condition) in *M. lutzae* and *M. massarti*, which are similar to *Hylodes*, supports the retention of *Megaelosia* in the Hylodinae (Lynch, 1971).

Cytogenetic studies in Hylodinae have shown that *Hylodes* and *Crossodactylus* have a conservative chromosome number ($2n=26$), although a 24-chromosome karyotype was described for *Hylodes nasus* (Beçak, 1968; Denaro, 1972; De Lucca & Jim, 1974; Bogart, 1991; Aguiar-Jr. *et al.*, *in prep*; Carvalho *et al.*, *in prep*). *Megaelosia* has two karyotypes, with $2n=28$ chromosomes in *M. massarti* (Melo *et al.*, 1995) and $2n=30$ in *M. boticariana* (Giaretta & Aguiar-Jr., 1998).

The larger and variable chromosome number, the large body size (about four times larger than other hylodines), the dietary habits such as batrachophagy, and the absence of announcement call (Giaretta *et al.*, 1993) are special characteristics of *Megaelosia* species not found in the other two hylodine genera. In addition, the phylogenetic relationship between hylodines and dendrobatids remains controversial. Lynch (1971) proposed the origin of dendrobatids from the Hylodinae based on the morphological characteristics of *Hylodes* and *Crossodactylus*, and this was reinforced by Bogart (1991) based on karyological data for *Hylodes* species.

In this report, we provide a more complete cytogenetic analysis of three *Megaelosia* species, *M. massarti* (De Witte, 1930), *M. boticariana* (Giaretta & Aguiar-Jr, 1998) and *M. lutzae* (Izeckson & Gouvêa, 1985), in order to obtain chromosomal data for a phylogenetic analysis within the Hylodinae and also to assess the Hylodinae-Dendrobatidae affiliation. We also describe a new chromosome number ($2n=32$) in *M. lutzae*, and a B chromosome with two morphotypes in *M. massarti*.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Four specimens of *M. massarti* (3 adult females and 1 sub-adult) from Paranapiacaba, Santo André, eight tadpoles of *M. lutzae* from Pindamonhangaba and four tadpoles of *M. boticariana* from Atibaia were studied. The three municipalities are located in São Paulo state. The adult and sub-adult specimens were deposited in the "Professor Adão José Cardoso" Natural History Museum (ZUEC) of the Universidade Estadual de Campinas, Brazil, under accession numbers ZUEC 11395-11397 and 11553. The small number of specimens analyzed reflected the difficulty in collecting them.

Chromosome preparations and techniques

All the metamorphosed frogs received an intraperitoneal injection of 1% colchicine solution at least 4 h before killing, as described by Schmid *et al.* (1979). The tadpoles were kept alive in a 1% colchicine solution for 4-5 h. After treatment with colchicine, the animals were killed by narcosis and slides were prepared from cells suspension of intestine epithelium and testis. For morphological studies, the slides were stained conventionally with Giemsa solution. Mean descriptive values for the karyotypes were calculated from information obtained from at least five well-spread mitotic metaphases for each specimen. The nomenclature of Green & Sessions (1991) was used to describe the chromosomal morphology. C-banding patterns were obtained by the technique of Sumner (1972), with slight modifications. Silver nitrate labeling for nucleolar organizer regions (Ag-NOR) was done as described by Howell & Black (1980).

RESULTS

Karyotype

Megaelosia boticariana, had $2n=30$ chromosomes (Fig. 1A). Pairs 10-15 were metacentrics, while pairs 1, 3-5, 7-9 were submetacentrics and pairs 2 and 6 were subtelocentrics (Figs. 1A, 6A and Table I). *M. lutzae* showed $2n = 32$ chromosomes consisting of seven pairs of metacentrics (pairs 8-10, 12-14, 16), five pairs of submetacentrics (2-6), one subtelocentric pair (pair 1) and three pairs of telocentrics (7, 11, 15) (Figs 1B, 6B and Table I). A secondary constriction was observed on the short arm of pair 3 in *M. massarti* and on pair 1 in *M. boticariana*, while in *M. lutzae* the constriction was located in the pericentromeric region of telocentric pair 15. The secondary constriction showed size heteromorphism among the three species (Figs. 1A-B, 6 A-B).

In two specimens of *M. massarti*, there was one supernumerary chromosome in all of the cells examined. However, the extra chromosome had a different morphology in each specimen analyzed, being a small metacentric in ZUEC 11396 (165 metaphases analyzed) (Figs. 2B, 7B and Table I) and a large submetacentric in ZUEC 11397 (160 metaphases analyzed) (Figs. 2C, 7C and Table I). In both karyotypes with supernumerary chromosomes ($2n=28+1$), the A chromosomes had the same morphology as in specimens with $2n=28$ chromosomes (Fig. 2A), except for pairs 1 and 2 of the karyotype carrying the large supernumerary chromosome, which were classified as submetacentric and metacentric, respectively. A secondary constriction was also detected on the long arm of pair 3 (Fig. 2B, C, 7C).

C- banding

In the three species, almost all the centromeric and telomeric regions of the chromosomes showed darkly stained bands (Figs. 3A-C, 4A-B, 6 and 7). Differences in the number, location and size of the heterochromatin regions revealed interspecific variation in the C-banding pattern among the species. In *M. massarti*, some of the non-centromeric bands showed gray staining, which was not easily observed (Fig. 3A). The short arm of pair

10 showed a large block of pericentromeric heterochromatin in the three species. Also, the secondary constrictions (pairs 3, 1 and 15, respectively) in the three karyotypes were entirely heterochromatic (Figs. 3A-C, 4A,B). The small B was totally heterochromatic (Fig. 4A, 7) and large B chromosome had a C-band only in the telomeric region of both arms (Fig. 4B, 7).

Nucleolus organizer region

The NORs were located on different chromosome pairs in the three species (Figs. 5A-E). In *M. massarti*, both the 28 and 29 chromosome karyotypes had the nucleolar organizer region in pair 3. This NOR was heteromorphic and coincident with the large heterochromatic block and the secondary constriction (Fig. 5A-C). In *M. boticariana*, the NOR was located on the short arm of pair 1, and was strikingly heteromorphic between the homologues (Fig. 5D). *M. lutzae* had the NOR in the pericentromeric region of pair 15, and was heteromorphic and coincident with an heterochromatic block (Fig. 5E).

DISCUSSION

Karyotypic variability

The karyotypes of *M. massarti* and *M. boticariana* described here are in general agreement with those previously described by Melo *et al.* (1995) and Giaretta & Aguiar-Jr. (1998), whereas the 32-chromosome karyotype in *M. lutzae* constitutes a new diploid number for *Megaelosia* and the subfamily Hylodinae.

Apart from the wide range in chromosome number (not described for other hylodines), the three *Megaelosia* species analyzed also differed from each other in the morphology of most of the chromosome pairs. Only pairs 8-10, 12 and 14 showed some homeologies, despite the slight differences in arm size in chromosomes 8, 9 and 14. These homeologies, as well as the presence of a conspicuous NOR-bearing secondary constriction of identical morphology (although they occur on different chromosome pairs), may

represent features of the ancestral karyotype. The darkly stained heterochromatic segment associated with the NOR constriction in the three karyotypes (see below) reinforces this assumption.

Variation in chromosome number and the presence of telocentric pairs suggest that centric fusion or fission is the major mechanism involved in the karyotypical evolution of some anuran groups (Morescalchi, 1973; Bogart & Tandy, 1981; King, 1990; Bogart, 1991). Considering the evolutionary trend towards a reduction in chromosome number in leptodactylids (Beçak, 1968; Beçak *et al.*, 1970; Morescalchi, 1973; Denaro, 1974; Heyer & Diment, 1974; King, 1990), the presence of telocentric pairs in *M. lutzae* ($2n=32$) suggests that a fusion-mediated mechanism could have reduced the diploid number in these *Megaelosia* species.

A fusion involving the telocentric pairs 7 and 15 (the latter possessing a heterochromatic NOR-carrying secondary constriction as an effective landmark) would produce a 30-chromosome karyotype very similar to that of *M. boticariana*. However, an additional rearrangement would be required to explain the change in morphology of pair 11. The absence of telocentric chromosomes in *M. boticariana* precludes the assumption of a fusion event leading to a 28-chromosome karyotype similar to that of *M. massarti*. In this case, the loss of one pair of chromosomes (probably a small one) and another type of rearrangement which would shift the position of pairs 1 and 3, could have produced such a karyotype. A pericentric inversion event could explain the position of the centromere in the homologues of pair 6 which were of practically equal length.

The involvement of rearrangements other than chromosomal fusion is suggested when the fundamental (FN) number of these three karyotypes is considered. This agrees with Beçak (1968) who argued that the morphological differentiation of anuran karyotypes and the great variability in chromosome number suggested, that in addition to centric fusions, other mechanisms of chromosomal modifications must have occurred during the evolution of this group. Thus, in the Leptodactylidae, where centric fusion best accounts for the variation in chromosome number, further and concerted alterations involving pericentric inversions or other types of translocation have also been considered, e.g., in the genus *Eleutherodactylus* (Bogart & Hedges, 1995).

Centric fission has also been proposed as a mechanism that may have operated in the karyotypic differentiation of certain anuran groups (Morescalchi, 1973; Kuramoto & Alison, 1989; King, 1990; Bogart, 1991; Bogart & Hedges, 1995; Busin *et al.*, 2001). Among the leptodactylids, fission events can explain better the diploid number variation in many Telmatobiinae karyotypes which deviate from those of most species in other subfamilies, that share the $2n=26$ karyomorph considered as a primitive character (see King, 1991; Bogart, 1991; Reig, 1972, *apud* Formas & Cuevas, 2000). Such a mechanism cannot be ruled out for the changes in chromosome number seen in the genus *Megaelosia*, although this hypothesis is less probable since telocentric chromosomes or other markers were not observed in the 30-chromosome karyotype. Nevertheless, centric fission of the third pair and a pericentric inversion in pair 11 in a 30-chromosome-like karyotype could produce the *M. lutzae* karyotype.

The possibility that the $2n=32$ and $2n=28$ karyotypes may have evolved independently from an ancestral karyotype with $2n=30$, such as found in *M. boticariana*, cannot be discarded. Bogart & Hedges (1995) hypothesized that at least nine independent changes in chromosome number involving fusion and fission events have occurred in Jamaican *Eleutherodactylus* lineages.

Within the Anura, supernumerary chromosomes have been described in the Leiopelmatidae, Pelobatidae, Hylidae and Ranidae (review on Green, 1991). The presence of B chromosomes in *M. massarti* constitutes a unique case in the family Leptodactylidae. The small B chromosome shows the common morphological properties which characterize supernumerary chromosomes, i.e., it is totally heterochromatic and is a small chromosome (Green, 1990; Camacho *et al.*, 2000). However, the large B found in ZUEC 11397 showed only small telomeric C-blocks on both arms, suggesting that heterochromatin probably has no role in the origin and development of this chromosome, as also reported by Venere *et al.* (1999) for some characiformes fishes. In addition, the karyotype with this large extra chromosome showed a slight change in the size of chromosome pairs 1 and 2 (shifting the position in the karyogram). Restructuring of the A set in karyotypes carrying supernumeraries is very uncommon and may indicate that additional rearrangements have occurred.

In Anura, the presence of distinct morphotypes for B chromosomes in a population has been reported for *Leiopelma hochstetteri*, which has the greatest variation in supernumerary chromosomes among vertebrates (Green *et al.*, 1987; Green, 1988, 1991). The variation in the remaining anuran species is restricted to the number of these extra elements (Green, 1991).

Different mechanisms have been proposed to explain the origin, maintenance and frequency of B chromosomes, the most accepted being that they may have derived from A chromosomes as a by-product of the standard karyotype (Camacho *et al.*, 2000). An independent origin for these chromosomes has also been suggested (Jones & Rees, 1982). According to Green (1990, 1991), there is no evidence to indicate that these chromosomes are evolutionary vestiges of ancestral karyotypes, and their low frequency of occurrence across species suggests a random process of generation.

As reported by Oliveira *et al.* (1997), the structure, function and behavior of supernumerary chromosomes are quite peculiar in different groups, making it difficult to generalize about their importance for the species. Any hypothesis about the origin and differentiation of supernumeraries in *M. massarti* is, at best speculative. Nevertheless, these chromosomes contribute to the karyotypic variability in *Megaelosia*.

C-banding and NOR

The C-banding pattern varied considerably among the three species and provided limited information for inferring the relationships among the species. Only the large heterochromatic block found in the short arm of pair 10 and the banding pattern of the NOR-carrying chromosome were useful as a marker and indicated that the group represents a clade. The short arm of pair 13 in *M. massarti* and *M. boticariana* was totally heterochromatic, suggesting homeology between them. The differential C-banding response of other pairs was rather complex and difficult to interpret, and precluded any unambiguous recognition of homologies. Also, it was not possible to compare and use the amount of heterochromatin as an indicator of the evolutionary trend among these karyotypes (see King, 1980, 1991).

Interspecific variability in the amount and distribution of heterochromatin is a general feature of most anurans, even in species with a conservative karyotype (King, 1991; Bogart & Hedges, 1995; Spasic-Boskovic *et al.*, 1997; Formas & Cuevas, 2000; Aguiar-Jr. *et al.* -submitted for publication). All three species had a pronounced amount of heterochromatin concentrated in the telomeric region of most chromosome pairs (not particularly evident in the plate of *M. lutzae* shown here). The variable intensity of staining in some heterochromatic regions indicated that the heterochromatin had a heterogeneous composition in these species (see Hsu & Arrighi, 1971).

As stated above, the NOR-carrying secondary constriction appeared to be homeologous among the three species studied. Such homeology reinforces the hypothesis that these karyotypes have undergone extensive rearrangements which have altered the chromosome number and NOR location since in the most closely related anuran species the NOR position is almost always stable (Schmid, 1982; King, 1990; Amaral *et al.*, 2000).

The heteromorphism among homologous NORs observed here cannot be attributed to duplications. Rather, they appear to involve the amplification of the ribosomal cistrons in one of a pair of homologues, as also suggested for most NOR heteromorphisms in the Anura (King, 1990). Schmid *et al.* (1990) proposed that unequal meiotic crossovers or sister chromatid exchanges could also give rise to heteromorphic NORs.

The massive C-block coincident with the NOR secondary constriction is a widespread characteristic of anuran karyotypes (King, 1980; King *et al.*, 1990; Kasahara *et al.*, 1996), and, as proposed by King (1991), may be attributed to the presence of repeated DNA sequences within the spacer region between the 28S+18S cistrons.

Concluding remarks

Although some homeologies were detected between the karyotypes of *Megaelosia* species, there was marked variability and some karyotypic instability, as suggested by the variation in chromosomal morphology and number. Karyotypically, *Megaelosia* differs considerably from *Hylodes* and *Crossodactylus*, which have a uniform karyotype within each genus (Beçak, 1968; Bogart, 1970; Denaro, 1972; De Lucca & Jim, 1974).

Lynch (1971) argued that *Megaelosia* species have certain primitive characteristics and that the genus is retained in the subfamily Hylodinae only because of the derived condition of the vocal apparatus shared with *Hylodes*. The similar external morphology among *Megaelosia* and *Hylodes* species may simply be the result of convergence.

Our data reinforce the divergent position of *Megaelosia* within the Hylodinae and indicate that *Megaelosia* does not provide useful karyological data for assessing Hylodinae-Dendrobatidae affiliations.

Acknowledgements

The authors thank Vinicius Bonato, Glauco Machado and Cláudio Patto for providing specimens of *Megaelosia massarti*, Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) and Departamento Florestal – Votorantim Celulose e Papel for the authorization to collect the specimens.

LEGENDS

Figure 1. Giemsa stained karyotypes of *M. boticariana* (A) and *M. lutzae* (B). Note the conspicuous secondary constriction (arrows) in the two karyotypes. Bar 5= μm .

Figure 2. Karyotypes of three females of *M. massarti* with 28 (A) and 29 chromosomes. The inset shows the small supernumerary in specimen ZUEC 11396 (B) and the large supernumerary in specimen ZUEC 11397 (C). In C, note the difference in morphology of chromosomes 1 and 2 compared to the standard 28 chromosome karyotype and the conspicuous secondary constriction (arrows). Bar 5= μm .

Figure 3 - C-banded chromosomes of females *M. massarti* (A), and tadpoles of *M. boticariana* (B) and *M. lutzae* (C). Note that all centromeric region are C-banded. Note also the presence in the three karyotypes of a large C-block coincident with the secondary constriction and a dark pericentromeric and centromeric band on the short arm of pair 10. Bar 5= μm .

Figure 4. Banding pattern of 29-chromosome karyotypes of two females of *M. massarti*. The inset shows the fully heterochromatic small B chromosome (A) and the large B chromosome with weakly stained telomeric C-bands (B). Bar 5= μm .

Figure 5. NOR-bearing chromosome pairs in females of *M. massarti* from a standard karyotype (A), karyotype with small (B) and large (C) supernumerary chromosomes; and tadpoles of *M. boticariana* (D) and *M. lutzae* (E). Bar 5= μm .

Figure 6. Ideograms of the *M. boticariana* (A) and *M. lutzae* (B) karyotypes. Dark sectors indicate C-bands. Dotted areas represent the secondary constrictions. The gray areas indicate NOR sites.

Figure 7. Ideograms of the 28 (A) and 29-chromosome karyotypes of *M. massarti* with small (B) and large (C) B-chromosomes. The dotted areas show the secondary constrictions and the gray areas represent the NOR. Dark sectors denote the C-band regions.

Table 1 – Morphometric analysis of the chromosomes of three *Megaelosia* species, and two specimens with supernumerary chromosomes. CH= chromosome, IC=centromeric index, RL=relative length, CP=centromeric position, M=metacentric, SM=submetacentric, ST=subtelocentric and T=telocentric. Classification according to Green & Sessions (1991).

<i>Megaelosia massarti</i>																	
CH	1	2	3	4	5	6	6'	7	8	9	10	11	12	13	14		
IC	0.80	0.26	0.27	0.37	0.15	0.31	0.35	0.32	0.42	0.44	0.43	0.44	0.43	0.34	0.30		
RL	12.38	11.97	10.32	10.15	7.49	7.48	7.47	6.91	5.8	5.39	4.98	4.76	4.41	4.00	3.22		
CP	M	SM	SM	M	ST	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	SM	SM		
<i>Megaelosia boticariana</i>																	
CH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
IC	0.33	0.24	0.34	0.27	0.25	0.23	0.29	0.33	0.36	0.42	0.43	0.40	0.42	0.46	0.45		
RL	13.52	12.39	10.44	9.31	8.64	7.71	6.29	4.87	4.81	4.46	4.18	3.74	3.31	3.31	3.02		
CP	SM	ST	SM	SM	SM	ST	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	M		
<i>Megaelosia lutzae</i>																	
CH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	15'	16
IC	0.24	0.37	0.37	0.25	0.27	0.32	0	0.39	0.43	0.43	0	0.44	0.45	0.46	0	0	0.4
RL	11.53	9.95	9.12	8.17	7.85	6.69	6.40	5.43	5.05	4.82	4.51	4.33	3.96	3.70	3.56	4.82	3.3'
CP	ST	SM	SM	SM	SM	SM	T	M	M	M	T	M	M	M	T	T	M
<i>Megaelosia massarti</i> (small B chromosome)																	
CH	1	2	3	4	5	6	6'	7	8	9	10	11	12	13	14	B	
IC	0.39	0.30	0.29	0.38	0.19	0.33	0.34	0.28	0.41	0.40	0.40	0.39	0.32	0.32	0.29	0.43	
RL	12.0	11.10	10.20	9.83	7.55	7.48	7.33	6.80	5.32	5.10	4.88	4.56	4.11	3.90	3.18	4.86	
CP	M	SM	SM	M	ST	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	SM	SM	M	
<i>Megaelosia massarti</i> (large B chromosome)																	
CH	1	2	3	4	5	6	6'	7	8	9	10	11	12	13	14	B	
IC	0.25	0.39	0.34	0.38	0.17	0.31	0.35	0.34	0.39	0.44	0.44	0.45	0.47	0.45	0.30	0.37	
RL	11.8	10.0	9.53	7.75	7.46	6.49	6.40	5.66	5.05	4.54	4.34	3.93	3.92	3.54	3.45	12.4	
CP	SM	M	SM	M	ST	SM	SM	SM	M	M	M	M	M	SM	SM	SM	

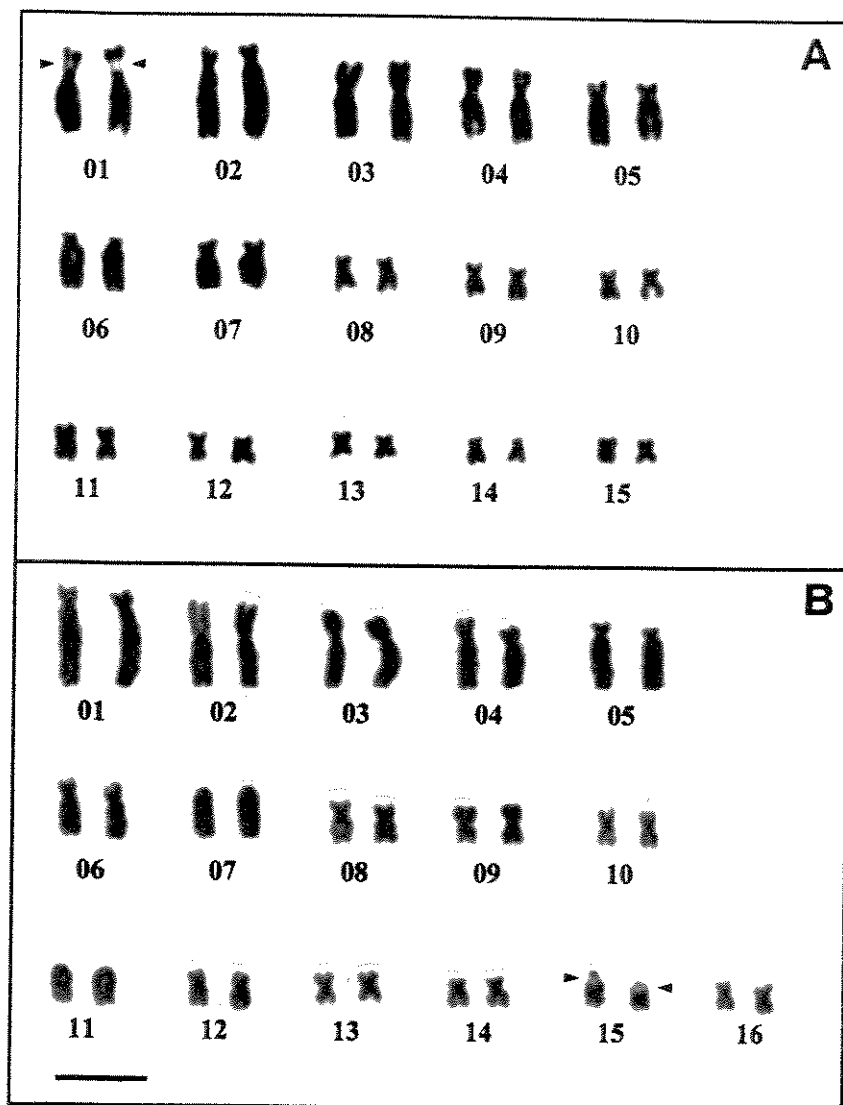


Fig. 1

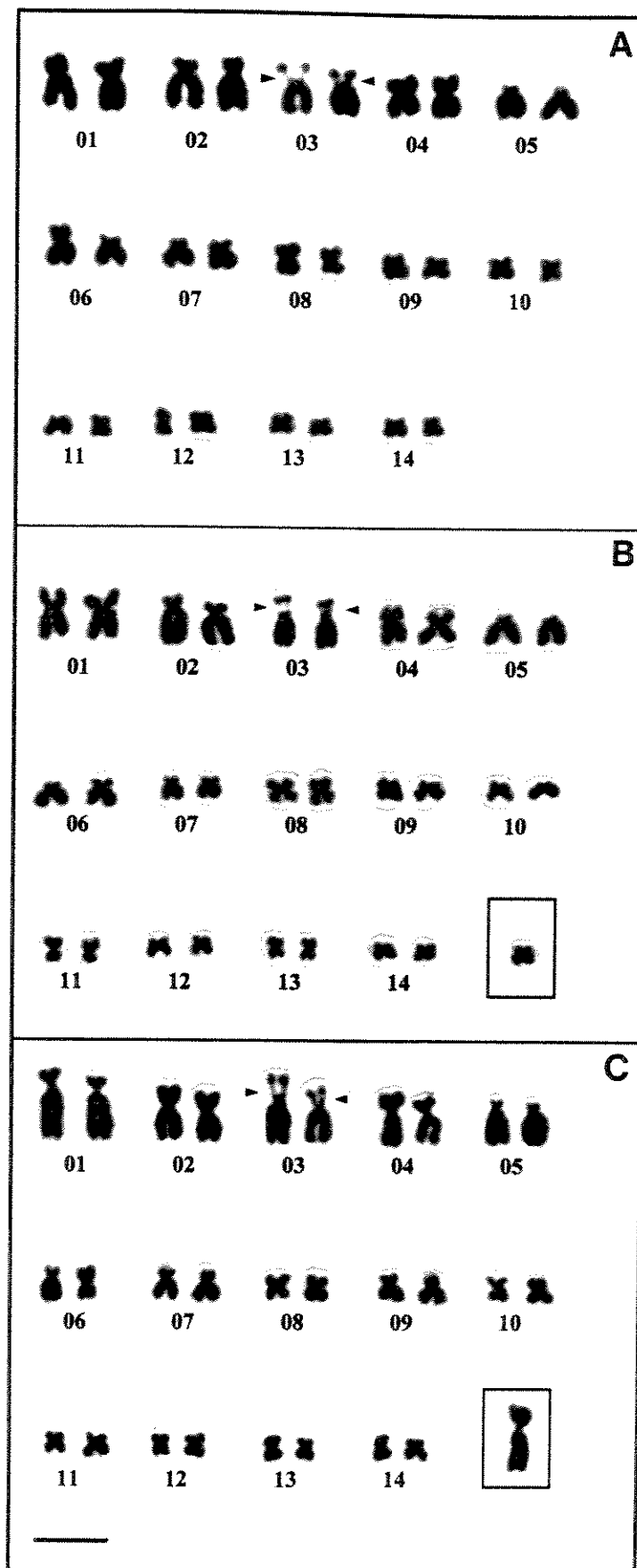


Fig. 2

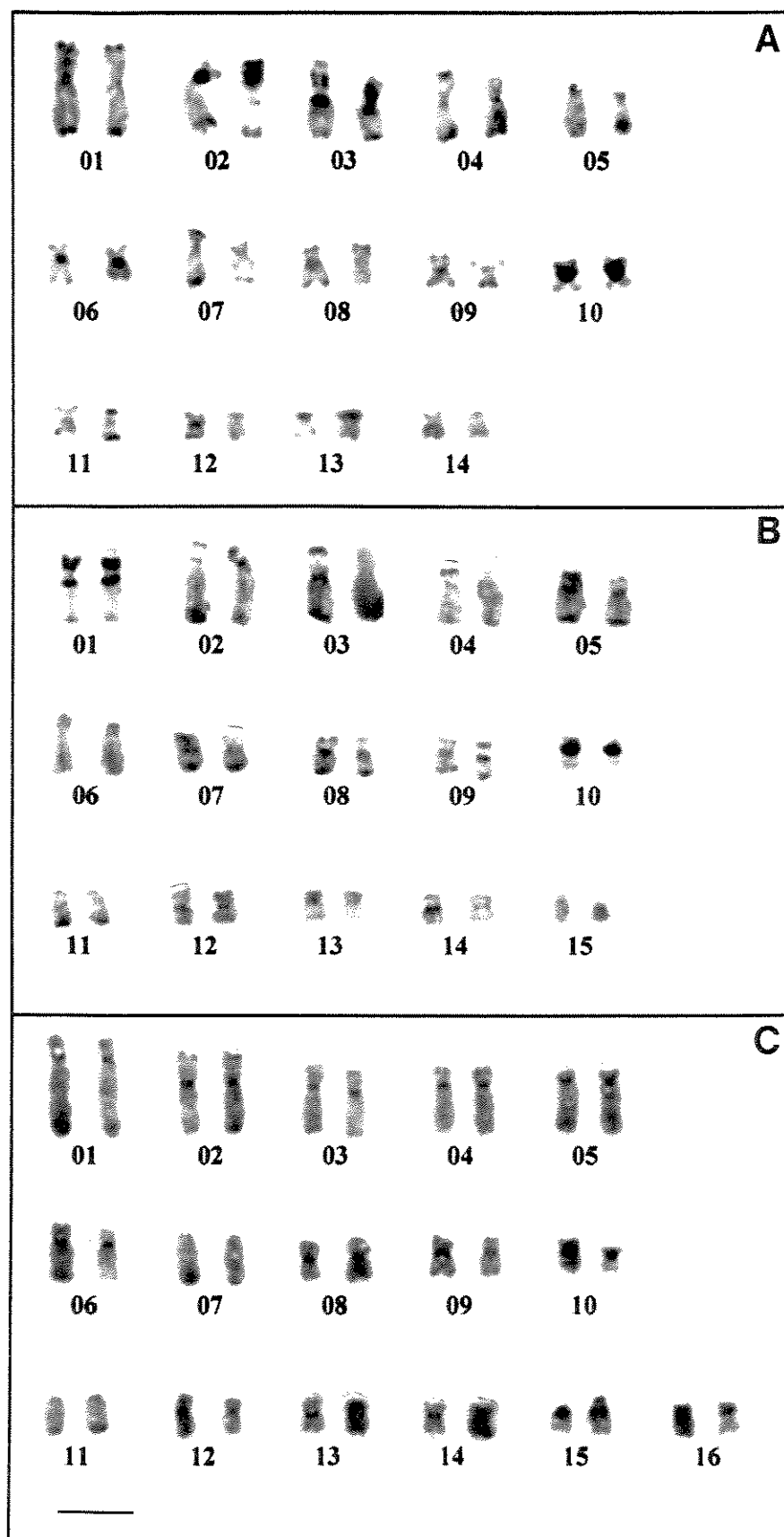


Fig. 3

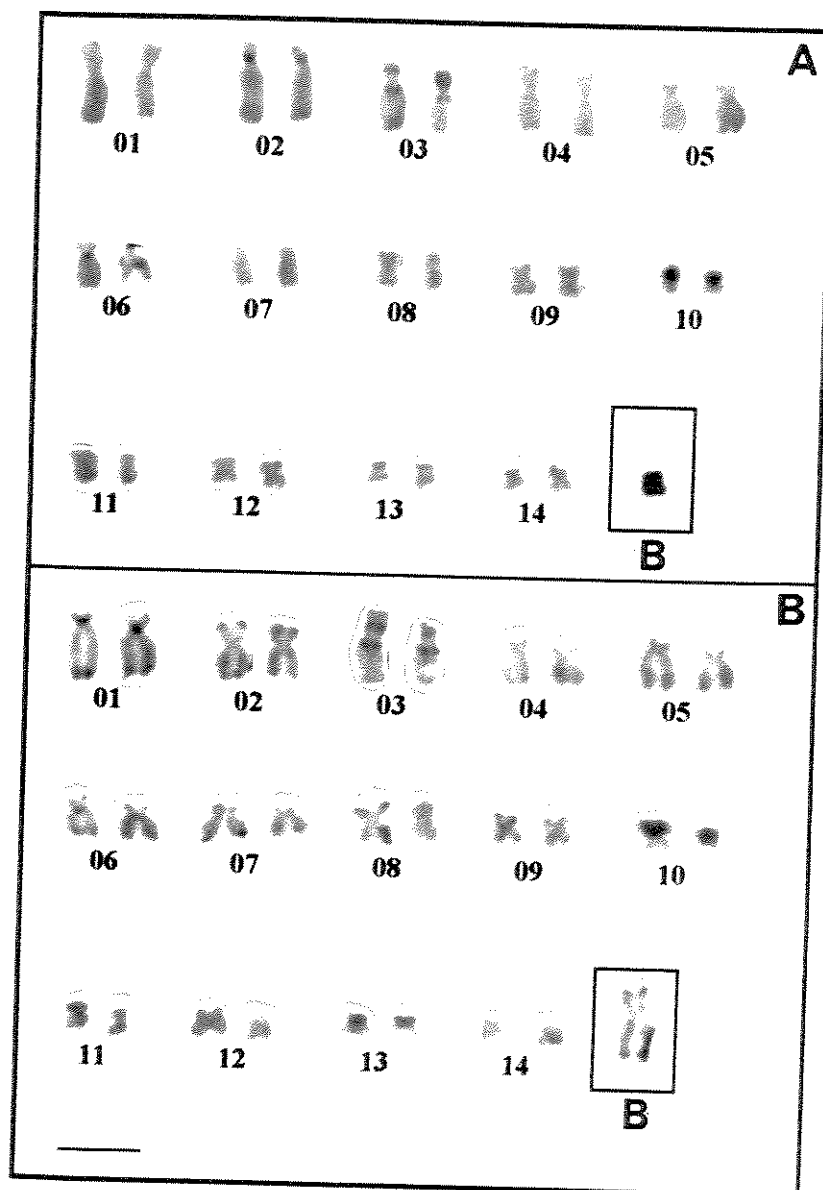


Fig. 4

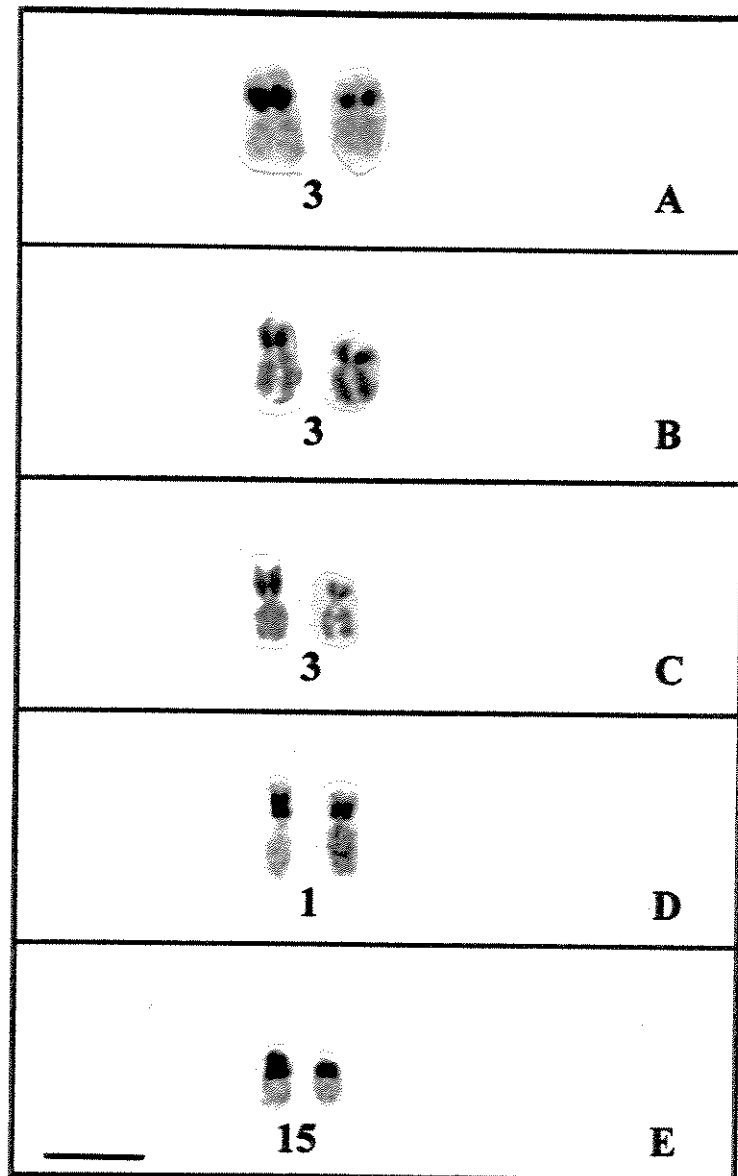
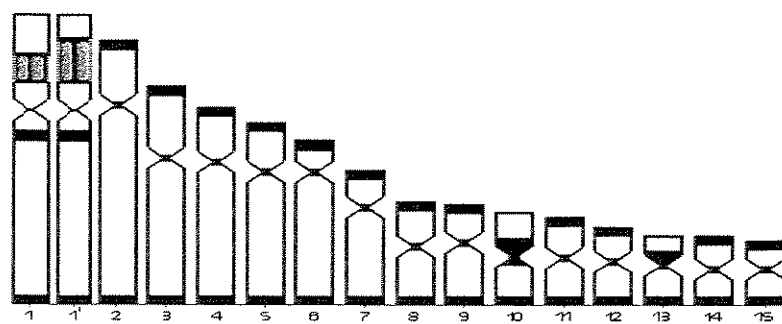
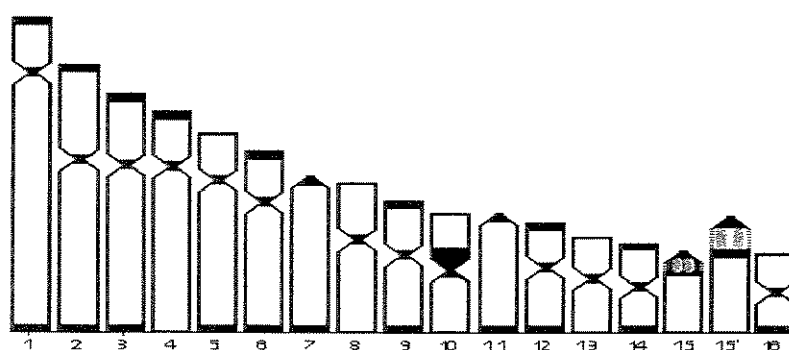


Fig. 5

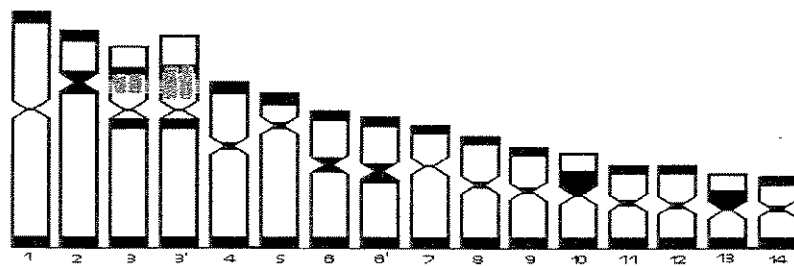


A

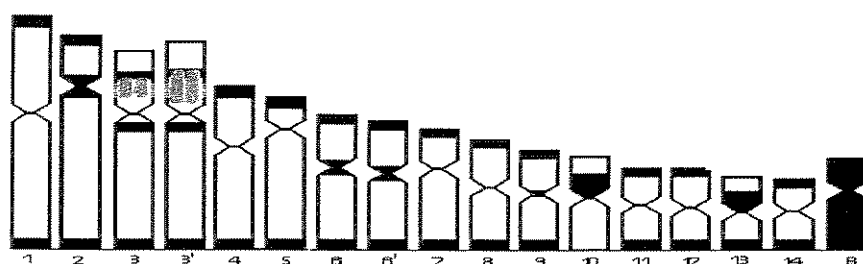


B

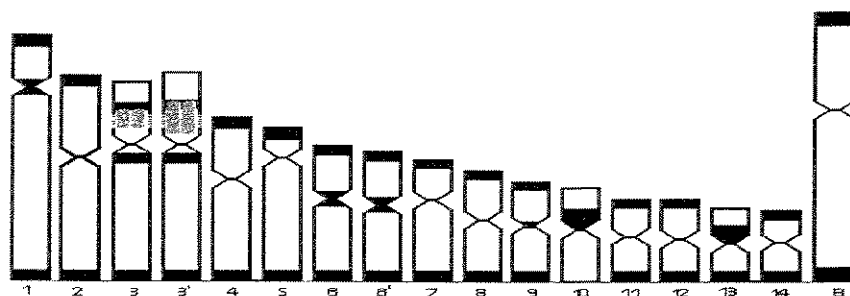
Fig. 6



A



B



C

Fig. 7

REFERENCES

- AMARAL, M. J. L. V.; RECCO-PIMENTEL, S. M. & CARDOSO, A. J. Cytogenetics analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). **Caryologia** **53**:283-288, 2000.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of anura. **Caryologia** **21**: 191-208, 1968.
- BEÇAK, M. L., DENARO, L. & BEÇAK, W. PolyploidY and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. **Cytogenetics** **9**: 225-238, 1970.
- BEUKEBOOM, L. W. Bewildering Bs: an impression of the 1st B chromosome conference. **Heredity** **73**: 328-336, 1994.
- BOGART, J. P. The influence of the life history on karyotypic evolution in frogs. In: Green, D. M. & Sessions, S. K., eds. **Amphibian cytogenetics and evolution**. Academic Press, San Diego, pp. 233-258, 1991.
- BOGART, J. P. & HEDGES, S. B. Rapid chromosome evolution in Jamaican frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). **J. Zool. Lond.** **235**: 9-31, 1995.
- BOGART, J. P. & TANDY, M. Chromosomes lineage in African ranoid frogs. **Monit. Zool. Ital. N. S. Supl.** **5**: 55-59, 1981.
- BUSIN, C. S., VINCIPROVA, G. & RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). **Genetica**, 2001. in press.
- CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F. & BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** **355**: 163-178, 2000.

- DE LUCCA, E. J. & JIM, J. Os cromossomos de alguns Leptodactylidae (Amphibia-Anura). **Rev. Bras. Biol.** **34**: 407-410, 1974.
- DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. **J. Herpetol.** **6**: 71-74, 1972.
- DE WITTE, G. F. Liste des reptiles et batraciens récoltés au Brésil par la mission Massart (1922-23) et description de sept nouvelles espèces. In: R. Bouillenne, P. Ledoux, P. Brien, and A. Navez, eds. **Une mission biologique belge au Brésil**, pp. 213-230 + 8 plates. Imprimerie Medicale et Scientifique (Soc. An.), Bruxelles, 1930.
- FORMAS, J. R. & CUEVAS, C. C. Comparative cytogenetic analysis of the Chilean leptodactylid frog genus *Telmatobufo*, with the description of the chromosomes of *T. venustus*. **Proc. Biol. Soc. Wash.** **113**: 890-899, 2000.
- FROST, D. R. **Amphibian Species of the World**. An online reference. V2.20, 2000.
- GIARETTA, A. A. & AGUIAR-JR., O. A new *Megaelosia* (Anura, Leptodactylidae-Hylodinae) from the Mantiqueira range, southeastern Brazil. **J. Herpetol.** **32**: 80-83, 1998.
- GIARETTA, A. A., BOKERMANN, W. C. A. & HADDAD, C. F. B. A review of the genus *Megaelosia* (Anura, Leptodactylidae) with a description of a new species. **J. Herpetol.** **27**: 276-285, 1993.
- GREEN, D. M. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: Extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. **Chromosoma** **95**: 55-70, 1988.
- GREEN, D. M. Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. **Genome** **33**: 818-824, 1990.

- GREEN, D.M. Supernumerary chromosomes in amphibians. In: Green, D. M. & Sessions, S. K., eds., **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. pp. 333-358, 1991.
- GREEN, D. M. & SESSIONS, S. K. Nomenclature for chromosomes. In: Green, D. M. & Sessions, S. K., eds., **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. pp. 431-432, 1991.
- GREEN, D.M., KEZER, J. & NUSSBAUM, R.A. Supernumerary chromosome variation and heterochromatin distribution in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*. **Chromosoma** **95**: 339-344, 1987.
- HEYER, W. R. & DIMENT, M. J. The karyotype of *Vanzolinius discodactylus* and comments on usefulness of karyotypes in determining relationships in the *Leptodactylus* complex (Amphibia, Leptodactylidae). **Proc. Biol. Soc. Wash.** **87**: 327-336, 1974.
- HOWELL, W. M. & BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Experientia** **36**: 1014-1015, 1980.
- HSU, T. C. & ARRIGHI, F. E. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. **Chromosoma** **34**: 243-253, 1971.
- IZECKSOHN, E. & GOUVEA, E. Nova espécie de *Megaelosia* de Itatiaia, Estado do Rio de Janeiro. (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arq. Univ. Fed. Rural Rio de Janeiro, Itaguaí**, **8**: 17-22, 1985.
- JONES, R. N. & REES, H. **B chromosomes**. New York. Academic Press, 1982.

- KASAHARA, S., SILVA, A. P. Z. & HADDAD, C. F. B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia – Bufonidae). **Braz. J. Genet.** **19**: 237-242, 1996.
- KING, M. C-banding studies on Australian hylid frogs. Secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** **94**: 45-58, 1980.
- KING, M. Chromosomal and immunogenetic data: a new perspective on the origin of Australia's reptiles. In: John, B. & Gwent, C., eds., **Animal Cytogenetics 4, Chordata 2, Amphibia**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1990.
- KING, M. Evolution of heterochromatin in the Amphibia genome. In: Green, D. M. & Sessions, S. K., eds. **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. Academic Press, San Diego. pp. 359-391, 1991.
- KURAMOTO, M. & ALLISON, A. Karyotypes of microhylid frogs of Papua New Guinea and their systematic implications. **Herpetologica** **45**: 250-259, 1989.
- LYNCH, J. D. Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. **Univ. Kans. Mus. Nat. Hist. Misc. Publ.** **53**: 1-238, 1971.
- MELO, A. S., RECCO-PIMENTEL, S. M. & GIARETTA, A. A The karyotype of the stream dwelling frog *Megaelosia massarti* (Anura, Leptodactylidae, Hylodinae). **Cytologia** **60**: 49-52, 1995.
- MORESCALCHI, A. Amphibia. In: Chiarelli, A. & Capanna, E., eds. **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution**. Academic Press, New York. pp. 233-248, 1973.
- OLIVEIRA, C., SABOYA, S. M. R., FORESTI, F., SENHORINI, J. A. & BERNARDINO, G. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. **Heredity** **79**: 473-476, 1997.

- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** **87**: 327-344, 1982.
- SCHMID, M., ORLET, J. & KLETT, C. Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma** **71**: 29-55, 1979.
- SCHMID, M., STEINLEY, C., NANDA, I. & EPPLER, J. T. Chromosome banding in Amphibia. In: Olmo, E. ed., **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**. Birkhäuser Verlag Basel, Berlin, pp. 21-45, 1990.
- SPASIC-BOSKOVIC, O., TANIC, N., BLAGOJEVIC, J. & VUJOSEVIC, M. Comparative cytogenetic analysis of European brown frogs: *Rana temporaria*, *R. dalmatina* and *R. graeca*. **Caryologia** **50**: 139-149, 1997.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell. Res.** **75**: 304-306, 1972.
- VENERE, P. C., MIYAZAWA, C. S. & GALETTI JR., P. M. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. **Genet. Mol. Biol.** **22**: 345-349, 1999.

3. CONCLUSÕES GERAIS

- 1- A espécie *Megaelosia lutzae* apresentou um cariótipo com $2n = 32$ cromossomos, sendo constituído por sete pares metacêntricos, cinco submetacêntricos, um subtelocêntrico e três telocêntricos.
- 2- *Megaelosia lutzae* difere no número, na morfologia de alguns cromossomos e na localização da constrição secundária em relação a *M. massarti* ($2n=28$) e *M. boticariana* ($2n=30$).
- 3- Dois tipos de cromossomos supernumerários foram encontrados em *M. massarti*, um deles grande e submetacêntrico e o outro pequeno e metacêntrico.
- 4- *Megaelosia boticariana* e *M. lutzae* apresentaram NOR apenas nos pares 1 e 15, respectivamente. Em todos os casos, a NOR mostrou-se heteromórfica, coincidente com uma constrição secundária e uma banda C. O heteromorfismo pode ter surgido por amplificação de sequências ribossomais.
- 5- Nas três espécies, blocos de heterocromatina constitutiva foram detectados na região dos centrômeros e telômeros em quase todos os cromossomos. O par 10 mostrou um bloco pericentromérico que se estende pelo braço curto do cromossomo em todas as espécies, sendo um marcador para o gênero. Em *M. massarti*, tanto nos cariótipos com $2n=28$, quanto naqueles com 29 cromossomos e em *M. boticariana*, uma outra região heterocromática foi encontrada no braço curto do par 13.
- 6- A variação no número e morfologia dos cromossomos, localização da NOR e padrão de heterocromatina, pode ter surgido por mecanismos de fusão/ fissão e outros rearranjos, evidenciados pela presença de cromossomos telocêntricos em *M. lutzae* e similaridade morfológica do braço cromossômico com a constrição secundária que carrega a NOR.
- 7- *Megaelosia* difere cariotipicamente de *Hylodes* e *Crossodactylus*, que possuem um número diplóide menor e bastante conservados.
- 8- *Megaelosia* não contribui para a elucidação da relação de parentesco entre Hylodinae e Dendrobatidae.

