



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Luciana Bolsoni Lourenço

**Estudo citogenético e do DNA ribossomal de *Paratelmatobius*
e *Scythrophrys* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Luciana Bolsoni Lourenço</i>	e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>SR Recco Pimentel</i>
---	---

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

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel



**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE Be
 N.º CHAMADA: UNICAMP
L934e
 V. Es.
 TOMBO BC/ 968-90
 PROC. 6. 372/01
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 02/11/01
 N.º CPD

CM00161228-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Lourenço, Luciana Bolsoni

L934e Estudo citogenético e do DNA ribossomal de *Paratelmatobius* e *Scythrophrys* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)/Luciana Bolsoni Lourenço. – Campinas, S.P.[s.n.], 2001.
 124f: ilus.

Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel

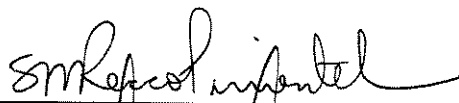
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. DNA ribossomal. 3. Anura. I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 19/07/2001

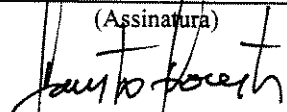
Banca Examinadora

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



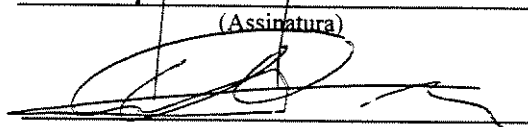
(Assinatura)

Prof. Dr. Fausto Foresti



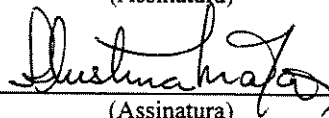
(Assinatura)

Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad



(Assinatura)

Profa. Dra. Isabel Cristina Martins dos Santos



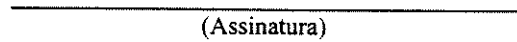
(Assinatura)

Profa. Dra. Sanae Kasahara



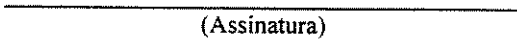
(Assinatura)

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini



(Assinatura)

Profa. Dra. Selma Candelária Genari



(Assinatura)

200124837

Dedicatória

Dedico este trabalho ao Professor Doutor
Adão José Cardoso (*in memoriam*).

Agradecimentos

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pela indispensável orientação na realização deste trabalho, pela confiança dispensada, pelo incentivo e apoio sempre prestados, e por todas as oportunidades oferecidas, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Adão José Cardoso (*in memoriam*), um dos idealizadores deste estudo.

Ao Prof. Paulo C. A. Garcia, imprescindível colaborador deste trabalho, pela coleta e identificação de animais e pelas valiosas discussões e comentários realizados ao longo de todo o estudo.

Ao Prof. Dr. Ariovaldo A. Giaretta, pela coleta e identificação de animais de Paranapiacaba-SP.

A Magno V. Segalla e Rodrigo Lingnau, pelo auxílio na coleta de animais em Piraquara-PR.

Ao SANEPAR (Companhia de Saneamento do Paraná), por ter permitido o acesso a Mananciais da Serra, Piraquara-PR.

À Profa. Dra. Anete P. de Souza, por ter disponibilizado o laboratório e possibilitado a subclonagem para a confecção da sonda usada na análise molecular do DNA ribossomal. À Suzely F. Siqueira, pela assistência nesta etapa do trabalho.

Ao Prof. Dr. Wanderley D. da Silveira, pelas relevantes sugestões e pela disponibilização de equipamentos e reagentes durante a análise molecular realizada.

Às Profas. Dras. Sanae Kasahara e Isabel Cristina M. dos Santos e ao Prof. Dr. Célio F. B. Haddad, pela análise prévia da tese. Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela revisão dos textos em inglês.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, Klélia A. Carvalho, Patrícia P. Parise-Maltempi, Fernando Ananias, Odair Aguiar Júnior, Ana Cristina P. Veiga-Menoncello, Lilian R. Medeiros, Maurício J.L.V. Amaral, Marta D. Soares-Scott, Cristina Rosa, Carmen S. Busin, Josiane A. de Andrade e Sérgio Siqueira Júnior, pelas valiosas discussões, tão importantes para a realização deste trabalho e para meu aprendizado, pelo auxílio prestado na realização de diversos experimentos e pela amizade conquistada.

À secretaria do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, especialmente à Lílíam A.S. Panagio, pelo eficiente auxílio prestado.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro.

À minha família, Marcelo, Marcos, Ana Maria, Maria Aparecida, Maria Henriqueta, Cleber, Júnia, Lucimara, Daniel, Ivete e Arcênio, e aos amigos Adriana, Márcio e Julinha, por estarem sempre presentes, incentivando e amparando todas as minhas conquistas.

Sumário

I - Resumo	7
II - Abstract.....	8
III - Introdução.....	9
1 – Citogenética como ferramenta de estudo	10
1.1 – As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) como caracteres citogenéticos	15
1.2 – Heterocromatina constitutiva e suas implicações evolutivas	21
2 – O estudo do DNA ribossomal	27
3 – Os anuros dos gêneros <i>Paratelmatobius</i> Lutz & Carvalho, 1958, e <i>Scythrophrys</i> Lynch, 1971	29
4 – Objetivos	30
5 – Referências bibliográficas	31
IV - Artigo 1	43
V - Artigo 2	66
V - Artigo 3	91
VII - Artigo 4	108
VIII - Conclusões Gerais	122

I – Resumo

A proximidade entre *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* é apontada por vários autores, embora esses gêneros estejam atualmente classificados em duas subfamílias de Leptodactylidae. No presente trabalho, as espécies consideradas viventes de *Paratelmatoobius*, *P. cardosoi* e *P. poecilogaster*, e do gênero monotípico *Scythrophrys*, *S. sawayae*, foram analisadas citogeneticamente. Alguns sítios de restrição do gene ribossomal 28S dessas espécies também foram investigados. A análise cariotípica forneceu dados indicativos da existência de uma nova espécie de *Paratelmatoobius*, *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*), e de dois grupos de *Scythrophrys*, propostas apoiadas também por dados anatômicos e relativos à vocalização desses anuros obtidos por outros autores. O complemento diplóide de todas essas espécies e aquele já descrito para *P. lutzii* apresentam 24 cromossomos, vários deles com morfologia semelhante nesses diferentes cariótipos, especialmente aqueles de *P. poecilogaster*, *P. lutzii* e grupo II de *Scythrophrys*. Essa característica pode ser utilizada para agrupar os gêneros em estudo, visto que o número diplóide $2n=24$ é raro dentre leptodactídeos e os cariótipos das espécies com esse número diplóide apresentam pouca semelhança com aqueles de *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys*. A análise das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) permitiu sugerir que a presença da NOR em um cromossomo metacêntrico pequeno, como observado em *P. poecilogaster*, *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) e grupo II de *Scythrophrys*, representa um estado plesiomórfico de localização da NOR nesses gêneros. O bandamento C permitiu sugerir algumas sinapomorfias de *P. cardosoi* e *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) e outras que reúnem os dois grupos de *Scythrophrys*. Esse método revelou, ainda, a presença de heterocromatina não-centromérica no braço curto dos cromossomos do par 1 de todos os cariótipos em análise, embora essa região apresente variados tamanhos nas diferentes espécies. A análise molecular do DNA ribossomal mostrou um sítio Pvu II exclusivo das duas populações do grupo I de *Scythrophrys*, corroborando a proposta da existência de dois grupos taxonômicos nesse gênero. As espécies de *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys*, bem como *Cycloramphus izeckshoni* e *Hylodes asper*, não apresentam um sítio Bst EII considerado na literatura uma possível sinapomorfia das subfamílias Leptodactylinae e Telmatobiinae, lançando questionamentos acerca daquela hipótese. Além disso, os mapas de restrição obtidos para as espécies de *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* mostraram variações interespecíficas no tamanho de alguns fragmentos, indicando que tais regiões podem ser úteis em futuras análises moleculares.

II - Abstract

The proximity between *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* has been suggested by several authors, even though these genera are currently classified in two subfamilies of Leptodactylidae. In the present work, the living species of *Paratelmatobius*, *P. cardosoi* and *P. poecilogaster*, and of the monotypic genus *Scythrophrys*, *S. sawayae*, were studied cytogenetically. Some restriction enzyme sites of ribosomal gene 28S were also analyzed. The karyotypic study indicated the presence of a new species of *Paratelmatobius*, *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*), and two groups of *Scythrophrys*, a finding supported by some morphological and bioacoustical analyses carried out by others. The diploid complement of all these species and that already described for *P. lutzii* consists of 24 chromosomes, several of which were similar in morphology, especially those of *P. poecilogaster*, *P. lutzii* and group II of *Scythrophrys*. A diploid number of $2n=24$ is rare among leptodactylids and the karyotypes of species with this chromosome number share fewer similarities with *Paratelmatobius* e *Scythrophrys*. Analysis of the nucleolus organizer regions (NORs) suggested that the presence of an NOR in a short metacentric chromosome, as seen in *P. poecilogaster*, *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) and group II of *Scythrophrys*, is a plesiomorphic state relative to the NOR location in these genera. The C-banding suggested possible sinapomorphies between *P. cardosoi* and *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*), and between the groups of *Scythrophrys*. This technique also revealed non-centromeric heterochromatin in the short arm of chromosome 1 in all the karyotypes, although this region showed interspecific variation in size. Molecular analysis of ribosomal DNA revealed a Pvu II site exclusive to populations of group I of *Scythrophrys*, which agrees with the proposal for two taxonomic groups in this genus. The species of *Paratelmatobius* and *Scythrophrys*, as well as *Cycloramphus izeckshoni* and *Hylodes asper*, failed to show a Bst EII site considered by others to be indicative of possible synapomorphy between the subfamilies Leptodactylinae and Telmatobiinae. The restriction maps for *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* showed interspecific variation in the size of some rDNA fragments, indicating that such regions may be useful in future molecular studies.

III - Introdução

Os estudos citogenéticos e moleculares têm fornecido importante contribuição para as investigações em sistemática de vários grupos de organismos. A análise das variações cromossômicas e da sequência do DNA permite a formulação de hipóteses sobre a relação filogenética entre diferentes grupos taxonômicos e sobre os fenômenos ecológicos e os rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução desses grupos. Embora muitas vezes a filogenia sugerida pelos dados citogenéticos e pelos dados moleculares coincida com a proposta baseada em análises morfológicas anatômicas, ecológicas e bioquímicas, existem casos de controvérsia ou diferentes resoluções entre esses tipos de análise. Isso pode ser resultado da superficialidade de alguma das análises feitas, o que leva a interpretações incorretas, da ocorrência de convergência durante a evolução de algum desses grupos de caracteres ou da diferença de taxa evolutiva de diferentes conjuntos de caracteres (Futuyma, 1992). Essa variação na taxa evolutiva é também responsável pela observação de que a análise isolada de um caráter sistemático não é capaz de fornecer informações filogenéticas em todos os níveis taxonômicos. Algumas técnicas de estudo geralmente permitem relacionar filogeneticamente espécies próximas, enquanto outras geralmente elucidam as relações entre taxa mais elevados. Essa observação também justifica a análise conjunta de dados de diferentes naturezas para maximizar o entendimento correto da filogenia do grupo de interesse (Hillis, 1987). Dessa forma, os estudos citogenéticos e moleculares fornecem novos dados que devem ser analisados conjuntamente com os anatômicos, ecológicos e bioquímicos para a escolha da árvore filogenética mais provável.

A Ordem Anura compõe a Classe Amphibia juntamente com as ordens Urodela e Gymnophiona. Os anuros são cosmopolitas, não ocorrendo apenas nas latitudes mais extremas ao norte, na Antártida e nas ilhas oceânicas. Atualmente, os anuros estão agrupados em 29 famílias (Frost, 2000). As investigações filogenéticas em Anura com base apenas em dados morfológicos são de difícil interpretação, uma vez que, apesar do grande número de espécies e da diversidade de habitats, os anuros são pouco variados morfolologicamente (Hillis, 1991; Emerson *et al.*, 2000). Exceto pelas relações entre as famílias basais (Cannatella, 1985, *apud* Hillis, 1991; Hillis, 1991),

muito pouco é conhecido sobre a filogenia dos Anura. A pequena divergência morfológica entre os Neobatrachia pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato de a maioria das famílias desse grupo ter derivado do ancestral há pouco tempo na escala evolutiva (Hillis, 1991). No entanto, isso não impede que caracteres citogenéticos e moleculares tenham sofrido maior divergência do que os morfológicos (a taxa evolutiva entre diferentes caracteres pode variar, como já mencionado), o que justifica uma maior investigação dos Neobatrachia nesses níveis. Exemplos que corroboram essa hipótese são encontrados em Bogart & Wasserman (1972), Batistic *et al.* (1975), Wiley *et al.* (1989), Hillis *et al.* (1993), Lourenço *et al.* (1999), dentre outros.

1. A citogenética como ferramenta de estudo em Anura

Até a década de 80, os estudos citogenéticos em Anura eram desenvolvidos com técnicas simples e a maior preocupação dessas investigações era a caracterização do número cromossômico de cada espécie. Esses estudos iniciais permitiram detectar a ocorrência de certa variabilidade entre os anuros, que se mostrou grande em determinados gêneros, como *Eleutherodactylus* (ver revisão de Bogart & Hedges, 1995, para referências) e pequena em outros, como *Bufo* (Bogart, 1973), embora Wilson *et al.* (1974) e Bush *et al.* (1977) tenham defendido a ocorrência de pequena taxa de evolução em Anura.

Embora muitos mecanismos de evolução cariotípica em Anura tenham sido propostos com base na análise de cariótipos corados convencionalmente com Giemsa (por exemplo, Morescalchi, 1967, e Bogart, 1973), melhor compreensão das relações filogenéticas entre os anuros e dos mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica desses animais passou a ocorrer após o uso de técnicas citogenéticas mais avançadas. Dentre essas, encontram-se o método Ag-NOR, o bandamento C, os bandamentos obtidos com enzimas de restrição, a coloração com fluorocromos e a hibridação “in situ”, que possibilitam a melhor caracterização dos cromossomos e, conseqüentemente, facilitam o reconhecimento de homeologias cromossômicas.

O bandamento G e os bandamentos baseados na replicação do DNA também já forneceram resultados satisfatórios para algumas espécies de anuros (Schempp & Schmid, 1981; Stock, 1984;

Schmid & Steinlein, 1991; Nishioka *et al.*, 1993; Schmid & Klett, 1994; Miura, 1995; Miura *et al.*, 1995; Kasahara *et al.*, 1996; Wiley & Little, 2000), embora sejam metodologias cujo emprego ainda oferece dificuldades, especialmente o bandamento G. Segundo Sumner (1994), uma adequação nas técnicas pode acabar resultando na detecção dessas bandas, embora ele não descarte a possibilidade de que a não visualização de bandas seja devida a uma forte espiralização dos cromossomos de anfíbios (como sugerido por Schmid, 1978a,b). Por outro lado, Holmquist *et al.* (1982) e Bernardi *et al.* (1985) defendem a hipótese de que o genoma nuclear dos vertebrados de sangue frio não apresenta "isocoros" (segmentos de DNA homogêneos na composição de bases e com replicação na mesma etapa da fase S), diferindo, assim, do genoma dos vertebrados de sangue quente. Segundo esses autores, nos vertebrados inferiores, inclusive anfíbios, o genoma estaria organizado em "clusters" temporais, mas tais "clusters" não formariam segmentos homogêneos em relação à composição de bases nitrogenadas, o que justificaria a não-obtenção de bandamento G nos cromossomos desses animais. Essa hipótese, no entanto, não é aceita por Stock (1984) e King (1988), que apresentam exemplos de cromossomos de anuros com bandas longitudinais resultantes do tratamento com tripsina (bandamento G). Para Schmid & Almeida (1988), tanto a extrema espiralização cromossômica como a ausência de regiões homogêneas na composição de base no DNA ("isocoros") podem estar envolvidas na não-obtenção de padrão de bandas de restrição semelhante ao apresentado pelos mamíferos.

Nos casos em que o bandamento G e aqueles baseados na replicação do DNA promovem a visualização de bandas transversais ao longo de todo o comprimento dos cromossomos, uma melhor comparação de diferentes cariótipos, cromossomo a cromossomo, se torna possível e a identificação de possíveis rearranjos ocorridos no processo de diferenciação dos cariótipos em análise fica mais eficiente.

Analisando as primeiras descrições cariotípicas de anuros, que consistiam na determinação do número cromossômico, identificação de constrições secundárias, posições centroméricas e comprimento relativo dos cromossomos (para referências, ver Kuramoto, 1990, e King, 1990), Morescalchi (1968, 1973) e Lynch (1971) sugeriram que anuros com caracteres morfológicos primitivos têm cariótipos com alto número cromossômico e, conseqüentemente, os cariótipos com poucos cromossomos das espécies mais derivadas são resultantes de um longo processo evolutivo.

Ainda com base em dados dessa natureza, Bogart (1973) especulou que cariótipos de anuros pertencentes a famílias consideradas mais derivadas (como Dendrobatidae, Hylidae, Leptodactylidae, Microhylidae e Ranidae) possam ter originado a partir de um cariótipo ancestral com 26 cromossomos do tipo de pelobatídeo. Segundo Bogart, cariótipo desse tipo é encontrado, por exemplo, em gêneros considerados primitivos dentro de Leptodactylidae, como *Telmatobius* e *Calyptocephala*. Provavelmente, nessa família o cariótipo ancestral com $2n=26$ sofreu redução cromossômica, originando cariótipos com 24 e 22 cromossomos, o que representa a maior dicotomia ocorrida entre os Leptodactylidae (Bogart, 1973).

Um interessante exemplo de redução do número diplóide de $2n=26$ para $2n=24$ foi observado no gênero *Rana* (Ranidae). Analisando os padrões de bandas de replicação tardia apresentados por diferentes espécies do grupo de sapos marrons ("brown frogs"), Miura *et al.* (1995) sugerem que um único evento de fusão "in tandem" entre os cromossomos 11 e 13 de um cariótipo ancestral com $2n=26$ (do tipo dos cariótipos atuais de *Rana* com $2n=26$) possa explicar a origem dos cariótipos com $2n=24$ em estudo. Embora a ocorrência dessa fusão cromossômica já tivesse sido uma das alternativas consideradas por Nishioka *et al.* (1987, *apud* Miura *et al.*, 1995), as análises de cariótipos corados convencionalmente ou submetidos ao bandamento C realizadas anteriormente ao estudo de Miura e colaboradores levaram alguns autores a interpretações equivocadas acerca do rearranjo em questão. Morescalchi (1967), por exemplo, sugeriu uma fusão entre cromossomos 6 e 10 e uma possível perda de material cromossômico para explicar a diminuição no número cromossômico diplóide nesse grupo. Já Green (1983) supôs que tal variação cromossômica tivesse envolvido a produção inicial de dois cromossomos telocêntricos através de inversões pericêntricas e a subsequente fusão desses.

Homeologias cromossômicas também foram reconhecidas entre os padrões de bandas de replicação tardia de seis espécies e uma subespécie de *Rana*, uma espécie de *Hyla* e uma de *Bufo*. Tal análise permitiu que Miura (1995) sugerisse que o baixo número cromossômico (22-26) e a similaridade dos cariótipos desses três gêneros (representantes de diferentes famílias) provavelmente não sejam resultantes de convergência, mas sim características presentes em um cariótipo ancestral comum, conservados até então. Essa conclusão de Miura reforça a hipótese de Bogart (1973) sobre a origem comum dos cariótipos de anuros de famílias mais derivadas,

mencionada anteriormente. Miura compara, também, os padrões de bandas de replicação tardia de *Rana*, *Hyla* e *Bufo* com o de *Xenopus laevis* ($2n=36$), descrito por Schmid & Steinlein (1991), espécie pertencente à família Pipidae, considerada primitiva em Anura. O autor conclui que cromossomos grandes de *Rana*, *Hyla*, *Bufo* e *Xenopus laevis* apresentam certa homeologia entre si, sugerindo que o cariótipo ancestral desses taxa inclui tais cromossomos. Miura suspeita, ainda, que outros gêneros também primitivos e com número cromossômico diplóide maior do que 26, como *Ascaphus* e *Alytes*, apresentem homeologia com os cromossomos grandes dos quatro gêneros mencionados anteriormente. Portanto, segundo esse autor, os rearranjos cromossômicos ocorridos durante a divergência dos Anura envolveram, principalmente, os cromossomos menores.

Além da fusão "in tandem", cujo exemplo foi considerado anteriormente, eventos de fusão cêntrica também podem ter acarretado redução no número cromossômico diplóide ao longo do processo evolutivo em Anura (Bogart, 1973; 1991; Beçak *et al.*, 1970; Morescalchi, 1973). Morescalchi (1973) considera, ainda, que tais eventos de fusão cromossômica possam ter contribuído para a transformação de cariótipos assimétricos em cariótipos simétricos. Por outro lado, o aumento do número cromossômico diplóide observado em alguns casos de anuros pode ser explicado por eventos de fissão cêntrica, conforme descrito por Bogart (1973, 1991), Cole (1974), Miura (1995) e Busin *et al.* (2001). Diferente do que ocorre nos exemplos já citados, em alguns casos não é possível apontar a polaridade da transformação cariotípica em análise, sendo impossível a eleição da redução ou do aumento de número cromossômico como o evento que resultou na situação atual. Exemplo disso é o que ocorre com *Eleutherodactylus glandulifer* (Bogart, 1991).

Translocações, inversões, adições, deleções e amplificações são também rearranjos que devem ter importante participação na evolução cariotípica. Vários estudos supõem que eventos como esses possam estar envolvidos, por exemplo, na diferenciação de cromossomos sexuais em diversos organismos, tendo, muitos deles, papel crucial no início desse processo (ver revisão de John, 1988).

Em Anura, a ocorrência de heteromorfismos sexuais cromossômicos é rara. Dentre as espécies citogeneticamente estudadas até hoje, apenas cerca de 24 casos de cromossomos sexuais heteromórficos são conhecidos e em vários desses casos o heteromorfismo só é detectado em

cariótipos submetidos a alguma técnica de bandamento cromossômico (ver revisão de Schmid *et al.* 1991; Nishioka *et al.* 1993; Schmid *et al.* 1992; Miura 1994a,b; Cuevas & Formas 1996; Lourenço *et al.*, 1999; Ryuzaki *et al.*, 1999). Diversos mecanismos cromossômicos relacionados à determinação do sexo ocorrem em Anura, evidenciando a participação de diferentes processos evolutivos na diferenciação de cromossomos sexuais nesse grupo. Tais processos são, portanto, recentes e muitas vezes suas evidências podem ser reconhecidas no estudo de categorias taxonômicas pouco abrangentes, como gêneros e espécies (exemplos em Iturra & Veloso, 1989; Cuevas & Formas, 1996; Lourenço *et al.*, 1999). Dessa forma, o estudo dos cromossomos sexuais pode fornecer interessantes informações acerca de relações filogenéticas interespecíficas, naqueles grupos em que tais cromossomos são facilmente reconhecidos através da análise citogenética.

Além dos rearranjos cromossômicos mencionados anteriormente como responsáveis pela diferenciação de cromossomos, os eventos de não-redução meiótica e/ou de endomitose zigótica também parecem ter exercido importante papel na evolução dos anuros. Vários casos de poliploidização são observados em diferentes famílias de Anura. Dentre os leptodactilídeos, por exemplo, são encontradas espécies poliplóides nos gêneros *Odontophrynus* (4n), *Ceratophrys* (8n), *Pleurodema* (4n), *Eleutherodactylus* (8n) e *Neobatrachus* (4n) (revisão de Tymowska, 1991). Exemplos de poliploidização são encontrados também em Bufonidae (revisão de Tymowska, 1991; Stöck *et al.*, 1999), em Hylidae (*Phyllomedusa*, 4n), em Ranidae (*Pyxicephalus*, 4n, e *Discoglossus*, 4n), em Myobatrachidae (*Neobatrachus*, 4n), em Pipidae (*Xenopus*, 4n) (ver lista de Kuramoto, 1990 e revisão de Tymowska, 1991) e em Microhylidae (*Cophixalus*, 4n, e *Chiasmocleis*, 4n) (Kuramoto & Allison, 1989; Kasahara & Haddad, 1997).

A autopoliploidização, segundo Tymowska (1991), é o mecanismo mais comum de poliploidização em Anura. No entanto, *Xenopus* e *Pleurodema* oferecem evidentes exemplos de alopoliploidização, fenômeno que envolve a formação de híbridos além dos eventos de não-disjunção cromossômica. A poliploidização é considerada um importante mecanismo de especiação em Anura, como proposto por Bogart & Wasserman (1972), que discutem a existência de duas espécies morfológicamente idênticas que apresentam, respectivamente, cariótipo diplóide e poliplóide.

1.1. As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) como caracteres citogenéticos

A análise das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) representa uma importante ferramenta para o estudo de cariótipos em anfíbios. As NORs são sítios cromossômicos formados por numerosas cópias de genes que codificam os RNA ribossomais (RNAr) 18S, 5,8S e 28S, arranjadas "in tandem" e separadas por seqüências espaçadoras (Long & Dawid, 1980; Miller, 1981). Além dessas seqüências, cada unidade repetitiva dos "clusters" de DNA ribossomal (DNAr) apresenta um espaçador transcrito externo, localizado a 5' do DNAr que codifica o RNAr 18S e dois espaçadores internos, posicionados entre os DNAr que codificam RNAr 18S e 5,8S e entre esse e o que transcreve RNAr 28S. Esses espaçadores são removidos do transcrito primário (que é um RNA 40S no caso dos anfíbios) durante o processo de maturação desse tipo de RNA (Long & Dawid, 1980).

As NORs são ricas em GC, principalmente nas regiões que codificam os RNAs 18S, 5,8S e 28S (Sumner, 1990) e geralmente são regiões de constrições secundárias, como inicialmente observado por Henderson *et al.* (1972) e Hsu *et al.* (1975). No entanto, algumas evidências mostram que nem todas as NORs aparecem como constrições secundárias e que em alguns casos elas contêm heterocromatina (Goessens, 1984; King, 1980; Schmid, 1982). Algumas observações sugerem, ainda, a localização adjacente de determinado tipo de heterocromatina em relação a algumas NORs (Schmid 1978a; 1982; King, 1980).

As regiões espaçadoras entre os cístrons 18S+28S são provavelmente compostas parcialmente ou inteiramente de seqüências repetitivas de DNA, o que justifica a detecção dessa região pela técnica de bandamento C (ver revisão de King, 1991). O papel dessa heterocromatina em rearranjos envolvendo as NORs já foi questionado em estudos com urodelos. De Lucchini *et al.* (1988) propuseram que a ocorrência de seqüências repetitivas nos espaçadores intergênicos do DNAr de *Triturus vulgaris meridionalis* provoque um aumento na freqüência de recombinação e/ou amplificação dessas regiões, acarretando a grande variabilidade de número e tamanho apresentada por "sítios adicionais" de DNAr.

A transcrição das NORs na intérfase acarreta a formação de nucléolos. Tais estruturas são constituídas por proteínas relacionadas a esse processo de transcrição e proteínas ribossomais (que

representam cerca de 85% dessa estrutura), além de DNA e RNA ribossomais (que podem representar até 17 e 10% do nucléolo, respectivamente). Nos nucléolos ocorre não só a síntese do transcrito primário, mas também o seu processamento para a produção do RNAr 18S, 5,8S e 28S e a associação desses RNAr com proteínas ribossomais e RNAr 5S (sintetizado fora do nucléolo e, então, transportado para esse) para a formação das subunidades ribossomais 40S e 60S. O tipo, o tamanho e o número de nucléolos existentes na célula também variam conforme o tipo celular estudado, o estado fisiológico da célula e o número de NORs existentes na célula. Nucléolos em forma de anéis, por exemplo, são encontrados em células com pequena síntese ribossomal, como linfócitos pequenos e monócitos do sangue periférico. Nucléolos grandes e compactos ou reticulados são observados em células muito ativas em relação à biogênese ribossomal, como células com alta velocidade de duplicação e células secretoras. Provavelmente, a diferença entre os tipos compacto e reticulado representa pouca diferença na atividade nucleolar. As diferenças morfológicas nucleolares que oferecem maiores informações sobre as características relativas às NORs e às suas atividades são tamanho e número. Um aumento na síntese de ribossomos, resultante da ativação de mais NORs, acarreta uma fusão entre elas e, conseqüentemente, entre os nucléolos. Quando a célula entra em divisão, ocorre a dispersão do nucléolo, originando vários nucléolos pequenos. Geralmente células que se dividem raramente ou não se dividem têm um ou poucos nucléolos (revisões de Schwarzscher & Wachtler, 1993; Schwarzscher & Mosgoeller, 2000).

Além de ser o sítio de transcrição de RNA ribossomal 18S, 5,8S e 28S, o nucléolo apresenta proteínas não-ligadas à biogênese ribossomal que exercem importante papel no controle do ciclo celular. Nos últimos anos, foram identificadas três proteínas reguladoras do ciclo celular cujas atividades são inibidas no nucléolo, Cdc 4, Mdm2 e Pch2 (ver revisões de Schwarzscher & Mosgoeller, 2000; Visintin & Amon, 2000). O processamento de alguns RNAs transportadores de fungos, a maturação do RNA da partícula de reconhecimento do sinal (RNA SRP) e outras modificações pós-transcricionais de pequenos RNAs nucleares (snRNA), como a metilação do RNA spliceossomal U6, são eventos que também ocorrem no nucléolo e estão motivando vários estudos (revisão de Olson *et al.*, 2000). No homem, o acúmulo de alguns vírus patogênicos no nucléolo também já foi relatado e as implicações desse fato têm sido questionadas (ver revisão de Schwarzscher & Mosgoeller, 2000).

A detecção das NORs para a análise do número e da localização cromossômica dessas regiões pode ser feita através de hibridação "in situ" ou através de técnicas citoquímicas, como coloração com mitramicina ou cromomicina, bandamento N e impregnação pelo íon prata. Dentre esses métodos, a hibridação "in situ" é o mais específico e evidencia todas as NORs, inclusive as inativas. A mitramicina e a cromomicina coram regiões genômicas ricas em GC, podendo evidenciar, portanto, não apenas as NORs, mas também muitos outros segmentos ricos em GC, como certas regiões heterocromáticas. O bandamento N (proposto por Matsui & Sasaki, 1973) envolve a extração de ácidos nucleicos e histonas dos cromossomos, seguida pela coloração com Giemsa e evidencia NORs. Embora Faust & Vogel (1974) tenham sugerido que esse bandamento evidencie heterocromatinas específicas adjacentes às NORs e não o DNAr dessas regiões, a técnica proposta em 1973 após algumas modificações mostrou-se capaz de detectar NORs em muitas espécies, como mencionado por Sumner (1990). A impregnação pelo íon prata é o método mais usado para a identificação de NORs, embora detecte apenas as NORs que estiveram ativas na interfase precedente. Essa técnica foi proposta inicialmente por Howell *et al.* (1975) e sofreu várias modificações, sendo o procedimento sugerido por Howell & Black (1980) o mais utilizado para a detecção de NORs e nucléolos.

O método de impregnação por prata (método Ag-NOR) baseia-se na afinidade de proteínas ácidas associadas às NORs ativas na interfase pelo íon prata. Essas proteínas argirófilas, também conhecidas por proteínas Ag-NOR, permanecem associadas às NORs mesmo durante a mitose e até o paquíteno da meiose. Vários estudos estão sendo feitos na tentativa de descrever quais são as proteínas Ag-NOR e algumas delas já foram identificadas, como RNA polimerase I (Scheer & Rose, 1984), nucleolina (Ochs *et al.*, 1983), DNA topoisomerase I (Guldner *et al.*, 1986), p135 (Pfeifle *et al.*, 1986) e UBF (Chan *et al.*, 1991; Hernandez-Verdun *et al.*, 1993). Trerè *et al.* (1989), analisando o aumento da área nucleolar em células tumorais, sugerem que proteínas envolvidas no preparo dos genes ribossomais para duplicação também sejam argirófilas. O domínio protéico responsável pela impregnação da prata também está sendo investigado. Alguns pesquisadores acreditam que a afinidade da prata se dá pelo grupo fosfato (Sato & Busch, 1981; Hubbell, 1985). Outros acreditam que os responsáveis sejam grupos carboxilas (Olert *et al.*, 1979; Buys & Osinga, 1984). Uma outra possibilidade é que o grupo argirófilo seja o sulfidril (De Capoa *et al.*, 1982),

embora os resultados de Olert *et al.* (1979), Buys & Osinga (1984) e Hubbell (1985) não suportem essa hipótese. Hernandez-Verdun *et al.* (1993) propõem que a afinidade pela prata seja promovida pelo domínio ácido amino-terminal das proteínas Ag-NOR e que seja independente de fosforilação. No entanto, vários estudos ainda devem ser feitos para elucidar essa questão.

Embora seja um método largamente utilizado, a impregnação pela prata metálica não é específica para NORs, pois outras estruturas como heterocromatina, cinetocoro e "cores" cromossômicos também podem ser marcadas. No entanto, essas estruturas quando marcadas são facilmente distinguíveis das NORs pelas suas formas e colorações, pois geralmente as NORs aparecem mais escuras e são puntiformes (Sumner, 1990).

Apesar de vários estudos já terem mostrado que algumas NORs podem permanecer inativas (ver revisões de Schwarzaker & Wachtler, 1993, e Schwarzaker & Mosgoeller, 2000), os mecanismos de interação entre as diferentes NORs e aqueles de interação entre as NORs e outras regiões do genoma, que interferem na regulação da atividade dos cístrons de DNA são pouco conhecidos. Estudos realizados em espécies de gafanhoto evidenciaram que regiões de heterocromatina supernumerária podem acarretar a inativação de genes supressores de genes ribossomais (Cabrero *et al.*, 1986; López-León *et al.*, 1995), relacionando polimorfismo de bandas heterocromáticas com variação no padrão de NOR apresentado. Salcedo *et al.* (1988), também em estudos com gafanhotos, relacionaram a ocorrência de cromossomos B com o aumento da dependência entre NORs, acarretando o aumento da atividade de algumas NORs e diminuição de outras. O estágio do desenvolvimento fisiológico também já foi relacionado com a regulação da atividade de NORs em ervilhas (Waterhouse *et al.*, 1986; Watson *et al.*, 1987) e em gafanhoto (López & León *et al.*, 1995). Vários trabalhos têm mostrado, ainda, a interação entre NORs em híbridos interespecíficos, evidenciando um fenômeno de competição entre as NORs provenientes de diferentes espécies, conhecido por anfiplastia, que resulta na dominância de algumas NORs, determinada em função da combinação de NORs encontrada (Bicudo, 1981). Em nível inter- e intrapopulacional, o fenômeno de competição e dominância entre NORs também já foi observado (Flavell & O'Dell, 1988; Santos *et al.*, 1990). Os estudos de Santos e colaboradores, realizados em uma população de trigo, mostraram que as NORs ativas dominantes são mais metiladas do que as demais e que, na ausência das NORs dominantes, as outras NORs têm sua atividade aumentada.

Na maioria dos anuros estudados, as regiões evidenciadas pelo método Ag-NOR e por hibridação "in situ" com sondas de DNAr são coincidentes (Schmid *et al.*, 1986; King *et al.*, 1990; Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1993a; 1995; Lourenço *et al.*, 1998). Até hoje, em apenas quatro espécies, *Hyla chrysoscelis*, *Hyla versicolor* (Wiley *et al.*, 1989), *Hyla nana* (Medeiros, 2000) e *Colostethus aff. marchesianus* (Veiga, 2000), o método de hibridação "in situ" revelou sítios adicionais não detectados por impregnação por prata, além das NORs evidenciadas por ambos os métodos. Nesses casos, tais sítios de homologia com DNAr nunca foram evidenciados como NORs ativas, o que torna a regulação diferencial na expressão dessa região uma hipótese pouco provável para a explicação do fenômeno observado. Por outro lado, a inativação permanente dos genes ribossomais presentes nesses sítios detectados exclusivamente pelo método de hibridação "in situ" é uma possível explicação para a situação relatada.

A inativação de genes ribossomais já foi levantada para explicar a não-detecção de NORs em todos os cromossomos homólogos ao portador de NOR na espécie tetraplóide de *Odontophrynus americanus* (Ruiz *et al.*, 1981; Cortadas & Ruiz, 1988; Ruiz & Brison, 1989), embora nesse caso a técnica de hibridação "in situ" não tenha sido utilizada para verificar a existência desses sítios possivelmente inativos. Já em híbridos interespecíficos de *Xenopus laevis* e *Xenopus mulleri*, a regulação da atividade de transcrição de DNAr foi claramente descrita (Honjo & Reeder, 1973). Nesse estudo os autores mostraram a transcrição preferencial do DNAr de *X. laevis* e a supressão da atividade do DNAr de *X. mulleri*.

O tamanho das diferentes NORs (mesmo que sejam homólogas) também pode variar entre diferentes indivíduos da mesma espécie, devido ao diferente número de cópias do gene ribossomal presente em cada NOR (Suzuki *et al.*, 1990; Leitch & Heslop-Harrison, 1992; Mellink *et al.*, 1994). Em anuros, esse fenômeno é bastante comum e amplamente descrito (Schmid 1978a,b; 1980a,b; 1982; Silva *et al.*, 1999; Formas & Cuevas, 2000). Segundo Schmid (1982), NORs duplicadas ou triplicadas não ocorrem em homozigose em populações selvagens, estando sempre associadas a NORs de tamanho "normal". A hipótese levantada por aquele autor para explicar tal fenômeno é a de que a homozigose de seqüências adjacentes às NORs, duplicadas juntamente com elas, tenha efeito deletério. Nesse caso, tais seqüências duplicadas seriam as responsáveis pela seleção sofrida pelo morfo portador da duplicação e não a duplicação da NOR propriamente dita, visto que o

excesso de DNAr parece não ser prejudicial ao organismo. Na maioria dos casos de heteromorfismos de tamanho de NORs descritos, não foi mencionada nenhuma variação intraindividual no padrão de NORs detectadas nas metáfases. No entanto, King *et al.* (1990) relataram variação desse tipo entre diferentes células de um mesmo indivíduo em espécies de *Litoria* e em *Cyclorana novaehollandiae* (Anura, Hylidae).

O número e a localização das NORs tendem a ser característicos de cada população ou espécie (para exemplos, Schmid, 1978a,b), embora variações dessas naturezas já tenham sido relatadas nos anuros *Hyla chrysoscelis* e *Hyla versicolor* (Wiley *et al.*, 1989), *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991), *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995), *Hyla ebraccata* (Kaiser *et al.*, 1996), *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998), *Physalaemus cuvieri* (Silva *et al.*, 1999) e *Hyla nana* (Medeiros, 2000). No caso de *Hyla ebraccata*, a variação encontrada é interpopulacional e se refere à localização da NOR. Nas demais espécies citadas, puderam ser observados exemplos de variação intrapopulacional na ocorrência de NORs. Em *B. terrestris*, *A. callidryas* e *P. cuvieri*, a variação intrapopulacional se dá em relação a NORs que ocorrem adicionalmente a um par fixo de NORs. Já em *H. chrysoscelis*, *H. versicolor* e *P. petersi*, nenhuma NOR está fixada nas populações estudadas.

A maioria dos anuros apresenta um par de NORs por genoma diplóide, condição observada tanto em famílias primitivas como derivadas (ver Kuramoto, 1990, e King, 1990, para referências). Tal observação levou King *et al.* (1990) a sugerir que, em Anura, a presença de apenas um par de NORs por genoma diplóide seja uma condição primitiva em relação à ocorrência de NORs múltiplas. Embora os eventos que levaram à dispersão da NOR durante o processo evolutivo não possam ser inequivocamente reconhecidos nos diferentes casos já estudados, alguns mecanismos possivelmente envolvidos nesse processo têm sido considerados por diversos autores (Wiley *et al.*, 1989; King *et al.*, 1990; Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1996; Lourenço *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999). São eles: translocações e/ou inversões envolvendo segmentos portadores de NOR, transposições acarretadas por elementos genéticos móveis ligados à NOR, ampliações de cístrons 18S+28S órfãos, e reinserções errôneas de DNA ribossomal durante a amplificação extracromossomal de cístrons 18S+28S observada na ovogênese de anfíbios.

Dessa forma, a análise cuidadosa do número e da localização cromossômica das NORs pode permitir a identificação de homeologias entre diferentes populações e espécies, possibilitando, em alguns casos, o reconhecimento de alguns rearranjos cromossômicos que possivelmente diferenciaram cariotipicamente diversos grupos. Além disso, a análise das NORs e dos nucléolos permite o estudo da atividade da célula durante o seu desenvolvimento, como no caso da gametogênese. Esse tipo de análise também pode auxiliar os estudos filogenéticos.

1.2. Heterocromatina constitutiva e suas implicações evolutivas

O termo heterocromatina foi atribuído por Heitz (1928) a segmentos cromossômicos que permanecem no estado condensado durante toda a intérfase, com base em observações morfológicas. Estudos autorradiográficos mostraram que a cromatina encontrada no estado condensado é transcricionalmente inativa (Ris & Korenberg, 1979). Dependendo do tipo de condensação envolvido, é possível distinguir três classes de cromatina condensada no núcleo interfásico: eucromatina condensada, heterocromatina facultativa e heterocromatina constitutiva. No caso da condensação da eucromatina, a inativação é reversível e ocorre em determinada geração celular. A heterocromatina facultativa é uma forma de eucromatina que sofreu inativação e condensação no início do desenvolvimento do organismo e permanece nesse estado por muitas gerações celulares em todos os tecidos somáticos. A heterocromatina constitutiva é aquela localizada em posições idênticas de cromossomos homólogos, em todas as células, como uma entidade permanente. Foram segmentos de heterocromatina constitutiva que Heitz (1928) descreveu e denominou de heterocromatina. Ao microscópio de luz essas classes podem ser diferenciadas; no entanto, tais cromatinas apresentam a mesma densidade ao microscópio eletrônico (ver revisão de John, 1988).

A heterocromatina constitutiva de diversos organismos já estudados é composta predominantemente por seqüências curtas de DNA, altamente repetitivas e não codificadoras, como confirmam as revisões de John (1988) e Sumner (1994). A suposta inexistência de genes na heterocromatina constitutiva e a observação de que essa cromatina pode ser deliberadamente

eliminada ou não amplificada enquanto o restante do DNA sofre politenização em células somáticas levou, no passado, alguns pesquisadores a considerarem a heterocromatina um “lixo” do núcleo. No entanto, atualmente já se sabe que vários genes funcionais são encontrados na heterocromatina de alguns organismos (ver revisões de Weiler & Wakimoto, 1995) e muitas funções já foram atribuídas à heterocromatina (indicadas a seguir), embora o significado biológico e evolutivo da heterocromatina ainda permaneça pouco elucidado e motive várias investigações. A heterocromatina deixa de ser o “lixo” do núcleo e é referida como *collector's item* (item de colecionador) (Pardue & Henning, 1990).

A inativação de genes localizados dentro ou próximos à heterocromatina foi um dos primeiros efeitos atribuídos à heterocromatina (variação por efeito de posição) e é um fenômeno amplamente estudado em *Drosophila* (Spofford, 1976; Reuter & Spierer, 1992; Weiler & Wakimoto, 1995). Por outro lado, segmentos heterocromáticos extras, não necessariamente adjacentes a NORs, também já foram relacionados com a regulação da expressão dessas regiões organizadoras de nucléolos. Cabrero *et al.* (1986), em estudos com gafanhoto, relacionaram a existência desses segmentos heterocromáticos extras a um aumento na atividade de NORs secundárias, sugerindo que esses blocos de heterocromatina possam inativar genes supressores dessas NORs, encontrados adjacentes a essa heterocromatina. López-León *et al.* (1995), também em estudo com gafanhoto, evidenciaram a ocorrência de vários tipos de dependência entre NORs na presença de heterocromatina supernumerária.

Uma importante proteína relacionada à inativação gênica em vários organismos é a HP1 (*heterochromatin protein 1*) (Eissenberg *et al.*, 1990). Originalmente descrita em *Drosophila* (James & Elgin, 1986; James *et al.*, 1989), a HP1 é uma proteína não-histônica atualmente já descrita em fungo, insetos, peixe, anfíbios e mamíferos (ver revisão de Eissenberg & Elgin, 2000). Vários estudos têm sido realizados a fim de esclarecer o mecanismo pelo qual a HP1 (e suas isoformas) reconhece e se liga à cromatina, para melhor entendimento do seu papel na repressão da expressão gênica (Minc *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000).

King (1991) discute outro importante efeito da heterocromatina, que se refere à proteção de sítios eucromáticos adjacentes a ela contra modificações estruturais acarretadas por recombinação, uma vez que a presença de heterocromatina pode inibir a formação de quiasma. Essa situação nem

sempre é observada em relação a blocos de heterocromatina já fixados na população, mas invariavelmente detectada em populações em que segmentos de heterocromatina encontram-se em um estado polimórfico (ver King, 1991, para referências; Íñigo *et al.*, 1998; Lourenço *et al.*, 1999). Além disso, John (1988) afirma em sua revisão que algumas categorias de heterocromatina permitem recombinação enquanto outras não, o que justificaria a observação de diferentes comportamentos meióticos em relação à presença de blocos heterocromáticos. Os casos de heteromorfismo de heterocromatina que acarretam a redução na taxa de recombinação podem ter grande importância para o início de diferenciação de cromossomos sexuais (Singh *et al.*, 1976; Jones & Singh, 1981; Jones, 1983; 1984).

Outra relevante observação relativa à heterocromatia refere-se à capacidade de pareamento ou associação meiótica apresentada por seqüências heterocromáticas encontradas em cromossomos homólogos ou não, fenômeno que exerce importante papel no pareamento cromossômico (Hawley *et al.* 1993; Íñigo *et al.*, 1998; revisões de John, 1988, Irick, 1994, e Wolf, 1994). Esse comportamento da heterocromatina é amplamente estudado, mas a natureza quiasmática ou aquiasmática desse pareamento/associação é ainda motivo de controvérsias (John & King, 1985; Jones, 1987; Wada & Imai, 1995).

A participação da heterocromatina vem sendo relatada, ainda, em vários outros eventos, como a condensação cromossômica (Cobb *et al.*, 1999), a organização tridimensional da cromatina no núcleo, a coesão entre cromátides-irmãs (ver revisões de John, 1988, e Zuckerkandl & Henning, 1995) e o fenômeno de afinidade entre cromossomos de uma mesma espécie (Walker, 1971; Yunis & Yasmineh, 1971). À heterocromatina constitutiva associada a NORs já foi atribuído papel na formação de um único nucléolo durante a intérfase (Bickham & Rogers, 1985).

Vários elementos genéticos móveis já foram encontrados na heterocromatina constitutiva de muitos organismos, principalmente em insetos, envolvendo-a em outros processos celulares, já que tais elementos podem ser transcritos (Danilevskaya *et al.*, 1993; Shevelyov, 1993; revisão de Dimitri, 1997). Além disso, considerando que os elementos genéticos móveis podem induzir rearranjos cromossômicos, sua presença na heterocromatina constitutiva pode acarretar alterações na distribuição da heterocromatina no genoma, constituindo, assim, uma possível causa dos

polimorfismos observados em relação à heterocromatina constitutiva (ver revisão de Dimitri, 1997, para referências).

A heterocromatina constitutiva é geralmente detectada citogeneticamente através da técnica de bandamento C. As heterocromatinas com outras características são evidenciadas por outros métodos, como bandamento N e impregnação por prata. A reação de Feulgen também é utilizada para a detecção de regiões cromossômicas com maior ou menor condensação (Sumner, 1990).

O bandamento C foi descoberto por Pardue & Gall (1970), que sugeriram que as regiões evidenciadas por esse método eram constituídas quase exclusivamente de DNA altamente repetitivo, denominado de DNA satélite. Posteriormente, DNA altamente repetitivo foi encontrado nas regiões banda C-positivas em várias espécies. Embora essa correlação entre banda C-positiva e DNA altamente repetitivo frequentemente ocorra, há casos em que não foi detectado esse tipo de DNA em regiões evidenciadas pelo bandamento C (Sumner, 1990). Bostock *et al.* (1972), Citoler *et al.* (1972) e Sperling & Rao (1974) observaram que as bandas C são replicadas tardiamente durante a fase S, o que é esperado uma vez que a heterocromatina tem replicação tardia (Schmid, 1967; Lima-De-Faria & Joworska, 1968). Sumner (1990), ao analisar a presença de genes na heterocromatina, sugere que esses sejam componentes de uma região eucromática pequena, microscopicamente não detectada, localizada dentro de uma região heterocromática.

O mecanismo bioquímico para explicar o bandamento C foi proposto por Holmquist (1979) e apresenta, basicamente, três etapas: um tratamento ácido, que promove a remoção de purinas das moléculas de DNA; um tratamento alcalino, que provoca β -eliminação envolvendo a ribose do nucleotídeo que sofreu depuração e desnatura irreversivelmente o DNA; e um tratamento salino, que remove segmentos de DNA quebrados. Acredita-se que a extração de DNA através desse método ocorra mais lentamente nas regiões de heterocromatina constitutiva, embora não se conheça exatamente o motivo dessa sensibilidade diferencial ao método.

Dos bandamentos conhecidos, o C é o principal nos estudos de Anura, uma vez que os bandamentos G, R e Q apresentam resultado satisfatório apenas em vertebrados superiores, como relatado por Sumner (1990). A análise da localização e do tamanho das bandas C, assim como das marcações das NORs, permitem a identificação de cromossomos. As bandas C podem ser pericentroméricas, intersticiais ou teloméricas. Em alguns organismos, como algumas espécies de

insetos, verificam-se braços ou mesmo cromossomos inteiros heterocromáticos. Cromossomos que não apresentam nenhuma região banda C-positiva são raros e provavelmente não ocorrem em cariótipos normais. Frequentemente o padrão de bandas C varia entre diferentes espécies (Sumner, 1990), podendo portanto ser um importante caráter sistemático, que permite, inclusive, a sugestão de rearranjos genéticos ocorridos durante a evolução do grupo em estudo.

Várias espécies de Archaeobatrachia foram analisadas utilizando-se o bandamento C. Essas análises permitiram concluir que uma quantidade relativamente pequena de heterocromatina constitutiva é encontrada nesse grupo de anuros (King, 1991). Por outro lado, apenas cerca de 15% das espécies de Neobatrachia estudadas citogeneticamente foram analisadas através da técnica de bandamento C. As análises feitas nesse nível mostram grande diferença no padrão de bandas apresentado por espécies de diferentes famílias, como Bufonidae, Hylidae, Leptodactylidae e Myobatrachidae (King, 1991). Regiões banda C-positivas não-centroméricas são comumente encontradas nessas famílias.

Além das variações interespecíficas, variações intraespecíficas relativas a bandas heterocromáticas também já foram descritas em anuros, especialmente polimorfismos em relação ao tamanho dessas regiões (Schmid, 1978a,b; Schmid, 1980a,b; King, 1980, 1991; Schmid *et al.*, 1983; 1987; 1989; 1990; 1993b; Miura *et al.*, 1995). Variação interpopulacional no tamanho de blocos heterocromáticos é rara, mas alguns casos já foram descritos (Schmid *et al.*, 1987; Miura, 1995). Por outro lado, variações intraespecíficas referentes ao número e à localização de bandas heterocromáticas são pouco comuns, embora alguns casos já tenham sido reportados (Schmid 1978b; 1980b; 1987; Miura *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999; Formas & Cuevas, 2000).

A variação na quantidade de heterocromatina banda C-positiva observada em Amphibia levou King (1991) a propor o envolvimento de três processos na evolução da heterocromatina constitutiva nesse grupo: a adição de heterocromatina a sítios cromossômicos específicos; a transformação de regiões cromossômicas eucromáticas em regiões de heterocromatina constitutiva; e a evolução em conjunto de múltiplos sítios heterocromáticos. A adição de heterocromatina é resultante da amplificação de seqüências de DNA repetitivo e provavelmente está correlacionada a mudanças no comprimento dos cromossomos. Embora existam evidências que mostrem que a

adição de heterocromatina é uma tendência em *Amphibia*, nada impede que deleções de regiões heterocromáticas tenham ocorrido. O conceito de transformação das regiões eucromáticas em heterocromáticas, resultando na heterocromatinização do genoma de anfíbios, foi apresentado originalmente por King (1980). Esse processo não promove grandes alterações no comprimento do cromossomo e, embora esse mecanismo de transformação da cromatina ainda não seja bem compreendido, existem duas teorias tentando explicá-lo. Segundo uma delas, a amplificação de seqüências repetitivas específicas distribuídas de forma interespaçada ao longo de uma região eucromática, acarretando uma modificação no estado de condensação dessa região, que poderia, inclusive, ser detectada por fluorocromos e pelo bandamento C. A segunda teoria sugere que essa alteração na condensação cromossômica (heterocromatinização) seja resultado da incorporação de uma seqüência de DNA repetitivo, originada a partir da amplificação de um sítio específico, a uma região de DNA de seqüência única. Qualquer que seja a origem causal da heterocromatinização, esse processo implica desativação gênica, conforme se acredita desde White (1973).

Segundo King (1991), o aumento na quantidade de heterocromatina constitutiva é uma tendência evolutiva em *Amphibia*, embora não descarte a possibilidade de ocorrência de diminuição dessa cromatina em grupos isolados. Essa tendência evolutiva sugere algum papel funcional para esse DNA não-codificador, contrariando a hipótese de que a heterocromatina constitutiva seja um “lixo” sem função. Dentre as possíveis funções dessa heterocromatina já mencionadas anteriormente, a que se refere ao envolvimento da heterocromatina constitutiva na redução de recombinação entre cromossomos sexuais em diferenciação parece ter comprovação em *Amphibia*.

O terceiro processo citado pelo autor refere-se à tendência de uma família de seqüências de DNA repetitivo evoluir em harmonia, acarretando certa homogeneidade entre os membros dessa família, que é maior dentro de uma mesma espécie do que entre espécies relacionadas (John & Miklos, 1988). Segundo Dover (1988), processos como “crossing-over” desigual, transposição de DNA, conversão gênica, amplificação gênica e “slippage” na replicação estão envolvidos na homogeneização dessas seqüências. Em *Anura*, a maioria das regiões heterocromáticas paracentroméricas é rica em GC, enquanto em *Caudata* é rica em AT. Isso mostra uma distribuição não-casual dessas regiões heterocromáticas nesses dois grupos e uma dicotomia entre eles. No

entanto, a heterocromatina associada a NORs tanto em Anura com em Caudata é rica em GC, não mostrando dicotomia. A razão dessa diferença entre a heterocromatina paracentromérica e a associada a NORs ainda não é entendida (King, 1991), embora a proposta de King *et al.* (1990), de que a existência de seqüências altamente repetitivas nas regiões intergênicas dos DNAr de Anura estejam impedindo a formação de quiasma nessas regiões de NOR, possa estar envolvida nisso.

Essas características da heterocromatina banda C-positiva mencionadas acima evidenciam que o seu estudo pode fornecer importantes informações evolutivas, sendo, portanto, um importante caráter citogenético a ser analisado.

2. O estudo do DNA ribossomal

Os genes nucleares que codificam os RNA ribossomais 18S, 5,8S e 28S nos eucariotos estão repetidos "in tandem" em longos sítios cromossômicos denominados NORs. Dois espaçadores internos (ITS) separam os genes 18S e 5,8S (ITS-1) e os genes 5,8S e 28S (ITS-2). Além disso, um espaçador transcrito externo (ETS) ocorre "upstream" ao gene 18S e contém sinais para o processamento da molécula de RNAr resultante da transcrição, evento que consiste na remoção dos transcritos externo e internos. O tamanho da região transcrita varia entre diferentes espécies, principalmente devido a variações no tamanho dos espaçadores (Long & Dawid, 1980; Miller, 1981; Gerbi, 1986).

As unidades repetitivas adjacentes são separadas por um DNA espaçador não transcrito (NTS). Tais espaçadores, também denominados espaçadores intergênicos (IGS), variam consideravelmente em tamanho entre diferentes organismos e até mesmo no mesmo indivíduo (Miller, 1981). Essas regiões intergênicas contêm seqüências repetitivas de elementos conhecidos como "enhancers", que otimizam a transcrição dos genes de DNAr, provavelmente por atraírem os fatores de transcrição envolvidos na síntese de RNAr (Flavell & O'Dell, 1979; Kohorn & Rae, 1982; 1983; Reeder *et al.*, 1983; Reeder, 1984; Alvares *et al.*, 1998).

As várias cópias desses genes ribossomais presentes no núcleo tendem a evoluir em harmonia, como uma família gênica, graças a eventos que acarretam a homogeneização desses

segmentos. Esse fenômeno foi denominado "concerted evolution" e descrito por vários autores (Arnheim *et al.*, 1980; Dover & Coen, 1981; Krystal *et al.*, 1981; Coen *et al.*, 1982a,b; Arnheim, 1983). Dentre os eventos que possibilitam tal processo destacam-se o "crossing over" desigual e a conversão gênica (ver revisões de Hillis & Dixon, 1991, e Li & Graur, 1991, para referências). Como resultado desse processo, a variação intraindividual e até mesmo intraespecífica do DNAr em questão é pequena. As diferenças intraindividuais observadas referem-se basicamente a variações de tamanho do espaçador intergênico. Essa baixa taxa de polimorfismo faz do DNAr um bom marcador filogenético e permite, inclusive, a caracterização de cada espécie com base em pequenas amostras (ver revisão de Hillis & Dixon, 1991).

Além disso, outra importante vantagem que o DNAr apresenta para estudos filogenéticos consiste na ocorrência de diferentes regiões com diferentes taxas evolutivas ao longo de cada unidade repetitiva. Tal característica permite a obtenção de informações de parentesco evolutivo em diferentes níveis taxonômicos (ver revisão de Hillis & Dixon, 1991). Dessa forma, a subunidade menor (18S) apresenta baixa taxa evolutiva e oferece, portanto, informações sobre eventos filogenéticos do Pré-cambriano. O gene 5,8S também possibilita algumas inferências acerca de eventos anteriores ao período Paleozóico, embora seu reduzido tamanho dificulte a eficiência na obtenção de informações (ver revisão de Hillis & Dixon, 1991). Já a subunidade maior (28S) apresenta maior variação, contendo muitos domínios divergentes e segmentos de expansão (Hassouna *et al.*, 1984; Hillis & Davis, 1987). Essa subunidade é uma ferramenta útil para análises dos eventos evolutivos ocorridos no Paleozóico e Mesozóico, podendo, ainda, fornecer dados relativos a divergências evolutivas mais recentes, ocorridas no Cenozóico (ver revisão de Hillis & Dixon, 1991; e exemplos em De Sá & Hillis, 1990, e Hillis *et al.*, 1993). Os segmentos espaçadores, principalmente os intergênicos, são as regiões mais variáveis do DNAr e são utilizados para a análise de taxa proximamente relacionados, sendo úteis inclusive na identificação de espécies e linhagens (ver Hillis & Dixon, 1991, para referências).

Dessa forma, a escolha do segmento do DNA ribossomal a ser utilizado no estudo deve levar em consideração a proximidade dos taxa em análise. Uma vez definida a região, dois tipos de análises podem ser feitas, sendo uma delas a análise da sequência de nucleotídeos e a outra, a investigação dos fragmentos gerados por enzimas de restrição no fragmento em estudo.

3. Os anuros dos gêneros *Paratelmatobius* Lutz & Carvalho, 1958, e *Scythrophrys* Lynch, 1971

Os gêneros *Paratelmatobius* e *Scythrophrys* são endêmicos do Brasil e pertencem à família Leptodactylidae (Frost, 2000). O gênero *Paratelmatobius* é composto por *P. lutzii*, *P. gaigeae*, *P. poecilogaster*, *P. cardosoi* (= *P. gaigeae* sensu Cardoso & Haddad, 1990) e *P. mantiqueira* (ver revisão de Pombal Jr. & Haddad, 1999). Essas espécies são raras, apresentam limitada distribuição e ocorrem em microhabitats específicos na Mata Atlântica da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (revisão de Pombal Jr. & Haddad, 1999). De acordo com Pombal Jr. & Haddad (1999), as espécies *P. gaigeae*, *P. lutzii* e *P. mantiqueira* podem ser consideradas desaparecidas. Baseados em dados morfológicos e ecológicos, esses autores reconheceram dois grupos em *Paratelmatobius*, grupo *P. cardosoi* e grupo *P. lutzii*. O primeiro deles compreende as espécies *P. cardosoi* and *P. mantiqueira* e o grupo *P. lutzii* abrange *P. lutzii*, *P. poecilogaster* e, provavelmente, *P. gaigeae*. O gênero *Scythrophrys* é monotípico e espécimes de *Scythrophrys sawayae* já foram encontrados na Serra do Mar dos Estados do Paraná e Santa Catarina (Frost, 2000).

As relações filogenéticas intergenéricas de *Paratelmatobius* e *Scythrophrys* permanecem pouco esclarecidas. Embora estejam atualmente classificados em duas diferentes subfamílias (Leptodactylinae e Telmatobiinae) (Frost, 2000), a proximidade entre esses gêneros já foi apontada por vários autores. Com base na aparência externa de apenas um espécime de *Scythrophrys sawayae*, Lynch (1971) reconheceu semelhanças entre *Scythrophrys*, *Paratelmatobius* e, em alguns aspectos, *Zachaenus*. Embora esse autor tenha classificado *Scythrophrys* como pertencente à subfamília Telmatobiinae, considerou os dados disponíveis insuficientes para a classificação desse gênero em nível de tribos. Heyer (1975) agrupou *Scythrophrys* e *Paratelmatobius* com *Craspedoglossa*, *Crossodactylus*, *Crossodactylodes*, *Cycloramphus*, *Hylodes*, *Megaelosia*, *Thoropa* e *Zachaenus* em uma categoria denominada de Grypiscines, embora tenha considerado prematuro o reconhecimento desse grupo de leptodactídeos como uma unidade taxonômica. Analisando outros 3 espécimes de *Scythrophrys sawayae*, Heyer (1983) concluiu que *Scythrophrys* difere do grupo *Zachaenus-Cycloramphus-Craspedoglossa* em relação a vários caracteres morfológicos. Esse autor também considerou *Scythrophrys*, *Physalaemus*, *Paratelmatobius* e *Zachaenus* semelhantes, concordando com a observação prévia de Lynch (1971). No entanto, Heyer argumentou que

Scythrophrys difere de *Paratelmatoebius* quanto à musculatura da mandíbula e à morfologia e musculatura do hióide e difere de *Physalaemus* na morfologia do esterno. Perante tais conclusões, Heyer (1983) definiu *Scythrophrys* como um Leptodactylidae muito peculiar, com relações filogenéticas não esclarecidas. Frost (2000), em sua revisão, também considerou incertas as relações filogenéticas de *Scythrophrys*, embora o classifique como Telmatobiinae.

Mais recentemente, Garcia (1996) analisou exemplares de *Paratelmatoebius lutzi* (do Parque Nacional do Itatiaia, R.J.), *Paratelmatoebius cardosoi* (de Paranapiacaba, S.P.) e *Scythrophrys sawayae* (de Rancho Queimado, S.C.). Utilizando caracteres osteológicos, musculares e comportamentais relativos à biologia reprodutiva, o autor discute que *P. cardosoi* mostra maior semelhança com *Scythrophrys sawayae* do que com *P. lutzi*, fazendo surgir novos questionamentos acerca das relações filogenéticas das espécies reunidas nesses dois gêneros.

Tais considerações tornam bastante interessante o estudo citogenético e o molecular dos gêneros *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys*, que podem fornecer caracteres ainda não considerados nas análises anteriores, auxiliando, assim, na interpretação das relações de parentesco desses gêneros. Nesse contexto, a única informação disponível para esses gêneros consiste na descrição cariotípica de *P. lutzi* com base em metáfases coradas convencionalmente com Giemsa (De Lucca *et al.*, 1974).

4. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo analisar citogeneticamente as espécies viventes de *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys*, a fim de reconhecer caracteres cromossômicos que possam elucidar a evolução cariotípica nesse grupo e, desta forma, contribuir para a análise filogenética desses leptodactídeos.

O presente estudo objetiva, também, a investigação preliminar da organização molecular do DNA ribossomal das espécies utilizadas no estudo citogenético, através da análise dos fragmentos gerados por enzimas de restrição nesse segmento de DNA. Além de fornecer alguns caracteres que podem ser usados na análise comparativa das espécies em questão, tal investigação fornece importantes subsídios para futuras análises moleculares nesse grupo.

5. Referências bibliográficas

- Arnheim, N. Concerted evolution of multi-gene families. In **Evolution of genes and proteins** (M. Nei and R.K. Koehn eds.), pp. 38-61, Sinauer, Sunderland, 1983.
- Arnheim, N., Treco, D., Taylor, B., Eicher, E. Distribution of ribosomal gene length variants among mouse chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** 79: 4677-4680, 1980.
- Alvares, L.E., Brison, O., Ruiz, I.R.G. Identification of enhancer-like elements in the ribosomal intergenic spacer of *Odontophrynus americanus* 2n and 4n (Amphibia, Anura). **Genetica** 104: 41-44, 1998.
- Batistic, R.F., Soma, M., Beçak, M.L., Beçak, W. Further studies on polyploid amphibians. **J. Hered.** 66: 160-162, 1975.
- Beçak, M.L., Denaro, L., Beçak, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. **Cytogenetics** 9: 225-238, 1970.
- Bernardi, G., Olofsson, B., Filipski, J., Zerial, M., Salinas, J., Cuny, G., Meunier-Rotival, M., Rodier, M. The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. **Science** 228: 953-958, 1985.
- Bickham, J.W., Rogers, D.S. Structure and variation of the nucleolus organizer region in turtles. **Genetica** 67: 171-184, 1985.
- Bicudo, H.E.M. Nucleolar organizer activity and its regulatory mechanisms in *Drosophila* species of the "mulleri" complex and their hybrids. **Caryologia** 34: 231-253, 1981.
- Bogart, J.P. Evolution of anuran karyotypes. In **Evolutionary Biology of The Anurans: Contemporary Research on Major Problems** (J.L. Vial, ed.), pp. 337-349, University of Missouri Press, Columbia, 1973.
- Bogart, J.P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution** (D.M. Green and S.K. Sessions eds.), pp. 233-257, Academic Press, San Diego, 1991.
- Bogart, J.P., Wasserman, A.O. Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. **Cytogenetics** 11: 7-24, 1972.
- Bogart, J.P., Hedges, S.B. Rapid chromosome evolution in Jamaican *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae). **J. Zool.** 235: 9-31, 1995.
- Bostock, C.J. The organization of DNA sequences in chromosomes. In **Cell Biology**, Vol.3 (L. Goldstein & D.M. Prescott, eds.), pp. 1-59, Academic Press, New York, 1972.
- Bush, G.L., Case, S.M., Wilson, A.C., Patton, J.L. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74: 3942-3946, 1977.

- 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*).
- Buys, C.H.C.M., Osinga, J. Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs. *Chromosoma* 89: 387-396, 1984.
- Cabrero, J., Navas-Castilho, J., Camacho, J.P.M. Effects of supernumerary chromosome segments on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Chorthippus binotatus*. *Chromosoma* 93: 375-380, 1986.
- Cannatella, D.C. **A phylogeny of primitive frogs (Archaeobatrachia)**. Ph.D. dissertation. University of Kansas, Lawrence, 1985.
- Cardoso, A.J., Haddad, C.F.B. Redescritção e biologia de *Paratelmatobius gaigeae* (Anura, Leptodactylidae) *Papéis Avulsos Zool.* 37: 125-132, 1990.
- Chan, E.K.L., Imai, H., Hamel, J.C., Tan, E.M. Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *J. Exp. Med.* 174:1239-1244, 1991.
- Citoler, P., Gropp, A., Natarajan, A.T. Timing of DNA replication of autosomal heterochromatin in the hedgehog. *Cytogenetics* 11: 53-62, 1972.
- Cobb, J., Miyaike, M., Kikuchi, A., Handel, M.A. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II α localization and chromosome condensation. *Chromosoma* 108: 412-425, 1999.
- Coen, E., Strachan, T., Dover, G. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 158: 17-35, 1982a.
- Coen, E., Thoday, J.M., Dover, G. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 295: 564-568, 1982b.
- Cole, C.J. Chromosome evolution in selected treefrogs, including casque-headed species (*Pternohyla*, *Triprion*, *Hyla*, and *Smilisca*). *Amer. Mus. Novitates* 2541: 1-10, 1974.
- Cuevas, C.C., Formas, J.R. Heteromorphic sex chromosomes in *Eupsophus insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Chrom. Res.* 4: 467-470, 1996.
- Cortadas, J., Ruiz, I.R.G. The organization of ribosomal genes in diploid and tetraploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Chromosoma* 96: 437-442, 1988.
- Danilevskaya, O., Lofsky, A., Kurenova, E.V., Pardue, M. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* contains a distinctive subclass of HET-A related repeats. *Genetics* 134 (2): 531-534, 1993.

- De Capoa, A., Ferraro, M., Lavia, P., Pellicia, F., Finazzi-Agro, A. Silver staining of nucleolus organizer regions (NORs) requires clusters of sulphhydryl groups. **J. Histochem. Cytochem.** **30**: 908-911, 1982.
- De Lucca, E.J., Jim, J., Foresti, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia** **27**: 183-191, 1974.
- De Lucchini, S., Andronico, F., Andreazzoli, M., Giuliani, M., Savino, R., Nardi, I. Extra-ribosomal spacer sequences in *Triturus*. **J. Mol. Biol.** **204**: 805-813, 1988.
- De Sá, R., Hillis, D.M. Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. **Mol. Biol. Evol.** **7**: 365-376, 1990.
- Dimitri, P. Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. **Genetica** **100**: 85-93, 1997.
- Dover, G.A. The new genetics. In: **The handling of chromosomes**, pp. 151-168, Allen and Unwin, London, 1988.
- Dover, G.A., Coen, E. Springcleaning ribosomal DNA: a model for multigene evolution? **Nature** **290**: 731-732, 1981.
- Eissenberg, J.C., Elgin, S.C. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. **Curr. Opin. Genet. Dev.** **10**: 204-210, 2000.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V., Elgin, S.C. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** **87**: 9923-9927, 1990.
- Emerson, S.R., Richards, C., Drewes, R.C., Kjer, K.M. On the relationships among ranoid frogs: a review of the evidence. **Herpetologica** **56**: 209-230, 2000.
- Faust, J., Vogel, W. Are "N bands" selective staining of heterochromatin? **Nature** **249**: 352-353, 1974.
- Flavell, R.B., O'Dell, M. The genetic control of nucleolus formation in wheat. **Chromosoma** **71**: 135-152, 1979.
- Flavell, R.B., O'Dell, M. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. **J. Mol. Biol.** **204**: 523-534, 1988.
- Foote, D.L., Wiley, J.E., Little, M.L., Meyne, J. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenet. Cell Genet.** **57**: 196-199, 1991.
- 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. Washington** **113**: 890-899, 2000.

- Frost, D.R. Amphibian species of the world: an online reference. V. 2.2 (1 September 2000). <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>, 2000.
- Futuyma, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2ª edição, Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 631pp., 1992.
- Garcia, P.C.A. **Recaracterização de *Scythrophrys sawayae* (Cochran, 1953) baseada em morfologia, osteologia e aspectos da miologia e história natural (Amphibia: Leptodactylidae)**. Dissertação de mestrado - PUCC RS, pp.1-78, 1996.
- Gerbi, S.A. The evolution of eukariotic ribosomal DNA. **BioSystems** 19: 247-258, 1986.
- Goessens, G. Nucleolar structure. **Int. Rev. Cytol.** 87: 107-158, 1984.
- Green, D.M. Evidence for chromosome number reduction and chromosomal homosequentiality in the 24-chromosome Korean frog *Rana dybowskii* and related species. **Chromosoma** 88: 222-226, 1983.
- Guldner, H.H., Szosteck, C., Vosberg, H.P., Lakomek, H.J., Penner, E., Bautz, F.A. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 KDa protein identified as DNA topoisomerase I. **Chromosoma** 94: 132-138, 1986.
- Hassouna, N., Michot, B., Bachellerie, J.-P. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. **Nucl. Acids Res.** 12: 3563-3583, 1984.
- Hawley, R.S., Irick, H., Zitron, A.E., Haddox, D.A., Lohe, A., New, C., Whitley, M.D., Arbel, T., Jang, J., Mckim, K., Childs, G. There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila*, one of which requires heterochromatic homology. **Dev. Genet.** 13: 440-467, 1993.
- Heitz, E. Das heterochromatin der moose. I. **Jabet. Wiss. Bot.** 69: 762-818, 1928.
- Henderson, A.S., Warburton, D., Atwood, K.C. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** 69: 3394-3398, 1972.
- Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Gautier, T. Nucleolar proteins during mitosis. **Chromosomes Today** 11: 79-90, 1993.
- Heyer, W.R. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. **Smith. Contr. Zool.** 199: 1-55, 1975.
- Heyer, W.R. Variation and systematics of frogs of the genus *Cycloramphus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Arq. Zool.** 30: 235-339, 1983.
- Hillis, D.M. Molecular versus morphological approaches to systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 18: 23-42, 1987.

- Hillis, D.M. The phylogeny of amphibians. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution** (D.M. Green and S.K. Sessions eds), pp.7-31, Academic Press, San Diego, 1991.
- Hillis, D.M., Davis, S.K. Evolution of the 28S ribosomal RNA gene in anurans: regions of variability and their phylogenetic implications. **Mol. Biol. Evol.** 4: 117-125, 1987.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quart. Rev. Biol.** 66: 411-453, 1991.
- Hillis, D.M., Ammerman, L.K., Dixon, M.T., De Sá, R. Ribosomal DNA and the phylogeny of frogs. **Herpetol. Monogr.** 7: 118-131, 1993.
- Holmquist, G. The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination. **Chromosoma** 72: 203-224, 1979.
- Holmquist, G., Gray, M., Porter, T., Jordan, J. Characterization of Giemsa dark- and light-band DNA. **Cell** 31: 121-129, 1982.
- Honjo, T., Reeder, R.H. Preferential transcription of *Xenopus laevis* ribosomal RNA in interspecies hybrids between *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*. **J. Mol. Biol.** 80: 217-228, 1973.
- Howell, W.M., Denton, T.E., Diamond, J.R. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. **Experientia** 31: 260-262, 1975.
- 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., Spirito, S.E., Pardue, M.L. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma** 53: 25-36, 1975.
- Hubbell, H.R. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. **Stain Techn.** 60: 285-294, 1985.
- Íñigo, E.R., Mason, P.L., Rufas, J.S., de la Veja, C.G. Effects of supernumerary heterochromatin on chiasma formation and chromosome segregation in *Dociostaurus genei* (Orthoptera). **Heredity** 80: 353-360, 1998.
- Irick, H. A new function for heterochromatin. **Chromosoma** 103: 1-3, 1994.
- Iturra, P., Veloso, A. Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. **Genetica** 78: 25-31, 1989.
- James, T.C., Eissenberg, J.C., Craig, C., Dietrich, V., Hobson, A., Elgin, S.C.R. Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. **Eur. J. Cell Biol.** 50: 170-180, 1989.
- John, B. The biology of heterochromatin. In **Heterochromatin: molecular and structural aspects** (R.S. Verma, ed.), pp. 1-128, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1988.

- John, B., King, M. Pseudoterminalisation, terminalisation, and non-chiasmate modes of terminal association. **Chromosoma** 92: 89-99, 1985.
- John, B., Miklos, G. **The Eukaryote Genome in Development Evolution**. Allen & Unwin, London, 1988.
- Jones, K.W. Evolution of sex chromosomes. **Dev. Mamm.** 5: 297-320, 1983.
- Jones, K.W. The evolution of sex chromosomes and their consequences for the evolutionary process. **Chromosomes Today** 8: 241-255, 1984.
- Jones, G.H. Chiasmata. In **Meiosis** (P.B. Moens, ed), pp 213-244, Academic Press, Orlando, 1987.
- Jones, K.W.; Singh, L. Conserved repeated DNA sequences in vertebrates sex chromosomes. **Hum. Genet.** 58: 46-53, 1981.
- Kaiser, H., Mais, C., Bolaños, F., Steinlein, C., Feichtinger, W., Schmid, M. Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica** 98: 95-102, 1996.
- Kasahara, S., Haddad, C.F.B. Karyotypes of two Brazilian microhylid frogs of the genus *Chiasmocleis*, including a new case of polyploidy. **J. Herpetol.** 31: 139-142, 1997.
- Kasahara, S., Silva, A.P.Z., Haddad, C. 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** 80: 191-217, 1980.
- King, M. The inter-relationship of G-banding, C-banding pattern and nucleolus organizer structure in anuran amphibians. **Kew Chrom. Conf. III, HMSO**: 51-63, 1988.
- King, M. Amphibia. In **Animal cytogenetics** (B. John ed.), v.4/2, Borntraeger, Berlin/Stuttgart, 1990.
- King, M. The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution** (D.M. Green and S.K. Sessions eds), pp.359-391, Academic Press, San Diego, 1991.
- King, M., Contreras, N., Honeycutt, R.L. Variation within and between nucleolar regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S and 28S "in-situ" hybridization. **Genetica** 80: 17-29, 1990.
- Kohorn, B.D., Rae, P.M.M. Non-transcribed spacer sequences promote in vitro transcription of *Drosophila* ribosomal DNA. **Nucleic Acids Res.** 10: 6879-6886, 1982.
- Kohorn, B.D., Rae, P.M.M. Localization of DNA sequences promoting RNA polymerase I activity in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** 80: 3265-3268, 1983.
- Krystal, M., D'Eustachio, P., Ruddle, F.H., Arnheim, N. Human nucleolus organizers on nonhomologous chromosomes can share the same ribosomal gene variants. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** 78: 5744-5748, 1981.

- Kuramoto, M. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. Educ.** **39**: 83-127, 1990.
- Kuramoto, M., Allison, A. Karyotypes of microhylid frogs of Papua New Guinea and their systematic implications. **Herpetologica** **45**: 250-259, 1989.
- Leitch, I.J., Heslop-Harrison, J.S. Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by in situ hybridization. **Genome** **35**: 1013-1018, 1992
- Li, W-H, Graur, D. **Fundamentals of Molecular Evolution** Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass., 1991.
- Lima-De-Faria, A., Joworska, H. Late DNA synthesis in heterochromatin. **Nature** **217**: 138-142, 1968.
- Long, E.O., Dawid, I.B. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Bioch.** **49**: 727-764, 1980.
- López-Léon, M.D., Cabrero, J., Camacho, J.P.M. Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genome** **38**: 68-74, 1995.
- 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. **Chrom. Res.** **6**: 621-628, 1998.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M., Cardoso, A.J. Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). **Can. J. Zool.** **77**: 624-631, 1999.
- Lynch, J.D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Univ. Kans. Mus. Nat. Hist., Misc. Publ.** **53**: 1-238, 1971.
- Matsui, S.I., Sasaki, M. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. **Nature** **246**: 148-150, 1973.
- Medeiros, L.R. **Estudo citogenético das espécies *Hyla nana* e *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae)**. Tese de Mestrado - Unicamp, pp. 1-77, 2000.
- Mellink, C.H.M., Bosma, A.A., De Haan, N.A. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA in situ hybridization signals in six breeds of domestic pig. **Hereditas** **120**: 141-149, 1994.
- Miller, O.L. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. **J. Cell Biol.** **91**: 15-17, 1981.
- Minc, E., Courvalin, J.-C., Buendia, B. HP1 γ associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.** **90**: 279-284, 2000.
- Miura, I. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica*. II. Sex-linkage analyses of the nucleolar organizer regions in chromosomes no. 4 of the Hiroshima and Saeki populations. **Zool. Sci.** **11**: 807-815, 1994a..

- Miura, I. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog, *Rana japonica*. I. Sex-related heteromorphism of the distribution pattern of constitutive heterochromatin in chromosome no 4 of the Nakaya population. **Zool. Sci.** 11: 797-806, 1994b..
- Miura, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla*, and *Bufo* (Amphibia: Anura). **Chromosoma** 103: 567-574, 1995.
- Miura, I., Nishioka, M., Borkin, L.J., Wu, Z. The origin of the brown frogs with $2n=24$ chromosomes. **Experientia** 51: 179-188, 1995.
- Morescalchi, A. Le relazioni tra il cariotipo di Anuri Displasioceli. I. Il corredo cromosomico di alcuni Ranidae. **Caryologia** 20:65-85, 1967.
- Morescalchi, A. Hypotheses on the phylogeny of the Salientia, based on karyological data. **Experientia** 24: 964-966, 1968.
- Morescalchi, A. Amphibia. In **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution** (A.B. Chiarelli and E. Capana eds.), pp. 233-348, Academic Press, New York, 1973.
- Nishioka, M., Miura, I., Saitoh, K. Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanism. **Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ.** 12: 55-81, 1993.
- Nishioka, M., Okumoto, H., Ueda, H., Ryuzaki, M. **Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ.** 9: 165-, 1987 (*apud* Miura *et al.*, 1995).
- Ochs, R., Lischwe, M., O'leary, P., Busch, H. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. **Exp. Cell Res.** 146: 139-149, 1983.
- Olert, J., Sawatzki, G., Kling, H., Gebauer, J. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). **Histochemistry** 60: 91-99, 1979.
- Olson, M.O.J., Dundr, M., Szebeni, A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. **Trends Cell Biol.** 10: 189-196, 2000.
- Pardue, M.L., Gall, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science** 168: 1356-1358, 1970.
- Pardue, M.L., Henning, W. Heterochromatin: junk or collector's item? **Chromosoma** 100: 3-7, 1990.
- Pfeifle, J., Boller, K., Anderer, F.A. Phosphoprotein pp135 is an essential component of the nucleolus organizer region (NOR). **Exp. Cell Res.** 162: 11-22, 1986.
- Pombal Jr., J.P., Haddad, C.F.B. Frogs of the genus *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae) with descriptions of two new species. **Copeia** 1999: 1014-1026.
- Reeder, R.H. Enhancers and ribosomal gene spacer. **Cell** 38:349-351, 1984.

- Reeder, R.H., Roan, J.G., Dunaway, M. Spacer regulation of *Xenopus* ribosomal gene transcription: competition in oocytes. **Cell** **35**: 449-456, 1983.
- Reuter, G., Spierer, P. Position effect variegation and chromatin proteins. **Bioessays** **14**: 605-612, 1992.
- Ris, H., Korenberg, J. Chromosome structure and levels of chromosome organization. In: **Cell Biology: a comprehensive treatise** (D.M. Prescott & L. Goldstein, eds.), New York, 1979.
- Ryuzaki, M., Hanada, H., Okumoto, H., Takizawa, N., Nishioka, M. Evidence for heteromorphic sex chromosomes in males of *Rana tagoi* and *Rana sakuraii* in Nishitama district of Tokyo (Anura: Ranidae). **Chrom. Res.** **7**: 31-42, 1999.
- Ruiz, I.R.G., Brison, O. Methylation of ribosomal cistrons in diploid and tetraploid *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura). **Chromosoma** **98**: 86-92, 1989.
- Ruiz, I.R.G., Soma M., Beçak W. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). **Cytogenet. Cell Genet.** **29**: 84-98, 1981.
- Salcedo, F.J., Viseras, E., Camacho, J.P.M. The B chromosomes of *Locusta migratoria*. III. Effects on the activity of nucleolar organizer regions. **Genome** **30**: 387-394, 1988.
- Santos, J., Sentís, C., Robledo, M., Fernández-Piqueras, J. Nucleolar dominance in interracial hybrids of the *Steropleurus martorelli* complex. **Genome** **33**: 153-155, 1990.
- Sato, K., Busch, H. Silver staining of phosphoserine and phosphothreonine in nucleolar and other phosphoproteins. **Cell Biol. Int. Rep.** **5**: 857-866, 1981.
- Scheer, U., Rose, K.M. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. **Proc. Nat. Acad. Sci., USA** **81**: 1431-1435, 1984.
- Schempp, W., Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY Sex chromosomes in *Rana esculenta*. **Chromosoma** **83**: 697-710, 1981.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** **66**: 361-388, 1978a.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma** **68**: 131-148, 1978b.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** **77**: 83-103, 1980a.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). **Chromosoma** **80**: 69-96, 1980b.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** **87**: 327-344, 1982.

- Schmid, M., Almeida, C.G. Chromosome banding in Amphibia. XII. Restriction endonuclease banding. **Chromosoma** 96: 283-290, 1988.
- Schmid, M., Klett, R. Chromosome banding in Amphibia XX. DNA replication patterns in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** 65: 122-126, 1994.
- Schmid, M., Steinlein, C. Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. **Chromosoma** 101, 123-132, 1991.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W. Chromosome banding in Amphibia. XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). **Chromosoma** 97: 434-438, 1989.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W. Chromosome banding in Amphibia. XVII. First demonstration of multiple sex chromosomes in amphibians: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma** 101: 284-292, 1992.
- Schmid, M., Vitelli, L., Batistoni, R. Chromosome banding in Amphibia. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma** 95: 271-284, 1987.
- Schmid, M., Haaf, T., Geile, B., Sims, S. Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). **Chromosoma** 88: 69-82, 1983.
- Schmid, M., Ohta, S., Steinlein, C., Guttenbach, M. Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeria* (Anura, Rhacophoridae). **Cytogenet Cell Genet** 62: 238-246, 1993a.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W., Poot, M. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Cell. Genet.** 62: 42-48, 1993b.
- Schmid, M., Sims, S.H., Haaf, T., Macgregor, H.C. Chromosome banding in Amphibia. X. 18S and 28S ribosomal RNA genes, nucleolus organizers and nucleoli in *Gastrotheca riobambae*. **Chromosoma** 94: 139-145, 1986.
- Schmid, M., Nanda, I., Steinlein, C., Kausch, K., Haaf, T., Epplen, J. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution** (D.M. Green and S.K. Sessions, eds). Academic Press, San Diego pp. 393-430, 1991.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F., León, P. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** 69: 18-26, 1995.
- Schmid, W. Heterochromatin in mammals. **Arch. Klaus-Stiftung Vererbungs-Forsch** 42: 1-60, 1967.

- Schwarzacher, H.G., Wachtler, F. The nucleolus. **Anat. Embryol.** **188**: 515-536, 1993.
- Schwarzaker, H.G., Mosgoeller, W. Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structures and function. **Cytogenet. Cell Genet.** **91**: 243-252, 2000.
- Shevelyov, Y.Y. Aurora, a non-mobile retrotransposon in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Mol. Gen. Genet.** **239**: 205-208, 1993.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Kasahara, S. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. **Hereditas** **131**: 135-141, 1999.
- Singh, L.; Purdom, I.F.; Jones, K.W. Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. **Chromosoma** **59**: 43-62, 1976.
- Sperling, K., Rao, P.N. Mammalian cell fusion. V. Replication behavior of heterochromatin as observed by premature chromosome condensation. **Chromosoma** **45**: 121-131, 1974.
- Spofford, J.B. Position-effect variegation in *Drosophila*. In **The genetics and biology of *Drosophila*** (M. Ashburner and E. Novitski, eds.), vol. 1c, pp.955-1018, Academic Press, London, 1976.
- Stock, A. D. The occurrence of G-bands in the mitotic chromosomes of the amphibian *Xenopus muelleri*. **Genetica** **64**: 225-228, 1984.
- Stöck, M., Schmid, M., Steinlein, C., Grosse, W.-R. Mosaicism in somatic triploid specimens of the *Bufo viridis* complex in the Karakoram with examination of calls, morphology and taxonomic conclusions. **Ital. J. Zool.** **66**: 215-232, 1999.
- Sumner, A.T. **Chromosome Banding**. Unwin Human Ltda, London, 1990.
- Sumner, A.T. Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem.** **38**: 91-109, 1994.
- Suzuki, H., Kusihara, Y., Kaneisa, T., Moriwaki, K. Variation in the distribution of the silver staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wild mouse *Mus musculus*. **Mol. Biol. Evol.** **7**: 271-282, 1990.
- Trerè, D., Pession, A., Derenzini, M. The silver stained proteins of interphase nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Exp. Cell. Res.** **184**: 131-137, 1989.
- Tymowska, J. Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. In **Amphibian Cytogenetics and Evolution**, pp. 233-257, Academic Press, San Diego, 1991.
- Veiga, A.C.P. **Estudo citogenético comparativo de espécies do gênero *Colostethus* (Anura - Dendrobatidae)**. Tese de Mestrado – Unicamp, pp. 1-75, 2000.
- Visintin, R., Amon, A. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. **Curr. Opin. Cell Biol.** **12**: 372-377, 2000.

- Wada, M.Y., Imai, H.T. Theoretical analyses of chiasmata using novel chiasma graph method applied to Chinese hamsters, mice and dog. **Jap. J. Genet.** 70: 233-265, 1995.
- Walker, P.M.B. "Repetitive" DNA in higher organisms. **Prog. Biophys. Molec. Biol.** 23: 147-190, 1971.
- Waterhouse, R.N., Boulyer, D., Gatehouse, J.A. An organ-specific hypomethylation of cotyledon genomic rDNA in *Pisum sativum* L. **FEBS Letters** 209: 223-226, 1986.
- Watson, J.C., Kaufman, L.S., Thompson, W.F. Developmental regulation of cytosine methylation in the nuclear ribosomal RNA genes of *Pisum sativum*. **J. Mol. Biol.** 193: 15-26, 1987.
- Weiler, K.S., Wakimoto, B.T. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. **Annu. Rev. Genet.** 29: 577-605, 1995.
- White, M.J.D. **Animal cytology and evolution**. 3rd edition, Cambridge Univ. Press, London, 1973.
- Wiley, J.E., Little, M.L. Replication banding pattern of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Cytogenet. Cell Genet.** 88: 11-14, 2000.
- Wiley, J.E., Little, M.L., Romano, M.A., Blount, D.A., Cline, G.R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Chromosoma** 97: 481-487, 1989.
- Wilson, A.C., Sarich, V.M., Maxson, L.R. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal, protein, and anatomical evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** 71: 3028-3030, 1974.
- Wolf, K.W. How meiotic cells deals with non-exchange chromosomes. **BioEssays** 16: 107-114, 1994.
- Yunis, J.J., Yasmineh, W.G. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. **Science** 174: 1200-1209, 1971.
- Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C.D., Eissenberg, J.C. Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA *in vitro*. **J. Biol. Chem.** 275: 28332-28338, 2000.
- Zuckerkindl, E., Henning, W. Tracking heterochromatin. **Chromosoma** 104: 75-83, 1995.

IV - Artigo 1

**Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae),
with phylogenetic comments**

Luciana B. Lourenço¹, Paulo C. A. Garcia², and Shirlei M. Recco-Pimentel^{3*}

^{1,3}Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brasil; Tel: 55 19 3788 6127; Fax: 55 19 3788 6111; e-mail: bolsoni@hotmail.com, shirlei@unicamp.br. ²Departamento de Zoologia e Curso de Pós-Graduação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil; e-mail: pcgarcia@ms.rc.unesp.br.

* corresponding author

Hereditas 133: 201-209, 2000

Abstract

In this paper we provide a cytogenetic analysis of *Paratelmatoobius cardosoi* and *Paratelmatoobius poecilogaster*. The karyotypes of both species showed a diploid number of 24 chromosomes and shared some similarity in the morphology of some pairs. On the other hand, pairs 4 and 6 widely differed between these complements. These karyotypes also differed in their NOR number and location. Size heteromorphism was seen in all NOR-bearing chromosomes of the two karyotypes. In addition, both karyotypes showed small centromeric C-bands and a conspicuous heterochromatic band in the short arm of chromosome 1, although with a different size in each species. The *P. cardosoi* complement also showed other strongly stained non-centromeric C-bands, with no counterparts in the *P. poecilogaster* karyotype. Chromosome staining with fluorochromes revealed heterogeneity in the base composition of two of the non-centromeric C-bands of *P. cardosoi*. Comparison of the chromosomal morphology of these *Paratelmatoobius* karyotypes with that of *P. lutzii* showed that the *P. poecilogaster* karyotype is more similar to that of *P. lutzii* than *P. cardosoi*. These cytogenetic results agree with the proposed species arrangements in the *P. cardosoi* and *P. lutzii* groups based on morphological and ecological data.

Introduction

The genus *Paratelmatoobius* Lutz & Carvalho is endemic to Brazil and comprises the species *P. lutzii*, *P. gaigeae*, *P. poecilogaster*, *P. cardosoi*, and *P. mantiqueira* (see review by Pombal Jr. & Haddad, 1999). *Paratelmatoobius* species are usually rare, and *P. gaigeae*, *P. lutzii*, and *P. mantiqueira* may be considered as missing species (Pombal Jr. & Haddad, 1999). Based on morphological and ecological data, Pombal Jr. & Haddad (1999) recognized two species groups, the *P. cardosoi* group and the *P. lutzii* group, in this genus. The former group contains *P. cardosoi* and *P. mantiqueira* and the *P. lutzii* group encompasses *P. lutzii*, *P. poecilogaster*, and probably *P. gaigeae*.

The intergeneric phylogenetic relationships of this group are not clear yet. Lynch (1971) considered *Paratelmatobius* as a member of the subfamily Leptodactylinae and pointed out some morphological similarities among *Paratelmatobius*, *Scythrophrys*, *Physalaemus* and, to a lesser extent, *Zachaenus*. This classification was followed by Frost (1999). Heyer (1975) grouped *Paratelmatobius* together with the genera *Scythrophrys*, *Zachaenus*, *Thoropa*, *Megaelosia*, *Hylodes*, *Cycloramphus*, *Crossodactylus*, *Crossodactylodes*, and *Craspedoglossa*. The proximity between the genera *Paratelmatobius* and *Scythrophrys*, suggested by Lynch (1971) and Heyer (1975), was also indicated by Garcia (1996). Based on ecological and morphological characters, Garcia (1996) suggested a closer relationship between *Scythrophrys* and *P. gaigeae* (= *P. cardosoi* sensu Pombal Jr. & Haddad, 1999) than between this species of *Paratelmatobius* and *P. lutzii*, and suggested a revision of both genera.

The cytogenetic information on *Paratelmatobius* is restricted to the chromosome number and morphology of the karyotype of *P. lutzii* (De Lucca *et al.*, 1974). To provide more data for a phylogenetic analysis of this group, we have done a cytogenetic study of the living species of *Paratelmatobius*, *P. cardosoi* Pombal Jr. & Haddad and *P. poecilogaster* Giaretta & Castanho (see review by Pombal Jr. & Haddad, 1999).

Materials and Methods

Animals

Fifteen males of *P. cardosoi* and 21 specimens (3 males, 3 females, 11 tadpoles, and 4 juveniles) of *P. poecilogaster* from Paranapiacaba, São Paulo State (Brazil) were studied. The *P. cardosoi* specimens were collected in November and December 1997 and the *P. poecilogaster* individuals were collected in December 1994, March 1995, November and December 1997. All the animals, except the tadpoles, one female and two juveniles of *P. poecilogaster*, were deposited in ZUEC (Museu de História Natural "Prof. Dr. Adão José Cardoso", Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil) or in CFBH (Célio F.B. Haddad collection, deposited in Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil).

Chromosome preparation and techniques

Mitotic chromosomes were obtained from intestinal and testes cell suspensions as described by Schmid (1978a) and Schmid *et al.* (1979). Conventional staining with a 10% Giemsa solution, the C-banding technique (King, 1980), the Ag-NOR method (Howell & Black, 1980), staining with distamycin A/DAPI (Schweizer, 1980), and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with an rDNA probe (Viegas-Péquignot, 1992) were performed in chromosomal preparations from both species. The rDNA probe used in FISH experiments consisted in a mixture of two recombinant plasmids, HM123 and HM456 (Meunier-Rotival *et al.*, 1979), which were biotin-labeled by a nick translation reaction according to the GIBCO protocol. To investigate further the *P. cardosoi* heterochromatin, metaphases from this species were stained with distamycin A/mithramycin A (Schweizer, 1980). The slides were examined on an Olympus microscope or on a BioRad MRC 1024 UV confocal microscope. Some of the photographs were obtained using the software Image Pro-Plus, version 3 (Media Cybernetics). Twenty-six metaphases from five specimens of *P. cardosoi* and 25 metaphases from five specimens of *P. poecilogaster* were measured. The chromosome classification relative to the centromeric position was done according to Green & Sessions (1991).

Results

Paratelmatoebius cardosoi

The full chromosomal complement of this species was $2n=24$ and consisted of eight pairs of metacentric chromosomes (1-3, 5, 6, 9, 11, and 12), three submetacentric pairs (7, 8, and 10) and one subtelocentric pair (4) (Figs. 1A, 1C, 2, and Table I). In all specimens analyzed, there was a secondary constriction in the long arm of both homologues of chromosome 7 (Fig. 1A), which were detected as NORs by the Ag-NOR method (Fig. 2A, 2B) and *in situ* hybridization (Fig. 2C). These techniques also identified a size heteromorphism between the homologous NORs in five of the specimens studied (Figs. 2A,C; Table II). After distamycin A/mithramycin A staining, the NORs showed a bright fluorescence (Fig. 3A) while in distamycin A/DAPI stained metaphases, they were negatively stained (Fig. 3B).

C-banding detected small amounts of constitutive heterochromatin in the centromeric region of all the chromosomes of this karyotype. Dark blocks of constitutive heterochromatin were also observed interstitially in both arms of chromosomes 1 and in the long arm of chromosomes 4, 5, and 9, and in the telomeric region of the long arm of chromosome 4. The whole short arm of chromosome 4 and the long arm of chromosome 7, except for the NOR, were revealed by C-banding. A heterogeneous intensity of staining was observed throughout this heterochromatic segment in the long arm of chromosome 7. A faintly stained C-band was seen in the short arm of chromosome 5 (Fig. 1C).

Variation in size was seen in the dark C-band of the long arm of chromosome 5. In two individuals, this band was smaller in both homologues (morph 5a), while three other specimens showed a bigger band (morph 5b) which was also homozygous. A heterozygous state for pair 5 was seen in one specimen. In Giemsa-stained metaphases, a secondary constriction was observed interstitially in the long arm of chromosome 5a (Fig. 1A). This constriction was also detected after C-banding (Fig. 1C). All of the seven specimens analyzed by C-banding showed size heteromorphism for the interstitial band of pair 9 (Fig. 1C).

Fluorescent staining with distamycin A/mithramycin A and distamycin A/DAPI revealed some heterochromatic blocks as bright segments in the *P. cardosoi* karyotype. The C-band in the long arm of chromosome 1 was brightly fluorescent in mithramycin-stained metaphases. Additionally, the C-band in the short arm of chromosome 1 showed a mithramycin-positive and DAPI-negative block adjacent to a mithramycin-negative and DAPI-positive block. In chromosome 7, the interstitial dark C-band adjacent to the NOR was more fluorescent after distamycin A/DAPI staining than the remaining heterochromatic arm. In contrast, the NOR was only slightly fluorescent after mithramycin staining. Also, in one individual, a slightly brighter region coincident with a large C-band block was detected by distamycin/mithramycin A staining in the long arm of chromosome 5. No bright fluorescence was detected in any centromeric region or heterochromatic segments of chromosome 4 (Fig. 3).

Paratelmatoebius poecilogaster

The *P. poecilogaster* karyotype consisted of metacentric, submetacentric and subtelocentric chromosomes, and the diploid number was $2n=24$ (Figs 1B, 1D; Table I). Two NOR-bearing chromosomal pairs (8 and 10) were identified in all specimens examined by the Ag-NOR method (Fig. 4A-D) and by fluorescence *in situ* hybridization (Fig. 4E-F). Variation in NOR size was detected for both pairs of NOR-bearing chromosomes (Fig. 4). Four patterns of NOR distribution were seen in the 12 specimens examined (Fig. 4A-D). The analysis of a considerable number of metaphases (Table II) showed no intraindividual variation in the NOR pattern, although the smaller NOR of the pair 8 of BC 33.09 (Fig. 4C) was hardly visualized in some metaphases. The NORs were detected as secondary constrictions in Giemsa-stained and distamycin A/DAPI-stained metaphases (Figs. 1B and 5).

C-banding revealed a small amount of centromeric heterochromatin in all chromosomes. A dark interstitial C-band was identified in the short arm of chromosome 1 and a faint C-band was observed interstitially in the long arm of chromosome 4. No interindividual variation was detected among the five specimens analyzed by this technique (Fig. 1D). Fluorescent staining with DAPI did not produce bright regions in *P. poecilogaster* chromosomes.

Discussion

The *Paratelmatoebius* karyotypes described here and that of *P. lutzii* (De Lucca *et al.*, 1974) have the same chromosome number ($2n=24$). Comparison of the relative length and the centromeric position of the chromosomes of *P. lutzii* (De Lucca *et al.*, 1974) and *P. poecilogaster* shows that these karyotypes are very similar. The divergence between the arm ratio of chromosome pairs 3 and 4 of *P. lutzii* and the corresponding pairs in *P. poecilogaster* may be an artifact. This apparent divergence can be explained by an exchange between the arm ratios for pairs 3 and 4 of *P. lutzii* in the table reported by De Lucca *et al.* (1974), what can be supported by the figure of the

chromosomes of this species shown in the same paper. Thus, chromosome pairs 3 and 4 of *P. lutzii* can be considered to be homeologous to the corresponding pairs in *P. poecilogaster*.

Similarly, pairs 6 and 7 in *P. lutzii* are probably homeologous to pairs 7 and 6 in *P. poecilogaster*, respectively, despite the different relative lengths attributed to these pairs in these two species. Such differential classification can be considered a technical artifact caused by divergent methods of measurement adopted in these karyotypes descriptions, but may also reflect small interspecific variations in the relative length of these chromosomes. The same argument applies to pairs 11 and 12 of these *Paratelmatobius* species.

The *P. lutzii* and *P. poecilogaster* karyotypes actually differed in the morphology of chromosome 8, which was metacentric in the *P. lutzii* and submetacentric in *P. poecilogaster*. In the later species, pair 8 was one of the NOR-bearing chromosome pairs. The location of the NOR in the *P. lutzii* karyotype is unknown.

Based on chromosomal morphology, the *P. cardosoi* karyotype resembled that of *P. lutzii* and *P. poecilogaster*, but pairs 4 and 6 are widely divergent in the *P. cardosoi* complement (Fig. 6). NOR analyses also showed large differences between the *P. poecilogaster* and *P. cardosoi* karyotypes. While in *P. cardosoi* the NOR-bearing chromosome was a medium sized submetacentric pair (pair 7), in *P. poecilogaster* NORs are observed in two smaller chromosome pairs (pairs 8 and 10).

Multiple NOR-bearing chromosome pairs have been considered a derived state in Anura (King *et al.*, 1990), and have been found in species from different families (Schmid, 1978b; Mahony & Robinson, 1986; Wiley *et al.*, 1989; Schmid *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 1998a). The evolutionary origin of multiple NORs in anurans probably includes events such as inversions, translocations, transposition by mobile genetic elements, amplification of "orphan" rDNA cistrons, and reinsertion errors during extrachromosomal amplification of ribosomal cistrons, as have been discussed by several authors (Wiley *et al.*, 1989; King *et al.*, 1990; Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 1998a).

Although no intraspecific variation was seen in the localization of NOR in the two species examined, size heteromorphism was detected in all NOR-bearing chromosome pairs in *P. cardosoi* and *P. poecilogaster*. *In situ* hybridization experiments with rDNA probes and silver staining

revealed the same regions in all metaphases, and both techniques were able to detect homologous NOR size heteromorphism in some specimens. The coincident labeling suggested the absence of silent NOR in these karyotypes, and that the size heteromorphisms reflect different numbers of rDNA genes in homologous NOR rather than a differential expression of these regions.

In anurans, size heteromorphism of homologous NORs has been described extensively (Schmid, 1978a;b; 1980a;b; 1982), with most cases being attributed to NOR amplification, although deletion events have been reported (Schmid, 1982). The correlation between *in situ* labeling and the amount of rDNA genes has been noted by others (King, 1988; King *et al.*, 1990). Additionally, the existence of individuals with different amounts of rDNA has been shown by molecular analyses, such as those performed by Knowland & Miller (1970a;b) which involved normal individuals and mutants of *Xenopus laevis* with a partial nucleolus.

P. cardosoi and *P. poecilogaster* had a small amount of centromeric heterochromatin, but *P. cardosoi* showed a larger quantity of non-centromeric heterochromatin. The similar morphology of chromosome pair 1 from both species allow the recognition of a probable homeology between the interstitial C-band in the short arm of *P. poecilogaster* chromosome 1 with part of the interstitial C-band in the short arm of *P. cardosoi* chromosome 1, since this band is bigger than in *P. poecilogaster*. The other non-centromeric C-bands of *P. cardosoi* have no counterparts in the *P. poecilogaster* karyotype.

Fluorochrome staining of *P. cardosoi* metaphases revealed heterogeneity in two heterochromatic blocks in this karyotype. One of the blocks corresponded to the C-band in the short arm of chromosome 1, which showed an AT-rich region adjacent to a GC-rich one. The second region corresponds to the heterochromatic block located between the NOR and the telomere in chromosome 7. Only a small region adjacent to this NOR was AT-rich, as shown by distamycin/DAPI staining. The remaining heterochromatic arm of this chromosome showed no specific base-pair richness. This heterogeneity in the composition of chromosome 7 heterochromatin may be responsible for the differential staining of this segment in some C-banded metaphases, in which a darker region was seen between the NOR constriction and the remaining long arm of the chromosome.

The analysis of *P. cardosoi* heterochromatin also revealed size variation in the interstitial bands of the long arms of chromosomes 5 and 9. Two morphs of each pair were identified. Interindividual variation in the C-banding pattern was observed, with three combinations of morphs 5a and 5b found in the specimens studies. In all C-banded specimens, chromosome pair 9 was heteromorphic.

This comparative cytogenetic analysis of *Paratelmatoebius* species indicates that the *P. poecilogaster* karyotype is more similar to that of *P. lutzii* than to *P. cardosoi*. This observation agrees with the proposal of Pombal Jr. & Haddad (1999) concerning the *P. lutzii* and *P. cardosoi* groups.

The diploid number of $2n=24$ seen in *Paratelmatoebius* is rarely found in the family Leptodactylidae (see King, 1990 and Kuramoto, 1990). Among the genera considered by Lynch (1971) and Heyer (1975) to be closely related to *Paratelmatoebius*, only one species of the genus *Hylodes*, *H. nasus* (Bogart, 1991), and the monotypic genus *Scythrophrys* (Lourenço *et al.*, 1998b and manuscript in preparation) have 24-chromosome karyotypes. However, based on the chromosomal morphology, the *H. nasus* karyotype (Bogart, 1991) does not share many similarities with those of *Paratelmatoebius* described here. A complete chromosomal evaluation of *Paratelmatoebius* requires a better characterization of the *H. nasus* karyotype and, specially, a cytogenetic analysis of *Scythrophrys*. Other leptodactylid species with 24-chromosome karyotype is *Adenomera marmorata* (Bogart, 1974), but this karyotype, with seven telocentric, two subtelocentric, one submetacentric and 2 metacentric chromosome pairs, widely differs from those described in the present paper.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Adão J. Cardoso (deceased) and Dr. Ariovaldo Giaretta for help with the field work and for useful comments, and Ana Carolina C. Barbosa for the assistance in some FISH experiments. This work was supported by the Brazilian agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (proc.nº 97/00459-9).

References

- Bogart, J.P. A karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). **Copeia** 1974: 728-737, . 1974
- Bogart, J.P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In: **Amphibian cytogenetics and evolution** (eds DM Green and SK Sessions) Academic Press, San Diego, p. 233-257, 1991.
- De Lucca, E.J., Jim, J., Foresti, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia** 27: 183-191, 1974.
- Foot, D.L., Wiley, J.E., Little, M.L., Meyne, J. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenet. Cell Genet.** 57: 196-199, 1991.
- Frost, D.R. Amphibian species of the world: an online reference. V. 2.1, 1999
- Garcia, P.C.A. **Recaracterização de *Scythrophrys sawayae* (Cochran, 1953) baseada em morfologia, osteologia e aspectos da miologia e história natural (Amphibia: Leptodactylidae)**. Masters Dissertation - PUCC RS, Porto Alegre, RS, pp 1-78, 1996.
- Green, D.M., Sessions, S.K. Nomenclature for chromosomes. In: **Amphibian cytogenetics and evolution** (eds DM Green and SK Sessions) Academic Press, San Diego, p. 431-432, 1991.
- Heyer, W.R. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae.. **Smith. Contr. Zool.** 199: 1-55, 1975.
- 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.
- King, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** 80: 191-217, 1980.
- King, M. The inter-relationship of G-banding, C-banding pattern and nucleolus organizer structure in anuran amphibians. **Kew Chrom. Conf. III, HMSO**: 51-63, 1988.
- King, M. Amphibia. In: **Animal cytogenetics** (ed B John) Berlin/Stuttgart: Gebrüder Borntraeger, p. 1-241, 1990.

- King, M., Contreras, N., Honeycutt, R.L. Variation within and between nucleolar regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S and 28S "in-situ" hybridization. **Genetica** 80: 17-29, 1990.
- Knowland, J., Miller, L. Reduction of ribosomal RNA synthesis and ribosomal RNA genes in a mutant of *Xenopus laevis* which organizes only a partial nucleolus. I. Ribosomal RNA synthesis in embryos of different nucleolar types. **J. Mol. Biol.** 53: 321-328, 1970a.
- Knowland, J., Miller, L. Reduction of ribosomal RNA synthesis and ribosomal RNA genes in a mutant of *Xenopus laevis* which organizes only a partial nucleolus. II. The number of ribosomal RNA genes in animals of different nucleolar types. **J. Mol. Biol.** 53: 329-338, 1970b.
- Kuramoto, M. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. **Bull. Fukuoka Univ. Educ.** 39 (III): 83-127, 1990.
- 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. **Chrom. Res.** 6: 621-628, 1998a.
- Lourenço, L.B., Recco-Pimentel, S.M., Garcia, P.C.A., Giaretta, A. Comparative cytogenetics of *Scythrophrys sawayae* and *Paratelmatobius poecilogaster* (Amphibia, Anura). **Cytogenet. Cell Genet.** 81: 110-111, 1998b (abstract).
- Lynch, J.D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Univ. Kans. Mus. Nat. Hist., Misc. Publ.** 53: 1-238, 1971.
- Mahony, M.J., Robinson, E.S. Nucleolar organiser region (NOR) location in karyotypes of Australian ground frogs (Family Myobatrachidae). **Genetica** 68: 119-127, 1986.
- Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Macaya, G., Bernardi, G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucl. Acids Res.** 6: 2109-2123, 1979.
- Pombal Jr., J.P., Haddad, C.F.B. Frogs of the genus *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae) with descriptions of two new species. **Copeia** 1999: 1014-1026, 1999.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma** 66: 361-388, 1978a.

- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma** 68: 131-148, 1978b.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma** 77: 83-103, 1980a.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes in *Pyxicephalus Adspersus* (Anura, Ranidae). **Chromosoma** 80: 69-96, 1980b.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87: 327-344, 1982.
- Schmid, M., Olert, J., Klett, C. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma** 71: 29-55, 1979.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F., León, P. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** 69: 18-26, . 1995
- Schweizer, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma** 58: 307-324, 1980.
- Viegas-Péquignot, E. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: ***In situ* hybridization: a practical approach** (ed D Willernson) Oxford University Press, IRL Press, p. 137-158, 1992.
- Wiley, J.E., Little, M.L., Romano, M.A., Blount, D.A., Cline, G.R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Chromosoma** 97: 481-487, 1989.

Figure legends

Figure 1. Karyotypes of *Paratelmatoobius cardosoi* (A,C) and *Paratelmatoobius poecilogaster* (B,D) after Giemsa staining (A,B) and C-banding (C,D). In A, the secondary constrictions corresponding to homomorphic and heteromorphic NORs (pair 7 in the inset) are indicated by small arrows. The large arrow indicates the secondary constriction in chromosome 5a (not equivalent to a NOR) in A and C. In B, the arrows indicate secondary constrictions of NORs. In C, the arrowhead indicates a small C-band in chromosome 5a and a large one in 5b. The inset shows pair 7 from another metaphase. Note that a heterochromatic block adjacent to the NOR (small arrow) can be distinguished from the remaining arm. In D, the arrow indicates a faint band in the long arm of chromosome 4. Bar = 5 μ m (A, C) and 5.4 μ m (B, D).

Figure 2. *Paratelmatoobius cardosoi* chromosomes treated with the Ag-NOR method (A, B) and FISH with rDNA probes (C). Note the size heteromorphism of the NORs detected in A and C. In B, a pair of homomorphic NORs.

Figure 3. Karyotype of *Paratelmatoobius cardosoi* stained with DA/mithramycin A (A) and DA/DAPI (B). The arrows indicate positively stained regions and the arrowheads indicate negatively stained segments. Note that the NOR is faintly stained in A and negatively stained in B. Bar = 5 μ m.

Figure 4. A-D. NOR-bearing chromosomes of *Paratelmatoobius poecilogaster* stained with Giemsa (left squares) and the Ag-NOR method (right squares). The four patterns of NOR distribution are shown. In E, a metaphase with two pairs of homomorphic NORs after FISH with rDNA probes. In F, the same pattern shown in D, after hybridization with rDNA probes. Note the larger label seen in the chromosome and nucleus (arrow).

Figure 5. Karyotype of *Paratelmatoobius poecilogaster* stained with DA/DAPI. The NORs are negatively stained (arrows). Bar = 5 μ m.

Figure 6. Idiograms of the *Paratelmatoebius cardosoi* (A) and *Paratelmatoebius poecilogaster* (B) karyotypes. Solid blocks: dark C-bands. Dark gray block: C-band seen as a clearer region in some C-banded metaphases. Light gray block: faint C-band. Open regions: secondary constrictions. Checkered circles: NORs.

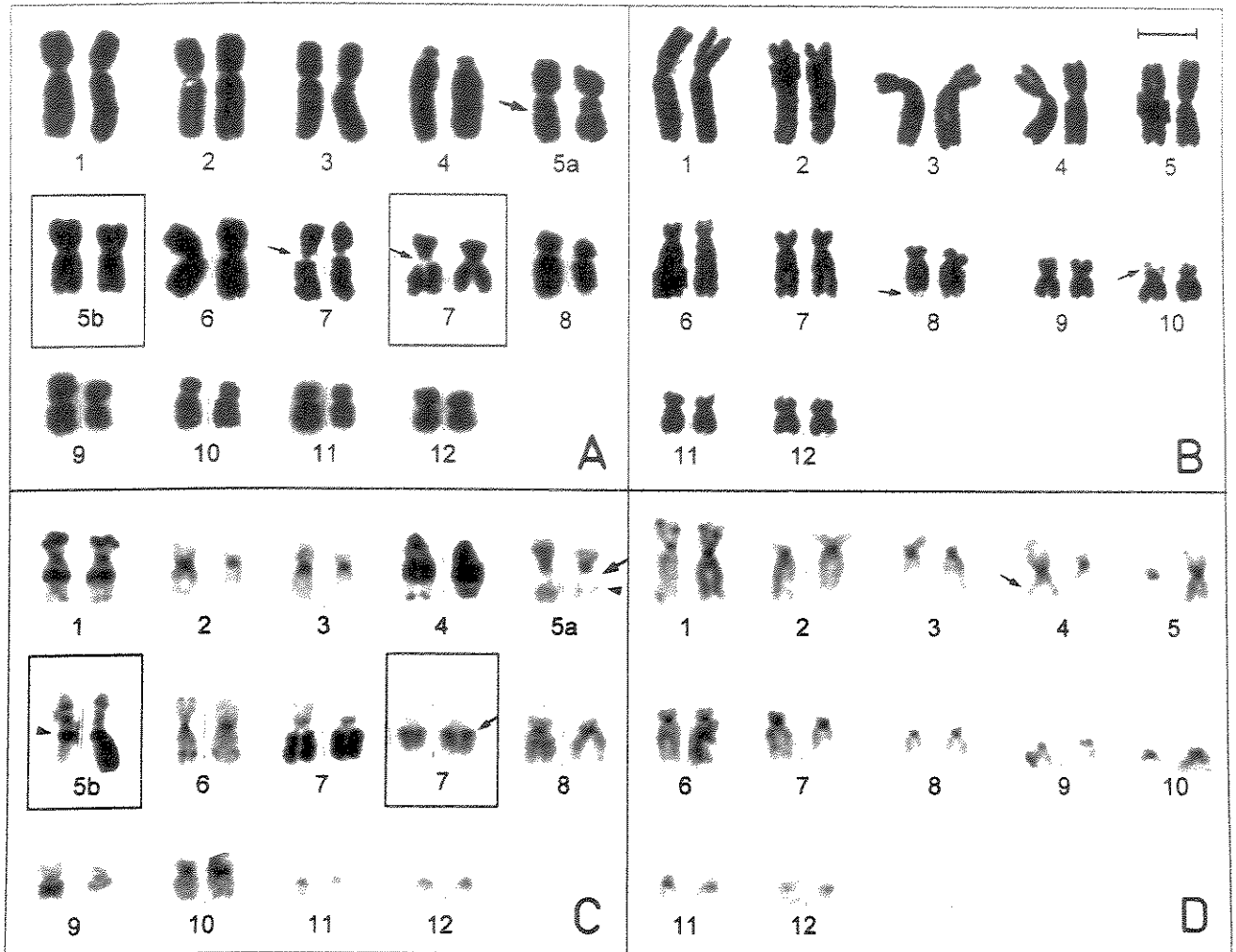


Figure 1

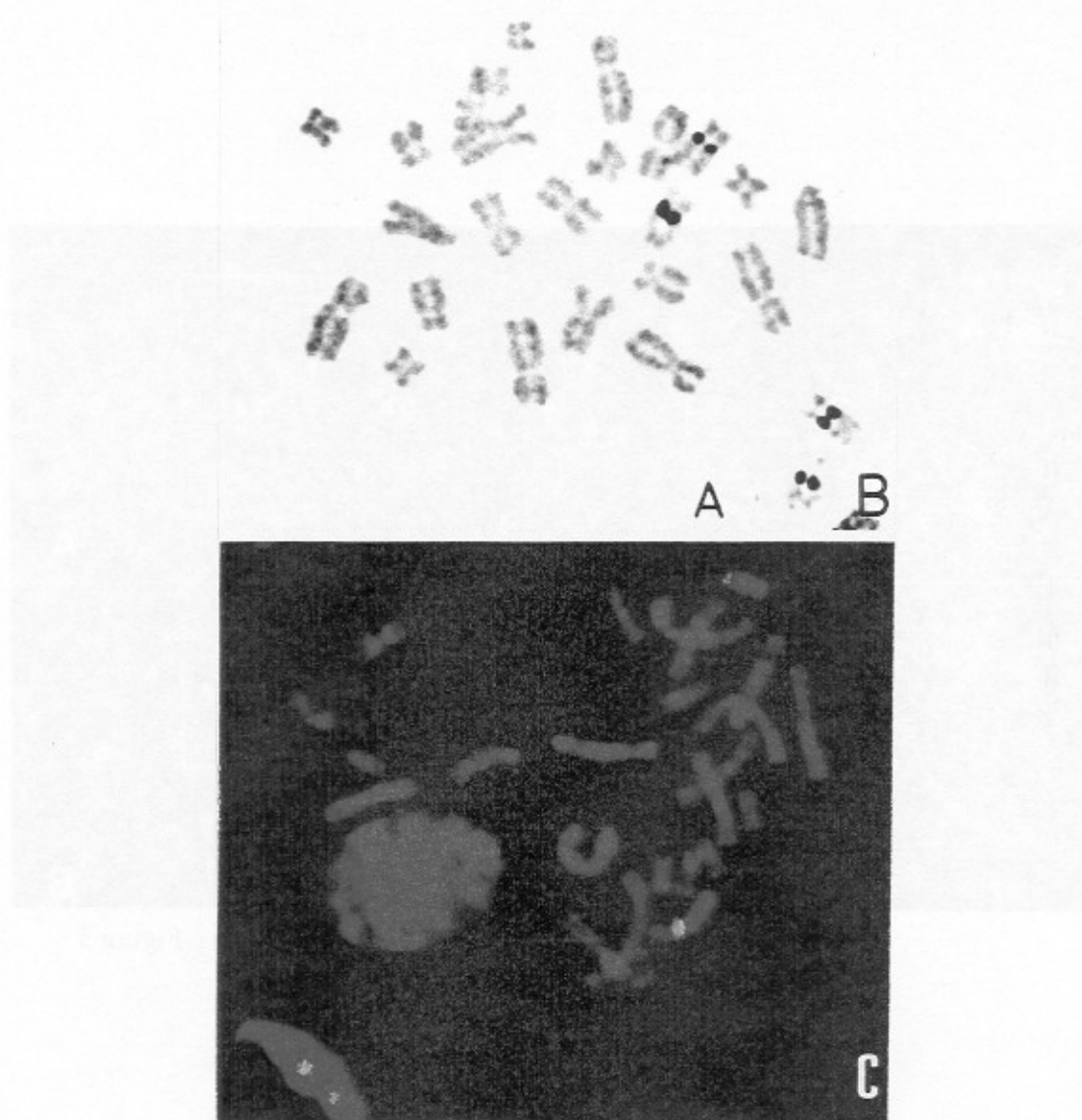


Figure 2

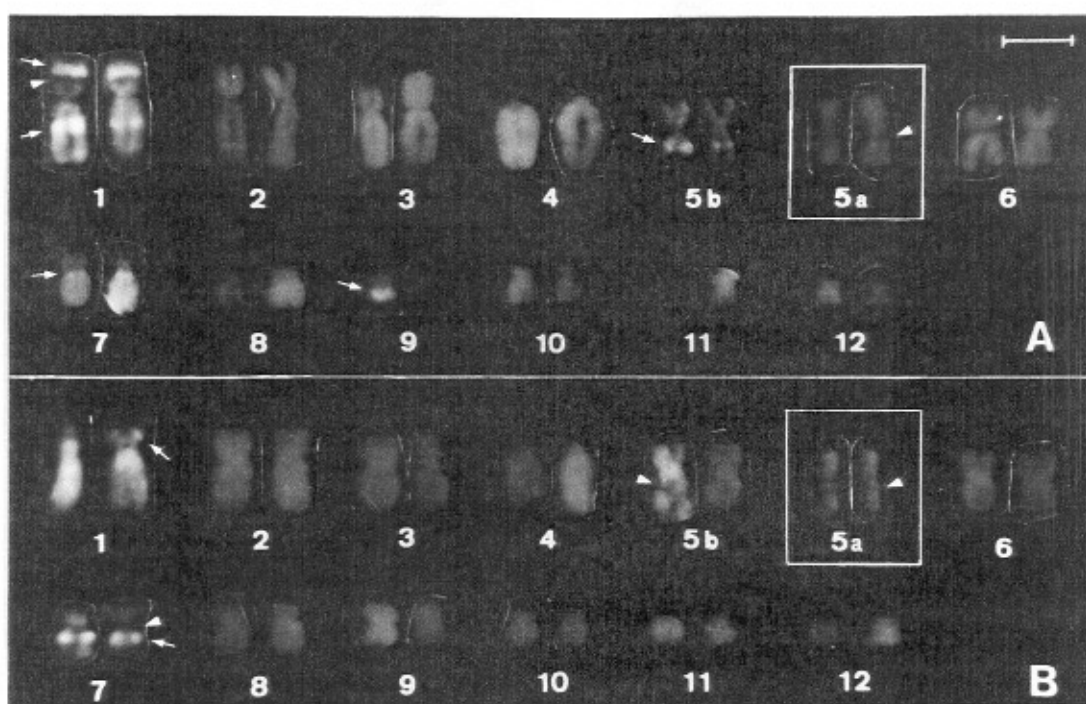


Figure 3

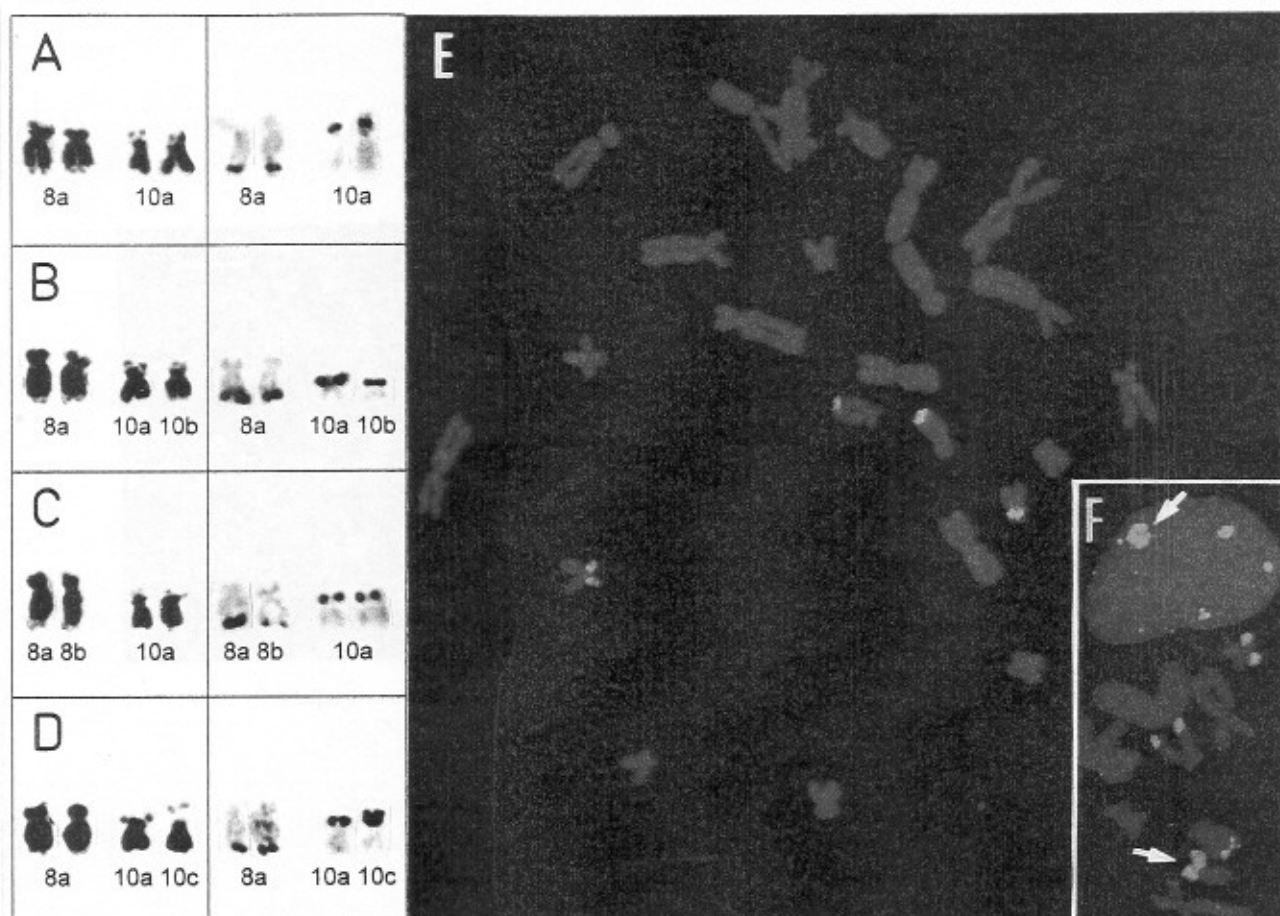


Figure 4

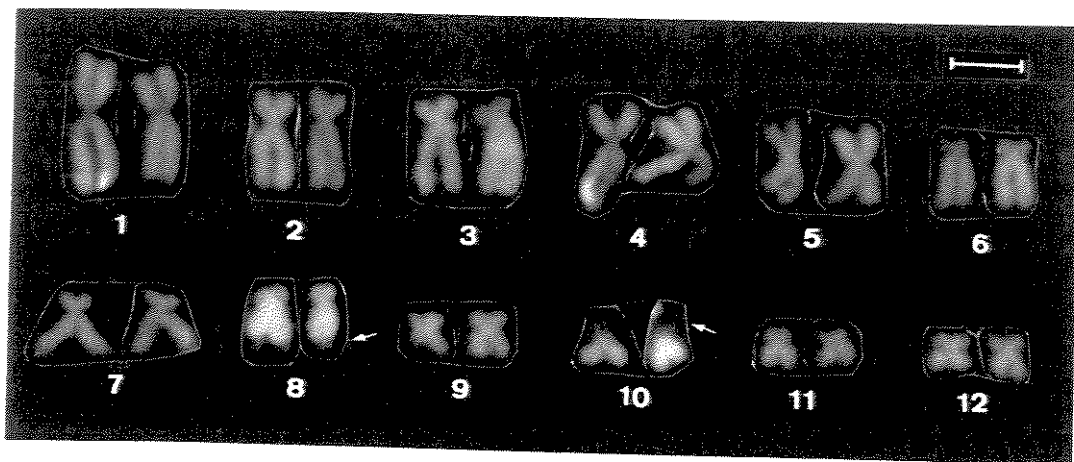


Figure 5

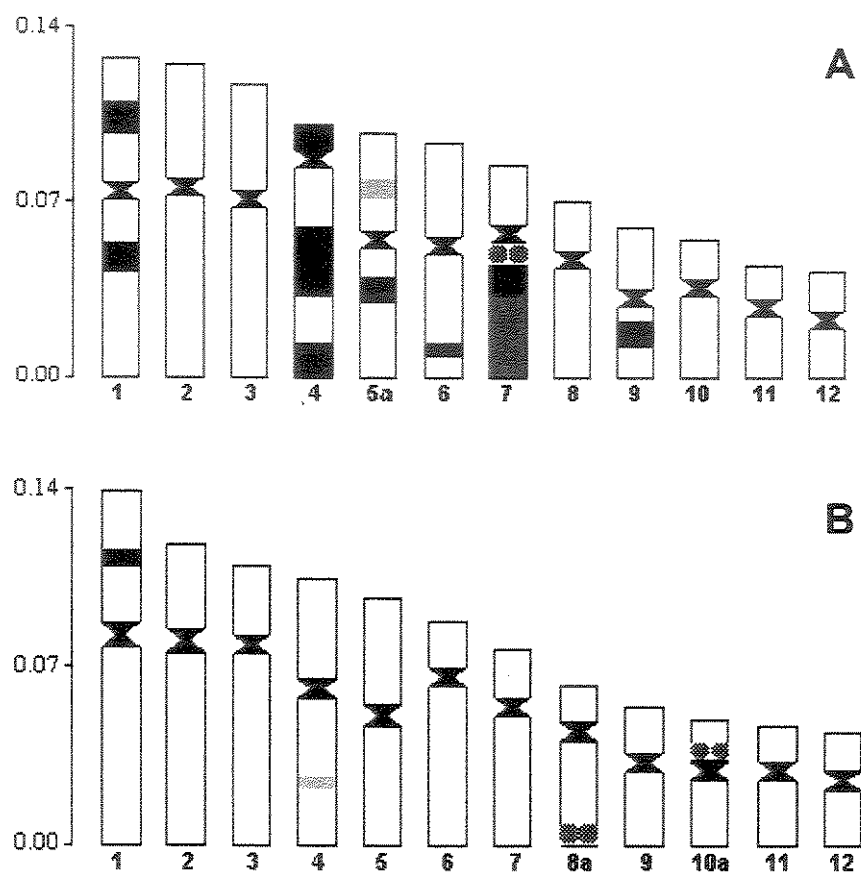


Figure 6

Table I. Morphometric parameters of the *Paratelmatoobius cardosoi* and *Paratelmatoobius poecilogaster* karyotypes.

		chromosomes														
		1	2	3	4	5	6	7	8a	8b	9	10a	10b	10c	11	12
<i>P. cardosoi</i>	<i>r. l.</i>	12.42	12.12	11.38	9.83	9.50	9.12	8.27	6.83	-	5.88	5.34	-	-	4.38	4.08
	<i>a. r.</i>	1.62	1.56	1.57	6.76	1.30	1.25	2.17	2.01	-	1.18	1.86	-	-	1.62	1.20
	<i>c. c.</i>	m	m	m	st	m	m	sm	sm	-	m	sm	-	-	m	m
<i>P. poecilogaster</i>	<i>r. l.</i>	13.79	11.80	10.96	10.50	9.75	8.80	7.70	6.29	5.68	5.46	4.96	4.16	5.58	4.70	4.40
	<i>a. r.</i>	1.51	2.06	2.54	1.45	1.10	3.03	2.35	2.67	2.33	1.48	1.58	2.02	1.18	1.64	1.40
	<i>c. c.</i>	m	sm	sm	m	m	st	sm	sm	sm	m	m	sm	m	m	m

r. l.: relative length (%); *a. r.*: arm ratio; *c. c.*: centromeric classification; m: metacentric; sm: submetacentric; st: subtelocentric

Table II. Number of silver-stained and C-banded metaphases analyzed from each specimen. CFBH: Prof. Célio F. B. Haddad collection. ZUEC: Museu de História Natural "Prof. Dr. Adão José Cardoso". BC: symbol attributed in the Cytogenetic Laboratory of the Department of Cell Biology for the identification of the specimens that were not deposited in museum.

Specimen	Metaphases analyzed by	
	Ag-NOR	C-banding
<i>P. cardosoi</i>		
CFBH 3255	40	31
CFBH 3256	4	-
CFBH 3257	6	4
CFBH 3258	9	-
CFBH 3259	41*	37
CFBH 3260	17	-
CFBH 3261	50	-
CFBH 3262	15*	8
CFBH 3263	10	8
CFBH 3264	24*	61
CFBH 3265	11	-
CFBH 3266	83*	115
CFBH 3267	70*	44
CFBH 3268	13	5
CFBH 3269	24	29
<i>P. poecilogaster</i>		
ZUEC 9599	12	-
BC 33.09	111*	37
BC 33.10	51*	20
BC 33.11	7*	3
BC 33.13	6*	3
ZUEC 9747	11*	41
BC 33.16	7*	-
BC 33.17	10*	-
BC 33.18	15	-
CFBH 3251	26	7
CFBH 3253	31	-
CFBH 3254	61	-

*specimens with evident heteromorphic NORs

V - Artigo 2

Intragenetic karyotypic divergence in *Scythrophrys* Lynch (1971) and new insights on the relationship with the leptodactylid *Paratelmatobius* Lutz & Carvalho (1958)

(Anura, Leptodactylidae)

Luciana B. Lourenço¹, Paulo C. A. Garcia², and Shirlei M. Recco-Pimentel^{3*}

^{1,3}Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brasil; Tel: 55 19 3788 6127; Fax: 55 19 3788 6111; e-mail: bolsoni@hotmail.com, shirlei@unicamp.br. ²Departamento de Zoologia e Curso de Pós-Graduação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil; e-mail: pcgarcia@ms.rc.unesp.br.

* corresponding author

Abstract

Three populations of *Scythrophrys* Lynch from Brazil were studied cytogenetically. The karyotype found in Piraquara (Paraná State) and São Bento do Sul (Santa Catarina State) (karyotype I) differed from that of Rancho Queimado (Santa Catarina State) (karyotype II) in NOR location and in the occurrence of some C-bands. In karyotype I, pair 5 contains NOR-bearing chromosomes, while in karyotype II the NOR occurs in pair 10. This difference probably accounts for the inverted classification of pairs 5 and 6 in these karyotypes, which appear to be homeologous, as suggested by the presence of heterochromatic markers. These karyotypes also differ in the size of the non-centromeric C-bands in pairs 1 and 8. Comparison of the *Scythrophrys* karyotypes with those of *Paratelmatobius* revealed several similarities, especially between karyotype II of *Scythrophrys* and that of *P. poecilogaster*. Both karyotypes have a NOR in pair 10, so it was considered to be present in the common ancestral for these genera. After this intergeneric comparison, the non-centromeric C-bands of pairs 7, 10, and that of pair 5 in karyotype I and of pair 6 in karyotype II were considered to be synapomorphies for *Scythrophrys*.

Introduction

The genus *Scythrophrys* Lynch, 1971, is endemic to Brazil (Frost, 2000) and contains only one species, *S. sawayae* (Cochran, 1953). The phylogenetic relationships of this leptodactylid genus are not clear yet. Based on external morphology, Lynch (1971) recognized similarities between *Scythrophrys* and *Paratelmatobius* and, in some aspects, between *Scythrophrys* and *Zachaenus*. Although this author classified *Scythrophrys* in the subfamily Telmatobiinae, the intergeneric relationships of *Scythrophrys* were not clarified. Heyer (1983) considered that *Scythrophrys* resembles *Zachaenus*, *Paratelmatobius*, and *Physalaemus* in external appearance, but reported differences between *Scythrophrys* and *Paratelmatobius* in jaw musculature and in hyoid morphology and musculature, and between *Scythrophrys* and *Physalaemus* in jaw musculature and sternal morphology. Heyer (1983) also pointed out some morphological divergences between *Scythrophrys* and the group *Zachaenus-Cycloramphus-Craspedoglossa* and concluded that

"*Scythrophrys* is a very distinctive leptodactylid genus with obscure phylogenetic relationships". More recently, based on ecological and morphological characters, Garcia (1996) corroborated the close relationship between the genera *Scythrophrys* and *Paratelmatoobius* and recognized more similarity between *Scythrophrys* and *Paratelmatoobius cardosoi* than between this species of *Paratelmatoobius* and *Paratelmatoobius lutzii*. These findings raised new questions about the relationships of the species assembled in these genera.

All the living species of *Paratelmatoobius* described to date have been studied cytogenetically (Lourenço *et al.*, 2000). Additionally, the diploid number and the chromosome morphology of *P. lutzii*, considered a missed species by Pombal Jr. & Haddad (1999), have been described (De Lucca *et al.*, 1974). However, the lack of cytogenetic information about *Scythrophrys* precludes cytogenetic comparisons between these genera. In this work, we describe the karyotypes of three populations of *Scythrophrys*, including one from the type-locality of *S. sawayae*.

Material and Methods

Specimens

Sixteen specimens of *Scythrophrys* were collected from three localities in south of Brazil from October 1997 to November 1999. Five specimens (three males and two females) were obtained from Piraquara, Paraná State, the type-locality of *S. sawayae*, three males were collected from Rio Vermelho, São Bento do Sul, Santa Catarina State, and eight specimens (seven males and one female) were obtained from Rancho Queimado, Santa Catarina State. All the specimens studied were deposited in CFBH (Célio F. B. Haddad collection, Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil) and in ZUEC (Museu de História Natural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil).

Chromosome preparations and techniques

After a treatment *in vivo* with colchicine, the specimens were killed and their intestines and testes were processed according to Schmid (1978a) and Schmid *et al.* (1979) for chromosomal preparations. Giemsa staining, C-banding (King 1980), Ag-NOR method (Howell & Black, 1980)

and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Viegas-Péquignot, 1992) with an rDNA probe were done. The probe used in FISH experiments consisted of the plasmid HM 123, which carries a fragment containing the major part of 28S ribosomal gene of *Xenopus laevis* (Meunier-Rotival *et al.*, 1979). For FISH analysis, a BioRad MRC 1024 UV confocal microscope was used. The morphometric analyses were done using Image Pro-Plus software, version 3 (Media Cybernetics). The chromosomes were classified according to criterion proposed by Green & Sessions (1991).

Results

All the specimens analyzed showed $2n=24$ chromosomes, but two distinct karyotypes were observed. The specimens from Piraquara and São Bento do Sul showed the same karyotypic complement (Figs. 1a, 2a, 3-5, 8a), which differ from that of the specimens from Rancho Queimado (Figs. 1b, 2b, 6, 7, 8b). These karyotypes are described separately below.

Karyotype of specimens from Piraquara and São Bento do Sul

This karyotype consists of five pairs of metacentric chromosomes (4, 6, 9, 10, and 12), six submetacentric pairs (2, 3, 5, 7, 8, and 11) and one polymorphic pair (1) (Figs. 1a, 2a and 3; Table 1). Small amounts of heterochromatin were observed in the centromeric region of all chromosomes (Fig. 2a). Other non-centromeric C-bands were also seen in pairs 5, 6, 7, 8, 9 and 10, and a faint band was hardly seen in the short arm of pair 1 (Fig. 2a).

In all specimens from Piraquara, pair 5 carried a NOR adjacent to the centromere (morph 5a), as detected by silver staining (Fig. 3) and *in situ* hybridization (Fig. 5). Interindividual variation in the NOR pattern was detected in specimens from São Bento do Sul using the same techniques. In one specimen, an apparent inversion involving the NOR was observed as a heterozygous condition in pair 5 (Figs. 3b, 4 and 5a). This chromosome morph, which differs from chromosome 5a in specimens from Piraquara, was designated morph 5b. Morphs 5a and 5b do not differ in arm ratio or chromosome length (Table 1). In another specimen from the same population, an extra NOR was observed in one homologue of pair 1 (Figs. 3c and 5b). This additional NOR is coincident with a heterochromatic band which is exclusive to this homologue of pair 1 (Fig. 2a). There was no

intraindividual variation in the NOR pattern and all the NORs were seen as secondary constrictions in Giemsa-stained metaphases (Fig. 1a).

A large block of heterochromatin was detected adjacent to the NOR site in both morphs of pair 5. This heterochromatin is also involved in the inversion that differentiated morphs 5a and 5b (Fig. 2a, 4). Thus, in morph 5a the heterochromatic block extends from the NOR to the telomere, and in morph 5b this heterochromatin is apparently continuous from the centromeric region to the NOR.

Karyotype of population of Rancho Queimado

This complement consists of five metacentric pairs (1, 4, 5, 9, and 12), four submetacentric pairs (2, 3, 7, and 11), and three polymorphic pairs with a divergent centromeric classification (6, 8 and, 10) (Figs. 1b, 2b, and 6; Table 1). C-banded metaphases showed small bands in all the centromeric regions. In pair 10, the centromeric heterochromatin is asymmetrically distributed (Fig. 2b). Additionally, the entire short arm of pairs 6 and 8 are heterochromatic and showed size heteromorphism (Fig. 2b). In one specimen, two morphs (a and b) were identified for each of these pairs in all the metaphases analyzed. These heteromorphisms were also detected by morphometric analysis, and resulted in distinct centromeric classifications (Table 1). The other specimens showed the morphs 6a and 8a in a homozygous condition. Other non-centromeric C-bands were also detected in pairs 1, 4, 5, 7, and 9 and in chromosome 10, adjacent to the NOR site (Fig. 2b).

Pair 10 is the only NOR-bearing chromosome pair in all specimens from this population (Figs. 6 and 7). Three different NOR sizes were observed in silver-stained metaphases (Fig. 6), two of which were also analyzed by *in situ* hybridization (Fig. 7). Such heteromorphism accounts for the variation in centromere classification in this pair and three morphs were recognized (10a, 10b, and 10c). In these cases, the NOR site was detected as secondary constrictions in Giemsa-stained preparations, except for morph 10b, probably because of the very reduced size of the latter's NOR. There was no variation in the NOR pattern within each specimen.

Discussion

Although the diploid number of 24 chromosomes was observed in all specimens of *Scythrophrys* analyzed, some conspicuous divergences were detected between the karyotype of specimens from Piraquara and São Bento do Sul (karyotype I) and that of animals from Rancho Queimado (karyotype II) (Fig. 8). The principal divergence is the different location of the fixed NOR site, which occurs in pair 5 in karyotype I and in pair 10 in karyotype II. The presence of the NOR is the only difference between pair 5 of karyotype I and pair 6 of karyotype II; the homeology of these chromosomes is strongly suggested by the presence of a large heterochromatic block in their short arms. The divergence in arm ratios and chromosome lengths and, consequently, the differential ordination of these pairs in karyotypes I and II is attributable to the absence/presence of the NOR site. This inversion suggested in the chromosome ordination of these karyotypes can also be deduced by the conspicuous homeology detected between pair 6 of karyotype I and pair 5 of karyotype II, which are metacentric chromosomes with typical interstitial C-bands in both arms.

Karyotypes I and II clearly differ in the amount of heterochromatin in the short arm of chromosome 8. While only the telomeric region of this arm is heterochromatic in karyotype I, in karyotype II the entire short arm consists of heterochromatin. Also, although an interstitial C-band is present in the short arm of pair 1 in both karyotypes, in karyotype I the band is small and hard to see. The faint band present in the long arm of chromosome 4 in karyotype II is not detected in karyotype I. However, this absence is not considered to indicate a clear divergence between these two karyotypes since the band in question was actually difficult to see even in karyotype II.

The chromosome morphs considered typical of each karyotype were never found in specimens from the other karyotypic group. In the case of the NOR sites, the experiments *in situ* revealed no "silent" NORs even in pair 10 in karyotype I or pair 6 (which corresponds to pair 5 of karyotype I; see above) in karyotype II. These findings suggest the existence of a certain separation between the two karyological groups described here.

Such interpopulational divergence in karyotype is not very common in anurans. In contrast to intrapopulational variation, which has been widely described in amphibians (Schmid, 1978a,b; 1980a,b; King, 1980, 1991; Schmid *et al.*, 1983, 1987, 1989, 1990, 1993; Miura *et al.*, 1995), interpopulational variation in C-band size is rare, although Miura (1995) recognized two groups

among 11 populations of *Bufo japonicus japonicus*, based on their C-banding pattern. An unusual case is that of *Alytes obstetricans*, in which two populations differed not only in the amount but also in the position of a constitutive heterochromatic band in chromosome 1, probably because of a paracentric inversion (Schmid *et al.*, 1987). In relation to NOR location, intrapopulational variation has been described for some species (Ruiz *et al.*, 1981; Wiley *et al.*, 1989; Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1995; Lourenço *et al.*, 1998; Silva *et al.* 1999), whereas interpopulational variation in NOR position, in which each population has a fixed, typical NOR, has been reported only for *Hyla ebraccata* (Kaiser *et al.*, 1996). Although in this case the external morphology and vocalizations of these *Hyla* species did not separate the populations studied into two taxonomic units, the authors considered possible that the cytogenetic findings may be indicative of an incipient speciation.

For the three populations of *Scythrophrys* studied here, the variation in morphological characters and in vocalization allowed recognition of the same groups identified cytogenetically and the geographical distribution of these populations also agrees with the existence of these groups (Garcia *et al.*, in preparation). Thereby, we suggest that the karyological groups I and II of *Scythrophrys* may represent two distinct taxonomic units in the genus.

Despite the differences discussed above, the similarity in the morphology of most of the chromosomal pairs and in the distribution of heterochromatin indicated that karyotypes I and II of *Scythrophrys* are closely related. Both karyotypes have small amounts of centromeric heterochromatin and similar non-centromeric bands in pairs 7, 9, and 10. Furthermore, the C-band in the short arm and the asymmetric distribution of heterochromatin in the centromeric region of pair 10 serve as good markers for the homeology of pair 10 in both karyotypes, although in karyotype II this pair also carries a NOR. The interstitial bands in pair 6 of karyotype I are also seen in pair 5 of karyotype II, and strongly suggest homeology between these pairs, as mentioned above.

Comparison of the karyotypes of *Scythrophrys* and of *Paratelmatobius* (De Lucca *et al.*, 1974; Lourenço *et al.*, 2000), two genera considered to be closely related morphologically (Lynch, 1971; Garcia, 1996), reveals several similarities. All karyotypes have a diploid complement of 24 chromosomes, with similar morphologies. This feature is indicative of the close relationship between these genera, since no other leptodactylid with a 24-karyotype shows such morphological relatedness (see lists in King, 1990, and Kuramoto, 1990). To date, the only two leptodactylid species with $2n=24$ are *Hylodes nasus* (Bogart, 1991) and *Adenomera marmorata* (Bogart, 1974).

But these karyotypes share few morphological similarities with those of *Paratelmatoobius* and *Scythrophrys*, especially that of *A. marmorata*, which has seven telocentric pairs (Bogart, 1974).

The similarities between the karyotypes of *Scythrophrys* and *Paratelmatoobius* are particularly strong considering karyotype II of *Scythrophrys* and that of *P. poecilogaster* (Lourenço *et al.*, 2000). The morphology of most of their chromosomal pairs is similar, as shown by the arm ratio values. Both karyotypes show also some similarities in C-banding pattern; however, pairs 5, 6, 7, 8, and 9 in karyotype II of *Scythrophrys* possess non-centromeric C-bands, that are absent in *P. poecilogaster*.

The karyotype II of *Scythrophrys* and that of *P. poecilogaster* have a similar NOR pattern. The short arm of pair 10 carries a NOR in both karyotypes, although a second fixed NOR occurs in pair 8 in *P. poecilogaster*. Although pair 10 of both karyotypes seems to be homeologous, they differ in the internal location of the NOR in the short arm (terminal in karyotype II of *Scythrophrys* and proximal to the centromere in *P. poecilogaster*) and in the C-banding pattern. While in that karyotype of *Scythrophrys* pair 10 shows the centromeric heterochromatin distributed asymmetrically and an interstitial C-band adjacent to the NOR, in *P. poecilogaster* pair 10 shows only the centromeric heterochromatin distributed symmetrically. One possible explanation for this distinct distribution of NOR and heterochromatin in these karyotypes is the occurrence of some internal rearrangements in this chromosome arm.

At this rate, since the short arm of pair 10 carries an NOR in one species of *Paratelmatoobius* and one of *Scythrophrys*, we hypothesize that a NOR-bearing chromosome like that was also present in the ancestral of these genera. This proposal does not prevent that the presence of an NOR in a small metacentric/submetacentric chromosome can be a synapomorphic character shared only by the genera *Scythrophrys* and *Paratelmatoobius*, although a cytogenetic study of other leptodactylid species is necessary to test this hypothesis.

The NORs observed in the genera *Scythrophrys* (this paper) and *Paratelmatoobius* (Lourenço, *et al.*, 2000), with the exception of the NOR in pair 8 of *P. poecilogaster* and that in pair 1 of karyotype I of *Scythrophrys*, are flanked by large blocks of heterochromatin. Such an arrangement has been described in other species (Schmid, 1978a, 1982; King, 1980; Schmid *et al.*, 1995), and a possible involvement of this heterochromatin in NOR rearrangements has been considered in amphibian analysis (Nardi *et al.*, 1977).

The C-banding pattern of *Scythrophrys* and *Paratelmatobius* karyotypes revealed the consistent presence of a C-band in the short arm of pair 1, although this band is much smaller in karyotype II of *Scythrophrys*. Additional homeology among the species of these genera involves an interstitial C-band in metacentric chromosome 9 present in the *Scythrophrys* karyotypes I and II and in *P. cardosoi*. Although this band is located on the short arm in the *Scythrophrys* karyotypes and on the long arm in *P. cardosoi*, they may be considered homeologous segments since pair 9 is a metacentric chromosome. This divergence may reflect a methodological artifact or could represent a real small divergence, that resulted in the inversion in the classification of the arms just because of their similar lengths in this metacentric pair. It is also possible that a pericentric inversion could play a role in the divergence of this pair in the evolution of these karyotypes. The faint C-band in the long arm of pair 4 in *P. poecilogaster* and in karyotype II of *Scythrophrys* may also share the same evolutionary origin. Similarly, the interstitial band in the long arm of pair 6 in *P. cardosoi* and in karyotype I of *Scythrophrys* and that in the long arm of pair 5 in karyotype II of *Scythrophrys* may be homeologous.

Comparative analysis of *Scythrophrys* and *Paratelmatobius* is also useful for corroborating the close relationship between the two karyotypes of *Scythrophrys*. By considering *Paratelmatobius* as an out-group for the cytogenetic analysis of *Scythrophrys*, some synapomorphies for the two groups of *Scythrophrys* are suggested: the C-bands of pairs 7, 10 and those of pair 5 of karyotype I and pair 6 of karyotype II.

Another interesting finding of the present analysis is the intrapopulational variation in the two karyological groups recognized. In the specimens from Rancho Queimado, the variation was restricted to the size of the NORs and of two C-bands. In anurans, such intrapopulational variation in NOR size (Schmid, 1978a,b, 1980a,b, 1982; Silva *et al.*, 1999) and heterochromatic bands (Schmid, 1978a,b, 1980a,b; King, 1980; Schmid *et al.*, 1990, 1993; Miura *et al.*, 1995) has been extensively described. On the other hand, the specimens from São Bento do Sul showed variation in pair 5 and in the occurrence of an additional NOR. The variation in pair 5 is suggested to be the result of the occurrence of a paracentric inversion, since the arm ratio did not change between morphs 5a and 5b. This event is probably not related to sex in group I of *Scythrophrys*, since while one male from São Bento do Sul showed an heteromorphic pair 5, the two other males from this population and the males from Piraquara showed homomorphic pair 5. Other interesting cases of

inversion in amphibian autosomal chromosomes were reported in *Alytes obstetricans* (Schmid *et al.*, 1987), in *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995) and in *Leptodactylus ocellatus* (Silva *et al.*, 2000) but, in the two latter species, involved pericentric inversion.

Extra NORs, in addition to a fixed NOR-bearing pair of chromosomes, such as observed in one specimen of *Scythrophrys* from São Bento do Sul, have been found in some anuran species (Foote *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1995). The coincident occurrence of NOR and C-band, as detected for this additional NOR, is also common in anurans (King, 1980; Schmid, 1982). An interesting feature of the additional NOR found in São Bento do Sul is its absence in specimens from Piraquara. This could represent interpopulational variation in group I of *Scythrophrys*, although a greater number of specimens would be necessary to confirm this hypothesis.

Acknowledgements

The authors thank Magno V. Segalla and Rodrigo Lingnau for help with the field work in Piraquara, PR; Museu de História Natural Capão da Imbuia (Curitiba, PR) and SANEPAR (Companhia de Saneamento do Paraná) for permitting the access to Mananciais da Serra, Piraquara, PR. This work was supported by the Brazilian agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (proc. 97/00459-9 and 98/06087-9).

References

- Bogart, J.P. A karyosystematic study of frogs in the genus *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae). *Copeia* 1974: 728-737, 1974.
- Bogart, J.P. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. In **Amphibian cytogenetics and evolution**. (D.M. Green and S.K. Sessions, eds). Academic Press, San Diego. pp 233-257, 1991.
- De Lucca, E.J., Jim, J., Foresti, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia* 27: 183-191, 1974.

- Foote, D.L., Wiley, J.E., Little, M.L., Meyne, J. Ribosomal RNA gene site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenet. Cell Genet.** **57**: 196-199, 1991.
- Frost, D.R. Amphibian species of the world: an online reference. V. 2.2 (1 September 2000). <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>, 2000
- Garcia, P.C.A. **Recaracterização de *Scythrophrys sawayae* (Cochran, 1953) baseada em morfologia, osteologia e aspectos da miologia e história natural (Amphibia: Leptodactylidae).** Masters dissertation - PUCRS, pp. 1-78, 1996.
- Green, D.M., Sessions, S.K. Nomenclature for chromosomes. In **Amphibian cytogenetics and evolution** (D.M. Green and S.K. Sessions, eds). Academic Press, San Diego. pp. 431-432, 1991.
- Heyer, W.R. Variation and systematics of frogs of the genus *Cycloramphus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Arq. Zool.** **30**: 235-339, 1983.
- 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.
- Kaiser, H., Mais, C., Bolaños, F., Steinlein, C., Feichtinger, W., Schmid, M. Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica** **98**: 95-102, 1996.
- King, M. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** **80**: 191-217, 1980.
- King, M. Amphibia. In **Animal cytogenetics** (B. John. Borntraeger, ed). Berlin/Stuttgart. Vol. 4/2, pp. 1-240, 1990.
- King, M. The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In **Amphibian cytogenetics and evolution** (D.M. Green and S.K. Sessions, eds). 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.
- 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. **Chrom. Res.** **6**: 621-628, 1998.

- Lourenço, L.B., Garcia, P.C.A., Recco-Pimentel, S.M. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. *Hereditas*, 2000 (in press).
- Lynch, J.D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. *Univ. Kans. Mus. Nat. Hist., Misc. Publ.* 53: 1-238, 1971.
- Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Macaya, G., Bernardi, G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucl. Acids Res.* 6: 2109-2123, 1979.
- Miura, I. Two differentiated groups of the Japanese toad, *Bufo japonicus japonicus*, demonstrated by C-banding analysis of chromosomes. *Caryologia* 48: 123-136, 1995.
- Miura, I., Nishioka, M., Borkin, L.J., Wu, Z. The origin of the brown frogs with $2n=24$ chromosomes *Experientia* 51: 179-188, 1995.
- Nardi, I., Barsacchi-Pilone, G., Batistoni, R., Andronico, F. Chromosome location of the ribosomal RNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). II. Intraspecific variability in number and position of the chromosome loci for 18S+28S ribosomal RNA. *Chromosoma* 64: 67-84, 1977.
- Pombal Jr., J.P., Haddad, C.F.B. Frogs of the genus *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae) with descriptions of two new species. *Copeia* 1999: 1014-1026, 1999.
- Ruiz, I.R.G., Soma, M., Beçak, W. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogenet. Cell Genet.* 29: 84-98, 1981.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* And *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-388, 1978a.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma* 68: 131-148, 1978b.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103, 1980a.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Chromosoma* 80: 69-96, 1980b.

- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** 87: 327-344, 1982.
- Schmid, M., Olert, J., Klett, C. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma** 71: 29-55, 1979.
- Schmid, M., Vitelli, L., Batistoni, R. Chromosome banding in Amphibia. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. **Chromosoma** 95: 271-284, 1987.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W. Chromosome banding in Amphibia. XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). **Chromosoma** 97: 434-438, 1989.
- Schmid, M., Haaf, T., Geile, B., Sims, S. Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). **Chromosoma** 88: 69-82, 1983.
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W., Poot, M. Chromosome banding in Amphibia. XVIII. Karyotype evolution and genomic size variation in *Pleurodema* (Anura, Leptodactylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** 62: 42-48, 1993.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Weimer, R., Mais, C., Bolaños, F., León, P. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytogenet. Cell Genet.** 69: 18-26, 1995.
- Schmid, M., Steinlein, C., Friedl, R., Almeida, C.G., Haaf, T., Hillis, D.M., Duellman, W.E. Chromosome banding in Amphibia. XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). **Chromosoma** 99: 413-423, 1990.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Kasahara, S. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. **Hereditas** 131: 135-141, 1999.
- Silva, A.P.Z., Haddad, C.F.B., Kasahara, S. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. **Cytobios** 103: 25-38, 2000.
- Viegas-Péquignot, E. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In ***In situ* hybridization: a practical approach** (D. Willernson, ed). Oxford. University Press, IRL Press, pp. 137-158, 1992.

Wiley, J.E., Little, M.L., Romano, M.A., Blount, D.A., Cline, G.R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rDNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Chromosoma** 97: 481-487, 1989.

Figure legends

Figure 1. Giemsa-stained karyotypes I (a) and II (b) of *Scythrophrys*. The boxes show other morphs of the polymorphic pairs. The arrows indicate the secondary constrictions of the NORs.

Figure 2. C-banded karyotypes I (a) and II (b) of *Scythrophrys*. The boxes show other morphs of the polymorphic pairs 5 and 10. The arrows show faint C-bands and the arrowheads indicate the secondary constrictions of NORs. Note in (a) a faint C-band that corresponds to the additional NOR of chromosome 1 seen in Figure 3c. An extra pair 10 is shown for each karyotype. Note the asymmetric distribution of the centromeric heterochromatin of pair 10.

Figure 3. NOR distribution patterns (a, b, and c) observed among specimens of *Scythrophrys* with karyotype I after silver staining. The NOR-bearing chromosome pairs are shown in boxes. Note in (b) the inverted positioning of the homologous NORs in pair 5.

Figure 4. Chromosomes 5a and 5b after Giemsa-staining (G), silver-staining (A) and C-banding (C). The arrows indicate the NOR. Note the inverted positions of the NOR and its adjacent C-band between morphs a and b of this chromosome pair.

Figure 5. Metaphases from two specimens of *Scythrophrys* with karyotype I hybridized with HM123. Note the inverted positioning of NOR in pair 5 in (a) and the additional NOR in chromosome 1 in (b) (arrow).

Figure 6. Silver-stained karyotype II of *Scythrophrys*. The box shows pair 10 from another specimen. Note the variation in NOR size.

Figure 7. Metaphases from two specimens of *Scythrophrys* with karyotype II hybridized with HM123. Note the variation in the size of NOR labeling.

Figure 8. Idiograms of karyotypes I (a) and II (b) of *Scythrophrys*. Solid blocks: dark C-bands. Gray blocks: faint C-bands. Open regions: secondary constrictions. Checkered circles: NORs.

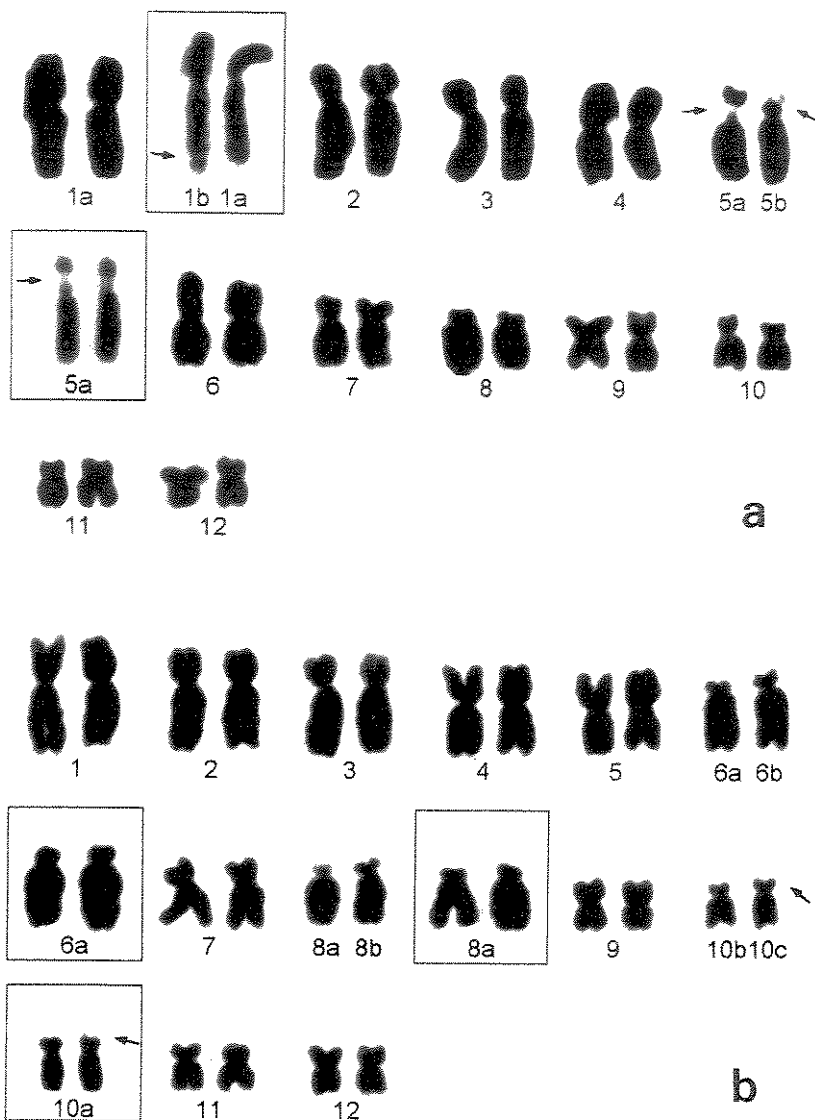


Figure 1

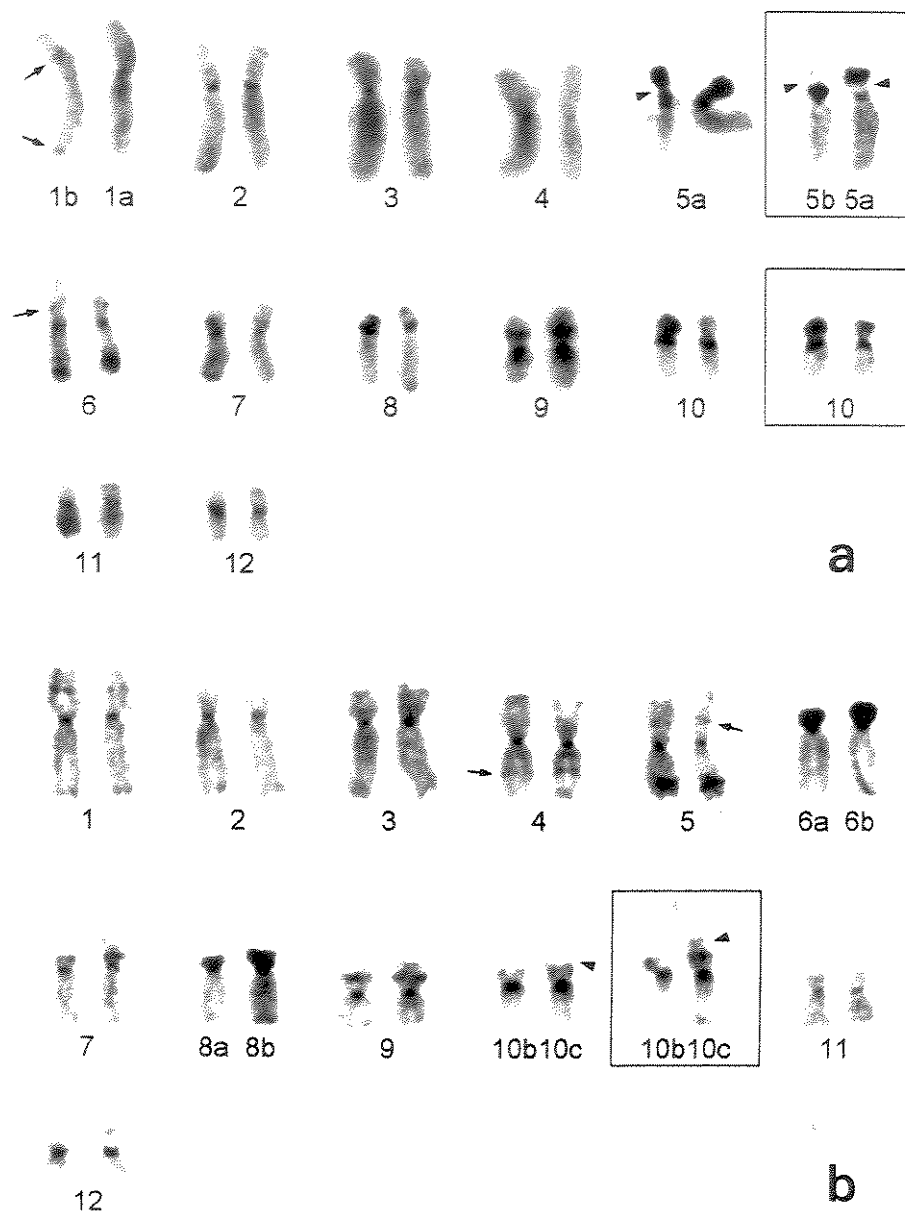


Figure 2

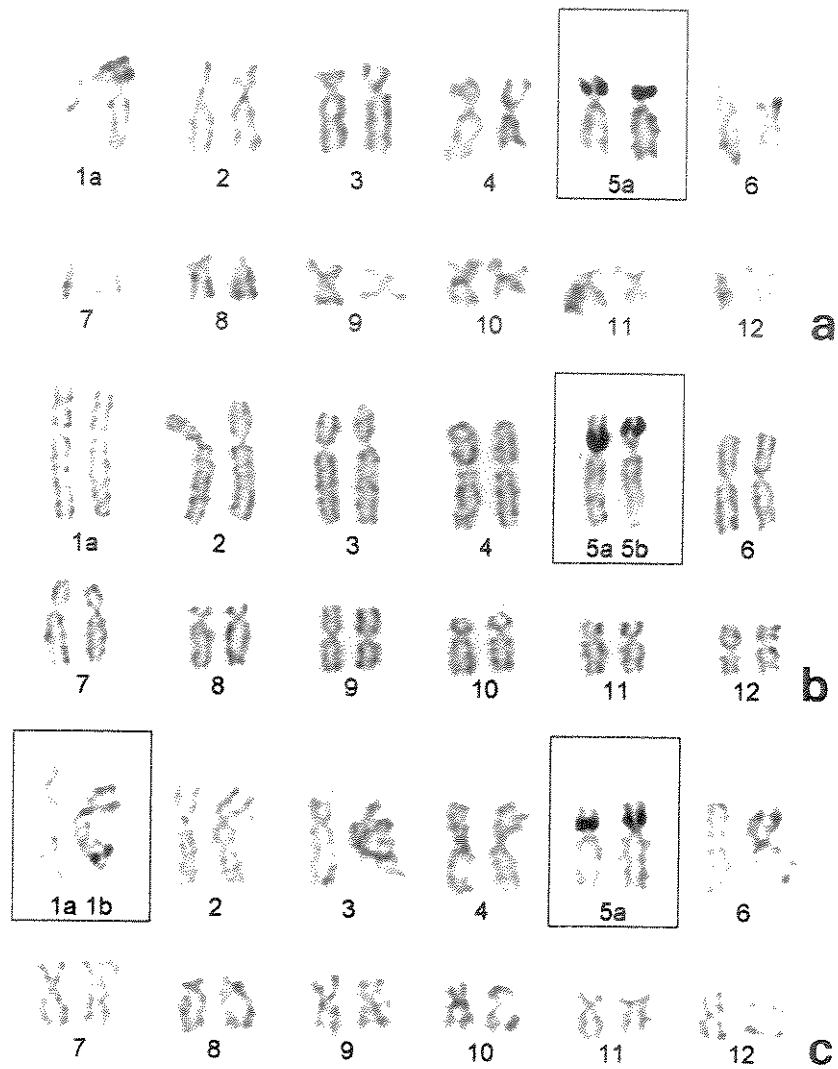


Figure 3

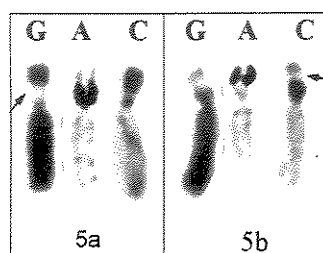


Figure 4

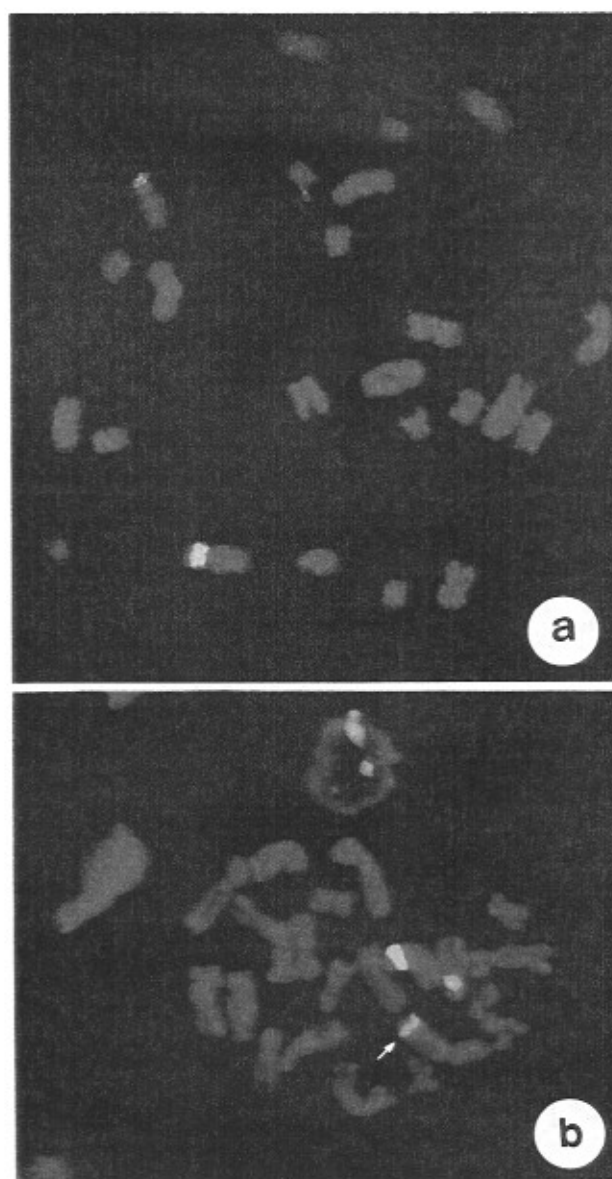


Figure 5

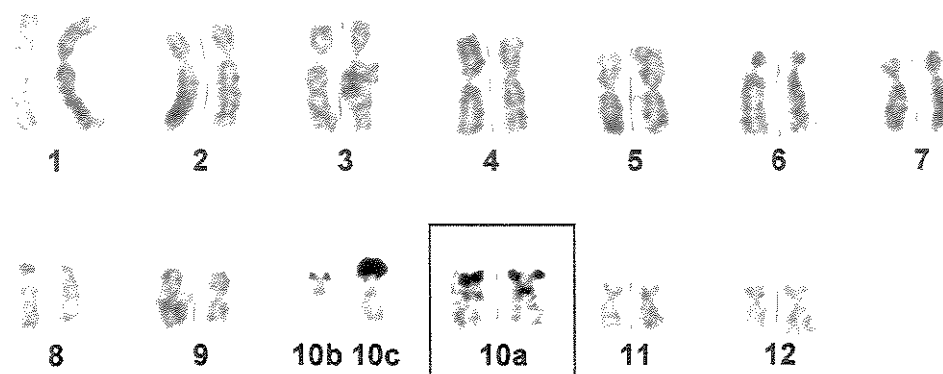


Figure 6

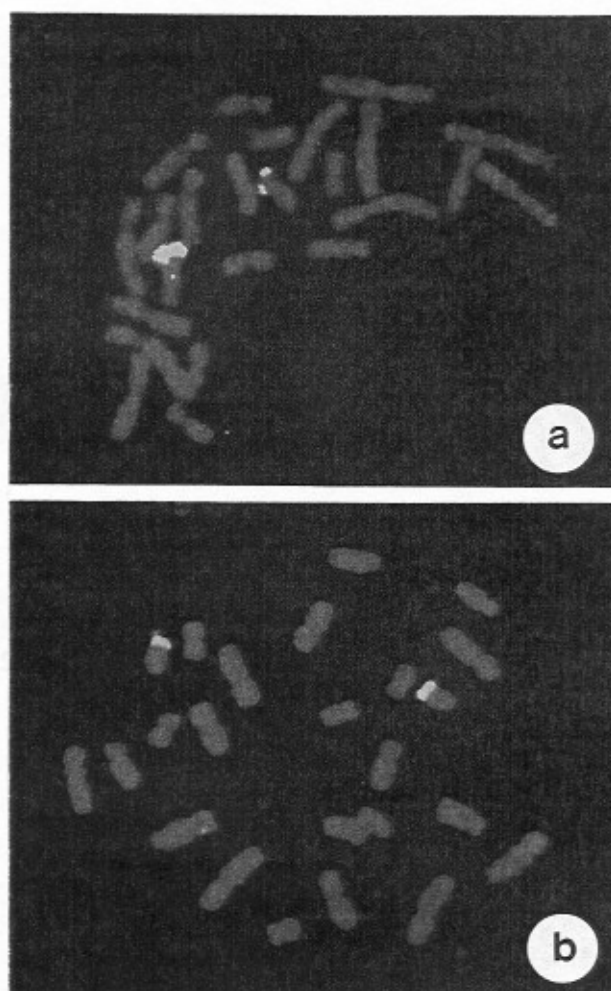


Figure 7

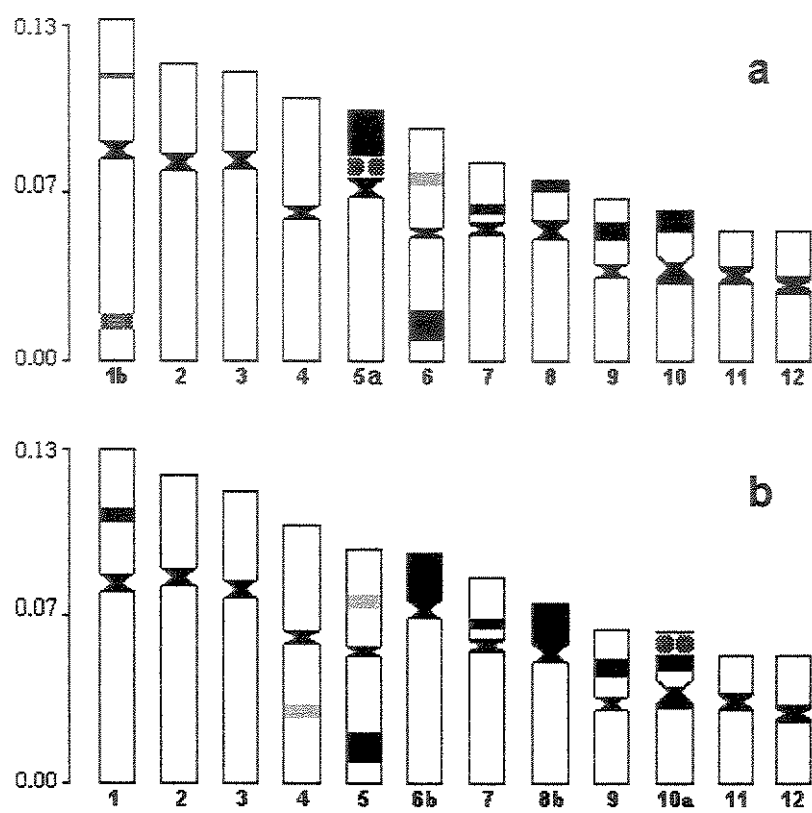


Figure 8

Table I. Morphometric data based on the measurement of 23 metaphases of karyotypes I and 40 metaphases of II of *Scythrophrys*.

		chromosomes																	
		1	1b	2	3	4	5a	5b	6a	6b	7	8a	8b	9	10a	10b	10c	11	12
Karyotype I	<i>r.l.</i>	12.68	13.73	11.50	10.87	10.18	9.76	9.27	9.09	-	7.66	6.45	-	6.06	5.48	-	-	5.09	5.08
	<i>a.r.</i>	1.54	1.72	2.02	2.26	1.29	2.13	1.94	1.23	-	2.03	2.62	-	1.23	1.68	-	-	1.99	1.28
	<i>c.c.</i>	m	sm	sm	sm	m	sm	sm	m	-	sm	sm	-	m	m	-	-	sm	m
Karyotype II	<i>r.l.</i>	13.05	-	11.94	11.17	10.55	9.36	-	8.18	8.70	7.94	6.45	7.00	5.78	5.32	5.1	6.11	4.93	4.86
	<i>a.r.</i>	1.51	-	2.00	2.23	1.32	1.14	-	4.02	2.94	2.05	3.83	2.93	1.09	2.16	2.34	1.52	1.79	1.20
	<i>c.c.</i>	m	-	sm	sm	m	m	-	st	sm	sm	st	sm	m	sm	sm	m	sm	m

r.l.: relative length (%); *a.r.*: arm ratio; *c.c.*: centromeric classification; m: metacentric; sm: submetacentric; st: subtelocentric

**Cytogenetics of a new species of *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae),
with the description of an apparent case of pericentric inversion**

Luciana B. Lourenço¹, Paulo C. A. Garcia², and Shirlei M. Recco-Pimentel^{3*}

^{1,3}Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brasil; Tel: 55 19 3788 6127; Fax: 55 19 3788 6111; e-mail: bolsoni@hotmail.com, shirlei@unicamp.br. ²Departamento de Zoologia e Curso de Pós-Graduação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil; e-mail: pcgarcia@ms.rc.unesp.br.

* corresponding author

Abstract

The karyotype of a new species of *Paratelmatoebius* from the *P. cardosoi* group is described. As with other *Paratelmatoebius* and *Scythrophrys* karyotypes, *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) shows a diploid number of 24 chromosomes, in addition to other similarities with the former karyotypes. The *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) karyotype differs from that of *P. cardosoi* in the morphology of pair 4, the NOR location and the C-bands in pairs 3 and 8 (exclusive to *Paratelmatoebius* sp) and those of pairs 7 and 9 (exclusive to *P. cardosoi*). Both karyotypes also differ in the amount of heterochromatin in pair 1. The presence of interstitial heterochromatin in the long arm of pair 1 and the interstitial C-bands in both arms of chromosome 5 are apparently synapomorphic characters of *P. cardosoi* and *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*), since they are absent in the other *Paratelmatoebius* and *Scythrophrys* karyotypes. In *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*), the nucleolus organizer region is on the short arm of a small metacentric chromosome (pair 9), an arrangement similar to the NOR-bearing chromosome pair in the karyotype of *P. poecilogaster* and in karyotype II of *Scythrophrys*. A conspicuous heteromorphism unrelated to the sex determining mechanism was also observed and probably arose from a pericentric inversion.

Introduction

The genus *Paratelmatoebius* Lutz & Carvalho comprises five species placed in two groups (Pombal Jr. & Haddad, 1999). The *P. cardosoi* group includes *P. cardosoi* and *P. mantiqueira* while the *P. lutzii* group contains *P. lutzii*, *P. poecilogaster*, and probably *P. gaigeae*. All *Paratelmatoebius* species are endemic to Brazil and *P. mantiqueira*, *P. lutzii* and *P. gaigeae* were considered as missing species by those authors.

Comparative cytogenetic analyses of living species of *Paratelmatoebius* (Lourenço *et al.*, 2000), *P. lutzii* (De Lucca *et al.*, 1974) and genus *Scythrophrys* (Lourenço *et al.*, in preparation) have shown several similarities between these genera and have allowed the evolutionary study of some chromosomal characters in this group.

In the present paper, we describe the karyotype of a new species of *Paratelmatoebius* in the *P. cardosoi* group and reassert the evolutionary hypothesis proposed in our previous studies of *Paratelmatoebius* and *Scythrophrys* (Lourenço *et al.*, 2000, and manuscript in preparation). An interesting case of an autossomal inversion is also described. This new species, here called *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) (Figure 1), was found in the Serra do Mar in the State of Paraná, Brazil, and differs from *P. cardosoi* by its advertisement call.

Materials and methods

Six males and two females of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) (Figure 1) collected from Piraquara, Paraná, Brazil, in October 1999 were studied cytogenetically. Chromosome preparations were obtained from intestinal and testes cell suspensions, as described by Schmid (1978) and Schmid *et al.* (1979). Conventional staining with a 10% Giemsa solution, the C-banding technique (King, 1980) and the Ag-NOR method (Howell & Black, 1980) were done. Chromosomes were classified according to Green & Sessions (1991). All the specimens were deposited in Célio F. B. Haddad collection (CFBH), Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil and in the Museu de História Natural "Prof. Dr. Adão José Cardoso" (ZUEC), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Results

The diploid complement of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) consists of 24 chromosomes, with six pairs of metacentric chromosomes and six of submetacentric chromosomes (Figures 2-4, 6; Table I). In all the specimens analyzed, a conspicuous secondary constriction was observed in the short arm of homologue 9 in Giemsa-stained metaphases (Figure 2) and was identified as an NOR site in silver-stained preparations (Figure 3). Additionally, a smaller secondary constriction was observed interstitially in the long arm of chromosome 5 in more decondensed metaphases (Figure 2a). All the centromeric regions of the *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) karyotype showed a small

amount of constitutive heterochromatin (Figure 4). Non-centromeric heterochromatic bands were easily visualized in pairs 1, 3, 5, and adjacent to the NOR in pair 9 (Figure 4). In some metaphases, a small telomeric C-band was observed in the short arm of pair 8 (Figure 4). Considering the small size of this band, it was probably not detected in all the metaphases because of technical problems in performing C-banding.

An interesting dimorphism was noted for pair 1 in one of the females. In this specimen, pair 1 was deeply heteromorphic in all metaphases analyzed (Figures 2-4). While one homologue (1a) was a submetacentric chromosome with an arm ratio of 1.72, the other homologue (1b) could almost be considered a subtelocentric chromosome since its arm ratio was 2.88 and, according to the classification system of Green & Sessions (1991), the arm ratio of a subtelocentric chromosome is 3.01-7.00. These morphs of pair 1 also differed in their C-banding pattern. Thus, while morph 1a showed interstitial heterochromatin in its long arm and nearly all its short arm was heterochromatic, in morph 1b, the long arm was heterochromatic and no heterochromatin was detected in the short arm (Figure 4). Intercellular variation was observed in the size of chromosome 1b relative to its homologous chromosome 1a. While in some metaphases morphs 1a and 1b showed almost the same size, in others, chromosome 1b was clearly smaller than 1a (Figure 2b).

The meiotic analysis of four males showed that, in 92% of 119 diakineses, the homomorphic pair 1 had a clear rod-like configuration, probably the result of a terminal association of the long arms (Figure 5). Such an association was particularly identifiable in C-banded diakinesis in which the heterochromatic markers of chromosome 1 (almost the whole arm and an interstitial band in the long arm) could be seen (Figure 5b).

Discussion

Interspecific analysis

The diploid number of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) is the same as in *P. cardosoi*, *P. poecilogaster* (Lourenço *et al.*, 2000), and *P. lutzii* (De Lucca *et al.*, 1974). The morphology of several chromosome pairs is also very similar among these species. The *Paratelmatoebius* sp. (aff.

cardosoi) karyotype differs from those of *P. poecilogaster* and *P. lutzii* especially in pair 6, which is metacentric in *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) and subtelocentric in *P. poecilogaster* and *P. lutzii*. On the other hand, pair 4 of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) differs morphologically from that pair of *P. cardosoi*. The location of the NOR also distinguishes *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) from *P. cardosoi*, since in *P. cardosoi* pair 7 is the NOR-bearing chromosome pair. Apart from the heterochromatic bands of pair 4 of *P. cardosoi*, which are characteristic of this species, the non-centromeric bands of pairs 7 and 9 of *P. cardosoi* are also not found in the *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) karyotype. The interstitial band in pair 3 and the telomeric band in pair 8 that are present in *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) do not occur in *P. cardosoi*. Additionally, while in *P. cardosoi* the short arm of chromosome 1 has an interstitial C-band, nearly all the short arm of chromosome 1a in *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) is heterochromatic. All of these differences provide a clear karyological distinction between the specimens studied here and *P. cardosoi*, and corroborate that *P. aff. cardosoi* is an undescribed species.

Both karyotypes have interstitial heterochromatin in the long arm of pair 1 (morph 1a in *Paratelmatoebius* sp.), although the amount of this heterochromatin is greater in *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) than in *P. cardosoi*. In addition, pair 5 of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) strongly resembles pair 5 (especially morph 5b) of *P. cardosoi*. The similar morphology and C-banding pattern in both arms of these chromosomes is a further evidence of their homeology. The long arm of both these chromosomes also has a secondary constriction. Interstitial heterochromatin in the long arm of chromosome 1 and the C-banding pattern of chromosome 5 mentioned above were not found in *Paratelmatoebius poecilogaster* (Lourenço *et al.*, 2000). Also, such characteristics were not seen in the genus *Scythrophrys*, (Lourenço *et al.*, manuscript in preparation), which is closely related to *Paratelmatoebius* (Lynch, 1971; Heyer, 1975; Garcia, 1996; Lourenço *et al.*, in preparation). Although one specimen of *Scythrophrys* showed a faint C-band in the long arm of one homologue of pair 1, it differed from the interstitial heterochromatin in the long arm of pair 1 of *P. cardosoi* and *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) also because it was associated with a NOR in that *Scythrophrys*. So, we conclude that those characteristics of pairs 1 and 5 of *P. cardosoi* and *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) can be synapomorphic characters that assemble these species.

The NOR-bearing chromosome pair of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) is probably homeologous to pair 10 of *P. poecilogaster* and to pair 10 of karyotype II of *Scythrophrys*, both of

which carry a NOR (Lourenço *et al.*, 2000, and manuscript in preparation). The classification of this pair as 9 in the *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) karyotype and not as pair 10 (as in the other karyotypes) is probably because of a conspicuous C-band between the NOR and the telomere of the short arm of this chromosome, which is absent in pair 10 of *P. poecilogaster* and of karyotype II in *Scythrophrys*. This heterochromatic band is apparently responsible for the greater size of the short arm of that chromosome in *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*).

The intrachromosomal location of the NOR in pair 10 of karyotype II of *Scythrophrys* differs slightly from that in pair 10 of *P. poecilogaster* and pair 9 of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*). In *Scythrophrys*, the NOR is more terminal, while in *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) and in *P. poecilogaster* it is proximal to the centromere. This variation may have been generated by a hypothetical paracentric inversion. Anyway, the location of a NOR in a small metacentric/submetacentric chromosome is an ancestral characteristic relative to the other NOR site present in *Paratelmatoebius* (in pairs 7 and 8; Lourenço *et al.*, 2000) and *Scythrophrys* (in pairs 1 and 5), as proposed elsewhere (Lourenço *et al.*, in preparation). Thus, the location of the NOR in pair 10 of *P. poecilogaster* and in the homeologous pair 9 of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) cannot be used to group these species separately from *P. cardosoi*, which does not have this NOR.

The comparison between the *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) and *Scythrophrys* karyotypes also showed that, as in *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*), karyotype I of *Scythrophrys* has a telomeric C-band in the short arm of pair 8, whereas in karyotype II the entire arm of this chromosome is heterochromatic. If the presence of heterochromatin in this region is considered a homeologous characteristic, then the common ancestor of *Paratelmatoebius* and *Scythrophrys* must have this heterochromatin before being lost in *P. poecilogaster* and *P. cardosoi*. An alternative hypothesis is that the telomeric C-band in pair 8 of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) is not homeologous to the non-centromeric heterochromatin of the *Scythrophrys* karyotypes so that these heterochromatin arose independently in these genera.

Overall, these cytogenetic data agree with the two groups of *Paratelmatoebius* proposed by Pombal Jr. & Haddad (1999), and allow the inclusion of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) in the *P. cardosoi* group.

Intraspecific variation in chromosome pair 1

Of the eight specimens of *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) examined, one female showed heteromorphism in pair 1 that was easily detected in all preparations. While chromosome 1a of *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) was similar in morphology to chromosome 1 of the other *Paratelmatoobius* and *Scythrophrys* species (see above), the unusual morph 1b of the karyotype described here was observed only in *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*). One possible mechanism to explain the appearance of morph 1b could be a pericentric inversion in morph 1a. This hypothesis is supported by the variation in the arm ratios of the morphs and by their distinct patterns of heterochromatin distribution. However, this mechanism cannot fully explain the decrease in the amount of euchromatin in morph 1b compared to 1a, particularly since this decrease may have arisen from a deletion or heterochromatinization.

The influence of this heteromorphism on the meiotic pairing/crossing of pair 1 was not evaluated because this phenomenon was seen in only one female. However, the meiotic analysis of homomorphic pairs of chromosome 1 suggested that the large amount of heterochromatin present impaired correct pairing/crossing and prevented the ring configuration. Such an influence of heterochromatin has been reported for several organisms (see review by John, 1988).

The heteromorphism in pair 1 of *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) was not related to the sex determining mechanism since in another female examined the morphs were homomorphic, as was the case for males.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grants nº 97/00459-9 and nº 98/06087-9).

References

- De Lucca, E.J., Jim, J., Foresti, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia* 27: 183-191, 1974.
- Garcia, P.C.A. **Recaracterização de *Scythrophrys sawayae* (Cochran, 1953) baseada em morfologia, osteologia e aspectos da miologia e história natural (Amphibia: Leptodactylidae).** Dissertação de mestrado - PUCRS, pp. 1-78, 1996.
- Green, D.M., Sessions, S.K. Nomenclature for chromosomes. In **Amphibian cytogenetics and evolution** (Green DM and Sessions SK, eds). San Diego. Academic Press, pp. 431-432, 1991.
- Heyer, W.R. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae.. *Smithson. Contr. Zool.* 199: 1-55, 1975.
- 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.
- John, B. The biology of heterochromatin. In: Verma R.S., ed. *Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects*. Cambridge. Cambridge Univ. Press, pp. 1-147, 1988.
- King, M. C-banding studies on Australian hyliid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191-217, 1980.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C.A., Recco-Pimentel, S.M. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. *Hereditas*, 2000 (*in press*).
- Lynch, J.D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. *Univ. Kans. Mus. Nat. Hist., Misc. Publ.* 53: 1-238, 1971.
- Pombal Jr., J.P., Haddad, C.F.B. Frogs of the genus *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae) with descriptions of two new species. *Copeia* 1999: 1014-1026, 1999.
- Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-388, 1978.
- Schmid, M., Olert, J., Klett, C. Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71: 29-55, 1979.

Figure legends

Figure 1. A male *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) from Piraquara, Paraná, Brazil. a. Dorsal view. b. Ventral view.

Figure 2. *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) karyotype. In a, a specimen with a homomorphic pair 1. The inset shows a secondary constriction in pair 5 with (arrow). In b, a specimen with a heteromorphic pair 1. The inset shows another pair 1 of the same specimen. Note the variable size of morph 1b relative to 1a. The secondary constriction of the NOR in pair 9 is also shown in a and b (arrow).

Figure 3. Silver-stained karyotype. Note the active NOR in pair 9. The inset shows the heteromorphic pair 1 in one female specimen.

Figure 4. C-banded karyotype. The insets show a homomorphic pair 1, and a pair 8 with a clear telomeric C-band in the short arm. The small interstitial bands of pair 5 are indicated by arrows.

Figure 5. Giemsa-stained (a) and C-banded (b) diakineses from a specimen with homomorphic pair 1. Note the rod-like configuration of this pair and the position of the short arms. The terminal association of the long arms is indicated (arrow).

Figure 6. Idiogram of the *Paratelmatoobius* sp. (aff. *cardosoi*) karyotype. Solid blocks: dark C-bands. Gray blocks: faint C-bands. Open regions: secondary constrictions. Checkered circles: NORs.

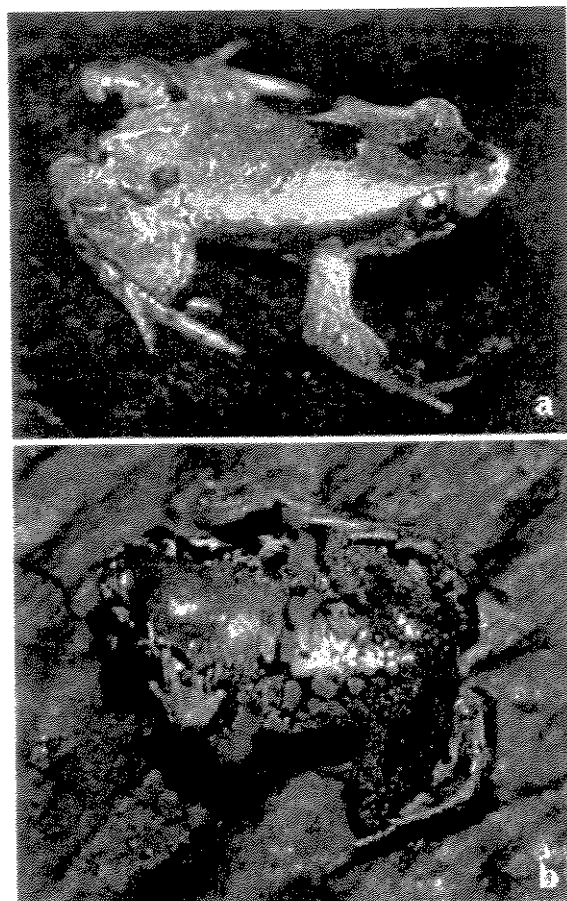


Figure 1

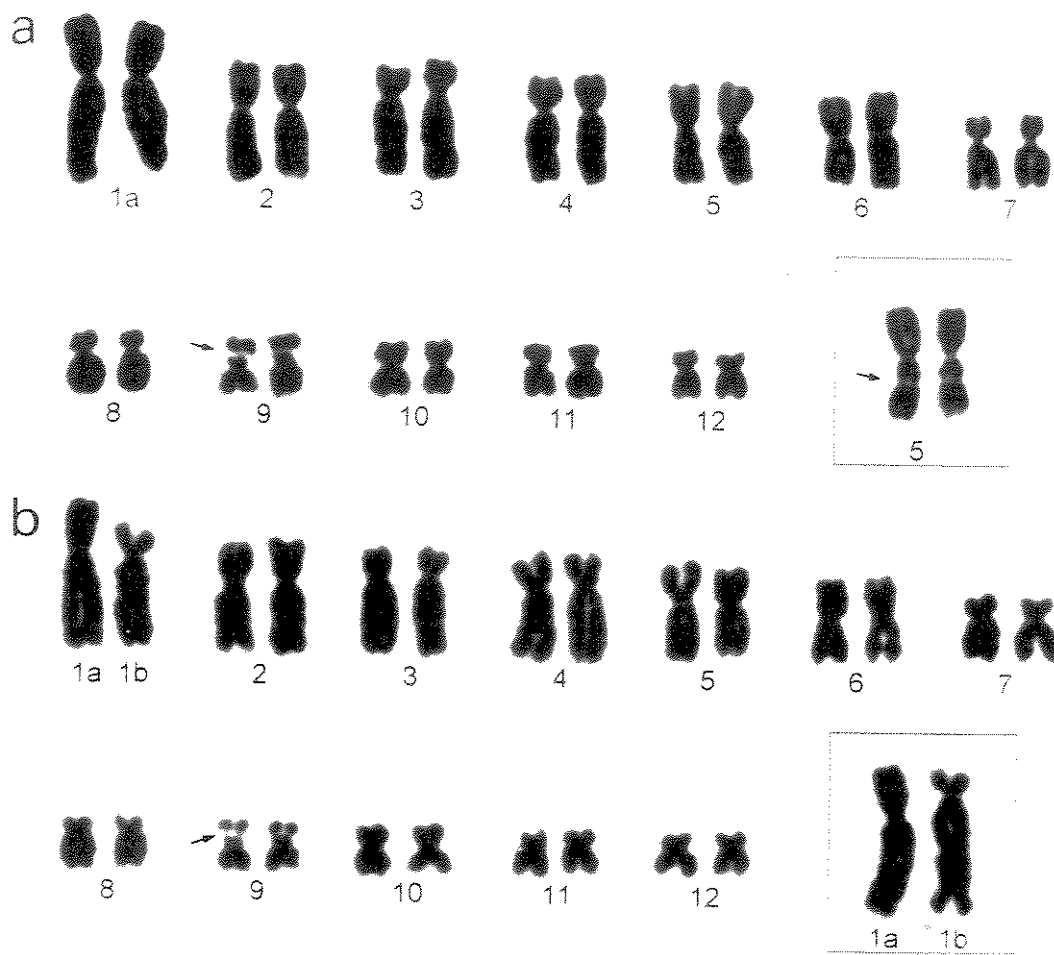


Figure 2

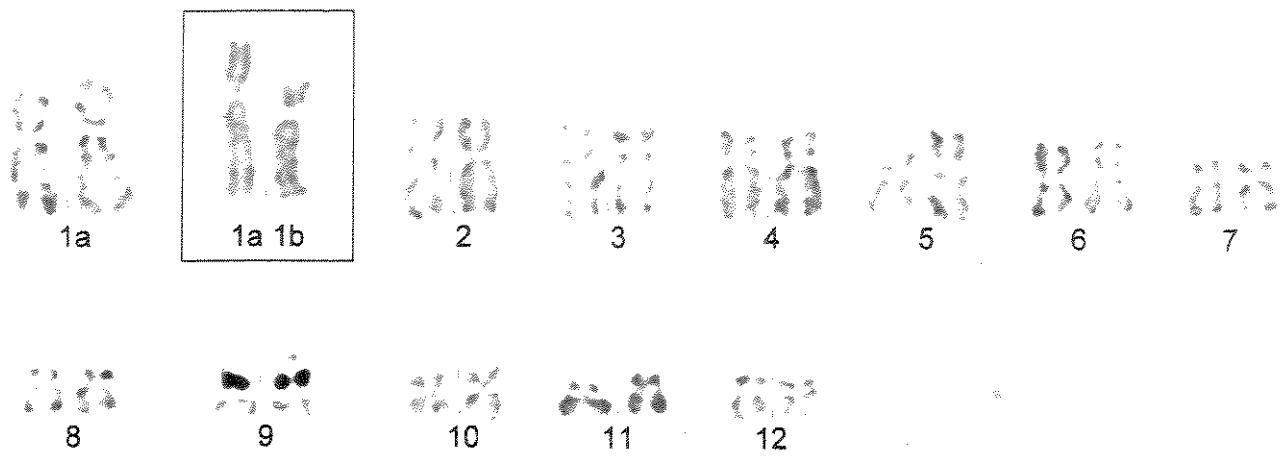


Figure 3

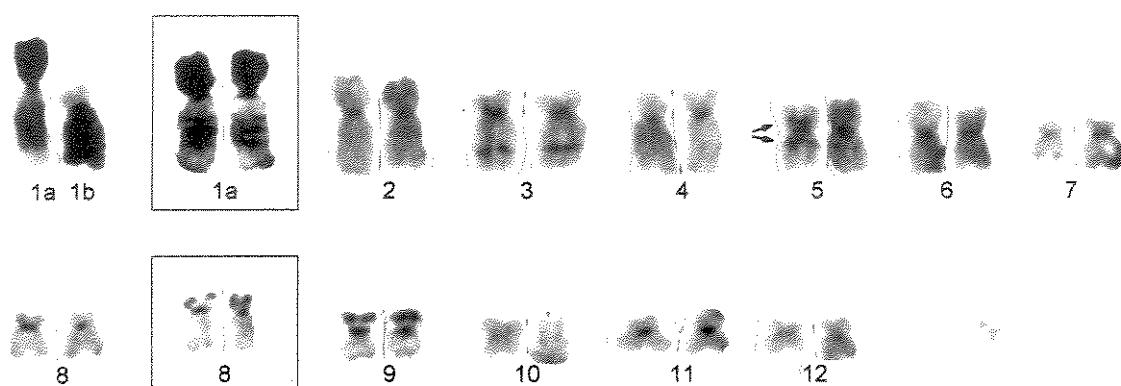


Figure 4

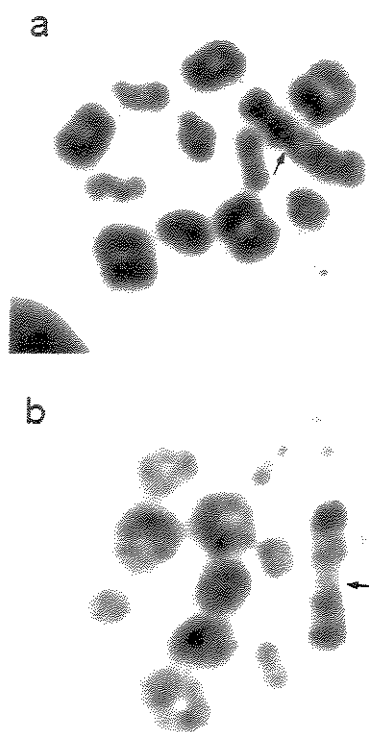


Figure 5

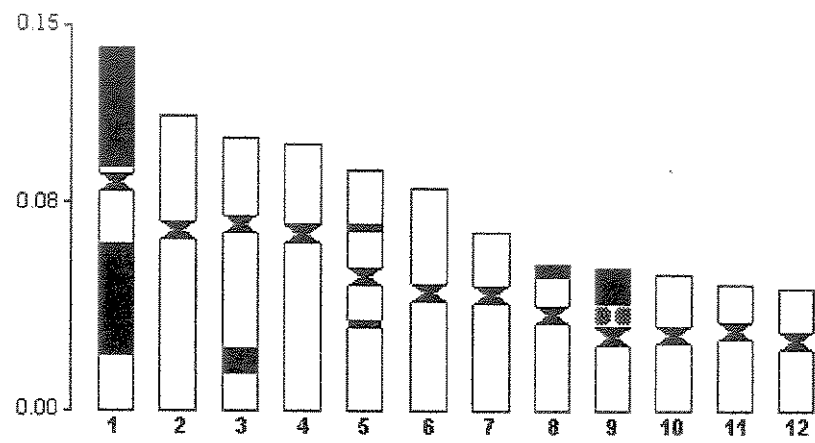


Figure 6

Table I. Morphometric data based on measurements from 39 metaphases of *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*).

chromosomes													
	1	1b	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
r.l.	14.44	11.96	11.47	10.66	10.42	9.40	8.69	6.98	5.72	5.54	5.32	4.94	4.77
a.r.	1.72	2.88	1.58	2.30	1.96	1.25	1.15	1.88	1.91	1.08	1.26	1.71	1.32
c.c.	sm	sm	m	sm	sm	m	m	sm	sm	m	m	sm	m

r.l.: relative length (%); a.r.: arm ratio; c.c.: centromeric classification; m: metacentric; sm: submetacentric; st: subtelocentric

VII - Artigo 4

**A preliminary molecular study of the 28S ribosomal DNA of
Paratelmatobius and *Scythrophrys* species (Anura: Leptodactylidae)**

Luciana B. Lourenço¹, Paulo C. A. Garcia², and Shirlei M. Recco-Pimentel^{3*}

^{1,3}Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brasil; Tel: 55 19 3788 6127; Fax: 55 19 3788 6111; e-mail: bolsoni@hotmail.com, shirlei@unicamp.br. ²Departamento de Zoologia e Curso de Pós-Graduação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil; e-mail: pcgarcia@ms.rc.unesp.br.

* corresponding author

Abstract

Physical maps of the 28S ribosomal RNA gene of species belonging to the genera *Paratelmatoebius* and *Scythrophrys* were constructed using five restriction endonucleases. There was no intraindividual or intrapopulation variation in the number of restriction sites or in the size of the resulting fragments. The extra Bst EII site considered in the literature to be a synapomorphy for the subfamilies Leptodactylinae and Telmatobiinae was not observed in the genera *Paratelmatoebius* and *Scythrophrys*, which suggests that this hypothesis may not be valid. An additional Pvu II site was found only in specimens of *Scythrophrys* from Piraquara (Paraná State, Brazil) and São Bento do Sul (Santa Catarina State, Brazil). This finding agrees with the karyological data which differentiate the population of *Scythrophrys* from Rancho Queimado from the others studied here. The size of the digested fragments differed among the species and, in the case of *Scythrophrys* from group I, there was also variation between the two populations. Sequencing of the rDNA segments studied here may be useful in phylogenetic studies of the genera *Paratelmatoebius* and *Scythrophrys*.

Introduction

The nuclear ribosomal DNA (rDNA) in the NOR (nucleolar organizer regions) of eukaryotes consists of tandemly repeated copies of the transcriptional unit for the precursor of 18S, 5.8S, and 28S ribosomal RNA (rRNA), separated by an intergenic spacers (IGS). Two internal transcribed spacers, known as ITS 1 and ITS 2, are located between the coding regions for 18S and 5.8S rRNA, and between the latter and the 28S coding region. In addition, an external transcribed spacer (ETS) occurs upstream to the 18S gene (Long & Dawid, 1980; Miller, 1981). The copies of rDNA genes in a species evolve in concert through coordinated mechanisms (Arnheim *et al.*, 1980; Dover & Coen, 1981; Krystal *et al.*, 1981; Coen *et al.*, 1982a,b; Arnheim, 1983). As a result, intra- and interindividual variations in rDNA are small and, when present, affect particularly the intergenic spacer (see Hillis & Dixon 1991 for a review).

The low rate of polymorphism in the rDNA transcription unit allows characterization of the rDNA of each species using only a few specimens and makes this DNA useful for interspecific

comparisons. In addition, the different coding regions of the rDNA repeats show usually distinct rates of evolution. As a result, this DNA can provide information about almost any systematic level (see review of Hillis & Dixon 1991).

In Anura, restriction mapping of the 28S gene in 54 species identified regions of variability that could be useful in phylogenetic studies (Hillis & Davis, 1986). Additionally, an interesting Bst EII site was reported as a possible synapomorphy for the Leptodactylinae and Telmatobiinae, two of the three subfamilies of Leptodactylidae (Hillis & Davis, 1986).

The leptodactylid genera *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* are closely related, as suggested by morphological, ecological (Lynch, 1971; Heyer, 1975; Garcia, 1996), and cytogenetical (Lourenço *et al.*, in preparation) data, even though currently allocated in the Leptodactylinae and Telmatobiinae, respectively (Frost, 2000). The taxonomic relationships of these genera to other leptodactylids are still not clear (see Lynch, 1971, Heyer, 1975, 1983).

An analysis of three karyotypes of *Paratelmatobius* (Lourenço *et al.*, 2000; Lourenço *et al.*, in preparation) and two of *Scythrophrys* (Lourenço *et al.*, in preparation) revealed interspecific variation in the NOR location. However, there is no information on the organization of the rDNA genes in these genera.

In this paper, we describe a preliminary analysis of the 28S ribosomal RNA gene in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys*.

Materials and Methods

Specimens

Three specimens of *Paratelmatobius poecilogaster*, 4 of *Paratelmatobius cardosoi*, 4 of *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) (see Lourenço *et al.*, in preparation), 8 of *Scythrophrys* from karyotypic group I (5 from Piraquara, Paraná State, Brazil and 3 from São Bento do Sul, Santa Catarina State, Brazil), and 6 specimens of *Scythrophrys* from karyotypic group II (from Rancho Queimado, in Santa Catarina State, Brazil) (see Lourenço *et al.*, in preparation) were studied. The specimens of *P. poecilogaster* and *P. cardosoi* were collected from Paranapiacaba (São Paulo State, Brazil) and those of *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) were from Piraquara (Paraná State, Brazil).

For comparison, the leptodactylid *Cycloramphus izecksohni* (subfamily Telmatobiinae) (one specimen from Corupá, Santa Catarina State, Brazil) and *Hylodes asper* (subfamily Hylodinae) (one specimen from Paranapiacaba) were also used. All the specimens studied were deposited in Célio F. B. Haddad collection (CFBH), Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, and in the Museu de História Natural "Prof. Adão José Cardoso" (ZUEC), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Southern blots

Genomic DNA was extracted from fresh or frozen liver and muscle using a standard phenol/chloroform method (Sambrook *et al.*, 1989). About 1-2 µg of genomic DNA from each specimen was digested with the restriction enzymes Eco RI, Bam HI, Bgl II, Bst EII, and Pvu II, used singly or in combination. The resulting fragments were separated on 1.2% agarose gels at about 1.5 V/cm in 1x TBE and transferred to positively charged nylon membranes (Hybond) (Sambrook *et al.*, 1989).

28S rDNA probe

An Eco RI-Bam HI fragment of the *Xenopus laevis* 28S gene extracted from the plasmid HM 123 (Meunier-Rotival *et al.*, 1979) was subcloned into the phagemid pBlueScript (Figs. 1 and 2). After labeling with digoxigenin by the random primer method, according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim), the recombinant phagemid (pBS 28) was used as a probe in the hybridization experiments.

Hybridization

The membranes were pre-hybridized in 5x SSC, 50% formamide, 0.1% lauroylsarcosine, 0.02% SDS, and 2% blocking reagent (Boehringer Mannheim) for 2-3 hs and then hybridized with the pBS 28 probe overnight at 42°C in pre-hybridization solution under the same conditions. After hybridization, the membranes were washed twice in 2x SSC and 0.1% SDS solution at room temperature, and twice in 0.1x SSC and 0.1% SDS solution at 60°C. Each wash lasted 15 min. The probe was detected using the chemiluminescence system from Boehringer Mannheim, with CSPD as the chemiluminescent substrate. After the incubation with substrate, the membranes were exposed to

x-ray films (Hyperfilm ECL, Amersham) and the bands then documented using a Kodak Digital Science System.

Results

There was no intraindividual or intrapopulation variation in the number or size of the fragments generated in any of the experiments (Figs. 3-7 and data not shown). In contrast, interpopulation variation was observed in the size of the digested fragments in group I of *Scythrophrys* (Figs. 4-6).

The restriction sites for Eco RI, Bam HI, and Bgl II were the same in all species, although there were some interspecific differences in the size of the restriction fragments obtained (Figs. 3-5). The digestions using Pvu II showed that two populations of group I of *Scythrophrys* had an extra site for this enzyme, which was absent in specimens of *Scythrophrys* from Rancho Queimado and in the other species analyzed. *Hylodes asper* had three Pvu II sites (Figs. 6 and 7).

Weak bands were detected in a double digestion with Bgl II and Pvu II and were considered to be the products of partial digestions (Fig. 6). This conclusion agreed with the pattern obtained in other experiments and with some single digestions not shown here. Comparison of these data with the restriction sites in the rDNA sequence of *Xenopus laevis* (GenBank/X02995) indicated that the ~1 kb fragment in lanes 1 and 5 of Figure 6 was a Bgl II-Pvu II segment derived from partial digestion of Pvu II since this hypothetical site is present in *X. laevis*. The total digestion of this fragment probably gave rise to fragments of ~900 bp and another of about 100 bp, which were not detected in our hybridization experiments. Since partial digestions were not done for all of the species studied, the Pvu II site deduced above was not considered in interspecific comparisons.

Discussion

The absence of intraindividual variability in *P. poecilogaster* showed that there was no divergence between the two NORs of this karyotype (one in chromosome pair 8 and another in pair 10; Lourenço *et al.*, 2000) for the rDNA segments studied here.

The lack of intraindividual and intrapopulational variations in the species studied allowed interspecific comparisons. Thus, the species of *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* did not have the extra Bst EII site found in the leptodactiline *Leptodactylus wagneri* and in the telmatobine *Telmatobius niger* (Hillis & Davis, 1986). This site was considered to be a possible synapomorphy for the subfamilies Leptodactylinae and Telmatobiinae, since it was absent in the other anurans studied by Hillis & Davis. However, our results refute this hypothesis since *Scythrophrys* is currently classified in the Telmatobiinae and *Paratelmatobius* in the Leptodactylinae (Frost, 2000).

The intergeneric relationships in these two subfamilies are still not fully understood. Lynch (1971) pointed out some similarities among *Scythrophrys* the leptodactylines *Paratelmatobius* and *Physalaemus* and, to a lesser extent, the telmatobine *Zachaenus*. Heyer (1975) suggested that *Craspedoglossa*, *Crossodactylodes*, *Crossodactylus*, *Cycloramphus*, *Hylodes*, *Megaelosia*, *Paratelmatobius*, *Scythrophrys*, *Thoropa*, and *Zachaenus* constitute a distinct group in the family Leptodactylidae, but subsequently abandoned this proposal and considered *Scythrophrys* to be “a very distinctive leptodactylid genus with obscure phylogenetic relationships” (Heyer, 1983). Thus, an investigation of the Bst EII site in the 28S gene of other leptodactylid genera may provide useful data for studying Leptodactylinae and Telmatobiinae.

The other informative region was the additional Pvu II site found in the two populations of *Scythrophrys* from group I, which was absent in *Scythrophrys* from Rancho Queimado, in the species of *Paratelmatobius* (present study) and in other anurans studied here or by others (Hillis & Davis, 1986). This finding agrees with the karyological data (Lourenço *et al.*, in preparation) that differentiate the *Scythrophrys* of Rancho Queimado from other *Scythrophrys*.

All the species studied, as well as the two populations of *Scythrophrys* from group I, could be distinguished each other by the size of the digested fragments. This finding and the restriction site variation discussed above suggest that sequencing the rDNA segment studied here could provide useful data for phylogenetic studies of *Paratelmatobius* and *Scythrophrys*.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Anete Pereira de Souza for helping with the subcloning experiments, Dr. Wanderley Dias da Silveira for important suggestions and the Brazilian agency FAPESP for financial support (Proc. 97/00459-9 and 98/06087-9).

References

- Arnheim, N. Concerted evolution of multi-gene families. In **Evolution of genes and proteins** (M. Nei and R.K. Koehn eds.), pp. 38-61, Sinauer, Sunderland, 1983.
- Arnheim, N., Treco, D., Taylor, B., Eicher, E. Distribution of ribosomal gene length variants among mouse chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**: 4677-4680, 1980.
- Coen, E., Strachan, T., Dover, G. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. **J. Mol. Biol.** **158**: 17-35, 1982a.
- Coen, E., Thoday, J.M., Dover, G. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. **Nature** **295**: 564-568, 1982b.
- Dover, G.A., Coen, E. Springcleaning ribosomal DNA: a model for multigene evolution? **Nature** **290**: 731-732, 1981.
- Frost, D.R. Amphibian species of the world: an online reference. V. 2.2 (1 September 2000). <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>, 2000.
- Garcia, P.C.A. Recaracterização de *Scythrophrys sawayae* (Cochran, 1953) baseada em morfologia, osteologia e aspectos da miologia e história natural (Amphibia: Leptodactylidae). Masters dissertation - PUCRS, pp. 1-78, 1996.
- Heyer, W.R. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae.. **Smith. Contr. Zool.** **199**: 1-55, 1975.
- Heyer, W.R. Variation and systematics of frogs of the genus *Cycloramphus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Arq. Zool.** **30**: 235-339, 1983.
- Hillis, D.M., Davis, S.K. Evolution of the 28S ribosomal RNA gene in anurans: regions of

- variability and their phylogenetic implications. **Mol. Biol. Evol.** 4: 117-125, 1987.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quart. Rev. Biol.** 66: 411-453, 1991.
- Krystal, M., D'Eustachio, P., Ruddle, F.H., Arnheim, N. Human nucleolus organizers on nonhomologous chromosomes can share the same ribosomal gene variants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78: 5744-5748, 1981.
- Lourenço, L.B., Garcia, P.C.A., and Recco-Pimentel, S.M. Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments **Hereditas**, 2000 (in press).
- Long, E.O., Dawid, I.B. Repeated genes in eukaryotes. **Annu. Rev. Biochem.** 49: 727-764, 1980.
- Lynch, J.D. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Univ. Kans. Mus. Nat. Hist., Misc. Publ.** 53: 1-238, 1971.
- Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Macaya, G., Bernardi, G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucl. Acids Res.** 6: 2109-2123, 1979.
- Miller, O.L. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. **J. Cell Biol.** 91: 15-17, 1981.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Press, 1989.

Figure legends

Figure 1. Representation of the *Xenopus laevis* rDNA fragment in the plasmid HM 123 (Meunier-Rotival *et al.*, 1979). The arrows and the arrowheads indicate the restriction sites of Eco RI and Bam HI, respectively. The solid block represents the fragment of about 2.5 kb subcloned in pBlueScript.

Figure 2. pBS 28S (1), HM 123 (2), and pBlueScript (3) after double digestion with Eco RI and Bam HI. Lane 1 shows the fragment of about 2.5 kb that was subcloned (arrow). Lane 4 contains lambda-Hind III and ϕ X-Hae fragments.

Figure 3. Restriction sites of EcoRI, BamHI, BglII, BstEII and Pvu II in the rDNA of the species of *Paratelmatobius* and *Scythrophrys*. The presumed Pvu II site in *Scythrophrys* from group II experiments is not shown.

Figure 4. Fragments of genomic DNA obtained after digestion with EcoRI (1-6) and EcoRI-BstEII (7-12) and hybridization with the pBS 28 probe. 1-2, 7. *Paratelmatobius poecilogaster*. Lanes 1 and 2 contain DNA from two individuals, both of which showed the same pattern. 3, 8. *P. cardosoi*. 4, 9. *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*). 5, 11. *Scythrophrys* of group I from Piraquara. 6, 12. *Scythrophrys* of group I from São Bento do Sul. 10. *Scythrophrys* of group II from Rancho Queimado.

Figure 5. Fragments of genomic DNA from, *Hylodes asper* (1), *Cycloramphus izechsoni* (2), *Paratelmatobius poecilogaster* (3), *P. cardosoi* (4), *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) (5), *Scythrophrys* from Rancho Queimado (6), *Scythrophrys* of group I from Piraquara (7), and group I from São Bento do Sul (8) hybridized with the pBS 28 probe, after digestion with EcoRI-BamHI-BglII.

Figure 6. Southern blotting of the genomic DNA of *Hylodes asper* (1), *Paratelmatobius poecilogaster* (2), *P. cardosoi* (3), *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) (4), *Scythrophrys* from Rancho Queimado (5), *Scythrophrys* of group I from Piraquara (6), and *Scythrophrys* of group I

from São Bento do Sul (7) with the pBS 28 probe, after digestion with Bgl II and Pvu II. The arrows indicate partially digested fragments.

Figure 7. Genomic DNA of *Hylodes asper* (1), *Paratelmatobius poecilogaster* (2), *P. cardosoi* (3), *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) (4), *Scythrophrys* from Rancho Queimado (5), and *Scythrophrys* of group I from Piraquara (6), digested with Pvu II and hybridized with the pBS 28 probe.

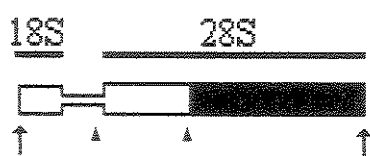


Figure 1

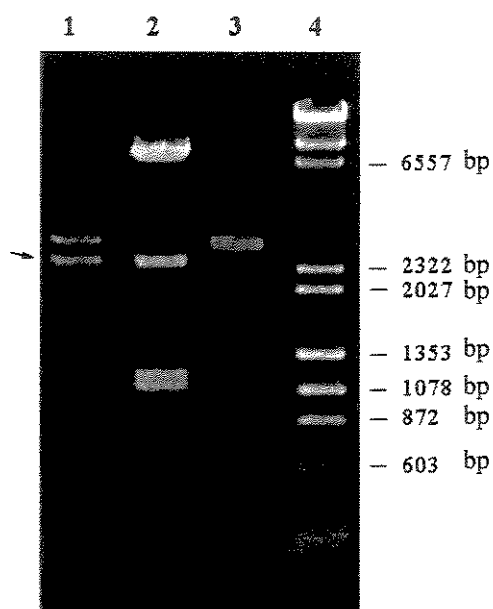


Figure 2

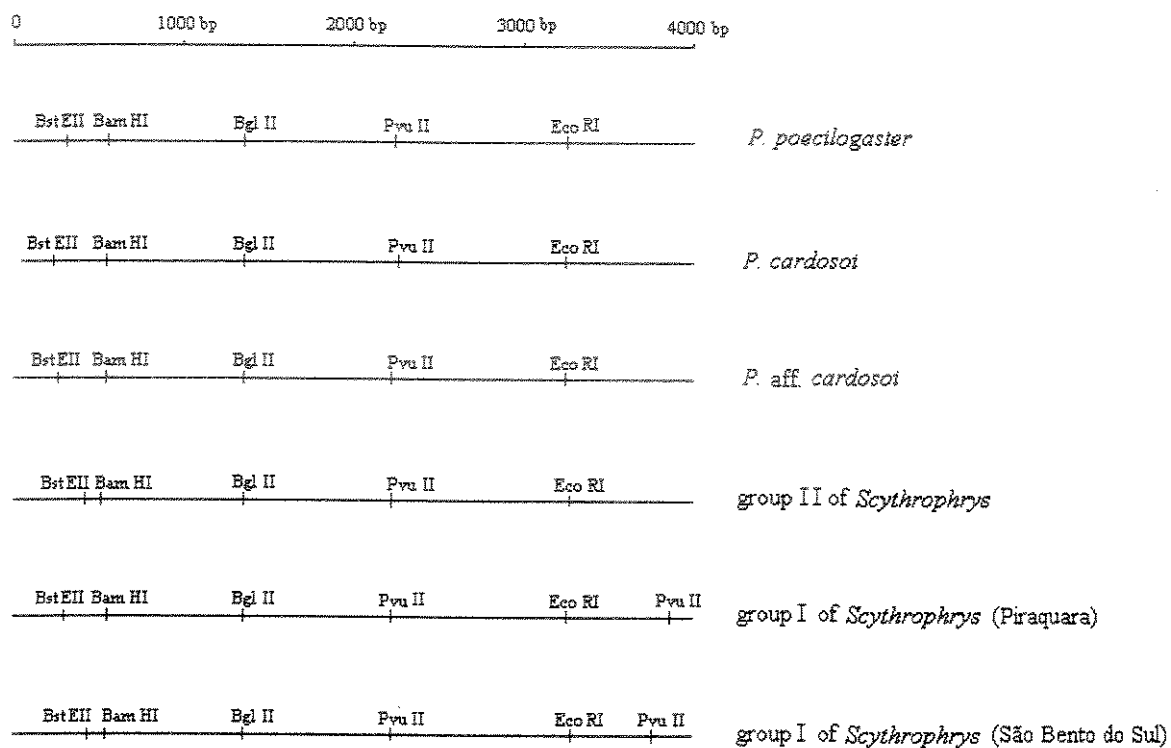


Figure 3

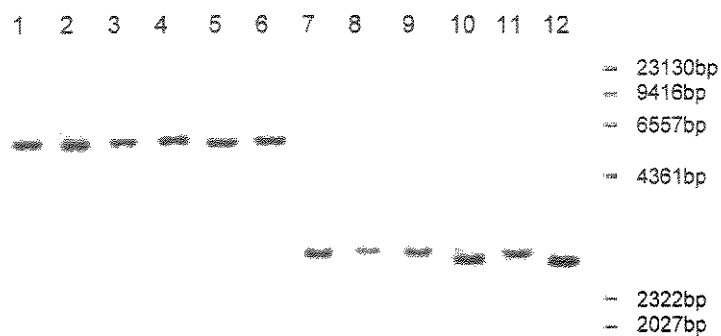


Figure 4

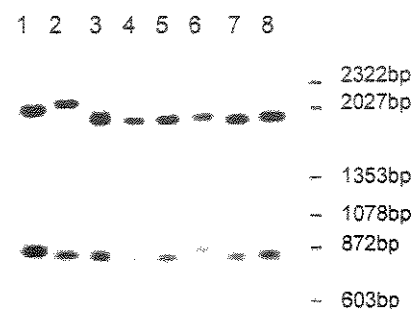


Figure 5

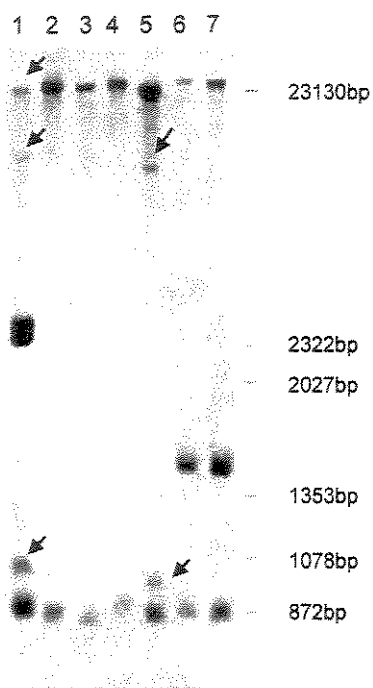


Figure 6

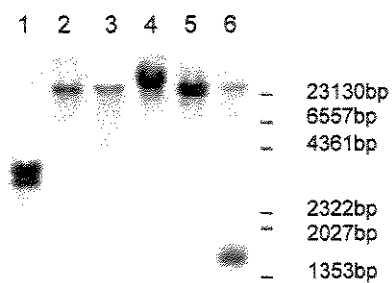


Figure 7

VIII - Conclusões gerais

1. A análise citogenética do gênero *Paratelmatobius* permitiu corroborar a existência de uma nova espécie no grupo *cardosoi*, *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*), conforme previamente sugerido por análises anatômicas e de vocalizações.
2. No gênero *Scythrophrys*, o estudo cromossômico identificou dois citótipos. A principal diferença entre eles consiste na localização da NOR. Visto que os animais com diferentes citótipos também apresentam divergências em relação à vocalização, sugerimos que tal variação citogenética seja uma evidência da presença de duas unidades taxonômicas em *Scythrophrys*.
3. Todas as espécies de *Paratelmatobius* e *Scythrophrys* apresentam complemento cromossômico diplóide com 24 cromossomos. Várias semelhanças morfológicas podem ser identificadas dentre tais cariótipos, distinguindo-os dos cariótipos de *Adenomera marmorata* e *Hylodes nasus*, outros dois únicos leptodactilídeos com número diplóide igual a 24. Dessa forma, aquele cariótipo com 24 cromossomos pode representar uma sinapomorfia para *Paratelmatobius* e *Scythrophrys*.
4. No cariótipo II de *Scythrophrys* e em *Paratelmatobius poecilogaster*, o par 10 é portador da NOR. No cariótipo de *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*), a NOR encontra-se no par 9, que difere do par 10 de *P. poecilogaster* por apresentar um conspícuo bloco heterocromático telomérico adjacente à NOR. Assim, esses pares 9 e 10 nos cariótipos em questão são homeólogos e a presença de NOR no braço curto desse cromossomo parece representar uma condição plesiomórfica da localização da NOR no grupo *Paratelmatobius-Scythrophrys*, já que essa situação ocorre em representantes desses dois gêneros. Essa observação, no entanto, não descarta a possibilidade de que a presença da NOR naquele cromossomo metacêntrico/submetacêntrico pequeno possa ser característica exclusiva dos leptodactilídeos *P. poecilogaster*, *Paratelmatobius* sp. (aff. *cardosoi*) e grupo II de *Scythrophrys*, não ocorrendo em

nenhuma outra espécie dessa família. Nesse caso, essa localização da NOR seria uma sinapomorfia que agruparia *Paratelmatoebius* e *Scythrophrys*. Ainda em relação à NOR, heteromorfismos de tamanho foram encontrados em *P. poecilogaster*, *P. cardosoi* e no cariótipo I de *Scythrophrys*.

5. A análise do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva revelou a presença de um segmento heterocromático no braço curto do par 1 de todos os cariótipos descritos neste estudo, embora o tamanho desse segmento varie entre as diferentes espécies tratadas.
6. A presença de heterocromatina intersticial não-associada à NOR no braço longo do par 1 e o padrão de distribuição de heterocromatina no par 5 de *P. cardosoi* e *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*) são características exclusivas dessas espécies.
7. Algumas bandas cromossômicas heterocromáticas foram sugeridas como sinapomorfias dos dois grupos de *Scythrophrys* identificados no presente trabalho. São elas, as bandas não-centroméricas dos pares 7, 10 e aquela do par 5 do cariótipo I e sua correspondente no par 6 do cariótipo II.
8. Em *P. cardosoi*, a análise citogenética com fluorocromos mostrou heterogeneidade em dois blocos heterocromáticos, um localizado no braço curto do par 1 e outro no braço longo do par 7.
9. Um caso de inversão paracêntrica foi facilmente reconhecido no cariótipo I de *Scythrophrys*, visto que envolvia um segmento cromossômico portador da NOR e um forte bloco heterocromático adjacente a ela. Em *Paratelmatoebius* sp. (aff. *cardosoi*), um caso aparente de inversão pericêntrica foi detectado no par 1. Esse evento explicaria a alteração tanto da morfologia cromossômica como do padrão de distribuição da heterocromatina verificada nesse par.

10. A análise do mapa de restrição da região codificadora do RNA ribossomal 28S detectou dois interessantes sítios. Um deles consiste em um sítio extra de restrição para Bst EII observado em alguns leptodactilídeos e sugerido na literatura como uma possível sinapomorfia de Leptadactylinae e Telmatobiinae. A ausência desse sítio nas espécies de *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* discorda dessa proposta, tornando o sítio Bst EII um importante sítio de restrição na análise dos leptodactilídeos. Outro dado relevante refere-se a um sítio Pvu II encontrado exclusivamente nas duas populações de *Scythrophrys* que apresentaram cariótipo I. Esse resultado corrobora o agrupamento proposto com base em dados citogenéticos, anatômicos e dados relativos à vocalização, que sugere a existência de duas unidades taxonômicas no gênero *Scythrophrys*.
11. A análise molecular do DNA ribossomal das espécies de *Paratelmatoobius* e *Scythrophrys* mostrou algumas diferenças interespecíficas em relação ao tamanho de alguns fragmentos de restrição. Tal resultado indica que o seqüenciamento dessas regiões pode fornecer interessantes informações para o estudo desses leptodactilídeos.