

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Fernando Ananias

**Análise citogenética e do DNA mitocondrial de populações de
Hyla semiguttata (Anura, Hylidae) e espécies relacionadas.**

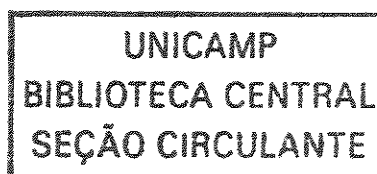
200306554

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

Shirlei Maria Recco-Pimentel

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

Orientadora: Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel



UNIDADE	80
Nº CHAMADA	UNICAMP
	An14a
V	EX
TOMBO BC/	52462
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00179862-4

R\$ 10,34 = 10,35

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

An14a

Ananias, Fernando

Análise citogenética e do DNA mitocondrial de populações de *Hyla semiguttata* (Anura, Hylidae) e espécies relacionadas/ Fernando Ananias. -- Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadoar: Shirlei Maria Recco-Pimentel
Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1.Cromossomos. 2.Filogenia. 3.Molecular. 4. Classificação.
I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria. II. Universidade Estadual
Biologia. de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

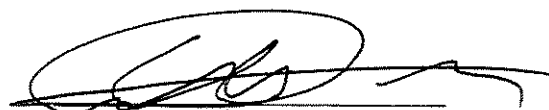
Data da Defesa: 27/09/2002

BANCA EXAMINADORA

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


Assinatura

Prof. Dr. Célio Fernando Baptista Haddad


Assinatura

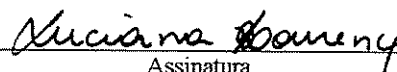
Prof. Dr. Guaracy Tadeu Rocha


Assinatura

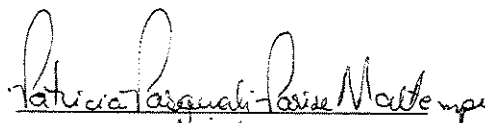
Profa. Dra. Denise de Cerqueira Rossa Feres

Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço


Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi


Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram de mais esta etapa, em especial a minha mãe *in memoriam*, pela magnitude de sua força espiritual presente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pela orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Paulo C. A. Garcia por ter proposto a problemática deste trabalho, pelas coletas dos exemplares e por toda orientação que foi fundamental para o desenvolvimento do mesmo.

À Profa. Dra. Ana Maria Azeredo Espin, por ter disponibilizado o laboratório de Genética Animal, do CBMEG, para o desenvolvimento de parte das técnicas para obtenção das seqüências da Região Controle do DNA mitocondrial.

À técnica Rosangela A. Rodrigues, do Laboratório de Genética Animal, do CBMEG, pelo companheirismo, amizade e, sobretudo pela orientação durante o início deste trabalho, imprescindível para minha formação.

Aos Profs. Dr. Mauricio Bacci Jr. e Dr. Vaderlei V. Martins, do Centro de Estudos de Insetos Sociais, da UNESP – campi de Rio Claro, por abrir espaço para desenvolver as técnicas de amplificação e sequenciamento do gene citocromo b, do DNA mitocondrial, além, das prestimosas dicas e orientação durante todo o período de minha estada.

À Dra. Anna Margareth Goebel, da Universidade do Colorado, EUA, pelas dicas e orientação, mesmo à distância, durante o início dos meus trabalhos na área molecular.

Ao colega Julian Faivovich, Division of Vertebrate Zoology – American Museum of Natural History and Center for Environmental Research & Conservation – Columbia University, por enviar os primers utilizados na amplificação do gene citocromo b e pelas valiosas dicas durante o desenvolvimento do trabalho.

À Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini por abrir as portas de seu laboratório para acompanhamento da técnica de sequenciamento direto e à Karla Suemy Clemente Yotoko por sua paciência no ensino da técnica.

Aos membros da pré-banca e da banca de defesa de tese, pelas valiosas sugestões e contribuições para o trabalho.

Aos meus alunos da Universidade Braz Cubas, que contribuíram para minha formação como docente, em especial àqueles que desenvolveram e desenvolve sua iniciação científica, sob minha orientação: Sérgio Siqueira Júnior, Samantha Celi Vieira,

João Reinaldo da Cruz de Campos, Cátia D. B. da Silva, Camila Paraventi e Elaine Marroco.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, Odair Aguiar Júnior, Ana Cristinas P. Veiga-Menocello, Lillian R. Medeiros, Maurício J. L. V. Amaral, Marta D. Soares-Scott, Cristina Rosa, Carmen S. Busin, Aline Dias Brandão e Josiane A de Andrade, pelo convívio.

À Klélia A. de Carvalho por todo o suporte técnico, imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho, além da grande amizade conquistada.

À grande amiga Luciana Bolsoni Lourenço, pelo seu exemplo de humanismo, conhecimento e pela amizade.

À amiga Ana Paula Zampieri da Silva, da UNESP – Rio Claro, pela amizade, companheirismo e principalmente pelos momentos de descontração durante minha estada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais.

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

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro. Processo número 2001/09084-5.

À CAPES pelo financiamento inicial.

À Universidade Braz Cubas pelo apoio sempre que possível.

Aos amigos professores, da Universidade Braz Cubas, Isabel C. Arantes, Sandra A. T. Hyodo, Márcio A. Torsoni, Luis Fernando F. Silveira, Jarbas Vargas Nascimento, Eduardo A. V. Marinho e Elena L. A. M. Marinho, pela convivência e auxílio prestado.

Aos amigos Sô, Celso, Pá e Dito pela grande amizade conquistada durante esta fase de nossa existência, contribuindo para a nossa própria superação.

À todos os membros da minha família, que colaboraram para minha formação, sempre me incentivando.

Ao casal Antonio e Edith (Piracicaba) pelos momentos que convivemos juntos, sempre me ouvindo com atenção.

Ao Magno pela sua presença em minha vida.

SUMÁRIO

I.	RESUMO	8
II.	ABSTRACT	9
III.	INTRODUÇÃO	10
	3.1. Família Hylidae	10
	3.2. Polimorfismo em anuros com ênfase na família Hylidae	11
	3.3. Região organizadora do nucléolo (NOR) e análise citogenética	13
	3.4. Heterocromatina e análise citogenética	16
	3.5. Estudos citogenéticos em Hylidae	20
	3.6. A citogenética do grupo de <i>H. pulchella</i> e de espécies relacionadas	23
	3.7. DNA mitocondrial – aspectos gerais	24
	3.8. Variação na organização do genoma mitocondrial	26
	3.9. Mecanismos de rearranjos do genoma mitocondrial	28
	3.10. A região controle	29
	3.11. DNA mitocondrial e filogenia em anfíbios	31
	3.12. Biogeografia e evolução	36
	3.13. Espécies de <i>Hyla</i> do grupo <i>pulchella</i>	38
IV.	JUSTIFICATIVA	39
V.	OBJETIVOS	40
	5.1. Gerais	40
	5.2. Específicos	40
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
VII.	ARTIGO 1	64
VIII.	ARTIGO 2	82
IX.	CONCLUSÕES GERAIS	109
	APÊNDICE 1	112
	APÊNDICE 2	116

I. RESUMO

Populações polimórficas de *Hyla semiguttata* e espécies relacionadas, pertencentes ao grupo de *Hyla pulchella*, foram analisadas citogeneticamente e através das seqüências de segmentos do gene citocromo b e da região controle do DNA mitocondrial. Todas as populações do táxon *H. semiguttata* apresentam polimorfismo no padrão de coloração, tamanho corpóreo e diferenças na vocalização de anúncio. A análise citogenética mostrou cariótipos com $2n = 24$ cromossomos com morfologia muito conservada em todas as espécies e o mesmo padrão de banda C. A região organizadora do nucléolo (NOR) foi detectada no braço longo do par 10 em *H. marginata* e no braço curto do par 1 nas populações de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula e Cambará do Sul, RS e de Piraquara, PR, *H. marginata* e *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) de Misiones, Argentina. Este foi o único caráter que as diferenciaram do ponto de vista citogenético, contrariando a sugestão de alguns autores de sinonimização de *H. semiguttata* e *H. joaquina* à *H. marginata*. A análise filogenética baseada em 361 pb do gene citocromo b e 744 pb da região controle mostraram que a população de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula é muito próxima de *H. joaquina*, contrariando a hipótese filogenética baseada em caracteres morfológicos e biológicos, que indicam uma proximidade maior com a população de Cambará do Sul. As populações de *H. semiguttata* de Palmeira e Piraquara são muito próximas entre si e distantes das demais. Apesar de *H. marginata* apresentar diferenças morfológicas e biológicas em relação às espécies *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*), *H. bishoffi* e *H. guentheri*, geneticamente parece ser muito próxima. A presença de *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*) (grupo de *H. polytaenia*) neste mesmo clado indica que o grupo de *H. pulchella* pode ser parafilético. Hibridação natural entre *H. bishoffi* e *Hyla* sp. n. sugere que eventos cladogênicos possam estar ocorrendo entre estas taxa em simpatria e que o padrão de canto semelhante facilitou este processo. Como já sugerido por outros autores, muitos eventos cladogênicos estariam relacionados com a especiação de hílideos neotropicais o que dificulta um estudo envolvendo populações polimórficas, principalmente quando o polimorfismo está relacionado com o padrão de coloração.

II. ABSTRACT

Polymorphic populations of *Hyla semiguttata* and related species in the *Hyla pulchella* group were analyzed cytogenetically and by comparing the sequences of the cytochrome b gene and the control region of mitochondrial DNA. All *H. semiguttata* populations showed polymorphism in color pattern, body size and acoustics. The cytogenetic analysis showed a karyotype with $2n = 24$ chromosomes and a very conserved chromosomal morphology in all of the species. *H. semiguttata* from São Francisco de Paula and Cambará do Sul, RS and Piraquara, PR, *H. marginata*, and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) from Misiones, Argentina had the same C-banding pattern. The nucleolar organizer region (NOR) located in the long arm of pair 10 in *H. marginata* and in the short arm of pair 1 in the other species the only character that differentiated these species cytogenetically. These results do not support the suggestion of some authors for the synonymization of *H. semiguttata* and *H. joaquina* with *H. marginata*. The phylogenetic analysis based on 361 bp of the cytochrome b gene and 744 bp of the control region of mitochondrial DNA showed that the *H. semiguttata* population at São Francisco de Paula was very close to *H. joaquina*, in contrast to the phylogenetic conclusions based on morphological and biological characters, which indicated a greater proximity with the population at Cambará do Sul. The populations of *H. semiguttata* at Palmeira and Piraquara were very close to each other and distant from the other populations. Although *H. marginata* differs morphologically and biologically from *Hyla* aff. *polytaenia*, *H. bishoffi* and *H. guentheri*, our analysis showed them to be very closely related. The presence of *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*) (*H. polytaenia* group) in this clado indicates that the *H. pulchella* group may be paraphyletic. Natural hybridization between *H. bishoffi* and *Hyla* sp. n. demonstrates that cladogenic events may occur between sympatric taxa and that the similar vocalization patterns of the two species facilitates this process. As already suggested by other many cladogenic events have been involved in the speciation of neotropical hylids, which makes it difficult a study polymorphic populations, especially when the polymorphism is related to the pattern of coloration.

III. INTRODUÇÃO

3.1. Família Hylidae

O número de espécies descritas na ordem Anura, representada por sapos, rãs e pererecas, tem aumentado. Duellman e Trueb (1986) relataram a existência de cerca de 3.500 espécies. Cogger e Zweifel (1998) registraram mais de 4.000 espécies. Entretanto, mais recentemente, Frost (2002) publicou a presença de 4.846 espécies.

Os anuros apresentam distribuição geográfica muito variada. Alguns ranídeos e hílideos habitam, por exemplo, a Serra Nevada da Califórnia, acima de 3.650 metros e a região dos Andes, acima de 4.870 metros (Pough *et al.*, 1998).

Na ordem Anura de maneira geral, o encontro entre os sexos dá-se por orientação sonora. O canto é diversificado, variando de acordo com a espécie, sendo que a maioria possui dois ou três tipos diferentes de canto, utilizando-os em diferentes situações. As características do canto de anúncio servem para identificar a espécie e o sexo do animal que o emite (Lutz, 1973; Pough *et al.*, 1998). Um canto de anúncio específico da espécie é considerado um caráter evolutivo conservativo e táxons aparentados freqüentemente apresentam cantos similares (Pough *et al.*, 1998).

De acordo com Frost (2002), a ordem Anura é dividida em 29 famílias. Na família Hylidae encontram-se anuros arborícolas, que usualmente possuem cabeça e olhos grandes e, freqüentemente, cintura delgada, patas longas e discos digitais aumentados e são denominados pererecas (Pough *et al.*, 1998). É um grupo recente uma vez que os fósseis conhecidos dos hílideos da América do Sul datam do Paleoceno (há mais de 57 milhões de anos) e aqueles da América do Norte, Europa e Austrália, datam da metade do período terciário (Cogger e Zweifel, 1998).

A família Hylidae está dividida em cinco subfamílias: Pelodyadinae (3 gêneros), Hemiphractinae (5 gêneros), Hyalinae (26 gêneros), Phyllomedusinae (6 gêneros) e Pseudinae (2 gêneros). Os gêneros da subfamília Hyalinae possuem uma distribuição geográfica bastante variável, habitando a América do Norte e do Sul, oeste da Índia, Eurásia (incluindo o extremo Norte da África) e o Arquipélago Japonês (Frost, 2002).

Segundo Chantell (1964), a família Hylidae teria sua origem a partir dos leptodactídeos (*apud* Anderson, 1991), idéia esta, suportada pelas análises moleculares de

Ruvinski e Maxson (1996), utilizando a espécie *Eleutherodactylus cuneatus* como representante dos leptodactilídeos, mais precisamente como membro dos Telmatobiinae, que reforça sua ancestralidade não somente para os hilídeos, mas para toda a superfamília Bufonoidea.

Anderson (1991) propôs que o gênero *Hyla* tenha surgido na América do Sul e expandido rapidamente por todo o continente, porém com o aumento do nível do mar, o grupo do norte foi separado do grupo do sul por aproximadamente 65 milhões de anos, sendo em seguida restabelecida a ligação.

Segundo Frost (2002), a família Hylidae é constituída por mais de 800 espécies distribuídas em 42 gêneros e destas mais de 500 habitam o Continente Americano (Cogger e Zweifel, 1998). Entre essas, 40% fazem parte do gênero *Hyla* sendo que destas, somente 28 espécies ocorrem na região Holoártica (Anderson, 1991).

Com aproximadamente 335 espécies, o gênero *Hyla* está entre os gêneros de anuros mais ricos em número de espécies (Frost, 2002) e mais de 80% delas estão distribuídas na região Neotropical (Duellman e Trueb, 1983 *apud* Chek *et al.*, 2001).

3.2. Polimorfismo em anuros com ênfase na família Hylidae

Espécies que apresentam polimorfismos visíveis são ideais para estudar as forças microevolutivas que mantêm a variação genética na natureza, pois, os fenótipos são facilmente detectados. No caso de polimorfismo no padrão de coloração, este muitas vezes possui uma herança puramente Mendeliana (Hoffman e Blouin, 2000).

Apesar de autores como McGuigan *et al.* (1998) sugerirem que os anfíbios anuros possuem uma morfologia relativamente conservada, muitas espécies exibem um notável polimorfismo na coloração ou no padrão de manchas dorsal e são excelentes para estudos de evolução dos polimorfismos encontrados (Hoffman e Blouin, 2000).

Entre os anuros, 48% das famílias, 35 gêneros e até pelo menos 225 espécies diferentes apresentam polimorfismo no padrão de coloração, sendo 1/3 pertencente ao gênero *Eleutherodactylus*, enquanto na família Hylidae os estudos apontam apenas para algumas espécies dos gêneros *Acris* (2 espécies), *Agalychnis* (1 espécie), *Amphignathodon* (1 espécie), *Gastrotheca* (5 espécies), *Hyla* (6 espécies), *Phrynohyas* (1 espécie), *Pseudacris* (2 espécies) e *Smilisca* (1 espécie) (Hoffman e Blouin, 2000).

Os fatores relacionados com a diferenciação no padrão de coloração e outros caracteres entre populações ou entre espécies muito próximas ainda são discutíveis (Mayr, 1963; West-Eberhard, 1983). Populações de *Dendrobates pumilio* no Panamá possuem um padrão de coloração extremamente divergente, enquanto *Minyobates* sp e *Phyllobates lugubris*, duas espécies muito próximas e simpátricas com *D. pumilio*, mostram pouca variação no padrão de coloração (Summers *et al.*, 1997). Através da análise da sequência do gene mitocondrial citocromo b, estes autores não conseguiram dados congruentes com as diferenças populacionais observadas e justificam que talvez a diferença na coloração pudesse estar relacionada com a dieta diferencial entre os dendrobatídeos.

Em alguns grupos de espécies do gênero *Hyla*, há espécies semelhantes e o padrão de vocalização pode ajudar muito na identificação, como é o caso de alguns membros do grupo de *Hyla leucophyllata*, que são fenotipicamente muito semelhantes, diferindo apenas quanto a vocalização, a distribuição e ao padrão de coloração, não se sabendo como estas diferenças estão relacionadas (Chek *et al.*, 2001). Por exemplo, o polimorfismo no padrão de coloração já foi motivo de confusão entre *H. favosa* e *H. leucophyllata* e somente com análise de alozimas de duas formas simpátricas detectou-se as diferenças (Titus *et al.*, 1989).

Além de *H. leucophyllata*, segundo Chek *et al.* (2001), há confusão sistemática no taxon *H. triangulum*, podendo ser resultado de um alto nível de polimorfismo no padrão de coloração encontrado. Duellman (1974) sinonimizou seis taxa como *H. triangulum*, depois de um extensivo estudo da variação no padrão de coloração e justificou que a manutenção do polimorfismo balanceado na natureza, poderia estar relacionado com heterozigose, seleção frequência-dependente e variação na pressão seletiva (Hedrick *et al.*, 1976; Hedrick, 1986).

O padrão de polimorfismo na coloração em anuros está sob algum tipo de seleção, devido ao grande número de espécies polimórficas, à ocorrência de uma aparente evolução convergente, à existência de polimorfismos idênticos em espécies muito próximas e à flutuação cíclica na frequência dos morfos sobre curtos (sazonalidade) ou longos (anuais) períodos de tempo (Hoffman e Blouin, 2000).

O padrão de coloração pode ser usado para distinguir espécies muito próximas e como acontece com outros caracteres morfológicos, a evolução do padrão de coloração independe da linhagem evolutiva (Titus *et al.*, 1989). Neste sentido, Mayr (1963 *apud*

Hoffman e Blouin, 2000) notou que divergências morfológicas podem ser imperceptíveis ou inexistentes, resultando em espécies irmãs, ou mostra ainda, um arranjo confuso de polimorfismo dentro de um taxon. Da mesma forma, Titus *et al.* (1989) analisaram o padrão de polimorfismo alozímico em *Hyla favosa*, *H. leucophyllata* e entre indivíduos fenotipicamente intermediários em microsimpatria no sudeste do Peru. Eles não encontraram diferenças entre o padrão genético das formas intermediárias em relação às formas puras, não podendo, desta forma, caracterizá-las como híbridos, restando apenas a hipótese da presença de três fenótipos pertencentes a uma única espécie.

3.3. Região organizadora do nucléolo (NOR) e análise citogenética

As regiões dos cromossomos contendo genes de rRNA e de cuja atividade de síntese se origina o nucléolo, são denominadas Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) (Schwarzacher e Wachtler, 1993; Schwarzacher e Mosgoeller, 2000).

A NOR é constituída por dezenas de unidades repetidas *in tandem* e cada uma é composta basicamente por seqüências que correspondem ao transcrito primário de rRNA, que após o processamento origina os RNAs 18S, 5,8S e 28S, separadas por seqüências que não são transcritas (Federoff, 1979; Long e Dawid, 1980; Webb e Mougey, 1991).

Vários métodos são utilizados para detecção de NORs nos cariótipos de diversos grupos. Entre eles, o método de Ag-NOR (Howell e Black, 1980) baseia-se na afinidade argirófila específica das proteínas associadas a NOR, chamadas genericamente de "proteínas Ag-NOR". Uma outra forma de detecção da NOR é através de substâncias fluorescentes como a mitramicina e a cromomicina. Essas substâncias são estruturalmente parecidas e formam um complexo estável com regiões do DNA rico em G-C, tendo sido proposto que sejam corantes intercalantes da hélice do DNA (Ward *et al.*, 1965; Behr *et al.*, 1969). Em anuros, ambos os fluorocromos marcam as NORs independente do seu estado de atividade. Todavia, outras regiões no genoma que apresentam seqüências ricas em G-C também são marcadas, o que confere a este método uma certa inespecificidade, apesar da região da NOR fluorescer muito mais (Schmid, 1982; Schmid *et al.*, 1986; Schmid *et al.*, 1993). E por último, a hibridação *in situ* que utiliza uma sonda de DNA ribossomal para localizar todos os segmentos cromossômicos que apresentam os cístrons ribossomais, independente da atividade.

A localização dos genes para DNA ribossomal (rDNA) ocorre geralmente nos mesmos cromossomos de uma determinada espécie (Nardi *et al.*, 1977), independente de se usar o método de hibridação *in situ*, utilizando sonda de rDNA ou a reação de AgNOR. Neste sentido, muitos estudos demonstram que as regiões prata-positivas coincidem com as marcações por hibridação *in situ*, utilizando sonda de rDNA (Schmid *et al.*, 1986; King *et al.*, 1990; Schmid *et al.*, 1993; 1995; Lourenço *et al.*, 1998; Lourenço *et al.*, 2000). Porém, algumas espécies apresentam NORs adicionais marcadas por hibridação *in situ* e não marcadas pela reação de AgNOR. Estas marcações adicionais envolvendo a localização dos genes de rDNA foram descritos em peixes (Monaco *et al.*, 1988), salamandras (Nardi *et al.*, 1977) e anfíbios como nas espécies *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991), *Hyla chrysoscelis* e *H. versicolor* (Wiley *et al.*, 1989), *H. nana* (Medeiros, 2000) e *Colostethus aff. marchesianus* (Veiga, 2000).

Inicialmente, foi proposto que as NORs são detectadas, geralmente, em regiões de constrições secundárias (Henderson *et al.*, 1972), porém, em alguns casos não se observa tais constrições e ainda, podem conter heterocromatina (Goessens, 1984; King, 1980; Schmid, 1982). De acordo com King (1980), as constrições secundárias podem ser classificadas em 5 tipos em função de características de coloração convencional, banda C e impregnação por prata. Os tipos I, II e V apresentam uma frequência variável de heterozigose no tamanho do "gap", enquanto no tipo IV há uma baixa frequência. O tipo III nunca apresenta cístron ribossomal, tanto na impregnação pela prata (King, 1980) quanto por hibridação *in situ* (King *et al.*, 1990). As diferenças observadas no tamanho do "gap" entre cromossomos homólogos de indivíduos diferentes da mesma espécie foi inicialmente explicada pela condensação cromossômica por King (1980). Através da hibridação *in situ* com sonda de rDNA, pôde-se confirmar as profundas diferenças na marcação, indicando diferenças na quantidade de rDNA (King *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1990; Leitch e Heslop-Harrison, 1992; Mellink *et al.*, 1994).

Muitos trabalhos relatam heteromorfismo no tamanho da NOR em anuros, marcada pelo íon prata ou pela hibridação *in situ* com sonda de rDNA e, até mesmo com ambas as técnicas (Schmid 1978a, b; 1982; Batistic, 1989; Ananias, 1996; Lourenço *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Busin *et al.*, 2000; Formas e Cuevas, 2000; Veiga, 2000; Lourenço *et al.*, 2000; Rosa, 2001). Por outro lado e de forma mais rara, é a variação intraindividual no tamanho da NOR, detectada em diferentes células de um mesmo indivíduo em *Litoria* e

Cyckorana novaehollandiae (King *et al.*, 1990). Aparentemente, NORs duplicadas e triplicadas não ocorrem em homozigose em populações selvagens, mas sempre são encontradas em combinação com NORs de tamanho “normal” nos cromossomos homólogos (Schmid, 1982). Este mesmo autor sugere que o aparecimento de NORs heteromórficas pode ser causado por deleção parcial ou por duplicação e triplicação de um dos cístrons. Por seu turno, King *et al.* (1990) consideram que a maioria dos heteromorfismos observados envolve amplificação do rDNA em um cromossomo do par de homólogos e ainda, primeiro ocorreria a amplificação de certas seqüências de DNA ribossomal e depois a amplificação inteira da NOR.

Além do heteromorfismo da NOR, variações inter- e intrapopulacionais no número e localização já foram relatadas em alguns anuros como em *Hyla chrysoscelis* e *Hyla versicolor* (Wiley *et al.*, 1989), *Phyllomedusa hypocondrialis* (Batistic, 1989), *Bufo terrestris* (Foote *et al.*, 1991), *Rana japonica* (Miura, 1994), *Agalychnis callidryas* (Schmid *et al.*, 1995), *Hyla ebracata* (Kaiser *et al.*, 1996), *Physalaemus petersi* (Lourenço *et al.*, 1998), *Physalaemus cuvieri* (Silva *et al.*, 1999) e em *Hyla nana* (Medeiros, 2000).

Segundo Schmid *et al.* (1990), a maioria das espécies de anuros, incluindo os mais primitivos e os mais derivados, apresentam apenas um par de NORs no cariótipo e comparações interespecíficas demonstram que os cariótipos de espécies próximas ou de grupos relacionados, quase sempre apresentam as NORs localizadas na mesma região cromossômica. Segundo estes mesmo autores, exceções a esta regra são indicativas de rearranjos durante o processo evolutivo, envolvendo o segmento cromossômico que carrega a NOR. A presença de mais de um par de NOR, marcado pelo íon prata, foi relatada no cariótipo de várias espécies do gênero *Phyllomedusa*, pertencente à família Hylidae, porém, não foi feita nenhuma correlação direta com algum tipo de rearranjo (Batistic, 1989).

Autores como Foote *et al.* (1991) e Schmid *et al.* (1995) sugerem como possíveis mecanismos relacionados com o aparecimento de variações interpopulacionais e intrapopulacionais no número e na localização da NOR: ocorrência de translocação recíproca e/ou inversões, transposição de seqüências contendo a NOR por meio de elementos de mobilidade gênica, amplificação de cístrons “órfãos” de rDNA que formam NORs funcionais e identificáveis e erros de reinserção durante a amplificação extracromossomal do rDNA durante a oogênese.

Além desses tipos de polimorfismos relacionados à NOR, Batistic (1989) relata a marcação prata-positiva em apenas um dos homólogos dos pares 9 e 11 em *Phyllomedusa hypochondrialis* relacionando este fato com a ocorrência de uma translocação recíproca entre o par 9 e o 11 que envolvesse o segmento da NOR.

3.4. Heterocromatina e análise citogenética

O termo heterocromatina é usado genericamente para descrever a cromatina ou segmentos cromossômicos que permanecem condensados durante todo ciclo celular, sendo transcricionalmente inativos (Babu e Verma, 1987). Atualmente, a definição de heterocromatina leva em consideração a composição do DNA e sua resposta às técnicas específicas de bandamento (Anderson, 1991; Sumner, 1994).

De acordo com Sumner (1994), a heterocromatina geralmente compreende pequena proporção do genoma, mas em casos excepcionais pode perfazer até 50% do total de DNA da célula.

Portanto, a cromatina condensada é transcricionalmente inativa ou porque está em estado reprimido com seu DNA inativo temporária e reversivelmente ou porque pode ser constituída de DNA não codificador e assim ser permanentemente incapaz de transcrever (John, 1988).

Atribui-se aos segmentos heterocromáticos propriedades como: replicar tardiamente no ciclo celular, quando comparados com a eucromatina, corar-se positivamente pela técnica de bandamento C e ser rico em DNA altamente repetitivo. A heterocromatina apresenta as funções de estabilizar regiões especializadas dos cromossomos (centrômeros e telômeros), facilitar o rearranjo cromossomal, estabelecer uma proteção para a eucromatina, quando localizada na periferia do envoltório nuclear e reduzir a recombinação meiótica (Hsu *et al.*, 1975; Babu e Verma, 1987; John, 1988; Sumner, 1990; 1994; Gatti e Pimpinelli, 1992), embora a natureza deste último possa variar de uma espécie para outra (Loidl, 1982; John e King, 1985; Berger e Greilhuber, 1991). Em alguns organismos que possuem grandes quantidades de heterocromatina nas células da linhagem germinativa, a quantidade de heterocromatina é regulada em certos tecidos somáticos por mecanismos que envolvem endoreplicação ou eliminação de DNA heterocromático (John, 1988; Pardue e Hennig, 1990). Sumner (1994) sugere que deve haver alguma função ou funções especiais

da heterocromatina na oogênese e na espermatogênese, uma vez que, a heterocromatina pode ser totalmente eliminada ou amplificada em células somáticas, enquanto é retida na linhagem germinativa.

Uma outra função atribuída à heterocromatina é a inatividade dos genes situados em suas proximidades (Reuter e Spieres, 1992). Neste fenômeno, conhecido como “efeito de posição”, a expressão gênica é reduzida pela heterocromatina adjacente (Pardue e Hennig, 1990; Sumner, 1994). O silenciamento dos genes eucromáticos no efeito de posição ocorre através de indução estrutural, pela aposição ou proximidade da heterocromatina à eucromatina em um relacionamento mútuo normal, que controla e/ou reprime sua atividade, de acordo com a concentração de determinados fatores (Zuckerandl e Hennig, 1995).

Outras funções da heterocromatina podem estar relacionadas a sua posição (geralmente centromérica) e sua composição (geralmente grandes quantidades de DNA repetido "*in tandem*") (Sumner, 1990). Considerando que a composição de bases do DNA heterocromático é variável, sua função pode estar relacionada ao centrômero, mais precisamente, com a função do cinetocôro, ou seja, de prender as cromátides irmãs durante a divisão celular e promover sua eficiente segregação na anáfase (Sumner, 1994).

Além disso, vários elementos de mobilidade gênica já foram encontrados na heterocromatina constitutiva, o que pode estar associado às alterações na distribuição da heterocromatina no genoma, constituindo, assim, uma possível causa dos polimorfismos observados em relação à heterocromatina constitutiva (Dimitri, 1997).

A técnica para evidenciar heterocromatina, descrita por Sumner (1972), envolve tratamento do material com HCl 0,2N; solução saturada de Ba(OH)₂ a 50 °C e 2 x SSC a 60 °C, seguido por coloração com Giemsa.

Desde que o método foi proposto, vários autores tentam explicar o real mecanismo para o bandamento C. Comings *et al.* (1973) e Pathak e Arrighi (1973) verificaram que o método envolve uma remoção preferencial do DNA das regiões banda C negativa. Holmquist (1979) propôs que as reações químicas responsáveis pela perda de DNA durante o bandamento C ocorrem por β -eliminação do DNA. Nesse processo ocorre depurinação causada pelo HCl deixando os resíduos de desoxirribose na forma de aldeídos; em seguida, os sítios apurínicos seriam quebrados pelo tratamento alcalino e, finalmente, a solução salina manteria a cadeia quebrada, resultando em uma coloração diferencial da cromatina.

Muitos autores utilizam para caracterização dos cromossomos, além do bandamento C, o bandamento diferencial com uso de fluorocromos com especificidade por regiões ricas em AT (quinacrina - "Q", Hoechst 33258 - "H" e DAPI) ou CG (cromomicina A₂ - "CMA" e mitramicina - "MM") que podem em alguns casos indicar a natureza do material banda C positivo (John, 1988).

Espécies muito próximas podem diferir não somente na quantidade de heterocromatina em seus genomas, mas também no número de bandas, na localização e nas propriedades de coloração da heterocromatina (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.

Diferenças nos padrões heterocromáticos entre espécies são encontradas tanto nos anuros basais quanto nos mais derivados (King, 1991). Nos anuros basais de 7 famílias pertencentes aos Archaeobatrachia foi detectado pequenas quantidades de heterocromatina através das técnicas de bandamento, enquanto que os Neobatrachias (anuros derivados) mostram uma grande diversidade interespecífica na distribuição e quantidade de heterocromatina. King (1991) considera que a evolução da heterocromatina no genoma dos anfíbios possa ocorrer ou por adição de heterocromatina ou por transformação da eucromatina em heterocromatina ou ainda, por uma evolução combinada de múltiplos sítios de heterocromatina.

Schmid (1978a) detectou três classes de heterocromatina em bufonídeos e em hilídeos, diferenciadas pela resposta aos métodos de bandamento: banda C positiva e fortemente fluorescente, banda C positiva com um grau de fluorescência menor que a eucromatina e heterocromatina telomérica com uma fraca banda C. Tais diferenças na propriedade de coloração da heterocromatina, principalmente em relação ao bandamento C, foram encontradas em alguns hilídeos dos gêneros *Litoria* (King, 1980) e *Hyla* (Anderson, 1991), nos leiopelmatídeos do gênero *Leiopelma* (Green e Sharbel, 1988; Green, 1988), e em ranídeos do gênero *Rana* (Schmid, 1978b; Green, 1985; Miura *et al.*, 1995).

Além das diferenças mencionadas quanto à resposta aos métodos de bandamento, a heterocromatina pode se apresentar também em estado heteromórfico, tanto no tamanho da banda quanto na intensidade de coloração (Sumner, 1990). Tais diferenças podem ocorrer entre cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo, entre indivíduos de uma mesma população e entre diferentes populações de uma mesma espécie.

Schmid (1978a) encontrou diferenças no tamanho dos blocos heterocromáticos em 7 espécies de bufonídeos e hilídeos. King (1980) detectou heteromorfismo em uma banda telomérica no par 12 de *Litoria meireiana* e Miura *et al.* (1995) encontraram uma variação intrapopulacional no padrão de banda heteromórfica em *Rana ornativentris* de Hirosaki - Japão. Uma hipótese que tenta explicar as diferenças no tamanho dos blocos heterocromáticos é o crossing-over somático (Sumner, 1990).

Sumner (1990) propôs que pelo menos três mecanismos podem estar relacionados ao aparecimento de novas bandas heterocromáticas: translocação ou inversão de bandas já existentes, transformação da eucromatina e amplificação de seqüências de DNA.

Em anfíbios, Schmid *et al.* (1991) relataram um caso em que a diferença na quantidade de heterocromatina foi associada com a diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais, que sofrem heterocromatinização. Em salamandras do gênero *Triturus*, por exemplo, os 12 pares de cromossomos são considerados homomórficos, porém quando submetidos à coloração específica para heterocromatina constitutiva, os cromossomos sexuais XY podem ser reconhecidos, devido ao aparecimento de uma região telomérica heterocromática em somente um dos cromossomos do par de homólogos (Schmid *et al.*, 1979).

Green e Sharbel (1988) sugeriram que o aparecimento de cromossomos sexuais em anfíbios está relacionado com a adição de heterocromatina, podendo ser de duas formas: através da heterocromatinização do DNA, com perda de eucromatina e função gênica ou através de acumulação de heterocromatina já existente sem perda de eucromatina. Neste sentido, Schmid *et al.* (1991) consideraram que o aparecimento de tais cromossomos envolve duas etapas, com mudanças estruturais: inversões pericêntricas e heterocromatinização.

Indícios da presença de cromossomos sexuais podem ser obtidos da observação do emparelhamento dos bivalentes em meiose, uma vez que o crossing-over é reduzido ou totalmente suprimido não formando quiasmas e conseqüentemente não formando anéis quando a heterocromatina está presente no telômero (Schmid *et al.*, 1990; Schmid *et al.*, 1991).

3.5. Estudos citogenéticos em Hylidae.

Segundo Morescalchi (1968), as espécies de anuros com caracteres morfológicos primitivos têm, geralmente, um cariótipo com um grande número de cromossomos, enquanto que cariótipos com baixo número seriam encontrados principalmente nas espécies mais recentes, de acordo com a evolução cromossômica. Além disso, Bogart (1973) propôs que as chamadas famílias de anuros “superiores” foram derivadas de um cariótipo com $2n = 26$ cromossomos.

O número de cromossomos das espécies pertencentes à família Hylidae é bastante homogêneo, sendo que no gênero *Hyla*, que tem a distribuição geográfica mais ampla, aparentemente existem dois ramos cariotípicos: $2n = 24$ e de $2n = 30$ (Bogart, 1973; Kuramoto, 1990). Kaiser *et al.* (1996) consideraram o grupo com $2n = 30$ cromossomos como monofilético, uma vez que apresentam um número conservativo neste gênero.

O cariótipo de $2n = 24$ cromossomos encontrado no gênero *Hyla* é simétrico e unimodal, característico de famílias avançadas (Morescalchi, 1990) e de acordo com Bogart (1973) e Miura (1995) a origem estaria em um ancestral com $2n = 26$ cromossomos, e, dentre os hílideos são encontrados cariótipos com $2n = 26$ cromossomos (Kuramoto, 1990).

O número cromossômico mais discrepante é de $2n = 34$, pertencente a *H. brunea*. Essa espécie é morfológicamente muito semelhante à *H. septentrionalis* que possui $2n = 24$ cromossomos, tendo as duas espécies sido consideradas inicialmente como uma única. O cariótipo de *H. brunea* apresenta a grande maioria dos cromossomos do tipo subtelocêntrico ou acrocêntrico e em *H. septentrionalis*, com apenas um cromossomo subtelocêntrico. Neste trabalho, Cole (1974) sugere a evolução cromossômica através de fissão cêntrica, envolvendo cinco pares de cromossomos do ancestral com $2n = 24$ cromossomos.

Bogart (1973) destaca a presença de outros números discrepantes como $2n = 20$ e $2n = 18$ para populações diferentes de *H. albosignata* porém, é questionável se este autor analisou diferentes populações de *H. albosignata* ou de houve algum erro de identificação. Segundo Batistic (1989), neste caso, a especiação e a conquista de novos ambientes está se dando associada à redução do número de cromossomos.

Um fato bastante interessante é a presença de $2n=22$ cromossomos em *H. albopunctata* (Beçak, 1968) e de $2n=24$ cromossomos para *H. raniceps* que foi incluída, juntamente com duas outras espécies, no mesmo grupo (Rabello, 1970).

Apesar de existir uma certa variação no número diplóide entre as espécies de hilídeos, o padrão morfológico dos cromossomos é bastante conservativo entre as espécies com 24 cromossomos. Foi observado por Bogart (1973) que *H. crepitans* e *H. pardalis*, do grupo de *H. faber*, possuem cariótipos muito próximos aos de *H. polytaenia*, do grupo de *H. polytaenia* e de *H. pulchella*, do grupo de *H. pulchella*, sendo também muito próximo de todas as *Hyla* com $2n=24$ cromossomos.

Bogart (1973) sugere que *H. sordida* e *Phrynohyas venulosa* do Panamá compõem o grupo de *Hyla* da região holoártica por apresentarem cariótipo parecido com a maioria daqueles hilídeos, podendo ser consideradas como importantes ligações entre os hilídeos neotropicais e holoárticos. Neste sentido, Anderson (1991) compara o cariótipo de espécies de *Hyla* holoárticas e neotropicais sugerindo, com base na similaridade no número e morfologia dos cromossomos, que as espécies de *Hyla* holoárticas possam ter se originado por invasão de espécies neotropicais naquela região.

Alterações numéricas no cariótipo podem ser encontradas dentro da família Hylidae, na qual algumas espécies apresentam cromossomos supernumerários como é o caso de *Acris crepitans* (Nur e Nevö, 1969) *Hyla* sp. (aff. *circumdata*) (Baldissera *et al.*, 1993), descrita posteriormente como *H. luctuosa* (Pombal e Haddad, 1993) e em *Hyla nana* (Medeiros, 2000), sendo ainda, muito especulativo sua origem e papel evolutivo.

Além dos estudos de descrição do cariótipo, o bandamento cromossômico passou a ser muito importante nos estudos de citogenética comparativa, apesar de poucas espécies da família Hylidae serem estudadas utilizando essa técnica. Schmid (1978a) analisou as espécies *H. arborea*, *H. cinerea* e *H. septentrionales* através dos bandamentos C e Q, além da localização da NOR. Wiley (1982) descreveu o padrão de bandamento G em nove espécies de *Hyla* americanas (*H. squirela*, *H. crucifer*, *H. gratiosa*, *H. cinerea*, *H. andersonii*, *H. femoralis*, *H. avivoca*, *H. chrysoscelis* e *H. versicolor*). Mais tarde, Wiley *et al.* (1989) identificaram um polimorfismo na localização de NOR em *H. chrysoscelis* e *H. versicolor* e reportaram o padrão de replicação tardio com BrdU em *H. chrysoscelis*. Anderson (1991) estudou 23 taxa do gênero *Hyla* da região holoártica, através do bandamento C e localização da NOR, além de, em 8 delas fazer uma análise do padrão de

restrição *in situ*. Neste mesmo trabalho, descreveu os cromossomos sexuais *H. squirela* e *H. femoralis*. Baldissera *et al.* (1993) descreveram o padrão de bandamento C e a localização de NOR em *H. prasina* e apenas a localização da NOR em *H. luctuosa*, *H. hayii* e *H. fuscovarius*, sendo que, atualmente, estas duas últimas pertencem ao gênero *Scinax*. Miura (1995) mostrou através de bandamento de replicação tardia em espécies de *Rana*, *Bufo* e *Hyla*, que há grande homologia entre os cromossomos dos três gêneros. Os resultados indicaram que *Hyla* está mais relacionada citogeneticamente com *Bufo* do que com *Rana*, havendo grande conservação nos pares de cromossomos grandes através da história evolutiva dos anuros. Ananias (1996) analisou algumas espécies de *Hyla* do grupo de *H. pulchella* através do bandamento C e localização de NOR. Kaiser *et al.* (1996) descreveram uma variação geográfica relacionada com diferentes localizações da NOR em duas populações alopátricas de *H. ebraccata*, na Costa Rica, que apresentaram NOR no par 10 ou no par 13. Raber (2000) analisou a distribuição de heterocromatina e a localização da NOR em duas espécies consideradas muito próximas ao grupo de *H. pulchella*: *H. guentheri* e *H. bischoffi*. Medeiros (2000) analisou populações simpátricas de *H. sanborni* e *H. nana*, encontrando um complemento cromossômico de $2n=30$ cromossomos e em 9,3% dos espécimes de *H. nana*, foi observado a presença de $2n=31$ cromossomos correspondendo a um pequeno supernumerário. As duas espécies, apesar da grande semelhança morfológica, podem ser separadas pelo cariótipo, padrão de bandamento C e localização da NOR. Gruber *et al.* (2000) analisaram várias espécies de *Hyla* com 30 cromossomos, através de bandamento C, localização de NORs e incorporação de BrdU para análise do padrão de replicação tardio. Carvalho *et al.* (2000, 2001) estudaram *H. cochranae* e *Aplastodiscus perviridis*, através de bandamento C e localização da NOR, e discutem a relação entre estes dois gêneros. Kasahara *et al.* (2001) apresentaram pela primeira vez dados de bandamento C, localização de NOR e bandamento fluorescente em *Osteocephalus langsdorffi*, *Corythomantis greeningi*, *Aparasphenodon brunoii* e *Scinax fuscovarius* obtendo pouca diferenciação entre espécies de diferentes gêneros da família Hylidae.

3.6. A citogenética do grupo de *H. pulchella* e de espécies relacionadas.

Dentro do grupo de *H. pulchella*, apenas para as espécies brasileiras podem ser encontrados dados de citogenética na literatura.

O cariótipo de *H. prasina* foi descrito por Beçak (1968), que até então a denominava de *H. pulchella prasina*, possuindo $2n = 24$ cromossomos. Rabello (1970), fazendo um estudo de revisão cromossômica de alguns anuros, relatou resumidamente os dados cariotípicos de espécies já estudadas e não destacou a presença de um par acrocêntrico nesta espécie. Baldissera *et al.* (1993), estudando esta mesma espécie proveniente da Serra do Japi, Jundiaí, Estado de São Paulo, adicionaram mais alguns dados citogenéticos. Confirmaram o número diplóide $2n = 24$ descrito por Beçak (1968) e detectaram a NOR no telômero do braço longo do par 12 e, em alguns indivíduos, uma NOR adicional no par 9. Através de bandamento C detectou também heterocromatina constitutiva em regiões centroméricas, teloméricas e intersticiais.

A subespécie *H. pulchella pulchella* foi estudada por Saez e Brum (1960) como *H. raddiana*. Estes autores apenas citaram o número de cromossomos como $2n = 24$, assim como Rabello (1970), mas não apresentaram o cariótipo da espécie. Indicaram ainda que todos os cromossomos são metacêntricos sem, no entanto, mostrar qualquer dado morfométrico para tal classificação.

Ananias (1996) analisou quatro espécies do grupo de *H. pulchella*: *H. pulchella pulchella*, *H. joaquina*, *H. caingua* e quatro populações de *H. prasina*. Neste estudo, foi encontrado um número cromossômico de $2n = 24$ cromossomos para todas as espécies, com cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos, de acordo com a classificação de Green e Session (1991). O padrão de bandamento C obtido para estas espécies mostrou uma similaridade muito grande entre elas, exceto para *H. p. pulchella* que apresentou pouca quantidade de heterocromatina constitutiva em seu genoma. Uma banda fortemente corada foi detectada no braço longo do par 10, exceto em *H. caingua*, o que pode ser um marcador para este grupo. *H. prasina* apresentou uma variação populacional no padrão de bandamento C, o que pode estar relacionado com rearranjos cromossômicos e consequentemente à evolução desta espécie. Em relação à localização da NOR, *H. prasina* e *H. p. pulchella* apresentaram NOR no telômero do braço longo do par 12 enquanto em *H.*

joaquinii no telômero do braço curto do par 1 e *H. caingua* na região centromérica do braço longo do par 7.

Raber (2000) analisou os cromossomos de duas espécies que já foram consideradas pertencentes ao grupo de *H. pulchella* ou muito próximas: *H. guentheri* e *H. bischoffi*. Ambas apresentaram $2n = 24$ cromossomos e todos com a mesma morfologia encontrada para as espécies do grupo de *H. pulchella* (Ananias, 1996). O padrão de bandamento C mostrou algumas características semelhantes às espécies do grupo de *H. pulchella*, como a forte banda no braço longo do par 10. Entretanto, em *H. bischoffi* foi encontrada uma banda no braço curto do par 6, o que a distingue de *H. guentheri* e não detectada em nenhuma espécie do grupo de *H. pulchella*. Em ambas as espécies foi encontrada uma marcação telomérica no braço longo do par 1, que também foi detectado em *H. joaquinii* e *H. prasina* (grupo de *H. pulchella*). A NOR nas espécies *H. guentheri* e *H. bischoffi* foi detectada no braço longo do par 10.

3.7. DNA mitocondrial – aspectos gerais

De acordo com Avise e Lansman (1983), o genoma mitocondrial é maternalmente herdado em todos os eucariotos. Em *Xenopus* (Dawid e Blakler, 1972), *Drosophila* (Reilly e Thomas, 1980), *Rana nigromaculata* e *Rana brevipoda* (Sumida, 1997a), foi comprovado a herança predominantemente materna do DNA mitocondrial.

O genoma mitocondrial possui como característica o formato circular com aproximadamente 16-20 kb de tamanho (Avise *et al.*, 1987) e, em geral, contém 2 genes para RNAs ribossomais (12S e 16S), 22 genes para RNAs transportadores, 13 genes para RNAs mensageiros e uma região controle que representa o início da replicação (Brown, 1985; Wolstenholme, 1992; Lewin, 2000), (Figura 1). Geralmente, a região controle possui em uma extremidade a ligação com um gene para RNA transportador que codifica prolina e na outra com o gene para RNA transportador que codifica fenilalanina.

Cada fita do DNA mitocondrial possui sua origem de replicação que forma uma estrutura secundária em “loop”. A origem de replicação da fita *heavy* (O_H) está localizada na região em “loop” (região D-loop) na região controle e para a fita *light* (O_L) está na sequência WANCY entre os tRNAs para asparagina e cisteína. Além disso, há uma

seqüência conservada 3'-GGCCG-5' na origem de replicação da fita L (O_L) que seria importante para a replicação desta fita *in vitro* (Hixson *et al.*, 1986).

Em anfíbios anuros, a caracterização do genoma mitocondrial se restringe a poucos estudos. Em *Xenopus laevis*, Cordonier *et al.* (1982) mapearam o genoma mitocondrial usando 19 enzimas de restrição diferentes e encontraram um tamanho de 17,6 Kb e uma estrutura semelhante a outros DNAs mitocondriais de vertebrados (Clayton, 1982). Wong *et al.* (1983) sequenciaram 2398pb do mtDNA que inclui a região controle e os tRNAs codificadores de treonina, prolina e fenilalanina. Dunon-Bluteau *et al.* (1985) acrescentaram em suas análises o seqüenciamento do citocromo b e Roe *et al.* (1985) descreveram a seqüência completa do genoma mitocondrial de *Xenopus laevis*, com 17553pb.

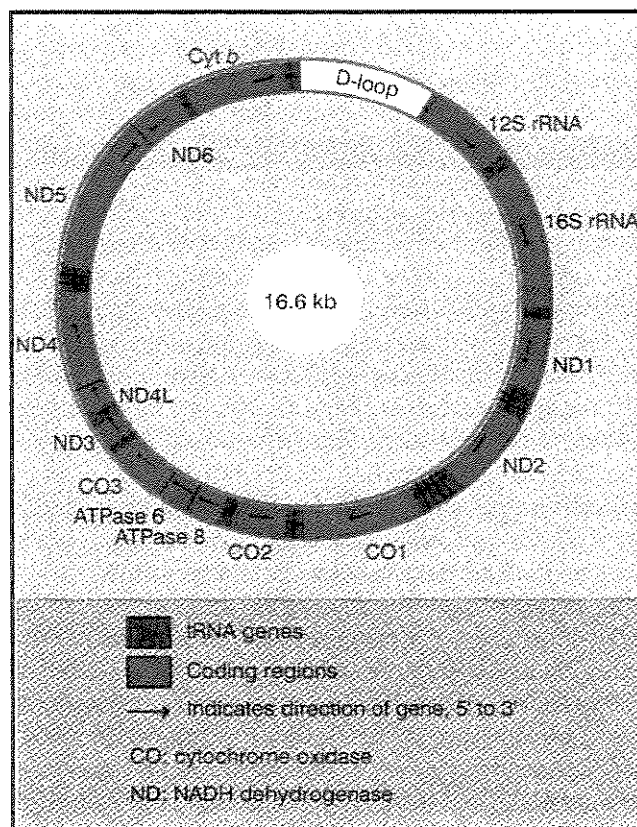


Figura 1 – Representação relativa da localização e direção da transcrição dos genes mitocondriais em vertebrados, segundo Lewin (2000).

Em *Rana japonica*, Sumida (1997b) encontrou três tamanhos de genoma mitocondrial: 18,5 Kb, 20,0 Kb e 21,5 Kb. Nuñez *et al.* (1999) analisaram populações de *Eupsophus calcaratus* e *E. roseus* e estimaram o tamanho de aproximadamente 17,7 Kb do

genoma mitocondrial destas duas espécies. Em hilídeos, Bermingham *et al.* (1986) estimaram um tamanho do DNA mitocondrial de 15,5 – 18,4 Kb para *Hyla cinerea* e 18 – 18,9kb para *H. gratiosa* e Lee *et al.* (1996) descreveram um tamanho de 20 a 30 Kb em *H. japonica*.

A variação no tamanho do genoma mitocondrial em diferentes espécies de anfíbios anuros parece não ser uma regra para a ordem. Variações semelhantes foram encontradas em outros grupos e estão relacionadas com o tamanho e o número de cópias de seqüências repetidas na região controle (Brown *et al.*, 1996; Gissi *et al.*, 1998; Härlid *et al.*, 1998; Ursing e Arnason, 1998).

3.8. Variação na organização do genoma mitocondrial

Os estudos de seqüenciamento completo de DNA mitocondrial animal mostraram que a maioria dos invertebrados possuem um genoma mitocondrial semelhante ao de vertebrados. Entretanto, vários rearranjos têm sido encontrados em nematódeos (Okimoto *et al.*, 1991, 1992), artrópodes (Boore *et al.*, 1995), bivalves (Hoffman *et al.*, 1992), moluscos (Yamazaki *et al.*, 1997), equinodermos (Cantatore *et al.*, 1989; Jacobs *et al.*, 1988) e insetos (Clary e Woltenholme, 1985, Lessinger e Azeredo-Espin, 2000).

Em vertebrados, como *Xenopus laevis* (Roe *et al.*, 1985), humanos e outros mamíferos (Bibb *et al.*, 1981; Anderson *et al.*, 1981) e em peixes (Tzeng *et al.*, 1992) a ordem gênica parece não sofrer grandes mudanças.

Apesar de vários estudos terem confirmado a presença do mesmo conteúdo gênico no genoma mitocondrial de vertebrados (figura 1), a organização destes genes no genoma pode diferir entre classes, gêneros e até mesmo entre espécies.

Em anfíbios anuros, a ordem gênica encontrada em *Xenopus* parece ser semelhante a ordem conservada de vertebrados (Roe *et al.*, 1985), mas em duas espécies do gênero *Rana* foram encontradas duas mudanças, ambas envolvendo transposição de tRNAs entre a região controle e o tRNA^{Phe}. Em *Rana catesbeiana*, a ordem gênica encontrada por Yoneyama (1987 *apud* Pereira, 2000) foi: região controle – tRNA^{Leu} – tRNA^{Thr} – tRNA^{Pro} – tRNA^{Phe} – 12SrDNA e em *Rana limnocharis*: região controle – tRNA^{Thr} – tRNA^{Pro} – tRNA^{Leu} – tRNA^{Phe} – 12SrDNA (Macey *et al.*, 1997). Além disso, em *Rana*

limnocharis há 15 a 37 nucleotídeos não codificadores flanqueando o tRNA^{Leu} e uma sequência considerada um pseudogene para este mesmo tipo de RNA entre a região controle e o tRNA^{Thr} (Macey *et al.*, 1997). Por outro lado, Yang *et al.* (1994) não encontraram o gene para RNA transportador que se localiza entre o gene para citocromo b e a região controle nas espécies de anuros *Rhacophorus taipeanus* e *Rh. moltrechti*.

No caso das salamandras, a maioria possui um genoma mitocondrial com a mesma organização padrão de vertebrados (Kumazawa e Nishida, 1999) porém, nos grupos Agamidae, Amphisbaenia, Scincidae, Xantusidae houve perda da região O_L, além de algumas espécies apresentarem a sequência IQM na ordem QIM (Macey *et al.*, 1997). Outra mudança que pode ocorrer é a translocação de tRNAs. Em cobras, o tRNA^{Gln} da sequência IQM migrou para a sequência WANCY, entre o tRNA^{Trp} e o tRNA^{Ala} em uma distância de 1,2 Kb da posição original (Kumazawa *et al.*, 1996).

Macey *et al.* (1997) concluíram que o movimento de tRNA da sequência WANCY e a perda da região O_L não são fenômenos independentes e Janke *et al.* (1994) relataram que as grandes regiões espaçadoras encontradas entre os genes transpostos podem ser um reflexo da deleção que ocorreu com os tRNAs.

Uma organização interessante foi encontrada em cobras das famílias Viperidae, Colubridae e Boidae em relação a região controle. As espécies analisadas apresentaram duas regiões controle, uma na localização esperada e outra inserida na sequência de tRNAs IQM junto com alguns tRNAs, sendo muito semelhantes entre os diferentes taxa (Kumazawa *et al.*, 1996, 1998). Estes autores propuseram que mecanismos do tipo duplicação *in tandem* ou conversão gênica poderiam explicar a presença desta região adicional em alguns taxa.

Um outro rearranjo encontrado em cobras foi a presença de um novo conjunto de tRNAs (LQM) e também a presença de um tRNA^{Phe}, considerado um pseudogene no final da região controle adicional (Kumazawa e Nishida, 1993, 1995; Kumazawa *et al.*, 1996, 1998).

Em tartarugas, foi encontrado a mesma organização gênica de mamíferos placentários, peixes e *Xenopus* (Kumazawa e Nishida, 1999).

Até pouco tempo, acreditava-se que peixes mantinham uma organização gênica conservada, porém Miya e Nishida (1999) descreveram o primeiro exemplo de rearranjo

dos genes tRNA entre a região controle e o gene ND6 (ND6 – citocromo b – tRNA^{Glu} – tRNA^{Pro} – tRNA^{Thr} – região controle).

A ordem gênica em vertebrados inferiores também varia. Em lampréias, considerados como os animais mais relacionados com os tetrápodos e tendo um tempo de divergência de aproximadamente 550 milhões de anos, duas regiões controles foram encontradas: a primeira considerada esperada com 491 pb, rica em A+T na extremidade 5' e possuindo os blocos de seqüências conservadas de outros vertebrados (CSB-II e CSB-III); e a segunda está separada da primeira por dois tRNAs e é formada por uma série composta de sete unidades repetitivas com 27 pb rica em A+T (Lee e Kocher, 1995).

3.9. Mecanismos de rearranjos do genoma mitocondrial

A maioria dos rearranjos dos genes mitocondriais envolve os genes para tRNAs. Segundo Stanton *et al.* (1994), a movimentação dos tRNAs pelo genoma é facilitada pela capacidade destes genes formarem estruturas secundárias, além de servirem como pontos de início da replicação em organismos que não possuem a origem de replicação da fita L (O_L) (Clary e Wolstenholme, 1985).

Mecanismos como inversão, transposição, recombinação intramolecular, duplicação *in tandem* e deleção foram propostos para explicar a maioria dos rearranjos encontrados até o momento (Pereira, 2000). Entretanto, alguns dos rearranjos encontrados não podem ser explicados por estes mecanismos e outros mecanismos desconhecidos devem estar envolvidos (Stanton *et al.*, 1994).

Em anfíbios, Macey *et al.* (1997) levantaram a possibilidade de ocorrência de transposição em *Rana limnocharis* pela presença de 15 a 37 nucleotídeos não codificadores flanqueando o tRNA^{Leu} e uma seqüência considerada um pseudogene para este mesmo tipo de RNA entre a região controle e o tRNA^{Thr}, uma vez que repetições diretas foram encontradas. Por outro lado, polimorfismo por inserção foi descrito em espécies da família Ranidae (Monnerot *et al.*, 1984) e Hylidae (Bermingham *et al.*, 1986; Spolsky e Uzzell, 1986).

A recombinação molecular pode gerar novos rearranjos (Thyagarajan *et al.*, 1996; Lunt e Hyman, 1997), mas parece ser muito raro no genoma mitocondrial. Além disso, as

inversões não explicam as novas ordens gênicas encontradas em algumas espécies e/ou grupos, uma vez que, nenhum dos rearranjos causou inversão da polaridade gênica, exceto em equinodermos (Smith *et al.*, 1993) nos quais o gene do RNA 16S possui a sua polaridade invertida.

3.10. A região controle

Na estrutura do DNA mitocondrial, o único espaço não codificador é a região controle, na qual se situa a origem de replicação desta molécula (revisão: Simon *et al.*, 1994). No DNA nuclear, as regiões não codificadoras (introns, regiões espaçadoras e pseudogenes) (Li *et al.*, 1984; Hillis e Davis, 1986) são variáveis tanto quanto a região D-loop.

A região controle na maioria dos taxa é pouco investigada, sendo esta a região do mtDNA que evolui mais rápido (Aquadro e Greenberg, 1983; Brown *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994). Ela é uma região informativa para inferência das relações evolutivas de espécies próximas e/ou subespécies (Tagliaro *et al.*, 1997).

Segundo Taanman (1999), a região controle é responsável pela transcrição e replicação do genoma mitocondrial, sendo caracterizada por apresentar três blocos curtos de sequência conservada (CSBs) que têm sido considerados envolvidos na replicação da fita H (Clayton, 1992) e pela sequência associada a terminação (TAS), com aproximadamente 65 nucleotídeos depois do tRNA^{Pro} que representa o final da D-loop na maioria dos vertebrados (Clayton, 1982). Ainda, a região controle parece estar organizada em três grandes regiões: uma região central conservada, uma região variável à esquerda (adjacente ao tRNA^{Pro}) e outra à direita (adjacente ao tRNA^{Phe}) (Saccone *et al.*, 1991; Gemmell *et al.*, 1996). Em anfíbios, Goebel *et al.* (1999) e Liu *et al.* (2000) verificaram a presença de regiões hipervariáveis na região 5' em vários taxa estudados.

Em invertebrados, principalmente em *Drosophila*, esta região foi bem caracterizada, particularmente em relação a ausência e presença de regiões repetidas (Clary e Wolstenholme, 1985, 1987) e, segundo Zhang e Hewitt (1997), a variação na organização dos elementos conservados em insetos pode estar relacionada com distintos padrões

evolutivos, podendo ser importante para estudos de polimorfismos genéticos e estrutura populacional.

Rand (1993), em revisão da literatura, demonstrou que ocorre variação intra e interespecífica no tamanho do mtDNA em diversos grupos animais, e em quase todos os casos, envolvendo um número variável de elementos repetidos *in tandem* (VNTRs) na região controle.

A natureza transitória destas grandes duplicações bem como de muitas VNTRs, pôde ser inferida da observação de que elas geralmente não são compartilhadas entre taxa relacionados, elas são frequentemente encontradas em estado heteroplásmico em indivíduos e não mostram altos níveis de seqüências divergentes em relação à versão original não duplicada (McKnight e Shaffer, 1997).

O tamanho da região controle pode ser variável tanto em vertebrados como em invertebrados. Lessinger e Azeredo-Espin (2000), analisando a região controle de espécies de dípteros causadores de miíase, encontraram uma variação no tamanho desta região de 1000 à 1600 pb.

Em *Xenopus*, Carr *et al.* (1987), analisando o mapa de restrição do mtDNA, encontraram 6 taxa com o mesmo tamanho de mtDNA, estimando em aproximadamente 17,4pb. Porém, nas espécies *X. clivii*, *X. vestitus* e *X. muelleri* há evidências da adição na região controle de um segmento de 300pb no primeiro e de 1100pb nos outros dois.

Além de *Xenopus*, o tamanho da região controle é muito variado dentro de gêneros diferentes e grupos de espécies, como é observado no gênero *Bufo* (Liu *et al.*, 2000; Goebel *et al.*, 1999) e em gêneros de diversas famílias (Goebel *et al.*, 1999).

A região controle do genoma mitocondrial é freqüentemente usada em estudos populacionais devido a sua alta variabilidade na seqüência de nucleotídeos, enquanto genes codificadores de proteínas como o citocromo b é geralmente usado para análise filogenética de taxa acima do nível de espécie (Pereira, 2000).

Um estudo que mostra a utilização filogenética de diversas seqüências do DNA mitocondrial foi feito por Liu *et al.* (2000) em espécies do gênero *Bufo* da Asia, com base nos genes 12S e 16S ribossomais mitocondriais, citocromo b e região controle. Neste trabalho, os autores concluíram que as diferentes regiões do DNA mitocondrial evoluem em taxas diferentes, e que árvores filogenéticas de diferentes genes para o mesmo organismo podem diferir. Níveis de variação intraespecífica muito baixa (0-1%) foram

encontrados para os genes ribossomais mitocondriais 12S e 16S, impedindo a solução das relações entre as populações. Por outro lado, as seqüências da região controle e citocromo b mostraram substancial variabilidade intraespecífica (0-8%).

3.11. DNA mitocondrial e filogenia em anfíbios

A filogenia molecular é o estudo das relações evolutivas entre organismos usando caracteres moleculares como as seqüências de DNA e de proteínas, inserção de elementos de transposição ou outros marcadores moleculares (Graur e Li, 2000). Nos últimos 30 anos, novas técnicas de biologia molecular estão permitindo um aumento expressivo da informação genética para a biologia (Avice, 1994; Hillis *et al.*, 1996) e um número considerável destas técnicas foram direcionadas para as questões de especiação (Chek, 1999).

A contribuição dos marcadores moleculares é bastante utilizada para estimar filogenia sistemática (Hillis *et al.*, 1996) não porque os caracteres morfológicos ou outros aspectos fenotípicos não são usados, mas sim, pelo fato dos caracteres moleculares serem valorizados em casos onde a variação morfológica é limitada ou há uma dificuldade para se estabelecer homologias (Moritz e Hillis, 1996).

A filogenia baseada em caracteres morfológicos dos anfíbios anuros dividiu-os em um grupo mais basal, os Archaeobatrachia, e um grupo mais derivado, os Neobatrachia (Reig, 1958; Duellman, 1975 *apud* Hay *et al.*, 1995). Hay *et al.* (1995) analisaram as relações filogenéticas entre as famílias de anfíbios através de seqüências dos genes ribossomais mitocondriais 12S e 16S e validaram os Neobatrachias como um grupo monofilético tendo como participante as superfamílias Bufonoidea e Ranoidea. Além disso, propuseram que os Sooglossidae formem uma linhagem separada, idéia esta suportada pelos dados moleculares de Ruvinsky e Maxson (1996).

A utilização do genoma mitocondrial e não nuclear para estudos filogenéticos está relacionada principalmente ao fato do genoma nuclear ser transmitido entre as gerações de determinados organismos de uma população através de contato sexual, e a diversidade genotípica surgindo através de mutações e recombinações (Saville *et al.*, 1998), enquanto a transmissão dos genes mitocondriais, na maioria dos eucariotos, acontece de forma clonal

(Birky, 1995), com diversidade genotípica, dependendo de mutações ou outros tipos de rearranjos.

Outras características do DNA mitocondrial que elevam o seu sucesso nos estudos filogenéticos são a presença de genes compactos e com poucas seqüências intergênicas não-codificantes (Cantatore e Saccone, 1987), herança materna (Kondo *et al.*, 1990; Gyllestein *et al.*, 1991), evolução rápida comparada ao genoma nuclear com reparo ausente (Brown *et al.*, 1979) e múltiplas cópias em uma única célula (Robin e Wong, 1988).

Além disso, evolução do DNA mitocondrial é 5-10 vezes mais rápida do que o DNA nuclear em mamíferos e talvez em todos os cordados (Miyata *et al.*, 1982; Cann *et al.*, 1984; Brown, 1985), sendo considerada uma molécula altamente informativa para a análise da estrutura de uma população e estudos de taxa relacionados (Avise *et al.*, 1979, 1983; Saunders *et al.*, 1986; Ptacek *et al.*, 1994). A análise filogeográfica do DNA mitocondrial é efetiva para identificar linhagens ou espécies crípticas em muitos taxa (Avise, 1994), inclusive em anfíbios onde a morfologia é relativamente conservada (McGuigan *et al.*, 1998). Guttman (1985) sugeriu a utilização do DNA mitocondrial como marcador no estudo da estrutura e evolução de populações de anuros.

Um grande número de estudos filogenéticos foi feito usando as seqüências de genes mitocondriais em diferentes níveis de relações filogenéticas (Kumazawa e Nishida, 1993; Zardoya e Meyer, 1996) e demonstraram que alguns genes mitocondriais são melhores do que outros para construir as relações filogenéticas entre taxa (revisão: Simon *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2000).

A escolha da seqüência do DNA mitocondrial a ser analisada depende da problemática. Os genes ribossomais mitocondriais podem ser usados para análise filogenética (Hillis e Dixon, 1991) por serem moléculas muito mais simples do que os genes rRNA nuclear, estando presente em apenas uma cópia por genoma e não contém regiões espaçadoras (revisão: Simon *et al.*, 1994). A análise destes genes é usada geralmente para solucionar divergências profundas (Woese, 1987; Cedergren *et al.*, 1988) e em alguns casos entre taxa muito próximos (Reeder, 1995).

O gene citocromo oxidase I (COI), que possui uma taxa de evolução mais rápida entre todos os genes codificadores de proteínas (Jacobs *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 1994), também pode ser informativo quando se tem casos de profunda divergência (Yokobori *et*

al., 1994; Cummings *et al.*, 1995) ou para análise das relações entre espécies de anuros relacionadas (Mable e Roberts, 1997).

Em geral, o gene citocromo b mitocondrial e a região controle são mais usados para resolver as relações entre espécies próximas, enquanto os genes ribossomais 12S e 16S são usados para examinar as relações filogenéticas entre taxa superiores como gêneros e famílias (Sumida *et al.*, 1998)

Os genes para RNAs transportadores evoluem mais lentamente do que os genes mitocondriais codificadores de proteínas (Wolstenholm e Clary, 1985; Kumazawa e Nishida, 1993) e não são usados para estudos filogenéticos.

A análise das seqüências do DNA mitocondrial foi feita até pouco tempo atrás através da digestão com enzimas de restrição para posterior análise do polimorfismo dos fragmentos (RFLP). Szymura *et al.* (1985) estudaram o padrão de restrição do DNA mitocondrial em uma zona de hibridação entre duas espécies do gênero *Bombina*; Denington (1985) identificou populações alopátricas de *Litoria ewingi* e *L. paraewingi* e o haplótipo de indivíduos híbridos ao longo de uma zona de hibridação; Spolsky e Uzzell (1986) analisaram a história evolutiva do híbrido *Rana esculenta* na Suíça, Austria e Polônia; Bermingham *et al.* (1986) descreveram um polimorfismo intraespecífico de tamanho do DNA mitocondrial e a ocorrência de heteroplasma individual para duas espécies de *Hyla*; Grohovaz *et al.* (1996) identificaram padrões variáveis do DNA mitocondrial entre populações de *Xenopus laevis* do sudeste da África; Sumida (1997a) analisou o padrão de herança do DNA mitocondrial entre híbridos de duas espécies do gênero *Rana*; Sumida (1997b) sugeriu a separação de dois grupos de populações (oeste e leste) de *Rana japonica*; Nuñez *et al.* (1999) analisaram geograficamente as populações de *Eupsopus calcaratus* e *E. roseus* estabelecendo a identidade taxonômica e diferenças entre populações alopátricas no Chile.

Nos últimos anos, muitos trabalhos foram desenvolvidos com anuros utilizando a tecnologia da PCR e seqüenciamento no estudo do DNA mitocondrial. Ptacek *et al.* (1994) seqüenciaram o gene citocromo *b* para determinar a especiação por poliploidia e a origem múltipla do tetraplóide *Hyla versicolor*; Yang *et al.* (1994) analisaram 108 pb de um segmento do gene citocromo *b* e 614-656 pb do segmento da região D-loop encontrando 1,7% de divergência entre as populações de *Rhacophorus taipeianus* da região norte e central em Taiwan; Gerhardt *et al.* (1994) analisaram os híbridos diplóides e tetraplóides

entre *Hyla chrysoscelis* e *Hyla versicolor* através da comparação da sequência de 600 pb do gene citocromo *b*; Tanaka *et al.* (1996) utilizaram 450 pb do gene citocromo *b* para estimar as relações filogenéticas entre 10 taxa do gênero *Rana*; Mable e Roberts (1997) utilizaram o gene citocromo oxidase I (COI) para investigar as relações filogenéticas entre as espécies diplóides e tetraplóides do gênero *Neobatrachus*; Graybeal (1997) utilizando os genes RNAr mitocondriais 12S e 16S inferiu as relações filogenéticas dos anuros da família Bufonidae; Summers *et al.* (1997) estudaram a divergência genética e fenotípica entre 3 espécies de anuros no Panamá; Sumida *et al.* (1998) analisaram as relações evolutivas entre três espécies de *Rana*, através das sequências dos genes citocromo *b* e 12S rDNA e encontraram alta frequência de transição relativa e transversão; Canatella *et al.* (1998) utilizaram os genes ribossomais (12S) e citocromo oxidase I (COI), além de outros caracteres para estimar a filogenia das espécies de *Physalaemus* do grupo *pustulosus*; Kobel *et al.* (1998) compararam 600 pb dos genes ribossomais 12S e 16S de espécies do gênero *Xenopus* para propor sua filogenia; Richards e Moore (1996) propuseram uma árvore filogenética para as espécies da família Rhacophoridae e outros ranóides através do uso de parte do genes RNAr mitocondriais 12S e 16S e do RNAt^{val}; Summers *et al.* (1999) relacionaram o cuidado parental no gênero *Dendrobates* com a evolução dos taxa através de sequências dos genes mitocondriais 16S, citocromo oxidase I e citocromo *b*; Lamb *et al.* (2000) analisaram uma zona híbrida entre *Bufo microscaphus* e *B. woodhoussii* no Arizona; Liu *et al.* (2000) investigaram as relações filogenéticas de bufonídeos asiáticos utilizando as sequências dos genes ribossomais mitocondriais 12S e 16S, além do gene citocromo *b* e da região controle; Vences *et al.* (2000) propuseram a filogenia dos dendrobatídeos através das sequências dos genes 16S e 12S; Sumida *et al.* (2000) construíram árvores filogenéticas, baseados nas sequências dos genes mitocondriais 12S e citocromo *b* para espécies do gênero *Rana* e Macey *et al.* (2001) investigaram 2013 bases compreendendo os genes ND1, tRNA^{Ile}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Tyr}, ND2, tRNA^{Trp}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr} e COI de espécies do grupo de *Rana boylii*.

A maioria desses estudos foram feitos com anuros da região Holoártica e apesar de autores como Gaston e Williams (1996, *apud* Chek *et al.*, 2001) assumirem que a região Neotropical possui a maior concentração de espécies de anuros conhecidas do mundo, elas

são pouco estudadas e por isso têm contribuído menos para gerar modelos que expliquem a evolução nesta ordem.

Uma das características dos anfíbios anuros neotropicais, assim como de outras regiões, é possuir, de um modo geral, um padrão morfológico conservativo (Cherry *et al.*, 1978; Maxson, 1984; Hass *et al.*, 1995; Richards e Moore, 1996), que acarreta algumas consequências para um estudo filogenético, pois fornece poucos caracteres filogeneticamente informativos, sendo difícil de inferir sobre as relações entre as populações, e, como em outros grupos, os anuros neotropicais são incluídos em modelos de especiação recente (Pleistoceno) (Duellman e Crump, 1974; Duellman, 1982; Linch, 1988 *apud* Chek *et al.*, 2001) nos quais as espécies formam complexos caracterizados pela grande semelhança morfológica. Além disso, as relações de distribuição das espécies atuais são muito pouco conhecidas, exceto para alguns grupos (da Silva e Patton, 1998).

Dos trabalhos desenvolvidos com anuros da região Neotropical, vale destacar o de Chek *et al.* (2001) que usaram as seqüências dos genes ribossomais 12S e 16S mitocondriais e citocromo b para estimar a filogenia entre espécies neotropicais de *Hyla* com 30 cromossomos e comparando seus resultados com os de Duellman (1982 *apud* Chek, 1999), baseados em caracteres morfológicos para o mesmo grupo, algumas divergências foram encontradas em relação a posição de alguns taxa. Por exemplo, *H. elegans* pode ser basal para todo o grupo de *H. leucophyllata* e altamente distinta de *H. leucophyllata*, assim como *H. triangulum* que se mostrou como taxon irmão de algumas populações de *H. leucophyllata* e não de outras, resultados estes, diferentes dos encontrados por Duellman (1982 *apud* Chek, 1999). Além disso, recentemente, Salducci *et al.* (2002) analisaram filogeneticamente algumas espécies da família Hylidae da Guiana Francesa, destacando as relações entre as quatro subfamílias: Pelodryadinae, Phyllomedusinae, Hemiphractinae e Hyalinae, sugerindo que o gênero *Scinax* possui um alto nível de diferenciação dentro dos Hylidae e que a subfamília Hyalinae deve ser parafilética pela posição do gênero *Litoria* como grupo irmão do gênero *Hyla*.

3.12. Biogeografia e evolução

Muitas espécies de anuros são naturalmente filopátricas, conservam os locais de cruzamento (Duellman e Trueb, 1986), e, conseqüentemente, têm um baixo fluxo gênico entre as populações. Quando o fluxo gênico entre populações é limitado por barreiras físicas (zoogeográficas) ou ecológicas, a diferenciação genética entre populações pode ser maior (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1989). Entre os anfíbios anuros, um fator biológico que reduz o fluxo gênico entre populações simpátricas é o padrão de vocalização que leva a um isolamento reprodutivo entre os taxa (Duellman e Pyles, 1983). Usando marcadores populacionais, o potencial de diferenciação genética entre populações de anuros pode ser estimado (Breden, 1987; Berven e Grudzien, 1990).

Para o modelo de especiação alopátrica, divergências entre populações são de extrema importância (Mayr, 1963). Com um contato secundário, populações divergentes podem intercruzar e restabelecer o fluxo gênico resultando em um taxon híbrido, dependendo da compatibilidade do genoma.

Variação, por meio de uma zona de contato, não necessita ser congruente para diferentes caracteres e uma análise comparativa pode esclarecer a história e a ecologia das interações entre populações (Harrison, 1993; Avise, 1994 *apud* Gollmann e Gollmann, 1995). Assim também, quando as espécies intercruzantes são simpátricas ou possuem uma distribuição parapátrica e hibridam ao longo de uma zona de contato, pode ocorrer a transferência interespecífica do DNA mitocondrial (Szymura *et al.*, 1985)

Dados moleculares de zonas híbridas de anuros são importantes para estudos de eventos híbridos, introgressão direcional (Lamb e Avise, 1986) e estrutura clinal (Gollmann, 1991; Sanderson *et al.*, 1992)

Zonas de hibridação em anfíbios anuros foram muito estudadas, como nos gêneros *Bombina* (Szymura e Barton, 1991), *Bufo* (Green, 1983), *Litoria* (Littlejohn e Watson, 1985), *Pseudacris* (Gartside, 1980), *Pseudophryne* (Woodruff, 1989), *Geocrina* (Gollmann e Gollmann, 1995) e em *Rana* (Kocher e Sage, 1986). Na maioria dos casos, a hibridação foi detectada primeiramente usando caracteres dos indivíduos adultos, particularmente através de caracteres morfológicos e de vocalização, enquanto que a morfologia dos girinos é pouco utilizada. Por outro lado, Gollmann e Gollmann (1995) analisaram a variação

morfológica nos girinos do complexo de espécies relacionados a *Geocrina laevis* e detectaram que a maioria das populações da zona híbrida era semelhante.

Sullivan e Lamb (1988) documentaram fluxo gênico interespecífico em populações de *Bufo microscaphus* e *B. woodhousii* no Arizona Central, baseando-se na vocalização e padrão alozímico, enquanto Lamb *et al.* (2000) utilizaram os genes mitocondriais citocromos b (326pb) e ribossomal 16S (510 pb) para distinguir estas duas espécies. Por seu turno, Sumida e Ogata (1998) analisaram a diferenciação intraespecífica em *Rana japonica* baseados nas seqüências do gene citocromo b mitocondrial encontrando uma diferenciação entre as populações de diversas regiões no Japão.

Muitos estudos estão utilizando o mtDNA em análise filogeográfica de taxa geograficamente muito espalhados para descobrir linhagens distintas ou ainda não reconhecidas e inferir sobre sua história, enfatizando a geografia, geologia e paleoclimatologia (Avice *et al.*, 1992; Zamudio *et al.*, 1997; Macey *et al.*, 1998).

Vale destacar alguns estudos filogeográficos em anfíbios, através do DNA mitocondrial, como o de Schauble *et al.* (2000) para o gênero *Limnodynastes* que foi bastante informativa sobre os mecanismos de especiação neste gênero; Wilkinson *et al.* (1996) analisaram a variação geográfica em *Rhacophorus arboreus*; e Yang *et al.* (1994) analisaram a variação no DNA mitocondrial de populações de *Rhacophorus* através da análise do gene citocromo b e da região controle. Mulcahy e Mendelson (2000) analisaram a filogeografia e a especiação em indivíduos morfologicamente variáveis de *Bufo valliceps*, e mostraram que esta espécie apresenta diferenças no tamanho, textura da pele e padrão de coloração entre as populações do nordeste da Costa Rica e sudeste dos Estados Unidos, com nenhuma evidência de variação clinal; Pramuk *et al.* (2001) e Emerson *et al.* (2000) utilizaram os genes ribossomais mitocondriais 12S e 16 S e o citocromo b para hipotetizar a filogenia e biogeografia de espécies de *Bufo* e de ranídeos asiáticos, respectivamente. Slade e Moritz (1998) analisaram populações naturais e introduzidas de *Bufo marinus* através de seqüências dos genes ND3 e tRNAs flanqueadores; e Nuñez *et al.* (1999) analisaram biogeograficamente populações de *Eupsophus calcaratus* e *E. roseus* através de digestão com enzimas de restrição (RFLP) e verificaram que apesar da semelhança no cariótipo e no padrão de canto entre estas taxa, o padrão de RFLP encontrado indicou serem duas espécies válidas.

Entre os hilídeos, Lee *et al.* (1996) observaram uma variação inter- e intrapopulacional no taxon *H. japonica* através de RFLP, encontrando uma variação maior quando compararam populações do Japão com as da Coreia. Assim também Barber (1999 a e b) analisou a filogeografia e o padrão de fluxo gênico entre populações de *H. arenicolor*, baseando-se em seqüências do gene citocromo b e Chek *et al.* (2001) analisaram vários grupos de *Hyla* neotropicais com 30 cromossomos, enfocando a filogenia das espécies do grupo de *H. leucophyllata*. Esses autores concluíram que, ou *H. elegans* ou *H. ebraccata* é taxon basal para este grupo, além de seus resultados sustentarem a premissa que a proximidade espacial pode ser um pobre fator de afinidade filogenética, considerando que, as populações de Manaus (Amazonas) e Serra do Navio (Amapá) apresentaram pouca distinção filogenética nesta distância considerada alta, enquanto profundas diferenças foram observadas entre as populações próximas (Manaus e Obidos – Amazonas) (Chek *et al.*, 2001).

3.13. Espécies do grupo de *Hyla pulchella*

De acordo com Lutz (1973), o grupo de *Hyla pulchella*, anteriormente conhecido genericamente como *Hyla raddiana*, é composto de populações encontradas no Brasil, Uruguai e Argentina.

O grupo foi definido por Duellman *et al.* (1997), incluindo as espécies afins do grupo de *Hyla circumdata*, com as seguintes espécies: *Hyla pulchella pulchella* Duméril e Bibron, 1841; *H. pulchella joaquina* Lutz, 1968; *H. pulchella cordobae* Barrio 1965; *H. pulchella riojana* Koslowski, 1895; *H. andina* Müller, 1924; *H. semiguttata* Lutz, 1925; *H. marginata* Boulenger, 1887; *H. prasina* Burmeister, 1856; *H. cymbalum* Bokermann, 1963; *H. albonigra* Nieden, 1923; *H. balzani* Boulenger, 1898; *H. marianitae* Carrizo, 1992; *H. melanopleura* Boulenger, 1912; *H. palaestes* Duellman, De La Riva e Wild, 1997.

Posteriormente, Cruz e Caramaschi (1998) incluíram *H. caingua* Carrizo, 1990 e Caramaschi e Cruz (2000) incluíram *H. ericae* Caramaschi e Cruz, 2000 no grupo de *H. pulchella*.

A caracterização do grupo de *H. pulchella* é complexa e ainda confusa. Atualmente, considera-se como espécies pertencentes a este grupo aquelas que apresentam corpo moderadamente robusto, cabeça tão larga quanto longa; flancos e áreas escondidas das

coxas de coloração pálida com manchas, barras ou reticulações negras ou, coxas e flancos de coloração escura com manchas pálidas; machos com antebraços hipertrofiados portando um prepólex bem desenvolvido terminando em um espinho; canto de anúncio consistindo em uma série de notas “tipo-sino”; reprodução em água corrente; coloração dorsal marrom, verde ou cinza e geralmente com manchas escuras do tipo reticulações ou barras transversais (Duellman *et al.*, 1997).

IV. JUSTIFICATIVA

Apesar dos estudos existentes sobre a caracterização morfológica do grupo de *Hyla pulchella*, ainda há muitas divergências sobre a posição taxonômica de algumas espécies. Recentemente, Garcia e Haddad (1999) analisaram as vocalizações de anúncio de populações de *H. semiguttata* e *H. marginata* de São Francisco de Paula, RS, e observaram um canto com dois tipos de notas, enquanto que as outras espécies e populações (*Hyla* aff. *marginata* de Rancho Queimado, SC; *Hyla pulchella joaquinii* de Urubici, SC; *Hyla semiguttata* de Cambará do Sul, RS e *Hyla semiguttata* de Misiones, Argentina) apresentaram uma única nota. O canto destas populações varia quanto a duração, estrutura das notas e frequência, contrariando a sugestão inicial de Langone (1993) de sinonimização de *H. semiguttata* e *H. pulchella joaquinii* à *H. marginata*. Além disso, Garcia e Haddad (1999) observaram vocalizações ligeiramente distintas entre as populações de *H. semiguttata*, sugerindo tratar-se de diferentes taxa. Esses autores concluíram que no Sul do Brasil existem diferentes populações relacionadas a estas espécies, as quais foram denominadas de complexo *marginata/semiguttata*. A figura 2 mostra exemplos dos espécimes analisados neste trabalho.

De acordo com Garcia *et al.* (2001), as espécies *H. marginata*, *H. semiguttata*, *H. p. joaquinii*, *H. ericae* e outras que estão em fase de descrição, parecem formar um subgrupo dentro do grupo de *Hyla pulchella*, caracterizado por ausência de manchas ou barras escuras nos flancos e áreas escondidas das coxas; vocalização em notas longas e multipulsionadas e reprodução em riachos.

Esses autores identificaram também, pela morfologia e padrão de vocalização de anúncio, três espécimes com características de híbrido, provavelmente entre *H. bischoffi* (espécie sem grupo) e *Hyla* sp. n. (uma espécie nova do grupo de *Hyla pulchella* que está

em fase de descrição), razão pela qual essas três espécies também foram incluídas no presente estudo.

Apesar da análise citogenética ser uma ferramenta que pode solucionar ou sugerir as relações entre taxa, algumas vezes ela pode não ser conclusiva para uma determinada problemática e, como atualmente, a análise da sequência de genes mitocondriais tem sido cada vez mais utilizada para estudos filogenéticos e sistemáticos em anfíbios anuros, estas duas ferramentas associadas podem contribuir para solucionar a problemática existente no complexo *marginata/semiguttata*, auxiliando no entendimento das relações filogenéticas entre essas taxa e na sistemática do grupo de *H. pulchella*.

V. OBJETIVOS

5.1. Gerais

Considerando-se a indefinição taxonômica das espécies do grupo de *Hyla pulchella*, neste trabalho a espécie *H. marginata*, populações morfologicamente polimórficas de *H. semiguttata* e algumas espécies relacionadas foram analisadas citogeneticamente e por sequenciamento do DNA mitocondrial, com o objetivo de levantar hipóteses para explicar as relações filogenéticas e contribuir para a sistemática destes taxa.

5.2. Específicos

- ✓ Caracterizar citogeneticamente as populações de *H. semiguttata* e uma população de *H. marginata*, utilizando a morfologia cromossômica, padrão de bandamento C e localização de NOR.
- ✓ Analisar as populações polimórficas de *H. semiguttata* comparando com *H. marginata* e algumas espécies relacionadas, utilizando as sequências da região controle e do gene citocromo *b* do DNA mitocondrial.
- ✓ Caracterizar uma possível situação de hibridação natural entre os taxa *H. bischoffi* e *Hyla* sp.n..

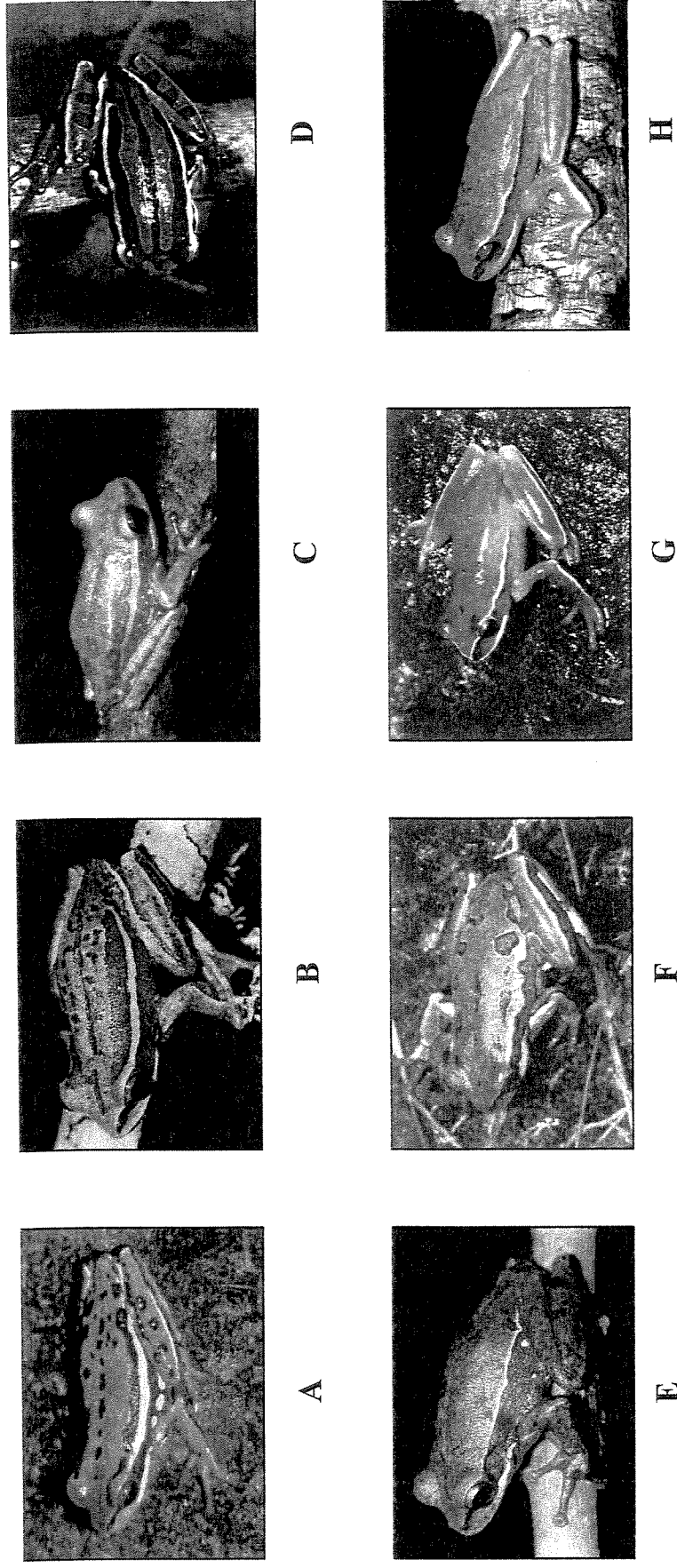


Figura 2 – Representantes dos taxa analisados: Populações de *H. semiguttata* de Cambará do Sul, RS (A), São Francisco de Paula, RS (B), Palmeira, PR (C), Piraquara, PR (D); *Hyla* aff. *semiguttata* (E); *H.p. joaquinii* (F); *H. marginata* (G) e *Hyla* sp. n.. – Fotos: P. C. A. Garcia

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANIAS, F. **Caracterização cromossômica de espécies e subespécies do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. Dissertação de Mestrado – Unicamp, pp. 1-101, 1996.
- ANDERSON, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. In: **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. M. G. GREEN & S. K. SESSIONS eds. Academic Press, San Diego. pp. 299-331, 1991.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARREL, B. G. DE BRUIJN, M. H. L.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERSLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STANDEN, R. & YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature** **290**: 457-465, 1981.
- AQUADRO, C. F. & GREENBERG, B. D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. **Genetics** **103**: 287-312, 1983.
- AVISE, J. C. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. **Evolution** **43**: 1192-1208, 1989.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York, Chapman & Hall, 1994.
- AVISE, J. C. & LANSMAN, R. A. Polymorphism of mitochondrial DNA in population of higher animals. In: **Evolution of Genes and Proteins**. M. NEI & R. K. KOEHN eds. Sinauer, Sunderland, Mass, pp. 147-164, 1983.
- AVISE, J.C.; GIBLIN-DAVIDSON, C.; LAERM, J.; PATTON, J. C. & LANSMAN, R. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetris*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**: 6694-6698, 1979.
- AVISE, J. C.; BOWEN, B. W.; LAMB, T.; MEYLAN, A. B. & BERMINGHAM, E. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: Evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the testudines. **Mol. Biol. Evol.** **9**: 457-473, 1992.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E. REEB, C. A.; & SAUNDERS, N. C. Intraespecific phylogeography: the

- mitochondrial bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** **18**: 489-522, 1987.
- BABU, A. & VERMA, R. S. Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. **Int. Rev. Cytol.** **108**: 1-60, 1987.
- BALDISSERA Jr. F. A.; OLIVEIRA, P.S.L. & KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Rev. Bras. Genet.** **16**(2): 335-34, 1993.
- BARBER, P. H. Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope). **Mol. Ecol.** **8**(4): 563-576, 1999a.
- BARBER, P. H. Phylogeography of canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. **Mol. Ecol.** **8**(4): 547-562, 1999b.
- BATISTIC, R. F. **Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura - Amphibia)**. Tese de Doutorado – USP, pp. 1-203, 1989.
- BEÇAK, M.L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia** **21**(3): 191-208, 1968.
- BEHR, W.; HONIKEL, K. & HARTMANN, G. Interaction of the RNA polymerase inhibitor chromomycin with DNA. **Eur. J. Bioch.** **9**: 82-92, 1969.
- BERGER, R. & GREILHUBER, J. C-bands and chiasma distribution in *Scilla siberica* (Hyacinthaceae). **Genome** **34**: 179-89, 1991.
- BERMINGHAM, E.; LAMB, T. & AVISE, J. C. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. **J. Heredity** **77**: 249-252, 1986.
- BERVEN, K. A. & GRUDZIEN, T. A. Dispersal in the wood frog (*Rana sylvatica*): implications for genetic population structure. **Evolution** **44**: 2047-2056, 1990.
- BIBB, M. J.; VAN ETEN, R. A.; WRIGHT, C. T.; WALBERG, M. W. & CALYTON, D. A. Sequence and organization of mouse mitochondrial DNA. **Cell** **26**: 167-180, 1981.
- BIRKY, C. W. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes - mechanisms and evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **92**(25): 11331-11338, 1995.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. In: **Evolutionary Biology of Anurans**. J. L. VIAL ed. Univ. Missouri Press, pp. 337-49, 1973.

- BOORE, J. L.; COLLINS, T. M.; STANTON, D.; DAEHLER, L. I. & BROWN, W. M. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. **Nature** **376**: 163-165, 1995.
- BREDEN, F. The effect of post-metamorphic dispersal on the population genetic structure of Fowler's toad, *Bufo woodhousei fowleri*. **Copeia**: 386-395, 1987.
- BROWN, J. R.; BECKENBACH, A. T. & SMITH, M. J. Length variation, heteroplasmy, and sequence divergence in the mitochondrial DNA of for species of sturgeon (*Acipenser*). **Genetics** **142**: 525-535, 1996.
- BROWN, J. R.; BECKENBACH, A. T. & SMITH, M. J. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Mol. Biol. Evol.** **10**: 326-341, 1993.
- BROWN, W. M.; GEORGE, M. & WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**: 1967-1971, 1979.
- BROWN, W. N. The mitochondrial genome of animals. In: **Molecular Evolutionary Genetics**. R. J. MacINTYRE ed. Plenum, New York. Pp. 95-130, 1985.
- 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** **110** (2): 131-141, 2000.
- CANATELLA, D. C.; HILLIS, D. M.; CHIPINDALE, P. T.; WEIGT, L.; RAND, A. S. & RYAN, M. J. Phylogeny of frogs of the *Physalaemus pustulosus* species group, with a examination of data incongruence. **Syst. Biol.** **47**(2): 311-335, 1998.
- CANN, R. L.; BROWN, W. M. & WILSON, A. C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. **Genetics** **106**: 479-499, 1984.
- CANTATORE, P. & SACCONE, C. Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. **Int. Rev. Cytol.** **108**: 149-208, 1987.
- CANTATORE, P.; ROBERTI, M.; RAINALDI, G.; GADATELA, M. & SACCONE, C. The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*. **J. Biol. Chem.** **264**: 10965-10975, 1989.
- CARAMASCHI, U. & CRUZ, C. A. G. Duas espécies novas de *Hyla* Laurenti, 1768 do Estado de Goiás, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Bol. Mus. Nac. Zool.** **422**: 1-12, 2000.

- CARR, S. M.; BROTHERS, A. J. & WILSON, A. C. Evolutionary inferences from restriction maps of mitochondrial-DNA from nine taxa of xenopus frogs. **Evolution** **41(1)**: 176-188, 1987.
- CARVALHO, K. A; GARCIA, P. C. A & RECCO-PIMENTEL, S. M. Citogenética de uma população de *Aplastodiscus* (Amphibia, Anura) de Santa Catarina. **Gen. Mol. Biol.** **23(3)**: 44, 2000.
- CARVALHO, K. A; GARCIA, P. C. A & RECCO-PIMENTEL, S. M. Descrição do cariótipo, padrão de banda C e localização da NOR de *Aplastodiscus perviridis* (Amphibia, Anura). **47º Congresso Nacional de Genética**.:Águas de Lindóia, 2001, CD-ROM.
- CEDERGREN, R.; GRAY, M. W.; ABEL, Y. & SANKOFF, D. The evolutionary relationships among known life forms. **J. Mol. Evol.** **28**: 98-112, 1988.
- CHANTELL, C. J. Some mio-pliocene hylids from the valentine formation of Nebraska. **Am. Midl. Nat.** **72**: 211-225, 1964
- CHEK, A **On species and speciation: what are appearances worth?** Doctor thesis. The University of Guelph, p. 246, 1999.
- CHEK, A. A.; LOUGHEED, S. C.; BOGART, J. P. & BOAG, P. T. Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** **18(3)**: 370-385, 2001.
- CHERRY, M. L.; CASE, S. M. & WILSON, A C. Frog perspective on the morphological difference between humans and chimpanzees. **Science** **200**: 209-211, 1978.
- CLARY, D. O & WOLSTENHOLME, D. R. The mtDNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. **J. Mol. Evol.** **22**: 252-271, 1985.
- CLARY, D. O & WOLSTENHOLME, D. R. *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A+T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. **J. Mol. Evol.** **25**: 116-125, 1987.
- CLAYTON, D. A. Replication of animal mitochondrial DNA. **Cell** **28**: 693-705, 1982.
- CLAYTON, D. A Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. **Int. Rev. Cytol.** **141**: 217-232, 1992.

- COGGER, H. G. & ZWEIFEL, R. G. **Encyclopedia of Reptiles & Amphibians**. Academic Press, Natural Word, San Diego, 132p., 1998.
- COLE, C. J. Chromosome evolution in selected treefrogs including Casque-Headed species (*Pternohyla*, *Priprion*, *Hyla* and *Smilisca*). **Amer. Mus. Nov.** **2541**: 1-10, 1974.
- COMINGS, D. E.; AVELINO, E.; OKADA, T. A. & WYANDT, H. E. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. **Exp. Cell Res.** **77**: 469-93, 1973.
- CORDONIER, A. M.; VANNIER, P. A. & BRUN, G. M. A restriction map of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA. **Eur. J. Biochem.** **126**: 119-127, 1982.
- CRUZ, C. A. G. & CARAMASCHI, U. Definição, composição e distribuição geográfica do grupo de *Hyla polytaenia* Cope, 1870 (Amphibia, Anura, Hylidae). **Bol. Mus. Nac. Zool.** **392**: 1-19, 1998.
- CUMMINGS, M. P.; OTTO, S. P. & WAKELEY, J. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. **Mol. Biol. Evol.** **12**: 814-822, 1995.
- DA SILVA, M. N. F. & PATTON, J. L. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. **Mol. Ecol.** **7**: 475-486, 1998.
- DAWID, I. B. & BLAKLER, A. W. Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. **Develop. Biol.** **29**: 152-161, 1972.
- DENINGTON, S. L. The *Litoria ewingi* complex (Anura: Hylidae) in south-eastern Australia. IX. Variation in mitochondrial DNA across a narrow zone of hybridization between *L. ewingi* and *L. paraewingi*. **Aust. J. Zool.** **33**: 43-152, 1985.
- DIMITRI, P. Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. **Genetica** **100**: 85-93, 1997.
- DUELLMAN, W. E. A reassessment of the taxonomic status of some neotropical Hyliid frogs. **Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Kansas** **27**: 1-27, 1974.
- DUELLMAN, W. E. On the classification of frogs. **Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kans.** **42**: 1-14, 1975.
- DUELLMAN, W. E. Quaternary climatic-ecological fluctuations in the lowland-tropics: frogs and forests. In: **Biological Diversification in the Tropics**. G. T. Prance ed. Columbia University Press, N.Y., pp.389-402, 1982.
- DUELLMAN, W. E. & CRUMP, M. L. Speciation in frogs of the *Hyla parviceps* group in the Upper Amazon Basin. **Occ. Pap. Mus. Nat. Hist. Kansas** **23**: 1-40, 1974.

- DUELLMAN, W. E. & PYLES, R. A. Acoustic resource partitioning in anurans communities. **Copeia**: 639-649, 1983.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. R. Frogs of the *Hyla columbiana* group: taxonomy and phylogenetic relationships. In: **Advances in Herpetology and Evolutionary Biology**. A G. J. Rhodin & K. Miyata eds. Mus. Comp. Zool. Harvard. Univ., Cambridge, pp. 33-51, 1983.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill, New York, 1986.
- DUELLMAN, W.E.; I. DE LA RIVA & E.R. WILD. Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. **Scientific Papers Natural History Museum the University Kansas**. 3: 1-41, 1997.
- DUNON-BLUTEAU, D.; VOLOVITCH, M. & BRUN, G. Nucleotide sequence of a *Xenopus laevis* mitochondrial DNA fragment containing the D-loop, flanking tRNA genes and the apocytochrome b gene. **Gene** 36: 65-78, 1985.
- EMERSON, S. B.; INGER, R. F. & ISKANDAR, D. Molecular systematics and biogeography of the fanged frogs of southeast Asia. **Mol. Phylogenet. Evol.** 16(1): 131-142, 2000.
- FEDEROFF, N. V. On spacers. **Cell** 16: 697-710, 1979.
- FOOTE, D. L.; WILEY, J. E.; LITTLE, M. L. & MEYNE, J. Ribosomal RNA genes site polymorphism in *Bufo terrestris*. **Cytogenet. Cell Genet.** 57: 196-199, 1991.
- FORD, E. B. **Mendelism and Evolution**. Methuen, London, pp. 342, 1960.
- FORMAS, J. R. & CUEVAS, C. C. Comparative cytogenetic analysis of the Chilean leptodactylidae frog genus *Telmatobufo*, with the discription of the chromosomes of *T. venustus*. **Proc. Biol. Soc. Washington** 113: 890-899, 2000.
- FROST, D. R. (2002). **Amphibian Species of the World: an online reference**. V2.21 (15 July 2002). Electronic database available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- GARCIA, P. C. & HADDAD, C. F. B. Análise das vocalizações de anúncio (advertisement calls) das espécies de *Hyla* relacionadas ao complexo de *Hyla marginata/semiguttata* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Res.Vº Cong. Lat. Amer. Herpet.**: 64, 1999.

- GARCIA, P. C., VINCIPROVA, G. & HADDAD, C. F. B. Vocalização, girino, distribuição geográfica e novos comentários sobre *Hyla marginata* Boulenger, 1887 (Anura, Hylidae, Hylinae). **Bol. Mus. Nac. Zool.** **460**: 1-19, 2001.
- GARTSIDE, D. F. Analysis of a hybrid zone between chorus frogs of the *Pseudacris nigrita* complex in the southern United States. **Copeia**: 56-66, 1980.
- GASTON, K. J. & WILLIAMS, P. H. Spatial patterns in taxonomic diversity. In: **Biodiversity: a biology of numbers and difference**. K. J. Gaston ed. Blackwell Science, Mississauga, Notario, pp. 202-229, 1996.
- GATTI, M. & PIMPINELLI, S. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Ann. Rev. Genet.** **26**: 239-75, 1992.
- GEMMELL, N. J.; WESTERN, P. S.; WATSON, J. M. & MARSHALL GRAVES, J. A. Evolution of the mammalian mitochondrial control region – comparisons of control region sequences between monotreme and therian mammals. **Mol. Biol. Evol.** **13**: 798-808, 1996.
- GERHARDT, H. C.; PTACEK, M. B.; BARNETT, L. & TORKE, K. G. Hybridization in the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. **Copeia** (1): 51-59, 1994.
- GISSI, C.; GULLBERG, A. & ULFUR, A. The complete mitochondrial DNA sequences of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. **Genomics** **50**: 161-169, 1998.
- GOEBEL, A.M.; DONNELLY, J. M. & ATZ, M. E. PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. **Mol Phylogenet. Evol.** **11**(1): 163-199, 1999.
- GOESSENS, G. Nucleolar structure. **Int. Rev. Cytol.** **87**: 107-158, 1984.
- GOLLMANN, G. Population structure of Australian frogs (*Geocrinia laevis* complex) in a hybrid zone. **Copeia**: 593-602, 1991.
- GOLLMANN, B. & GOLLMANN, G. Morphology variation in tadpoles of the *Geocrinia laevis* complex: regional divergence and hybridization (Amphibia, Anura, Myobatrachinae). **J. Zool. Syst. Evol. Res.** **33**: 32-41, 1995.
- GRAUR, D. & LI, W-H. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, p. 481, 2000.

- GRAYBEAL, A. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. **Zool. J. Lin. Soc.** **119**: 297-338, 1997.
- GREEN, D. M. Allozyme variation through a clinal hybrid zone between the two toads *Bufo americanus* and *B. hemiophrys* in southeastern Manitoba. **Herpetologica** **39**: 28-40, 1983.
- GREEN, D.M. Differentiation in amount of centromeric heterochromatin between subspecies of the red-legged frog, *Rana aurora*. **Copeia** **1985**: 1071-1074, 1985.
- GREEN, D.M. Heteromorphic sex chromosomes in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zealand. **J. Heredity** **79**: 165-9, 1988.
- GREEN, D.M. & SHARBEL, T.F. Comparative cytogenetics of the primitive frog, *Leiopelma archeyi* (Anura, Leiopelmatidae). **Cytog. Cell Genet.** **47**: 212-6, 1988.
- GREEN, D. M., and S. K. SESSIONS. Nomenclature for chromosomes. In: **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. D. M. Green and S. K. Sessions eds., pp. 431-432. Academic Press, San Diego, 1991.
- GROHOVAZ, G. S.; HARLEY, E. & FABIAN, B. Significant mitochondrial DNA sequence divergence in natural populations of *Xenopus laevis* (Pipidae) from southern Africa. **Herpetologica** **52(2)**: 247-253, 1996.
- GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F. B. & KASAHARA, S. Análise citogenética de espécies de *Hyla* (Anura, Hylidae) com 30 cromossomos. **Gen. Mol. Biol.** **23(3)**: 43, 2000.
- GUTTMAN, S. I. Biochemical studies of anuran evolution. **Copeia**: 292-309, 1985.
- GYLLESTEIN, U.; WHARTON, D.; JOSEFSSON, A. & WILSON, A. C. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. **Nature** **352**: 255-257, 1991.
- HÄRLID, A; JANKE, A. & ÁRNASON, U. The complete mitochondrial genome of *Rhea americana* and early avian divergences. **J. Mol. Evol.** **46**: 669-679, 1998.
- HARRISON, R. G. **Hibrid Zones and the Evolutionary Process**. Oxford university Press, New York, 1993.
- HASS, C. A.; DUNSKI, J. F. & MAXSON, L. R. Divergence lineages within the *Bufo margaritifera* complex (Amphibia: Anura; Bufonidae) revealed by albumin immunology. **Biotropica** **27**: 238-249, 1995.

- HAY, J. M.; RUVINSKY, I.; HEDGES, S. B. & MAXSON, L. R. Phylogenetic relationships of Amphibians families inferred from DNA sequence of mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. **Mol. Biol. Evol.** **12**(5): 928-937, 1995.
- HEDRICK, P. W. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** **17**: 535-566, 1986.
- HEDRICK, P. W.; GINEVAN, M. E. & EWING E. P. Genetic polymorphism in heterogeneous environments. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** **7**: 1-32, 1976.
- 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.
- HILLIS, D. & DAVIS, S. K. Evolution of ribosomal DNA: fifty million years of recorded history in the frog genus *Rana*. **Evolution** **40**: 1275-1288, 1986.
- HILLIS, D. & DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quant. Rer. Biol.** **66**: 411-453, 1991.
- HILLIS, D. M. MORITZ, C. & MALE, B. K. **Molecular Systematics**. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, 1996.
- HIXSON, J. E.; WONG, T. W. & CLAYTON, D. A. Both the conserved stem-loop and divergence 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand replication. **J. Biol. Chem.** **261**: 2384-2390, 1986.
- HOFFMAN, E. A. & BLOUIN, M. S. A review of colour and pattern polymorphisms in anurans. **Biol. J. Linn. Soc.** **70**: 633-665, 2000.
- HOFFMAN, R. J.; BOORE, J. L. & BROWN, W. M. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Genetics** **131**: 397-412, 1992.
- HOLMQUIST, G. The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination. **Chromosoma** **72**: 203-24, 1979.
- HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia** **36**: 1014-5, 1980.
- HSU, T.C.; SPIRITO, S.E. & PARDUE, M.L. Distribution of 18S+28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma** **53**: 23-36, 1975.

- JACOBS, H. T.; ELLIOT, D. J.; MATH, V. B. & FARQUHARSON, A. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. **J. Mol. Biol.** **201**: 185-217, 1988.
- JANKE, A.; FELDMAIER-FUNCHS, G.; THOMAS, W. K.; VON HAESLER, T. & PÄÄBO, S. The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. **Genetics** **137**: 243-256, 1994.
- JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: **Heterochromatin Molecular and Structural Aspects**. R. S. VERMA ed.. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1-147, 1988.
- JOHN, B. & KING, M. The inter-relationship between heterochromatin distribution and chiasma distribution. **Genetica** **66**: 183-94, 1985.
- KAISER, H.; MAIS, C.; BOLAÑOS, F.; STEINLEIN, C.; FEITCHTINGER, W. & SCHMID, M. Chromosomal investigation of three Costa Rica frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica** **98**: 95-102, 1996.
- KASAHARA, S.; SILVA, A P. Z.; HADDAD, C. F. B. & GARCIA, P. C. A. Utilização de fluorocromos base-específicos e de técnica de FISH com sondas de DNAr em cromossomos de anfíbios anuros. **47º Congresso Nacional de Genética**. Águas de Lindóia: Digito S/C Ltda, CD-ROM, 2001.
- KING, M. C-banding on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma** **80**: 191-217, 1980.
- KING, M. Evolution of heterochromatin in the Amphibia genome. In: **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. M. G. GREEN & S. K. SESSIONS eds. Academic Press, San Diego. pp. 359-91, 1991.
- KING, M.; CONTRERAS, N. & HONEYCUTT, R.L. Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. **Genetica** **80**: 17-29, 1990.
- KOBEL, H. R.; BARANDUN, B. & THIEBAUD, C. H. Mitochondrial rDNA phylogeny in *Xenopus*. **Herpetol. J.** **8(1)**: 13-17, 1998.
- KOCHER, T. D. & SAGE, R. D. Further genetic analysis of a hybrid zone between leopard frogs (*Rana pipiens* complex) in central Texas. **Evolution** **40**: 21-33, 1986.

- KONDO, R.; SATTA, Y.; MATSUURA, E. T.; ISHIWA, H.; TAKAHATA, N. & CHIGUSA, S. I. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. **Genetics** **126**: 657-663, 1990.
- KUMAZAWA, Y. & NISHIDA, M. Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes deepbranch animal phylogenetics. **J. Mol. Evol.** **37**: 380-398, 1993.
- KUMAZAWA, Y. & NISHIDA, M. Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. **Mol. Biol. Evol.** **12**: 759-772, 1995.
- KUMAZAWA, Y. & NISHIDA, M. Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. **Mol. Biol. Evol.** **16**: 784-792, 1999.
- KUMAZAWA, Y.; OTA, H.; NISHIDA, M. & OZAWA, T. Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. **Mol. Biol. Evol.** **13**: 1242-1254, 1996.
- KUMAZAWA, Y.; OTA, H.; NISHIDA, M. & OZAWA, T. The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. **Genetics** **150**: 313-329, 1998.
- KURAMOTO, M. A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. **Bul. Fukuoka Univ. Ed.** **39**: 83-127, 1990.
- LAMB, T. & AVISE, J. C. Directional introgression of mitochondrial DNA in a hybrid population of treefrogs: the influence of mating behavior. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**: 2526-2530, 1986.
- LAMB, T.; SULLIVAN, B. K. & MALMOS, K. Mitochondrial gene markers for the hybridizing toads *Bufo microscaphus* and *Bufo woodhousii* in Arizona. **Copeia**: 234-237, 2000.
- LANGONE, J.A. Caráterización, sinonimia y distribución geográfica de *H. marginata* Boulenger 1887 (Amphibia, Anura, Hylidae). **Res. III Cong. Lat. Herp.**: 228, 1993.
- LEE, H. Y.; PARK, O. Y.; OH, S. J. & YANG, S. Y. The intra- and interpopulational genetic variation in mitochondrial DNA of Korean *Hyla japonica*. **Korean J. Genet.** **18(1)**: 15-24, 1996.

- LEE, W. J. & KOCHER, T. D. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization. **Genetics** **13**: 873-887, 1995.
- LEITCH, I. J. & HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of the 19S-5,8S-26S rRNA genes in barley by in situ hybridization. **Genome** **35**: 1013-1018, 1992.
- LESSINGER, A. C. & AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. **Med. Veter. Entomol.** **14**:71-80, 2000.
- LEWIN, B. How many genes are there? In: **Genes VII**. Oxford University Press. pp.67-87, 2000.
- LI, N. H.; WU, C. I. & LUO, C. C. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotid substitutions in pseudo genes and its evolutionary implications. **J. Mol. Evol.** **21**: 58-71, 1984.
- LITTLEJOHN, M. J. & WATSON, G. F. Hybrid zones and homogamy in Australian frogs. **Ann. Ver. Ecol. Syst.** **16**: 85-112, 1985.
- LIU, W.; LATHROP, A; FU, J.; YANG, D. & MURPHY, R. W. Phylogeny of east asian bufonids inferred from mitochondrial DNA sequences (Anura: Amphibia). **Mol. Phylogenet. Evol.** **14**(3): 423-435, 2000.
- LYNCH, J. D. Refugia. In: **Analitical Biogeography**. A A MYERS & P. S. GILLER eds. Chapman and Hall, London. Pp. 311-342, 1988.
- LONG, E. O. & DAWID, I. B. Repetead genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Bioch.**, **49**: 727-64, 1980.
- LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. & CARDOSO, A J. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescent *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 *Paratelmatobios* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. **Hereditas** **133**: 201-209, 2000.
- LOYDL, J. Further evidence for a heterochromatin-chiasma correlation in some *Allium* species. **Genetica** **60**:31-5, 1982.

- LUNT, D. H. & HYMAN, B. C. Animal mitochondrial DNA recombination. **Nature** **387**:247, 1997
- LUTZ, B. **Brasilian species of the *Hyla***. Universidade do Texas Press, Austin & London. pp. 74-85, 1973.
- MABLE, B. K. & ROBERTS, J. D. Mitochondrial DNA evolution of tetraploids in the genus *Neobatrachus* (Anura: Myobatrachidae). **Copeia** (4): 680-689, 1997.
- MACEY, J. M.; STRASBURG, J. L.; BRISSON, J. A.; VREDENBURG, V. T.; JENNINGS, M. & LARSON, A. Molecular phylogenetics of western north american frogs of the *Rana boylei* species group. **Mol. Phylogenet. Evol.** **19**(1): 131-143, 2001.
- MACEY, J. R.; LARSON, A.; ANANJEVA, N. B.; FANG, Z. & PEPENFUSS, T. J. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. **Mol. Biol. Evol.** **14**: 91-104, 1997.
- MACEY, R. J.; SCHULTE, J. A.; LARSON, A.; FANG, Z.; WANG, Y.; TUNIYEV, B. S. & PEPENFUSS, T. J. Phylogenetic relationships of toads in the *Bufo bufo* species group from the eastern escarpment of the Tibetan Plateau: A case of vicariance and dispersal. **Mol. Phylogenet. Evol.** **9**: 80-87, 1998.
- MAXSON, L. R. molecular probes of phylogeny and biogeography in toads of the widespread genus *Bufo*. **Mol. Biol. Evol.** **4**: 345-356, 1984.
- MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963.
- MCGUIGAN, K.; McDONALD, K.; PARRIS, K. & MORITZ, C. Mitochondrial DNA diversity and historical biogeography of a rainforest restricted frog (*Litoria pearsoniana*) from south-east Queensland. **Mol. Ecol.** **7**(2): 175-186, 1998.
- McKNIGHT, M. L. & SHAFFER, H. B. Large, rapidly evolving intergenic spacers in the mitochondrial DNA of salamander family Ambystomatidae (Amphibia: Caudata). **Mol. Biol. Evol.** **14**(11): 1167-1176, 1997.
- MEDEIROS, L. R. **Estudo citogenético das espécies *Hyla nana* e *Hyla samborni* (Anura, Hylidae)**. Dissertação 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.

- MIURA, I. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog, *Rana japonica* II. Sex-linkage analyses of the nucleolar organizer regions in chromosomes n° 4 of the Hiroshima and Saeki populations. **Zool. Sci.** 11: 807-15, 1994.
- MIURA, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). **Chromosoma** 103:567-74, 1995.
- MIURA, I.; NISHIOKA, M.; BORKIN, L. J. & WU, Z. The origin of the brown frogs with $2n = 24$ chromosomes. **Experientia** 51: 179-88, 1995.
- MIYA, R. & NISHIDA, M. Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. **Mar. Biotech.** 1: 416-426, 1999.
- MIYATA, T.; HAYASHIDA, H.; KIKUNO, R.; HAGESAGAWA, M.; KOBAYASHI, M. & KOIKE, K. Molecular clock of silent substitution: at least sixfold preponderance of silent changes in mitochondrial genes over those in nuclear genes. **J. Mol. Evol.** 19: 28-35, 1982.
- MONACO, P. J.; RASCH, E. M. & MUSICH, P. R. Polymorphism in ribosomal DNA of a unisexual fish, *Poecilia formosa*. **Copeia** 3: 777-780, 1988.
- MONNEROT, M.; MOUNOLOU, J. C. & SOLIGNAC, M. Intra-individual length heterogeneity of *Rana esculenta* mitochondrial DNA. **Biol. Cell** 52: 213-218, 1984.
- MORESCALCHI, A. Hypotheses on the phylogeny of the Salientia, based on karyological data. **Experientia** 24: 964-6, 1968.
- MORESCALCHI, A. Cytogenetics and the problem of Lissamphibian relationships. In: **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**. E. OLMO ed.. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 1-19, 1990.
- MORITZ, C. & HILLIS, D. M. Molecular systematics: context and controversies. In: **Molecular Systematics**. D. M. Hillis; C. Moritz & B. K. Mable. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, 1996.
- MULCAHY, D. G. & MENDELSON, J. R. Phylogeography and speciation of the morphologically variable, widespread species *Bufo valliceps*, based on molecular evidence from mtDNA. **Mol. Phyl. Evol.** 17(2): 173-189, 2000.

- NARDI, I.; BARSACCHI-PILONE, G. & ANDRONICO, F. Chromosomal location of the rRNA genes in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). **Chromosoma** **64**: 67-84, 1977.
- NUÑEZ, J. J.; ZÁRRAGA, A. M. & FORMAS, J. R. New molecular and morphometric evidence for the validation of *Eupsophus calcaratus* and *E. roseus* (Anura: Leptodactylidae) in Chile. **Stud. Neotrop. Fauna & Env.** **34**: 150-155, 1999.
- NUR, U. & NEVO, E. Supernumerary chromosomes in the cricket frog, *Acris crepitans* (Amphibia, Salientia). **Caryologia** (**22**): 97-102, 1969.
- OKIMOTO, R.; CHAMBERLIN, H.; MacFARLANE, J.L. & WOLSTENHOLME, D. Repeated sequence sets in mitochondrial DNA molecules of root-knot nematodes (*Meloidogyne*): nucleotide sequences, genome location and potential for host-race identification. **Nucleic. Acids Res.** **19**: 1619-1626, 1991.
- OKIMOTO, R.; MacFARLANE, J.L.; CLARY, D. O & WOLSTENHOLME, D. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. **Genetics** **130**: 471-498, 1992.
- PARDUE, M.L. & HENNING, W. Heterochromatin: junk or collectors item? **Chromosoma** **100**: 3-7, 1990.
- PATHAK, S. & ARRIGHI, F. E. Loss of DNA following C-banding procedures. **Cytog. Cell Gen.** **12**: 414-22, 1973.
- PEREIRA, S. L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Gen. Mol. Biol.** **23**(4): 745-752, 2000.
- POMBAL, Jr. P. & HADDAD, C. F. B. *Hyla luctuosa*, a new treefrog from Southeastern Brazil (Amphibia, Hylidae). **Herpetologica** **49**(1): 16-21, 1993.
- POUGH, F.V.; ANDREWS, R.W.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H. & WELLS, K.D.. **Herpetology**. Upper Saddle River. Prentice-Hall, Inc. XI+577p, 1998.
- PRAMUK, J. B.; HASS, C. A. & HEDGES, S. B. Molecular phylogeny and biogeography of west Indian toads (Anura: Bufonidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** **20**(2): 294-301, 2001.
- PTACEK, M. B.; GERHARDT, H. C. & SAGE, R. D. Speciation by polyploidy in treefrogs: multiple origins of the tetraploid, *Hyla versicolor*. **Evolution** **48**(3): 898-908, 1994.

- RABELLO, M.N. Chromosomal studies in brazilian anurans. **Caryologia** **23**(1): 45-59, 1970.
- RABER, S. C. **Caracterização cromossômica de *Hyla bischoffi* e *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae)**. Dissertação de mestrado - UNICAMP, 2000.
- RAND, D. M. Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. **J. Mol. Evol.** **37**: 281-295, 1993.
- REEDER, T. Phylogenetic relationships among Phrynosomatid lizards as inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences: substitutional bias and information content of transitions relative to transversions. **Mol. Phylogenet. Evol.** **4**: 203-222, 1995.
- REIG, O. A. Propositiones para una nueva macrosystematica de los anuros. Nota preliminar. **Phycis** **21**: 109-118, 1958.
- REILLY, J. G. & THOMAS, C. A Length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. **Plasmid** **3**: 109-115, 1980.
- REUTER, G. & SPIERERS, P. Position effect variegation and chromatin protein. **Bioassays** **14**: 605-612, 1992.
- RICHARDS, C. M. & MOORE, W. S. A phylogeny for the African treefrog family Hyperoliidae based on mitochondrial rDNA. **Mol. Phylogenet. Evol.** **5**: 522-532, 1996.
- RIVERO, J. A. On the identity and relationships of *Hyla luteocellata* Roux (Amphibia, Salientia). **Herpetologica** **25**: 126-134, 1969.
- ROBIN, E. D. & WONG, R. Mitochondrial Dna molecules and virtual number of mitochondrial per cell in mammalian cells. **J. Cell. Physiol.** **136**: 507-513, 1988.
- ROE, B. A.; MA, D. P.; WILSON, R. K. & WONG, F. H. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. **J. Biol. Chem.** **260**: 9759-9774, 1985.
- ROSA, C. **Estudo citogenético em espécies do gênero *Megaelosia* (Anura, Hylodinae)**. Dissertação de Mestrado – Unicamp, pp. 1-56, 2001.
- RUVINSKY, I. & MAXSON, L. R. Phylogenetic relationships among bufonoid frogs (Anura: Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** **5** (3): 533-547, 1996.

- SACCONE, C.; ATTIMONELLI, M. & SBISÁ, E. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. **Mol. Evol.** **33**: 83-91, 1991.
- SAEZ, F. A. & BRUM, N. Chromosome os South American amphibians. **Nature** **185**: 945, 1960.
- SALDUCCI, M-D.; MARTY, C.; CHAPPAZ, R. & GILLES, A. Molecular phylogeny of French Guiana Hylineae: implications for systematic and biodiversity of the Neotropical frogs. **C. R. Biologies** **325**: 141-153, 2002.
- SANDERSON, N.; SZYMURA, J. M. & BARTON, N. H. Variation in mating call across the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*. **Ibid.** **46**: 595-607, 1992.
- SAUNDERS, N. C.; KESSLER, L. G. & AVISE, J. C. Genetic variations and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. **Genetics** **112**: 613-627, 1986.
- SAVILLE, B. J.; KOHLI, Y. & ANDERSON, J. B. mtDNA recombination in a natural population. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**: 1331-1335, 1998.
- SCHÄUBLE, C. S.; MORITZ, C. & SLADE, R. W. A molecular phylogeny for the frog genus *Limnodynastes* (Anura: Myobatrachidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** **16**(3): 379-391, 2000.
- SCHAWARZACHER, H.G. & WACHTLER, F. The nucleolus. **Anat. Embryol.** **188**: 515-536, 1993.
- SCHAWARZACHER, H.G. & MOSGOELLER, W. Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structure and function. **Cytogenet. Cell Genet.** **91**: 243-252, 2000.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers 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**: 131-48, 1978b.
- SCHMID, M. Chromosome Banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma** **87**: 327-44, 1982.

- SCHMID, M.; OLERT, J. & KLETT, C. Chromosome Banding in Amphibia III. Sex chromosome in *Triturus*. **Chromosoma** 71: 29-55, 1979.
- 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: 139-45, 1986.
- SCHMID, M.; OHTA, S.; STEINLEIN, C. & GUTTENBACH, M. Chromosome Banding in Amphibia XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Burgeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). **Cytog. Cell Genet.** 62: 238-46, 1993.
- SCHMID, M.; NANDA, I.; STEINLEI, C.; KAUSCH, K. & HAAF, T. Sex-determining mechanism and sex chromosome in Amphibia. In: **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. M. G. GREEN & S. K. SESSIONS eds. Academic Press, San Diego. pp. 393-430, 1991.
- SCHMID, M.; FEICHTINGER, W.; WEIMER, R.; MAIS, C.; BOLANÕS, F. & LEÓN, P. Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). **Cytog. Cell Genet** 69: 18-26, 1995.
- SCHMID, M.; STEINLEI, C.; FRIEDL, R.; DE 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: 413-23, 1990.
- SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B. & KASAHARA, S. Nucleolus organizer region in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. **Hereditas** 131: 135-141, 1999.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A; CRESPI, B.; LIU, H. & FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Ent. Soc. Am.** 87(6): 651-701, 1994.
- SLADE, R. W. & MORITZ, C. Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced ranges. **Proc. R. Soc. Lond. B** 265: 769-777, 1998.
- SMITH, M. J.; ARNDT, A.; GORSKI, S. & FAJBER, E. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. **J. Mol. Evol.** 36:545-554, 1993.

- SPOLSKY, C. & UZZELL, T. Evolutionary history of the hybridogenetic frog *Rana esculenta* as deduced from mtDNA analysis. **Mol. Biol. Evol.** 3: 44-56, 1986.
- STANTON, D. J.; DAEHLER, L. L.; MORITZ, C. C. & BROWN, W. M. Sequences with the potential to form stem-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA. **Genetics** 137: 233-241, 1994.
- SULLIVAN, B. K. & LAMB, T. Hybridization between the toads *Bufo microscaphus* and *Bufo woodhousii* in Arizona: variation in release calls and allozymes. **Herpetologica** 44: 325-333, 1988.
- SUMIDA, M. Inheritance of mitochondrial DNAs and allozymes in the female hybrid lineage of two Japanese pond frog species. **Zool. Sci.** 14: 277-286, 1997a.
- SUMIDA, M. Mitochondrial DNA differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica* as revealed by restriction endonuclease analysis. **Genes Genet. Syst.** 72: 79-90, 1997b.
- SUMIDA, M. & OGATA, M. Intraspecific differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica* inferred from mitochondrial DNA sequences of the cytochrome b gene. **Zool. Sci.** 15: 989-1000, 1998.
- SUMIDA, M.; OGATA, M.; KANEDA, H. & YONEKAWA, H. Evolutionary relationships among Japanese pond frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. **Genes Genet. Syst.** 73: 121-133, 1998.
- SUMIDA, M.; KANEDA, H.; KATO, Y.; KANAMORI, Y.; YONEKAWA, H. & NISHIOKA, M. Sequence variation and structural conservation in the D-loop region and flanking genes of mitochondrial DNA from Japanese pond frogs. **Genes Genet. Syst.** 75: 79-92, 2000.
- SUMMERS, K.; WEIGT, L. A.; BOAG, P. & BERMINGHAM, E. The evolution of female parental care in poison frogs of the genus *Dendrobates*: evidence from mitochondrial DNA sequences. **Herpetologica** 55(2): 254-270, 1999.
- SUMMERS, K.; BERMINGHAM, E.; WEIGT, L.; McCAFFERTY, S. & DAHLSTROM, L. Phenotypic and genetic divergence in three species of dart-poison frogs with contrasting parental behavior. **J. Heredity** 88: 8-13, 1997.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** 75: 304-6, 1972.

- SUMNER, A.T. C-banding and related methods. In: **Chromosome Banding**. Unwin Hyman, 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.
- SZYMURA, J. M. & BARTON, N. H. The genetic structure of the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*: comparison between transects and between loci. **Evolution** **45**: 237-261, 1991.
- SZYMURA, J. M.; SPOLSKY, C. & UZZELL, T. Concordant change in mitochondrial and nuclear genes in a hybrid zone between two frog species (genus *Bombina*). **Experientia** **41**: 1469-1470, 1985.
- TAANMAN, J. W. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. **Biochem. Biophys. Acta** **1410**: 103-123, 1999.
- TAGLIARO, C. H.; SCHANEIDER, M. P. C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. C. & STANHOPE, M. J. Marmoset phylogenetics, conservation perspective, and evolution of the mtDNA control region. **Mol. Biol. Evol.** **14**(6): 674-684, 1997.
- TANAKA, T.; MATSUI, M. & TAKENAKA, O. Phylogenetic relationships of Japanese brown frogs (*Rana*: Ranidae) assessed by mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. **Bioch. Syst. Ecol.** **24**: 299-307, 1996.
- THYAGARAJAN, B.; PADUA, R. A & CAMPBELL, C. Mammalian mitochondria posses homologous DNA recombination activity. **J. Biol. Chem.** **271**: 27536-27543, 1996.
- TITUS, T. A.; HILLIS, D. M. & DUELLMAN, W. E. Color polymorphism in neotropical treefrogs: An allozymic investigation of the taxonomic status of *Hyla favosa* Cope. **Herpetologica** **45**: 17-23, 1989.
- TZENG, C. S.; HUI, C. F.; SHEN, S. C. & HUANG, P. C. The complete nucleotide sequence of the *Crossostoma lacustre* mitochondrial genome: conservation and variation among vertebrates. **Nucl. Acids Res.** **20**: 4853-4858, 1992.
- URSING, B. M. & ARNASON, U. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). **J. Mol. Evol.** **47**: 302-306, 1998.

- VEIGA, A. C. P. **Estudo citogenético comparativo de espécies do gênero *Colostethus* (Anura – Dendrobatidae)**. Dissertação de Mestrado – Unicamp, pp. 1-75, 2000.
- VENCES, M.; KOSUCH, J.; LÖTTERS, S.; WIDMER, A.; JUNGFER, K.-H.; KÖHLER, J. & VEITH, M. Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12S ribosomal RNA genes sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** **15**(1): 34-40, 2000.
- WARD, D.C.; REICH, E. & GOLDBERG, I.H. Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs. **Science** **149**: 1259-63, 1965.
- WEBB, B.S. & MOUGEY, E.B. News from the nucleolus: rRNA gene expression. **TIBS** **16**: 58-62, 1991.
- WEST-EBERHARD, M. J. Sexual selection, social competition and speciation. **Q. Rev. Biol.** **58**: 155-183, 1983.
- WILEY, J. E. Chromosome banding patterns of treefrogs (Hylidae) of the eastern United States. **Herpetológica** **38**: 507-20, 1982.
- WILEY, J. E.; LITTLE, M. L.; ROMANO, M. A.; BLOUNT, D.A. & CLINE, G. R. Polymorphism in the location of the 18S and 28S rRNA genes on the chromosomes of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Chromosoma** **97**: 481-7, 1989.
- WILKINSON, J. A.; MATSUI, M. & TERACHI, T. Geographic variation in a Japanese tree frog (*Rhacophorus arboreus*) revealed by PCR-aided restriction site analysis of mtDNA. **J. Herp.** **30**(3): 418-423, 1996.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.** **51**: 221-271, 1987.
- WOLSTENHOLME, D. R. & CLARY, D. O. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. **Genetics** **109**: 725-744, 1985.
- WOLSTENHOLME, D. R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. **Int. Rev. Cytol.** **141**: 173-216, 1992.
- WONG, J. F. H.; MA, D. P.; WILSON, R. K. & ROE, B. A. DNA sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial heavy and light strand replication origins and flanking tRNA genes. **Nucl. Acid Res.** **14**(11): 4977-4995, 1983.
- WOODRUFF, D. S. Postmating reproductive isolation in *Pseudophryne* and the evolutionary significance of hybrid zones. **Science** **203**: 561-563, 1989.

- YAMAZAKI, N.; UESHIMA, R.; TERRETT, J. A.; YOKOBORI, S. I.; KAIFU, M.; SEGAWA, R.; KOBAYASHI, T.; NUMACHI, K. I.; UEDA, T.; NISHIKAWA, K.; WATANABE, K. & THOMAS, R. H. Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene order organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual tRNA secondary structures. **Genetics** **145**: 749-758, 1997.
- YANG, Y. J.; LIN, Y. S.; WU, J. L. & HUI, C. F. Variation in mitochondrial DNA and population structure of the Taipei treefrog *Rhacophorus taipeianus* in Taiwan. **Mol. Ecol.** **3**: 219-228, 1994.
- YOKOBORI, S.; HASEGAWA, M.; UEDA, T.; OKADA, N.; NISHIKAWA, K. & WATANABE, K. Relationship among coelacanths, lungfishes, and tetrapods: A phylogenetic analysis based on mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences. **J. Mol. Evol.** **38**: 602-609, 1994.
- YONEYAMA, Y. The nucleotide sequence of the heavy and light strand replication origins of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome. **J. Nippon Méd. Sch.** **54**: 429-440, 1987.
- ZAMUDIO, K. R.; JONES, K. B. & WARD, R. H. Molecular systematics of short horned lizards: biogeography and taxonomy of a widespread species complex. **Syst. Biol.** **46**: 284-305, 1997.
- ZARDOYA, R. & MEYER, A. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the lungfish (*Protopterus dolli*) supports its phylogenetic position as a close relative of land vertebrates. **Genetics** **142**: 1249-1263, 1996.
- ZHANG, D. X. & HEWITT, G. M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Bioch. Syst. Ecol.** **25**: 99-120, 1997.
- ZHU, D.; JAMIESON, B. G. M.; HUGALL, A. & MORITZ, C. Sequence evolution and phylogenetic signal in control region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). **Mol. Biol. Evol.** **11**: 672-683, 1994.
- ZUCKERKANDL, E. & HENNIG, W. Tracking heterochromatin. **Chromosoma** **104**: 75-83, 1995.

VII. ARTIGO 1

Conserved karyotypes versus polymorphism in *Hyla pulchella* group species (Anura, Hylidae): chromosomal morphology, heterochromatin distribution and localization of nucleolar organizing region (NOR)

FERNANDO ANANIAS^{1*}, PAULO C. A. GARCIA² and SHIRLEI M. RECCO-PIMENTEL³

¹*Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP and Curso de Ciências Biológicas, Universidade Braz Cubas, Mogi das Cruzes, SP, Brasil. e-mail: feanancias@brazcubas.br*

²*Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil. e-mail: pcagarcia@bol.com.br*

³*Departamento de Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil. e-mail: shirlei@unicamp.br*

*author for corresponding at Curso de Ciências Biológicas, Universidade Braz Cubas, Av. Francisco Rodrigues Filho, 1233, CEP 08773-380, Mogi das Cruzes, SP, Brasil. Tel.

ABSTRACT

Cytogenetic analyses were done on specimens of *H. marginata* and on three populations of *H. semiguttata* differing in morphology and in the physical parameters of their advertising call, as well as in individuals of *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*). All specimens had $2n = 24$ chromosomes with a morphology very similar to that of other 24-chromosome *Hyla*. *H. semiguttata* and *H. marginata* showed the same C-banding pattern but were distinguished by the location of the NOR on pair 1 in *H. semiguttata* (in the three populations) and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*), and on pair 10 in *H. marginata*. The *H. semiguttata* populations did not differ cytogenetically, despite variations in their morphology and advertisement calls. Similarly, *H. semiguttata* and *H. p. joaquini* had identical C-banding patterns and NOR locations, suggesting that they are very closely related.

INTRODUCTION

According to LUTZ (1973), the *Hyla pulchella* group, previously known as *Hyla raddiana*, occurs in Brazil, Uruguay and Argentina. The group was defined by DUELLMAN et al. (1997) as consisting of the following species, excluding the related species of the *Hyla circumdata* group: *Hyla pulchella pulchella* Duméril and Bibron, 1841; *H. pulchella joaquini* Lutz, 1968; *H. pulchella cordobae* Barrio, 1965; *H. pulchella riojana* Koslowski, 1895; *H. andina* Müller, 1924; *H. semiguttata* Lutz, 1925; *H. marginata* Boulenger, 1887; *H. prasina* Burmeister, 1856; *H. cymbalum* Bokermann, 1963; *H. albonigra* Nieden, 1923; *H. balzani* Boulenger, 1898; *H. marianitae* Carrizo, 1992; *H. melanopleura* Boulenger, 1912 and *H. palaestes* Duellman, De La Riva & Wild, 1997. FAIVOVICH (1996) subsequently included *H. caingua* Carrizo, 1990 and CARAMASCHI and CRUZ (2000) included *H. ericae* Caramaschi and Cruz, 2000 in the *pulchella* group. In addition, GARCIA et al. (in prep.) raised the subspecies *H. p. joaquini* to the full species category because of its larger size, robust arms and distinct acoustic parameters compared to *Hyla p. pulchella*.

The characterization of the *pulchella* group is difficult. The species considered to be part of this group include those (1) a moderately robust body and a proportionally long,

wide head, (2) flanks and inner thigh areas with a pale coloration and black bars or reticulations, or dark thighs and flanks with pale spots, (3) males with hypertrophied forearms but a well developed prepolex terminating in a spine, (4) an advertising call consisting of a series of “bell type” notes, (5) reproduction in flowing water, and (6) a brown, green or gray dorsal color, generally with dark spots, reticulations or transversal bars (DUELLMAN et al., 1997).

In an attempt to clarify the relationships within the large *pulchella* group, GARCIA et al. (2001) suggested that the species *H. marginata*, *H. semiguttata*, *H. joaquinii*, *H. ericae* and others currently being described, form a subgroup within the *Hyla pulchella* group based on certain common characteristics, including the absence of stains or dark bars on the flanks and on the inner surface of the thighs, long, multi-pulsed acoustic notes, and reproduction in creeks.

Hyla marginata is found in the southern Brazilian States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina (GARCIA et al., 2001) and *H. semiguttata* Lutz in the States of Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná in Brazil, as well as in northwestern Argentina (LUTZ 1925; CEI et al. 1961; LUTZ 1973; BRAUN and BRAUN 1980). The relationship between *H. marginata* Boulenger and *H. semiguttata* LUTZ within the *pulchella* group is unclear. LUTZ (1973) suggested that *H. marginata* was similar to *H. p. joaquinii* in some characters. LANGONE (1993) considered *H. semiguttata* and *H. p. joaquinii* synonymous with *H. marginata*. Morphological differences have been observed in specimens of *H. semiguttata* from southern of Brazil and northwestern Argentina (P. C. A. GARCIA personal observation).

GARCIA and HADDAD (1999) reported the existence of different populations which they referred to as belonging to the *marginata/semiguttata* complex. Analysis of the advertising calls of populations of *H. semiguttata* and *H. marginata* showed that *H. marginata* had call parameters that differed from those of *H. semiguttata*. All populations of *H. semiguttata* studied so far (Misiones, Argentina; Cambará do Sul and São Francisco de Paula, RS, and Piraquara, PR, Brazil) show significant differences in their call patterns, which suggests the existence of more than one species under the same name.

Considering the difficulty in defining *H. marginata* and *H. semiguttata*, as well as the uncertain relationships among species of the *pulchella* group and between this and other groups (*polytaenia* and *circumdata*), the aim of this study was to cytogenetically compare

three populations of *H. semiguttata* and one population of *H. marginata* in order to clarify some of these issues.

MATERIAL AND METHODS

Specimens of *H. marginata*, *H. semiguttata* (populations of Cambará do Sul, São Francisco de Paula and Piraquara, Brazil) and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) from Argentina were collected and deposited in the collection of the Department of Zoology of the State University of São Paulo (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil (Table 1).

Chromosomal preparations was obtained after intraperitoneal injection of and aqueous solution of 2% colchicine (0.02 ml/g of body weight). After at least 4 h, the intestines and testes were removed to prepare the cell suspensions (SCHMID 1978; SCHMID et al. 1979). Metaphase preparations stained with 10% Giemsa solution were photographed with an Olympus BX60 microscope and used to determine the karyotypes. The chromosomes were classified according to their centromere position based on the nomenclature and centromeric index proposed by GREEN and SESSION (1991).

The constitutive heterochromatin pattern and NOR localization were assessed using the C-banding (SUMNER 1972) and Ag-NOR (HOWELL and BLACK 1980) techniques, respectively.

RESULTS

Karyotypes

All populations of *H. marginata*, *H. semiguttata*, and *Hyla* sp (aff. *semiguttata*) had $2n=24$ chromosomes. Pairs 1, 2, 8, 11 and 12 were metacentric, pairs 3, 5, 7, 9 and 10 were sub-metacentric, and pairs 4 and 6 were sub-telocentric (Figs. 1 and 4; Table 2). *H. marginata* had secondary constrictions in the centromeric region of the long arms of pair 10. In *H. semiguttata* (three populations) and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*), such constructions occurred in the telomeric region of the short arm of pair 1 in some metaphases (Figs. 1 and 4).

C-banding pattern

The same heterochromatin pattern was observed in *H. marginata*, *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) (Figs. 2 and 4) using the C-banding method. The centromeric regions of all chromosomes were labeled. A strong heterochromatic band was observed on the long arm of pair 10, as well as in the telomeric region of the long arm in pair 1.

Nucleolar organizing region – (NOR)

The NOR in *H. marginata* was located near of the centromeric area on the long arm of pair 10, coincident with the secondary constriction and the heterochromatin block. In *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*), the NOR occurred in the telomeric region on the short arm in pair 1 (Figs. 3 and 4).

DISCUSSION

The diploid chromosome number of $2n=24$ is common in the order Anura and occurs in species of several families (KURAMOTO 1990). Most species belonging to the genus *Hyla* show $2n=24$ or $2n=30$ chromosomes (BEÇAK 1968; RABELLO 1970; BOGART 1973; KURAMOTO 1990; SKUK and LANGONE 1992; ANDERSON 1991; BALDISSERA et al. 1993; KAISER et al. 1996), which suggests a dichotomy within the genus *Hyla*, despite the fact there are also other diploid numbers such as $2n=18$, 20, 26, 32 and 34 (KURAMOTO 1990; BALDISSERA Jr. et al, 1993). According to MIURA (1995), the appearance of *Hyla* species with $2n=24$ chromosomes can be related to a common ancestor with $2n=26$, and BOGART (1973) suggested that species with morphologically similar karyotypes can be considered to have had a common ancestor. One of the possible mechanisms to explain the change from $2n=26$ to $2n=24$ chromosomes may be related to the telomeric fusion of two chromosomes or to centric fusion (MORESCALCHI 1990). The *Hyla* species with $2n=18$, 20 and 22 chromosomes probably had their origin in the karyotype with $2n=24$ chromosomes (BOGART 1973). KING (1990) considered species with $2n=30$ chromosomes to be more evolved within this genus.

Despite the differences in external morphology among *H. semiguttata* populations, *H. marginata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*), these species show a very conserved chromosomal morphology. The karyotypes of *H. marginata*, *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) were very similar to other species of the *pulchella* group (*H. p. pulchella*, *H. caingua*, *H. prasina*, *H. p. joaquinii*) (BALDISSERA et al. 1993; ANANIAS 1996) and to *H. guentheri* and *H. bischoffi* (RABER 2000), as well as to some neotropical and holoartic *Hyla* species (BOGART 1973; ANDERSON 1991). This further demonstrated the high level of karyotype conservation.

Comparison of the constitutive heterochromatin pattern of the three species studied have with those previously described for the *pulchella* group and related species revealed that there were some common C-bands in most of them. *H. prasina* (BALDISSERA et al. 1993; ANANIAS 1996), *H. joaquinii* (ANANIAS 1996), *H. guentheri* and *H. bischoffi* (RABER 2000) had the same telomeric band in pair 1 also found in *H. marginata*, *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*). However, this band is absent in *H. caingua* and *H. p. pulchella* (ANANIAS 1996).

Although *H. marginata*, *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) are morphologically different, their constitutive heterochromatin patterns were the same, confirming that they are very closely related. In addition, *H. p. joaquinii* (São Joaquim – type location) (ANANIAS 1996) had the same heterochromatin pattern observed in *H. marginata*, *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*), suggesting that they are more closely related to each other than to other species of the group. KASAHARA et al. (1996) reported similar results in three species of *Bufo* which had striking morphological differences but a single C-band pattern, typical of species of the *marinus* group, but different from species in other groups (SCHMID 1978; 1980; 1982; MATSUI et al., 1985; SCHMID and ALMEIDA, 1988; SCHMID and GUTTENBACH 1988; HERRERO et al., 1993). *H. marginata* differed from *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) in the localization of the NOR. The Ag-NOR staining in the telomere of pair 1 in *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) and in the near of pericentromeric area of pair 10 in *H. marginata* may have arisen translocations through. *H. p. joaquinii* also had an NOR in the telomeric region of pair 1, suggesting a similarity to *H. semiguttata* and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*).

According to GARCIA and HADDAD (1999), there are differences in the advertising call among the three populations of *H. semiguttata*. However, cytogenetic analysis of these populations provides no evidence to support the hypothesis of their belonging to different taxa. On the other hand, the synonymization of *H. semiguttata* and *H. p. joaquini* to *H. marginata*, as suggested by LANGONE (1997), was not confirmed since only *H. semiguttata* and *H. joaquini* can be mistaken cytogenetically.

In conclusion, the biological differences within the *Hyla* species and populations of *H. semiguttata* studied here were not reflected in the chromosomal structure of these species, even though GOLDMAN and BARTON (1992) suggested that genetic changes should be seen in the populational structure and should influence speciation and diversification. However, this lack of chromosomal variation does not mean that there is currently no speciation in progress. Our results also show that the relationship among *H. marginata*, *H. joaquini* and *H. semiguttata* and their populations may be better understood through mitochondrial DNA analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Célio F. B. Haddad for his help in collecting the samples and Klélia Aparecida de Carvalho for her technical expertise. P.C.A.G. was supported by a scholarship from FAPESP (process nº 98/06087-9).

REFERENCES

- Ananias F, (1996). Caracterização cromossômica de espécies e subespécies de *Hyla* do grupo *pulchella* (Amphibia, Anura, Hylidae). Master thesis, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.
- Anderson K, (1991). Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. In: Amphibian Cytogenetics and Evolution. (ed M G Green and S K Sessions), Academic Press, San Diego, p. 299-331.

- Baldissera Jr. F.A, Oliveira PSL and Kasahara S, (1993). Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. Rev. Bras. Genet. 16: 335-345.
- Beçak ML, (1968). Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. Caryologia 21: 191-208.
- Bogart JP, (1973). Evolution of anuran karyotypes. In: Evolutionary biology of anurans (ed JL Vial). Univ. Missouri Press, p. 337-349.
- Braun PC and Braun CAS, (1980). Lista prévia dos anfíbios do Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, Ser. Zool., Porto Alegre 56: 121-146.
- Caramaschi U and Cruz CAG, (2000). Duas espécies novas de *Hyla* Laurenti, 1768 do Estado de Goiás, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). Bol. Mus. Nac. Zool. 422: 1-12.
- Cei JM and Roig VG, (1961). Batracios recolectados por la expedición biológica Erspamer en Corrientes y selva oriental de Misiones. Notas Biol. Facult. Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Corrientes Zool. 1: 10.
- Cruz CAG and Caramaschi U, (1998). Definição, composição e distribuição geográfica do grupo de *Hyla polytaenia* Cope, 1870 (Amphibia, Anura, Hylidae). Bol. Mus. Nac. Zool. 392: 1-19.
- Duellman WE, De La Riva I and Wild ER, (1997). Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. Scientific Papers Natural History Museum the University Kansas 3: 1-41.
- Faivovich J, (1996). La larva de *Hyla semiguttata* A. Lutz, 1925 (Anura, Hylidae). Cuadernos de Herpetologia 9: 61-67.
- Garcia PCA and Haddad CFB, (1999). Análise das vocalizações de anúncio (advertisement calls) das espécies de *Hyla* relacionadas ao complexo de *Hyla marginata/semiguttata* (Amphibia, Anura, Hylidae). Res.V(Cong. Lat. Amer. Herpet.:64.
- Garcia PCA, Vinciprova G and Haddad CFB, (2001). Vocalização, girino, distribuição geográfica e novos comentários sobre *Hyla marginata* Boulenger, 1887 (Anura, Hylidae, Hylinae). Bol. Mus. Nac. Zool. 460: 1-19.
- Goldman N and Barton NH, (1992). Genetics and geography. Nature 357: 440-441.

- Green DM and Session SK, (1991). Nomenclature for chromosomes. In: Amphibian Cytogenetics and Evolution. (ed DM Green and SK Sessions), Academic Press, San Diego, p. 431-432.
- Herrero P, López-Jurado LF, Arano B and García-Paris M, (1993). Karyotype analysis and nuclear DNA content of *Bufo brongersmai* Hoogmoed. J. Herpetol. 27: 463-465.
- Howell WM and Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. Experientia 36: 1014-1015.
- Kaiser H, Mais C, Bolaños F, Steinlein C, Feichtinger W and Schmid M, (1996). Chromosomal investigation of three Costa Rica frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. Genetica 98: 95-102.
- Kasahara S, Silva APZ and Haddad CFB, (1996). Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). Braz. J. Genet. 19: 237-242.
- King M, (1990). Amphibian. In: Animal Cytogenetics. (ed B John). Gebrüder Borntraeger, Berlin/Stuttgart. p. 1- 241.
- Kuramoto M, (1990). A list of chromosome numbers of anuran Amphibians. Bull. Fukuoka Univ. Ed. 39: 83-127.
- Langone JA, (1993). Carácterización, sinonimia y distribución geográfica de *H. marginata* Boulenger 1887 (Amphibia, Anura, Hylidae). Res. III Cong. Lat. Herp.: 228.
- Langone JA, (1997). Caráterização de *Hyla guentheri* Boulenger, 1886 (Amphibia, Anura, Hylidae). Cuad. Herp. 11: 13-20.
- Lutz A, (1925). Batraciens du Brésil. II. Compt. Ren. Soc. Biol. Paris. 93(22): 211-214.
- Lutz B, (1973). Brazilian species of *Hyla*. Texas University Press, Austin & London, p. 74-85.
- Matsui M, Seto T, Kohsaka Y and Borkin LJ, (1985). Bearing of chromosome c-banding patterns on the classification of Eurasian toads of the *Bufo bufo* complex. Amphibia-Reptilia 6: 23-33.
- Miura, I. (1995). The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). Chromosoma 103: 567-574.

- Morescalchi A, (1990). Cytogenetics and the problem of Lissamphibian relationships. In: Cytogenetics of Amphibians and Reptiles. (ed E Olmo), Birkhäuser Verlag, Basel, p. 1-19.
- Rabello MN, (1970). Chromosomal studies in brazilian anurans. *Caryologia* 23: 45-59.
- Raber SC, (2000). Caracterização cromossômica de *Hyla bischoffi* e *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). Master thesis, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.
- Saez FA and Brum N, (1960). Chromosome os South American amphibians. *Nature* 185: 945.
- Schmid M, (1978). Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-388.
- Schmid M, (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83-103.
- Schmid M, (1982). Chromosome Banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87: 327-44.
- Schmid M and Almeida CG, (1988). Chromosome banding in Amphibia. XII. Restriction endonucleases banding. *Chromosoma* 96: 283-290.
- Schmid M and Guttenbach M, (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma* 97: 101-114.
- Schmid M, Olert J and Klett C, (1979). Chromosome Banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71: 29-55.
- Skuk G and Langone JA, (1992). Los cromosomas de cuatro especies del género *Hyla* (Anura: Hylidae) con número diploide de $2n = 30$. *Acta Zool. Lilloana* 41: 165-171.
- Sumner AT, (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 – Karyotypes of *H. marginata* (a), *H. semiguttata* from São Francisco de Paula, RS. (b), Cambará do Sul, RS. (c) and Piracuara, PR. (d) and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) (e) after Giemsa staining. Bar = 5 μ m.

Fig. 2 – C-banded karyotypes of *H. marginata* (a), *H. semiguttata* from São Francisco de Paula, RS. (b), Cambará do Sul, RS. (c) and Piracuara, PR. (d) and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) (e). Bar = 5 μ m.

Fig. 3 – Silver-stained NOR of *H. marginata* (a), *H. semiguttata* from São Francisco de Paula, RS. (b), Cambará do Sul, RS. (c) and Piracuara, PR. (d) and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) (e)

Fig. 4 – Idiograms of *H. marginata* (a), *H. semiguttata* (b) and *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) (c) (analyzed in the present work) and *H. joaquini* (d) (Ananias *et al.*-in prep.). Solid blocks denote heterochromatin, opened areas represent the secondary constriction and shaded circles denote NORs.

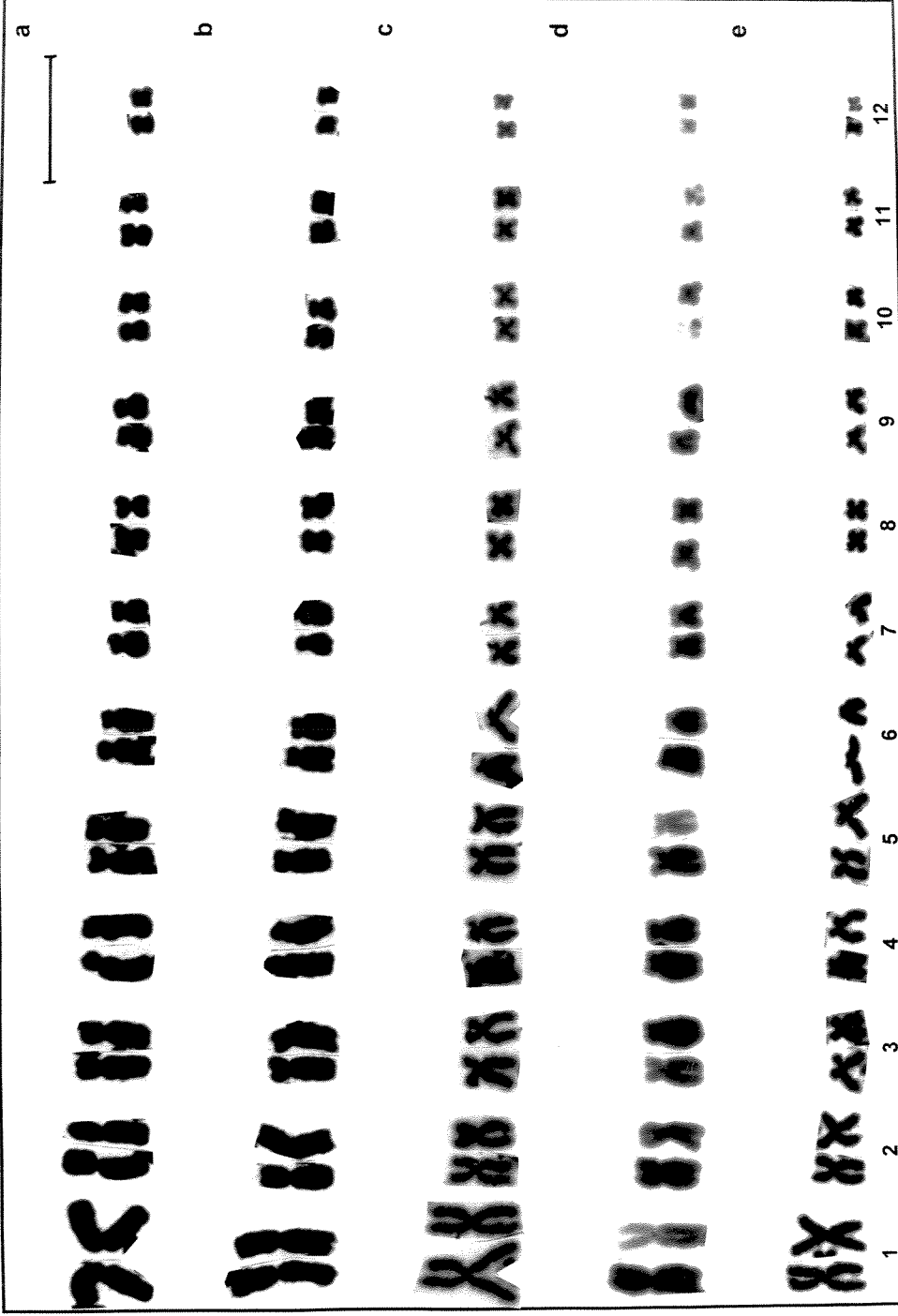


Figure 1

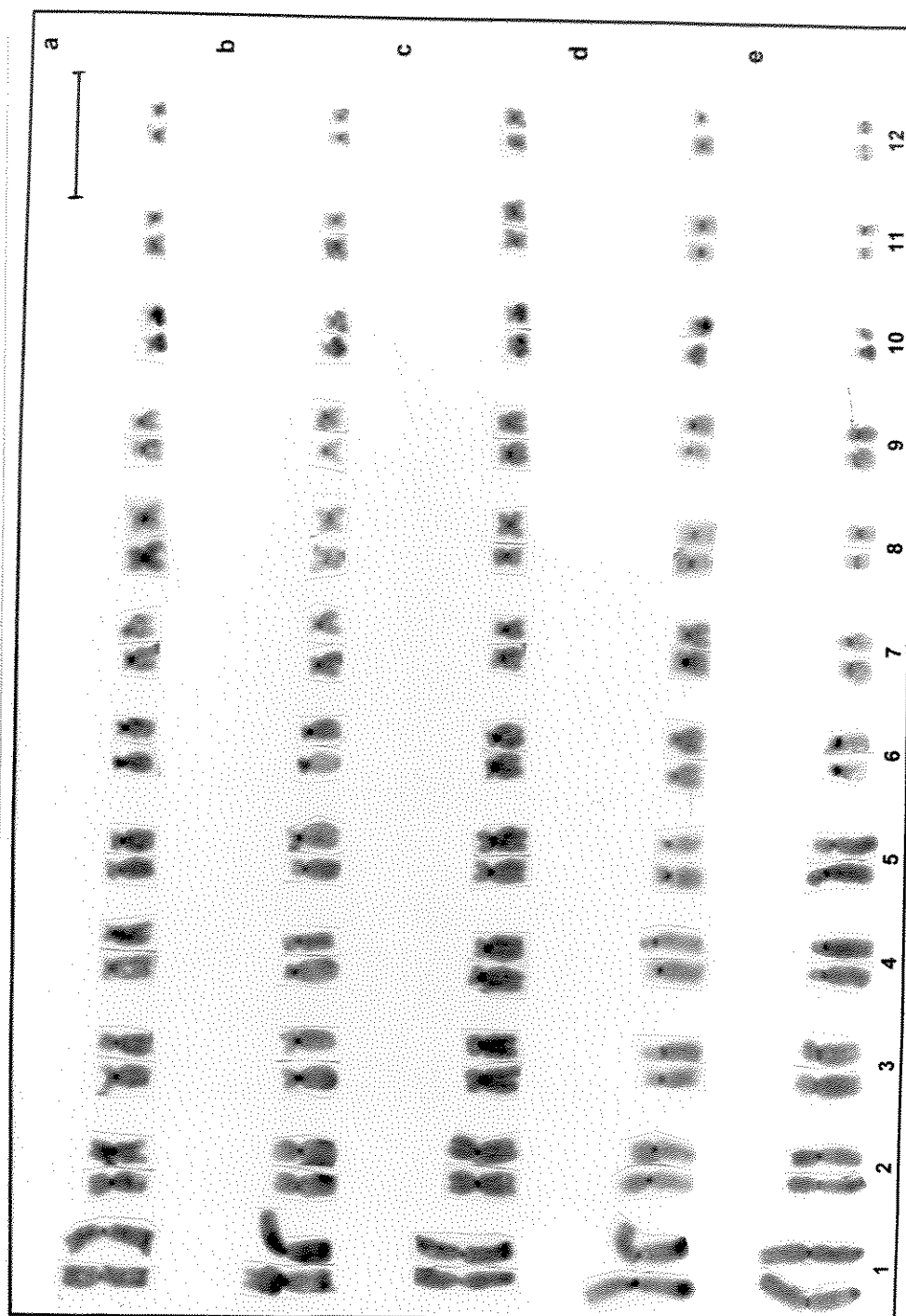


Figure 2

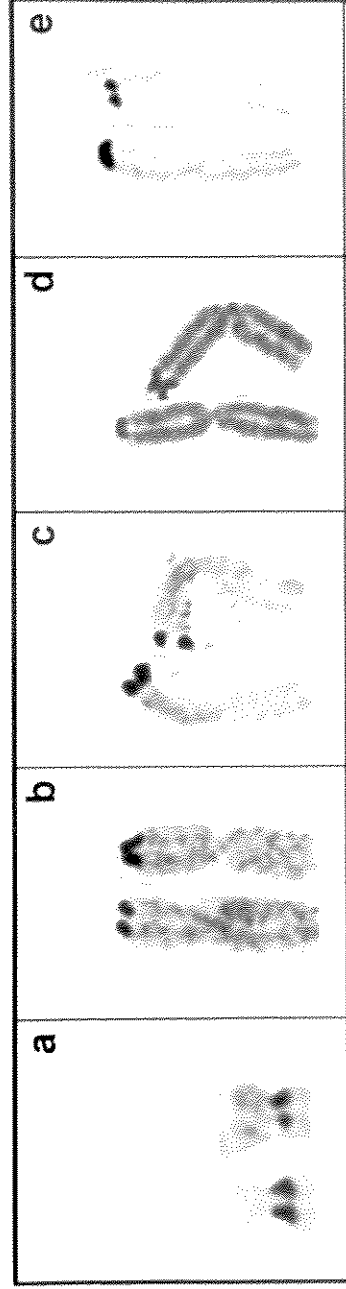


Figure 3

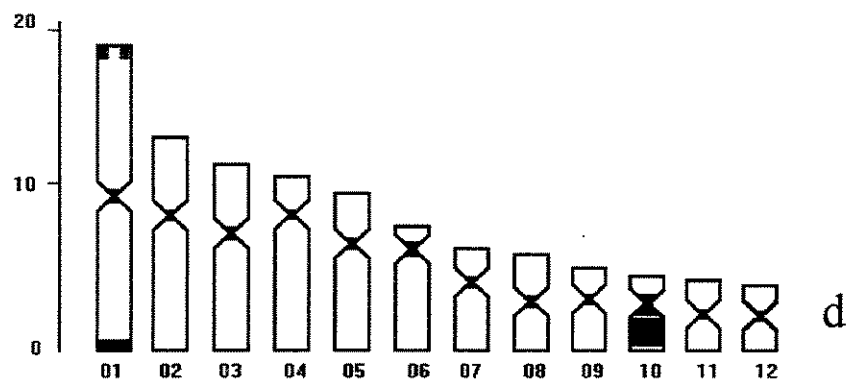
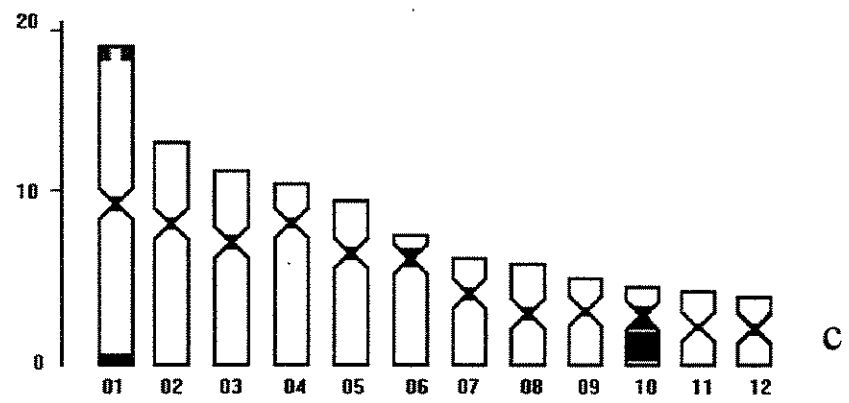
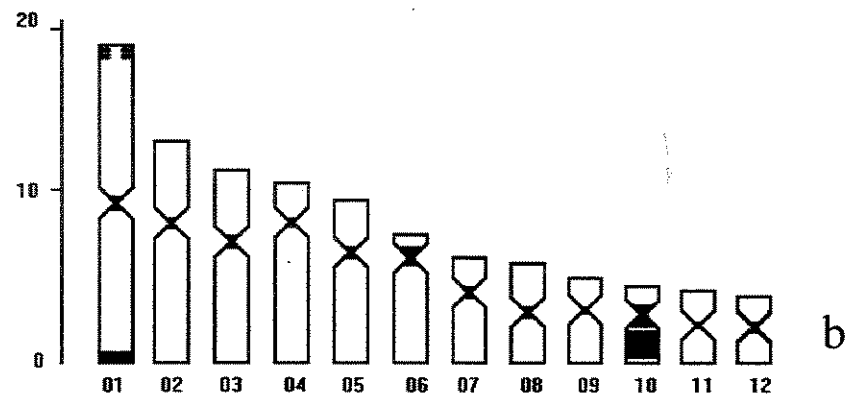


Table 1. Number of specimens, collection site in Brazil and Argentina and Museum catalogue number of the examined specimens. RS = Rio Grande do Sul State; SC = Santa Catarina State; PR = Paraná State; Br = Brazil.

Species	Number of specimens	Collection Site	Museum catalogue numbers
<i>H. semiguttata</i>	12 males	Cambará do Sul, SC; Br	3114-3122 and 3126-3128
	07 males	São Francisco de Paula, RS; Br	3139-3145
	04 males	Piraquara, PR; Br	3704-3707
<i>Hyla</i> sp. (aff. <i>semiguttata</i>)	04 males	Misiones, Argentina	4908, 3446, 4909 and 4910
<i>H. marginata</i>	08 males	São Francisco de Paula, RS; Br	3090-3094 and 3819-3821

Table 2. Morphometric data of mitotic chromosomes of *H. semiguttata*, *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) and *H. marginata*.

Chromosome Number												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>H. semiguttata</i> (São Francisco de Paula, RS)												
AR±	1.15±	1.58±	2.70±	3.26±	2.50±	4.16±	1.85±	1.10±	1.86±	1.73±	1.10±	1.05±
SD	0.01	0.15	0.03	0.06	0.23	0.20	0.12	0.10	0.03	0.14	0.02	0.02
CI±	0.48±	0.39±	0.30±	0.23±	0.31±	0.19±	0.34±	0.49±	0.35±	0.36±	0.49±	0.49±
SD	0.01	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.05
<i>H. semiguttata</i> (Cambará do Sul, RS)												
AR±	1.10±	1.60±	3.00±	3.35±	2.70±	4.18±	1.87±	1.10±	1.83±	1.74±	1.07±	1.03±
SD	0.09	0.05	0.10	0.02	0.05	0.03	0.05	0.02	0.01	0.04	0.03	0.03
CI±	0.48±	0.39±	0.31±	0.23±	0.30±	0.19±	0.34±	0.49±	0.35±	0.37±	0.48±	0.49±
SD	0.05	0.01	0.01	0.05	0.05	0.01	0.02	0.01	0.05	0.02	0.01	0.05
<i>H. semiguttata</i> (Piracuara, PR)												
AR±	1.11±	1.61±	2.90±	3.30±	2.65±	4.15±	1.86±	1.10±	1.87±	1.73±	1.08±	1.04±
SD	0.04	0.02	0.05	0.04	0.10	0.07	0.08	0.07	0.01	0.04	0.05	0.03
CI±	0.49±	0.39±	0.31±	0.23±	0.29±	0.19±	0.36±	0.49±	0.36±	0.36±	0.50±	0.49±
SD	0.02	0.01	0.03	0.02	0.06	0.02	0.03	0.03	0.02	0.05	0.01	0.03
<i>Hyla</i> sp. (aff. <i>semiguttata</i>) (Misiones, Argentina)												
AR±	1.12±	1.63±	3.00±	3.40±	2.85±	4.16±	1.90±	1.10±	1.92±	1.72±	1.06±	1.03±
SD	0.03	0.02	0.03	0.05	0.20	0.10	0.01	0.05	0.10	0.05	0.02	0.02
CI±	0.50±	0.40±	0.32±	0.26±	0.30±	0.19±	0.37±	0.49±	0.36±	0.37±	0.48±	0.49±
SD	0.09	0.02	0.05	0.01	0.05	0.03	0.05	0.01	0.01	0.10	0.01	0.05
<i>H. marginata</i> (São Francisco de Paula, RS)												
AR±	1.14±	1.65±	3.00±	3.40±	2.85±	4.17±	1.86±	1.10±	1.90±	1.72±	1.11±	1.05±
SD	0.04	0.05	0.15	0.06	0.16	0.10	0.12	0.10	0.19	0.05	0.03	0.02
CI±	0.49	0.38±	0.31±	0.25±	0.30±	0.19±	0.34±	0.48±	0.35±	0.37±	0.49±	0.48±
SD	± 0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01	0.05	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01

Type	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	sm	sm	m	m
------	---	---	----	----	----	----	----	---	----	----	---	---

Note: AR = arm ratio; CI = centromeric index; SD = standart deviation; m = metacentric, sm = submetacentric and st = subtelocentric

VIII. ARTIGO 2

Análise filogenética molecular de algumas populações fenotipicamente variáveis de *Hyla semiguttata* e de espécies relacionadas (Anura: Hylidae)

Fernando Ananias¹, Paulo C. A. Garcia², Mauricio Bacci Jr³, Vanderlei G. Martins³, Julian Faivovich⁴, Ana Maria L. Azeredo-Espin⁵ and Shirlei Maria Recco-Pimentel⁶

^{1} Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas e Curso de Ciências Biológicas, Universidade Braz Cubas, Rua Francisco Rodrigues Filho, 1233 - CEP 08773-380, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil, email : feananas@brazcubas.br; ²Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brasil email : pcagarcia@bol.com.br; ³ Centro de Estudos de Insetos Sociais , IB, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brasil email : mbacci@rc.unesp.br; ⁴ Division of Vertebrate Zoology – American Museum of Natural History and Center for Environmental Research & Conservation – Columbia University email : julian@amnh.org; ⁵ Departamento de Genética e ⁶Departamento de Biologia Celular, IB, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, email: shirlei@unicamp.br*

*corresponding author

RESUMO

Neste estudo nós seqüenciamos o gene citocromo b e a região controle do DNA mitocondrial de seis espécies do grupo de *Hyla pulchella*, uma espécie do grupo de *H. polytaenia*, duas espécies que já foram consideradas pertencentes ao grupo de *H. pulchella* e que atualmente não estão atribuídas a nenhum grupo, um suposto híbrido entre *H. bischoffi* e *Hyla sp n.* e *H. circumdata* (grupo de *H. circumdata*) e *H. albopunctata* (grupo de *H. albopunctata*), que foram utilizadas como grupos externos. Diferentes populações de *H. semiguttata*, espécie pertencente ao grupo de *H. pulchella* que apresenta polimorfismos morfológicos e de canto de anúncio, foram submetidas a estudos filogenéticos. As seqüências obtidas foram alinhadas e analisadas por máxima parcimônia. Árvores de consenso estrito mostraram dois grandes clados. Um clado formado por *H. p. joaquini*, pelas populações de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula e Cambará do Sul, R.S., Brasil e com *Hyla sp.* (aff. *semiguttata*) de Misiones, Argentina, como seu grupo irmão; e outro clado formado por *H. marginata*, *H. prasina*, *H. caingua*, *H. bischoffi*, *H. guentheri*, um suposto híbrido entre *H. bischoffi* e *Hyla sp.n.* e *Hyla sp.* (aff. *polytaenia*). As populações de *H. semiguttata* de Piraquara e Palmeira, PR, Brasil sempre apareceram como basais. Estes resultados indicam que as populações de *H. semiguttata* possuem estoques gênicos diferentes e que eventos cladogênicos estão em andamento. Como sugerido por alguns autores, parece que muitos eventos cladogênicos estariam relacionados com a especiação de hílideos neotropicais o que dificulta um estudo envolvendo populações polimórficas, principalmente quando o polimorfismo está relacionado com o padrão de coloração.

INTRODUÇÃO

A subfamília Hylinae é composta por 26 gêneros (Frost, 2002), entre os quais, o gênero *Hyla*, apresenta poucas espécies com padrão polimórfico de coloração (Hoffman e Blouin, 2000). Apesar do padrão de coloração ser usado para distinguir espécies próximas, assim como acontece com outros caracteres morfológicos, a evolução do padrão de

coloração independe da linhagem evolutiva (Titus *et al.*, 1989). Neste sentido, quando há barreiras físicas (zoogeográficas) ou ecológicas o fluxo gênico é limitado, aumentando a diferenciação genética entre as populações (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1989). Assim também, condições adequadas para a transferência interespecífica do DNA mitocondrial podem ocorrer quando as espécies intercruzantes são simpátricas mas ocorrendo habitats diferentes ou quando as espécies possuem distribuição parapátrica e hibridam ao longo de uma zona de contato (Szymura *et al.*, 1985). Em anfíbios, um fator biológico que oferece uma barreira ao fluxo gênico entre populações simpátricas é o padrão de vocalização, que mantém um isolamento reprodutivo entre os taxa (Duellman e Pyles, 1983).

Ultimamente, a utilização de técnicas moleculares foi direcionada para as questões sobre diferenciação de espécies e sobre o processo de especiação, sendo a contribuição dos marcadores moleculares bastante utilizada para reconstrução da filogenia (Hillis *et al.*, 1996). Entre as moléculas estudadas, o DNA mitocondrial (DNAMt) possui algumas características que determinam o seu sucesso nos estudos filogenéticos, como a presença de genes compactos e com poucas seqüências intergênicas não-codificantes (Cantatore e Saccone, 1987), herança materna (Kondo *et al.*, 1990; Gyllestein *et al.*, 1991), evolução rápida comparada ao genoma nuclear, portanto com reparo inexistente (Brown *et al.*, 1979), múltiplas cópias em uma única célula (Robin e Wong, 1988), além da transmissão dos genes mitocondriais acontecer de forma clonal na maioria dos eucariotos, com diversidade genotípica dependendo de mutações ou outros tipos de rearranjos (Birky, 1995). O DNAMt é uma molécula considerada altamente informativa para a análise da estrutura de uma população e estudos de taxa relacionados (Avise *et al.*, 1979; Sauders *et al.*, 1986; Ptacek *et al.*, 1994) e identificação de linhagens ou espécies crípticas (Avise, 1994). Goldman e Barton (1992) sugeriram que o DNA mitocondrial se presta mais a estudos evolutivos através da análise do padrão de variação genética dentro de uma população do que entre espécies diferentes. Isto ocorre porque o padrão de variação genética se reflete na estrutura populacional de uma espécie, influenciando os mecanismos de divergência e especiação, inclusive em anfíbios (Guttman, 1985).

Vários estudos filogenéticos usando seqüências de genes mitocondriais foram feitos estabelecendo padrões diferentes de relação filogenética e demonstram que alguns genes são melhores do que outros para construir as relações filogenéticas entre taxa (Simon *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2000). O gênero *Hyla*, com aproximadamente 315 espécies, está entre os

gêneros mais ricos em espécies (Frost, 2000) e mais de 80% delas estão distribuídas na região Neotropical (Duellman e Trueb, 1983). Dentro do gênero *Hyla*, poucos estudos foram feitos utilizando genes mitocondriais para estimar a filogenia ou contribuir para solucionar a sistemática de grupos de espécies. Bermingham *et al.* (1986) descreveram um polimorfismo intraespecífico no tamanho do DNA mitocondrial e a ocorrência de heteroplasmia individual em *Hyla cinerea* e *H. gratiosa*; Ptacek *et al.* (1994) seqüenciaram o gene citocromo *b* para determinar a especiação por poliploidia e a origem múltipla do tetraplóide *Hyla versicolor*; Gerhardt *et al.* (1994) analisaram os híbridos diplóides e tetraplóides entre *Hyla chrysoscelis* e *Hyla versicolor* através da comparação da seqüência de 600 pb do gene citocromo *b*; Lee *et al.* (1996) observaram uma variação inter e intrapopulacional no taxa *H. japonica* através de RFLP, encontrando uma variação maior quando comparam populações do Japão e da Coreia; Barber (1999 a e b) analisou a filogeografia e o padrão de fluxo gênico entre populações de *H. arenicolor* baseando-se em seqüências do gene citocromo *b* e Chek *et al.* (2001) usaram as seqüências dos genes ribossomais 12S e 16S mitocondriais e citocromo *b* para estimar a filogenia entre espécies neotropicais de *Hyla* com 30 cromossomos, enfatizando o grupo de *H. leucophyllata*, que apresenta populações polimórficas em relação ao padrão de coloração e diferenças na vocalização de anúncio.

Hyla semiguttata A. Lutz, 1925 e *H. marginata* Boulenger, 1887 são espécies pertencentes ao grupo de *H. pulchella* que, atualmente, é composto por 16 taxa, pelo acréscimo de *H. caingua* Carrizo, 1990 (Cruz e Caramaschi, 1998) e *H. ericae* Caramaschi e Cruz, 2000; (Caramaschi e Cruz, 2000), às 14 espécies listadas por Duellman *et al.* (1997).

Algumas populações de *H. semiguttata* do Sul do Brasil e uma da Argentina foram claramente diagnosticadas como populações polimórficas em relação ao tamanho corpóreo, padrão de coloração dorsal, desenvolvimento do prepólex, diferença no tipo de área de reprodução, além de apresentarem um padrão de vocalização de anúncio divergente (Garcia *et al.* - *in press*). Neste trabalho, nós realizamos a análise filogenética de algumas espécies do grupo de *H. pulchella*, enfatizando as várias populações polimórficas do táxon *H. semiguttata* ao longo de sua distribuição geográfica, com base no gene citocromo *b* e na região controle do DNA mitocondrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Seis espécies do grupo de *Hyla pulchella*, uma espécie do grupo de *H. polytaenia*, duas espécies que já foram consideradas pertencentes ao grupo de *H. pulchella* e que atualmente não estão atribuídas a nenhum grupo, um suposto híbrido entre *H. bischoffi* e *Hyla sp. n.* e *H. circumdata* (grupo de *H. circumdata*) e *H. albopunctata* (grupo de *H. albopunctata*), que foram utilizadas como grupos externos, foram coletados na região Sul e Sudeste do Brasil durante as estações reprodutivas dos anos de 1993 a 2001 (Fig. 1; Tabela 1). Além disso, a espécie *Hyla sp.* (aff. *polytaenia*¹) (representante do grupo de *H. polytaenia*) também foi estudada em nossas análises. A maioria dos espécimes foi depositada na Coleção de Anfíbios Célio F. B. Haddad (CFBH), do Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brasil.

As amostras de tecido, geralmente fígado e/ou músculo foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ou colocadas em etanol 95% e preservadas em freezer a -70°C.

Extração do DNA e amplificação

A extração do DNA foi feita utilizando o protocolo padrão com fenol/clorofórmio (Hedges *et al.* 1991). A amplificação parcial do gene citocromo b foi realizada por PCR em uma termocicladora MJ research, utilizando os primers MVZ15 (Moritz *et al.*, 1992) e Cytb2 (Kocher *et al.*, 1989) (Tabela 2). O volume de reação foi de 25 µl com o kit PCR-Beads (Pharmacia-Biotech) e 0,5 µM de cada primer. O programa utilizado incluiu uma desnaturação inicial de 3 min. a 94°C, seguida por ciclos com desnaturação de 1 min. a 94°C, anelamento de 1 min. a 46°C e extensão de 1 min. a 72°C, seguido de uma extensão final de 3 min. a 72°C. A região controle foi amplificada utilizando os primers internos ControlWrev-L e ControlP-H (Goebel *et al.*, 1999) (Tabela 2). Reações com volume total

¹ Esta espécie foi citada como *Hyla polytaenia* por Heyer *et al.* (1998) para Salesópolis, SP. No entanto, Caramaschi & Cruz (2000) não incluíram nenhuma espécie do Estado de São Paulo na definição de *Hyla polytaenia*. Esta espécie é considerada uma nova espécie do grupo de *H. polytaenia* (Caramaschi, com. pess.)

de 50 µl foram feitas adicionando oligonucleotídeos a 2mM, cloreto de magnésio a 1,5 mM, *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL) a 1U/100µl, 0,4 µM de cada primer e DNA molde a 300 ng/µl. Ajustes na concentração de alguns componentes foram necessários para algumas espécies. Utilizou-se uma termocicladora Perkin Elmer, com desnaturação inicial de 5 min. a 96°C, seguida por ciclos com uma desnaturação de 30 seg. a 94°C, anelamento de 45 seg. a 42°C e extensão de 2 min. a 60°C, seguido de uma extensão final de 8 min. a 62°C. Ajustes na temperatura de anelamento foram necessários em alguns casos.

Para purificação das amostras utilizou-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification da Amersham Pharmacia Biotech, seguindo as especificações do fabricante.

Seqüenciamento

Citocromo b – Os produtos da PCR foram seqüenciados em ambas as direções usando o seqüenciador ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) e o kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction da Amersham Pharmacia Biotech..

Região Controle – uma alíquota do produto de DNA amplificado pela PCR e purificado foi clonado no vetor plasmidial pGEM-T (Kit *pGEM-T Vector System I*, Promega), de acordo com as especificações do fabricante. Os clones que apresentaram inserto de tamanho esperado foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, Amersham Pharmacia Biotech) e submetidos ao seqüenciamento em seqüenciador automático (ALF Express II, Amersham Pharmacia Biotech). As reações de seqüenciamento foram realizadas com o Kit *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* (Amersham Pharmacia Biotech). As extremidades das seqüências parciais do inserto (cerca de 500 a 600 bases) obtidas com cada um dos *primers* (M13 *forward* e M13 *reverse*) no seqüenciamento automático foram sobrepostas e uma única seqüência de DNA foi recuperada para cada inserto clonado.

Análise Filogenética e Alinhamento

As seqüências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) e as regiões com ambigüidades no alinhamento foram excluídas da análise filogenética,

efetuada pelo método da máxima parcimônia (Camin e Sokal, 1965), usando o programa PAUP versão 4.0b4a de Swofford (2000). As transições, transversões e gaps (inserções/deleções) receberam o mesmo peso, 1:1:1. Foi utilizado algoritmo exato do tipo *branch-and-bound* (Handy e Penny, 1982) para construção das árvores, que tiveram os suporte dos nós calculados por bootstrap (Nei e Kumar, 2000), utilizando 100 réplicas, com 10 buscas heurísticas ao acaso em cada réplica.

RESULTADOS

A análise do gene citocromo b resultou em uma árvore de consenso estrito entre as 22 árvores mais parcimoniosas obtidas através da análise de 105 caracteres informativos (360 passos, índice de consistência (CI) de 0,5472 e um índice de retenção (RI) de 0,6386; Fig. 2, Tabela 3). A árvore de consenso estrito mostrou algumas tricotomias. Uma delas envolvendo: Clado A (suportado por um *bootstrap* de 81%), formado por *H. p. joaquini*, pelas populações de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula e Cambará do Sul, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil e com *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) de Misiones, Argentina, como seu grupo irmão; Clado B (suportado por um *bootstrap* de 86%), formado por *H. marginata*, *H. prasina*, *H. caingua*, *H. bischoffi*, *H. guentheri* e um suposto híbrido entre *H. bischoffi* e *Hyla* sp.n. e um Clado C formado apenas por *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*). A segunda tricotomia suportada por um *bootstrap* de 99% envolve todos os cladogramas anteriores (ABC), mais o clado formado pelas taxa *H. semiguttata*, população de Piraquara e Palmeira e clado formado pelo táxon *Hyla* sp.n..

Uma situação um pouco diferente foi encontrada a partir da análise das seqüências da região controle. Três árvores mais parcimoniosas foram obtidas a partir de 206 caracteres informativos (Tabela 3). A árvore de consenso estrito mostrou uma topologia relativamente diferenciada em relação à árvore do gene citocromo b. Várias tricotomias observadas anteriormente foram solucionadas, exceto aquela formada pelas populações de *H. semiguttata* de Piraquara e Palmeira e os dois cladogramas maiores suportados por um *bootstrap* de 100% (Fig. 3).

Na combinação dos dois genes obteve-se uma árvore de consenso estrito entre as três mais parcimoniosas obtidas a partir da análise de 291 caracteres informativos do gene

citocromo b e da região controle, que pode ser observada na Figura 4. Todos os nós apresentaram altos índices de *bootstrap*, superior a 70%. Dois grandes clados monofiléticos são suportados por alto índice de *bootstrap* (100%). Nesta árvore, as populações de *H. semiguttata* de Palmeira e Piraquara continuam mostrando uma proximidade muito grande, que são grupos irmãos. O clado formado pelas populações de *H. semiguttata* de Cambará do Sul e São Francisco de Paula, juntamente com *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) e *H. p. joaquinii*, formam um grupo monofilético. *H. p. joaquinii* parece estar mais relacionada com a população de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula (suportado por um *bootstrap* de 82%), do que com a população de Cambará. O táxon *Hyla* sp. (aff. *semiguttata*) aparenta um relacionamento muito próximo ao clado anterior (Fig. 4). Como observado nas outras duas árvores (Figs. 2 e 3), *H. prasina* e *H. caingua* são grupos irmãos e o suposto híbrido natural entre *Hyla* sp. n. e *H. bischoffi*, sempre esteve no mesmo clado desta última. A espécie *Hyla* sp. (aff. *polytaenia*) (grupo de *H. polytaenia*) sempre apareceu no mesmo clado das espécies consideradas do grupo de *H. pulchella* (Fig. 2, 3 e 4).

A figura 1 mostra as regiões de coleta das populações de *H. semiguttata* e dos outros taxa analisados neste trabalho. Comparando com as relações filogenéticas apresentadas nas figuras 2, 3 e 4, nota-se que a população de Cambará do Sul é muito distinta daquela de São Francisco de Paula, apesar da proximidade geográfica, correspondendo às diferenças fenotípicas encontradas. Por outro lado, a população de Piraquara, próxima da localidade tipo de São Bento do Sul, é geograficamente distante daquela de Palmeira, sendo encontrada uma grande proximidade genética entre ambas. No caso de *H. p. joaquinii*, apesar da similaridade morfológica e de canto de anúncio em relação a *H. semiguttata* de Cambará do Sul e de uma maior divergência destes atributos em relação à população de São Francisco de Paula (Garcia *et al.*, em preparação), a análise filogenética baseada nas seqüências da região controle (Fig. 3) e análise combinada (Fig. 4), mostrou que há uma maior proximidade entre *H. p. joaquinii* e a população de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula, contrariando a idéia de que a proximidade geográfica pudesse ser indicativa de maior afinidade filogenética. Além disso, as seqüências do gene citocromo b dos espécimes analisados, mostraram a presença de dois haplótipos nas populações de Cambará do Sul, diferenciados nas posições 3, 5, 51, 309 e 351 e de Piraquara (posições 141, 234 e 309), o que não aconteceu com a população de São Francisco de Paula (Fig. 2 e Apêndice 1).

Machos de *H. bischoffi*, *Hyla* sp. n. e de um suposto híbrido natural entre estes dois taxa foram encontrados vocalizando em simpatria na região de Rancho Queimado, Estado de Santa Catarina (PCA Garcia - comunicação pessoal). A análise fenotípica dos indivíduos do suposto híbrido natural mostrou que eles são morfologicamente muito semelhantes à *Hyla* sp. n. (Garcia *et. al.* em preparação). Em todas as árvores de consenso estrito geradas a partir das seqüências do gene citocromo b, região controle e na análise COMBINADA, o suposto híbrido sempre esteve posicionado no mesmo clado juntamente com *H. bischoffi*, suportado por um *bootstrap* superior a 96% (Fig.2, 3 e 4).

DISCUSSÃO

Diferentes regiões do DNA mitocondrial possuem taxas evolutivas diferentes e as árvores filogenéticas obtidas de diferentes genes para o mesmo grupo de organismos podem diferir. No caso do gene para citocromo b, ele parece ser informativo para níveis intermediários de divergência (Graybeal, 1993; Liu *et al.*, 2000), enquanto a região controle (D-loop) parece evoluir mais rapidamente e é usada para divergências recentes, como as que ocorrem no nível de população (Yang *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2000). Comparando as duas árvores de consenso estrito (citocromo b e região controle), percebe-se que as tricotomias observadas em alguns clados a partir das seqüências do gene citocromo b, foram solucionadas a partir das seqüências da região controle, indicando que a região controle, neste caso, foi muito útil para solucionar as divergências entre taxa próximos, que provavelmente estão em um processo de especiação recente.

Por outro lado, a análise por máxima parcimônia das seqüências do gene citocromo b e da região controle do DNA mitocondrial, revelou que as populações de *H. semiguttata* de Cambará do Sul e de São Francisco de Paula possuem estoques gênico diferentes, formando clados distintos entre si e do clado formado pela população de Piraquara e Palmeira. Esta relação filogenética observada entre estes dois clados corrobora com a distância geográfica entre estas populações. Geograficamente, a população de *H. semiguttata* de Cambará do Sul está localizada entre a população de São Francisco de Paula e *H. p. joaquini* de Urubici. No entanto, as características morfológicas e o padrão de canto de anúncio indicam maior proximidade entre *H. p. joaquini* e a população de *H. semiguttata* de Cambará do Sul. As árvores obtidas neste trabalho indicam maior

proximidade filogenética entre a população de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula e *H. p. joaquini*, contrariando a hipótese filogenética baseada em caracteres morfológicos e biológicos (Garcia *et al.*, em preparação). Como ainda não foi possível caracterizar as populações ao longo deste eixo geográfico, que iria da população de *H. joaquini* até a população de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula, passando pela população de Cambará do Sul, não se pode inferir se há fluxo gênico ou não entre essas populações.

Em relação às outras populações de *H. semiguttata* de Palmeira e Piraquara, a análise citogenética da população de Piraquara não evidenciou nenhuma diferença desta com as de São Francisco de Paula e Cambará do Sul, assim como também em relação à *H. p. joaquini* (Ananias *et al.* em preparação). Apesar disso, a análise filogenética com base na sequência do DNA mitocondrial sugere que estas duas populações (Palmeira e Piraquara) são muito próximas. Uma vez que a população de Piraquara está localizada próximo da localidade tipo do táxon *H. semiguttata*, um estado plesiomórfico dos caracteres moleculares separou claramente tais populações

Hyla sp. (aff. *semiguttata*) (população da Argentina), sempre apareceu em todas as árvores de consenso estrito, como basal e intimamente relacionada com as espécies do clado formado pelas populações de *H. semiguttata* de Cambará do Sul e de São Francisco de Paula e *H. joaquini*, concordando com a semelhança citogenética entre esses táxons (Ananias *et al.* em preparação).

Divergências intraindividual na sequência do gene citocromo b foram constatadas entre as populações de *H. semiguttata* de Cambará do Sul e Piraquara. A árvore de consenso estrito a partir do gene citocromo b mostrou que dos quatro espécimes seqüenciados da população de Cambará, um deles (espécime CFBH 3135) apresentou um haplótipo diferente em relação aos outros três (posição 3, 5, 51, 309 e 351). Já na população de Piraquara os dois exemplares seqüenciados apresentaram divergências nas seqüências do gene citocromo b (posição 141, 234 e 309). Por outro lado, a população de São Francisco de Paula não apresentou nenhuma divergência intraindividual, e possui uma composição diferente na sequência de bases, além de ser fenotipicamente divergente das demais sugerindo que uma revisão taxonômica possa ser feita.

Alguns estudos têm mostrando divergências intraespecíficas em populações de alguns anfíbios anuros, como é o caso de *Rana japonica* (Sumida e Ogata, 1998). Estes autores analisaram o gene citocromo b mitocondrial encontrando uma diferenciação entre

as populações de diversas regiões no Japão e, mais recentemente, Chek *et al.* (2001) mostrou que as populações polimórficas do táxon *H. leucophyllata* também apresentam diferenciação intraespecífica e que a distância geográfica não está relacionada diretamente com a afinidade filogenética, pelo menos neste táxon.

O fato de um representante do grupo de *H. polytaenia* (*H. aff. polytaenia*) além de *H. bischoffi* e *H. guentheri* ficarem incluídas em algum clado das espécies do grupo de *H. pulchella* em todas as análises filogenéticas, indica que o grupo de *H. pulchella* pode ser parafilético e também sugere a adição das espécies *H. bischoffi* e *H. guentheri* no grupo de *H. pulchella*.

No segundo grande clado constituído pelas espécies do grupo de *H. pulchella*, mais *Hyla* sp. (*aff. polytaenia*), *H. bischoffi* e *H. guentheri* (estas duas últimas consideradas próximas ao grupo de *H. pulchella*, mas não oficialmente incluídas no mesmo) nota-se que *H. marginata*, apesar de apresentar diferenças morfológicas e biológicas em relação as demais espécies deste clado (Garcia *et al.* - em preparação), geneticamente parece ser muito próxima à *H. bischoffi* e *H. guentheri*. Citogeneticamente, (Ananias *et al.* em preparação) este táxon difere das populações de *H. semiguttata* e de *H. joaquini* apenas pela localização da NOR.

A ocorrência de hibridação natural demonstra que um processo de especiação possa estar ocorrendo nas populações de *H. bischoffi* e *Hyla* sp. n. que ocorrem em simpatria na região de Rancho Queimado, SC.. Segundo Avise *et al.* (1987) e Avise (1989) quando o fluxo gênico entre populações é limitado por barreiras físicas (zoogeográficas) ou ecológicas, a diferenciação genética entre populações pode ser maior. Porém, no caso destes dois taxa existe uma semelhança no padrão de canto, o que poderia ter facilitado o processo de hibridação, uma vez que a vocalização é um dos principais fatores de isolamento reprodutivo pré-gamético em populações de anuros simpátricos (Duellman e Pyles, 1983). As árvores obtidas a partir das seqüências do gene citocromo b, região controle e análise combinada, mostraram que o suposto híbrido natural entre *H. bischoffi* e *Hyla* sp. n. sempre apareceu como táxon irmão de *H. bischoffi* e não de *Hyla* sp. n.. Este resultado indica que uma transferência interespecífica do DNA mitocondrial ocorreu de *H. bischoffi* e não de *Hyla* sp. n., permitindo concluir que um macho de *Hyla* sp. n. cruzou com uma fêmea de *H. bischoffi*. Zonas de hibridação em anfíbios anuros são muito comuns, como nos gêneros *Bombina* (Szymura e Barton, 1991), *Bufo* (Green, 1983), *Litoria*

(Littlejohn e Watson, 1985), *Pseudacris* (Gartside, 1980), *Pseudophryne* (Woodruff, 1989), *Geocrina* (Gollmann e Gollmann, 1995) e em *Rana* (Kocher e Sage, 1986). Na maioria dos casos, a hibridação foi detectada primeiramente usando caracteres dos indivíduos adultos, particularmente através de caracteres morfológicos e de vocalização.

Como sugerido por Chek *et al.* (2001), parece que muitos eventos cladogênicos estariam relacionados com a especiação de hílideos neotropicais, o que dificulta um estudo envolvendo populações polimórficas.

Apesar de Garcia *et al.* (2001) sugerirem a presença de um complexo formado pelas espécies *H. marginata*, *H. semiguttata*, *H. p. joaquini*, *H. ericae* e *Hyla* sp. n. (em fase de descrição), os resultados obtidos mostram uma origem polifilética das espécies do grupo de *H. pulchella*, uma vez que as espécies e populações acima citadas sempre estiveram em clados distintos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio financeiro (processo número 2001/09084-5). Ananias F. agradece em especial, à técnica Rosângela A. Rodrigues do Laboratório de Genética Animal do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, pela colaboração e orientação durante a primeira etapa deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avise, J. C. (1989). Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* **43**: 1192-1208.
- Avise, J.C. (1994). "Molecular Markers, Natural History and Evolution", Chapman & Hall, New York.
- Avise, J.C., Giblyn-Davidson, C., Laerm, J., Patton, J. C., and Lansman, R. (1979). Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 6694-6698.

- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., and Saunders, N. C. (1987). Intraespecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.
- Barber, P. H. (1999a). Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope). *Mol. Ecol.* **8**(4): 563-576.
- Barber, P. H. (1999b). Phylogeography of canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Ecol.* **8**(4): 547-562.
- Bermingham, E., Lamb, T., and Avise, J. C. (1986). Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. *J. Heredity* **77**: 249-252.
- Birky, C. W. (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes – mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(25): 11331-11338.
- Brown, W. M., George, M., and Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1967-1971.
- Camin, J. H., and Sokal, R. R. (1965). A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution* **19**: 311-326.
- Cantatore, P., and Saccone, C. (1987). Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *Int. Rev. Cytol.* **108**: 149-208.
- Caramaschi, U., and Cruz, C. A G. (2000). Duas espécies novas de *Hyla* Laurenti, 1768 do Estado de Goiás, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Bol. Mus. Nac. Zool.* **422**: 1-12.
- Chek, A. A., Lougheed, S. C., Bogart, J. P., and Boag, P. T. (2001). Perception and history: molecular phylogeny of a diverse group of neotropical frogs, the 30-chromosome *Hyla* (Anura: Hylidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **18**(3): 370-385.
- Cruz, C. A G., and Caramaschi, U. (1998). Definição, composição e distribuição geográfica do grupo de *Hyla polytaenia* Cope, 1870 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Bol. Mus. Nac. Zool.* **392**: 1-19.
- Duellman, W. E., and Pyles, R. (1983). A Acoustic resource partitioning in anurans communities. *Copeia*: 639-649.
- Duellman, W.E., and Trueb, L. R. (1983). Frogs of the *Hyla columbiana* group: taxonomy and phylogenetic relationships. In “Advances in Herpetology and Evolutionary Biology” (A. G. J. Rhodin and K. Miyata, Eds), pp. 33-51. Mus. Comp. Zool. Harvard Univ., Cambridge.

- Duellman, W.E., De La Riva, I., and Wild, E. R. (1997). Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* groups in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean groups of *Hyla*. *Scientific Papers Natural History Museum the University Kansas*. **3**: 1-41.
- Frost, D. R. (2002). Amphibian Species of the World: an online reference. V2.21 (15 July 2002). Electronic database available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Gartside, D. F. (1980). Analysis of a hybrid zone between chorus frogs of the *Pseudacris nigrita* complex in the southern United States. *Copeia* : 56-66.
- Gerhardt, H. C., Ptacek, M. B., Barnett, L., and Torke, K. G. (1994). Hybridization in the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *Hyla versicolor*. *Copeia* (**1**): 51-59.
- Goebel, A.M., Donnelly, J. M., and Atz, M. E. (1999). PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome *b* in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in Amphibians successfully. *Mol Phylogenet. Evol.* **11**(1): 163-199.
- Goldman, N., and Barton, N. H. (1992). Genetics and geography. *Nature* **357**: 440-441.
- Gollmann, B., and Gollmann, G. (1995). Morphology variation in tadpoles of the *Geocrina laevis* complex: regional divergence and hybridization (Amphibia, Anura, Myobatrachinae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **33**: 32-41.
- Graybeal, A. (1993). The phylogenetic utility of cytochrome b: Lessons from bufonid frogs. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2**: 256-269.
- Green, D. M. (1983). Allozyme variation through a clinal hybrid zone between the two toads *Bufo americanus* and *B. hemiophrys* in southeastern Manitoba. *Herpetologica* **39**: 28-40.
- Guttman, S. I. (1985). Biochemical studies of anuran evolution. *Copeia* : 292-309.
- Gyllenstein, U., Wharton, D., Josefsson, A., and Wilson, A. C. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* **352**: 255-257.
- Handy, M. D., and Penng, M. D. (1982). Branch-and-bound algorithmic to determine minimal evolutionary tree. *Discrete Math.* **96**: 51-68
- Hedges, S. B., Bezy, R. L., and Maxson, L. R. (1991). Phylogenetic relationships and biogeography of xantusiid lizards, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **8**: 767-780.

- Hillis, D. M., Moritz, C., and Male, B. K. (1996). "Molecular Systematics", Sinauer Assoc. Inc., Sunderland.
- Hoffman, E. A., and Blouin, M. S. (2000). A review of colour and pattern polymorphisms in anurans. *Biol. J. Linn. Soc.* **70**: 633-665.
- Kocher, T. D., and Sage, R. D. (1986). Further genetic analysis of a hybrid zone between leopard frogs (*Rana pipiens* complex) in central Texas. *Evolution* **40**: 21-33.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Pääbo, S., Villabranca, F. X., and Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6196-6200.
- Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E. T., Ishiwa, H., Takahata, N., and Chigusa, S. I. (1990). Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* **126**: 657-663.
- Lee, H. Y., Park, O. Y., Oh, S. J., and Yang, S. Y. (1996). The intra- and interpopulational genetic variation in mitochondrial DNA of Korean *Hyla japonica*. *Korean J. Genet.* **18**(1): 15-24.
- Littlejohn, M. J., and Watson, G. F. (1985). Hybrid zones and homogamy in Australian frogs. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **16**: 85-112.
- Liu, W., Lathrop, A., Fu, J., Yang, D., and Murphy, R. W. (2000). Phylogeny of east asian bufonids inferred from mitochondrial DNA sequences (Anura: Amphibia). *Mol. Phylogenet. Evol.* **14**(3): 423-435.
- Moritz, C., Schneider, C. J., and Wake, D. B. (1992). Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Sys. Biol.* **41**: 273-291.
- Nei, M., and Kumar, S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Ptacek, M. B., Gerhardt, H. C., and Sage, R. D. (1994). Speciation by polyploidy in treefrogs: multiple origins of the tetraploid, *Hyla versicolor*. *Evolution* **48**(3): 898-908.
- Robin, E. D., and Wong, R. (1988). Mitochondrial Dna molecules and virtual number of mitochondrial per cell in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* **136**: 507-513.
- Saunders, N. C., Kessler, L. G., and Avise, J. C. (1986). Genetic variations and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics* **112**: 613-627.

- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., and Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Ent. Soc. Am.* **87**(6): 651-701.
- Sumida, M., and Ogata, M. (1998). Intraspecific differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica* inferred from mitochondrial DNA sequences of the cytochrome b gene. *Zool. Sci.* **15**: 989-1000.
- Swofford, D. L. (2000). "Phylogenetic Analysis Using Parsimony", version 4.0b4a. Illinois Natural History Survey, Campaign, USA.
- Szymura, J. M., and Barton, N. H. (1991). The genetic structure of the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*: comparison between transects and between loci. *Evolution* **45**: 237-261.
- Szymura, J. M., Spolsky, C., and Uzzell, T. (1985). Concordant change in mitochondrial and nuclear genes in a hybrid zone between two frog species (genus *Bombina*). *Experientia* **41**: 1469-1470.
- Titus, T. A., Hillis, D. M., and Duellman, W. E. (1989). Color polymorphism in neotropical treefrogs: Na allozymic investigation of the taxonomic status of *Hyla favosa* Cope. *Herpetologica* **45**: 17-23.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acid. Res.* **22**: 4673-4680.
- Woodruff, D. S. (1989). Postmating reproductive isolation in *Pseudophryne* and the evolutionary significance of hybrid zones. *Science* **203**: 561-563.
- Yang, Y. J., Lin, Y. S., Wu, J. L., and Hui, C. F. (1994). Variation in mitochondrial DNA and population structure of the Taipei treefrog *Rhacophorus taipeianus* in Taiwan. *Mol. Ecol.* **3**: 219-228.

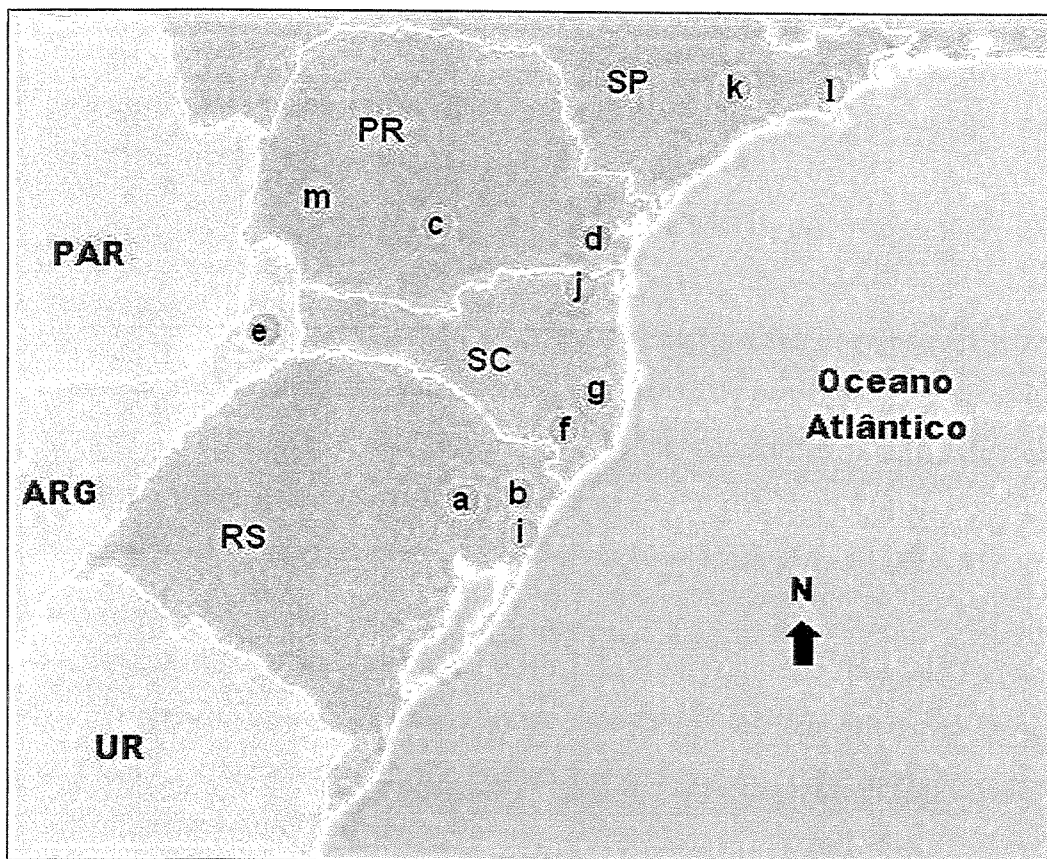
LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 – Mapa do sul, parte do sudeste do Brasil e região de Misiones, na Argentina, mostrando as localidades onde os espécimes foram coletados. As letras correspondem aos taxa da tabela 1.

Figura 2 - Árvore de consenso estrito entre as 22 mais parcimoniosas obtidas a partir da análise de parcimônia de 105 caracteres informativos do gene citocromo *b*. Os números à frente das clados indicam os valores de “bootstrap” (100 buscas heurísticas com 10 réplicas por busca), que foram omitidos se menores do que 50%. Na frente de cada espécime localiza-se o número de registro na coleção.

Figura 3 - Árvore de consenso estrito entre as 3 mais parcimoniosas obtidas a partir da análise de parcimônia de 206 caracteres informativos da região controle. Os números à frente das clados indicam os valores de “bootstrap” (100 buscas heurísticas com 10 réplicas por busca), que foram omitidos se menores do que 50%. Na frente de cada espécime localiza-se o número de registro na coleção.

Figura 4 - Árvore de consenso estrito entre as 3 mais parcimoniosas obtidas a partir da análise de parcimônia de 291 caracteres informativos do gene citocromo *b* e da região controle. Os números à frente das clados indicam os valores de “bootstrap”, que foram omitidos se menores do que 50%. Na frente de cada espécime localiza-se o número de registro na coleção.



a=São Francisco de Paula; b=Cambará do Sul; c= Palmeira; d= Piraquara; e= Misiones; f= Urubici; g= Rancho Queimado; i= Terra de Areia; j= São Bento do Sul; k= Campinas; l= Boracéia; m= Cascavel.

Figura 1

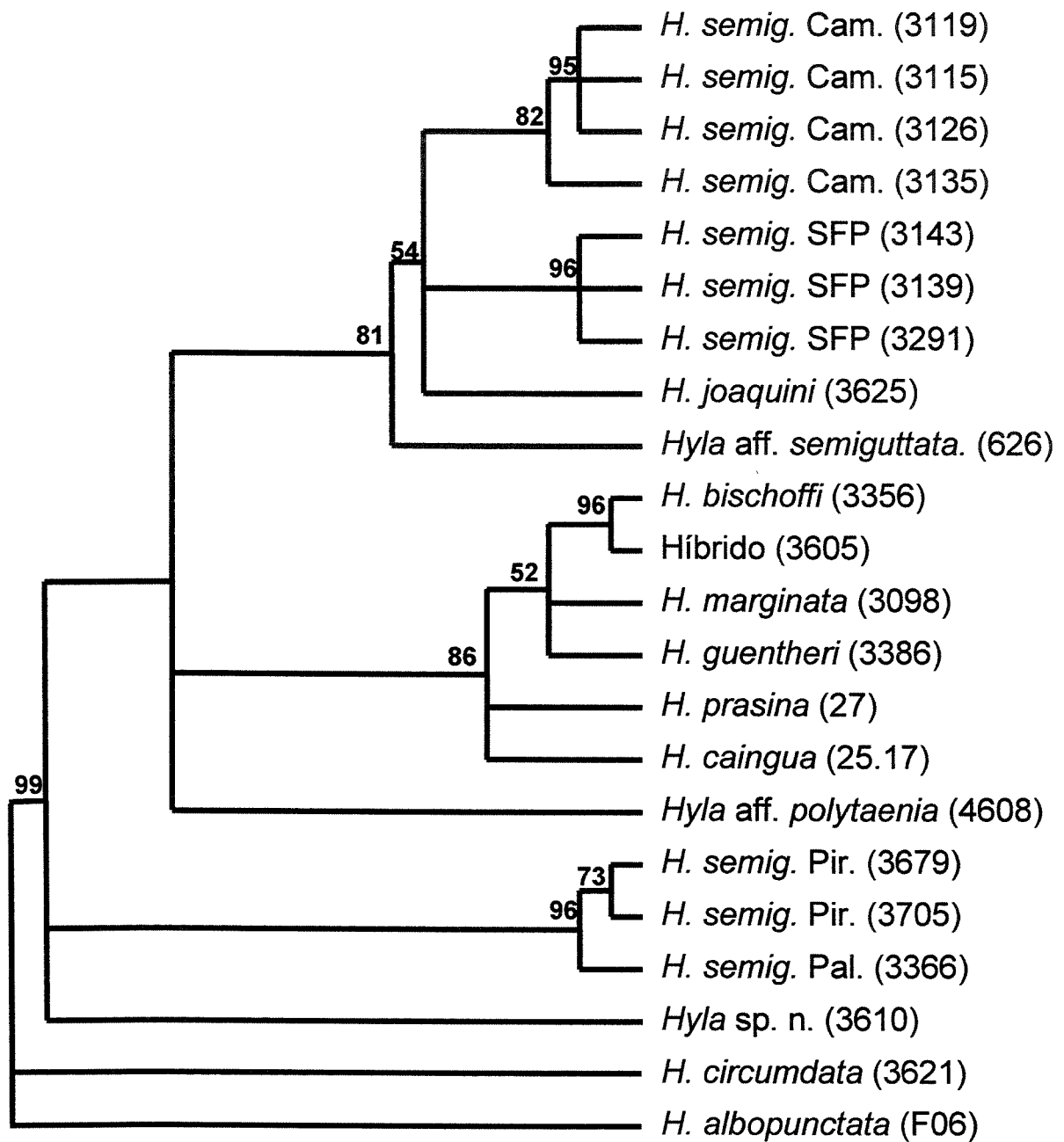


Figura 2

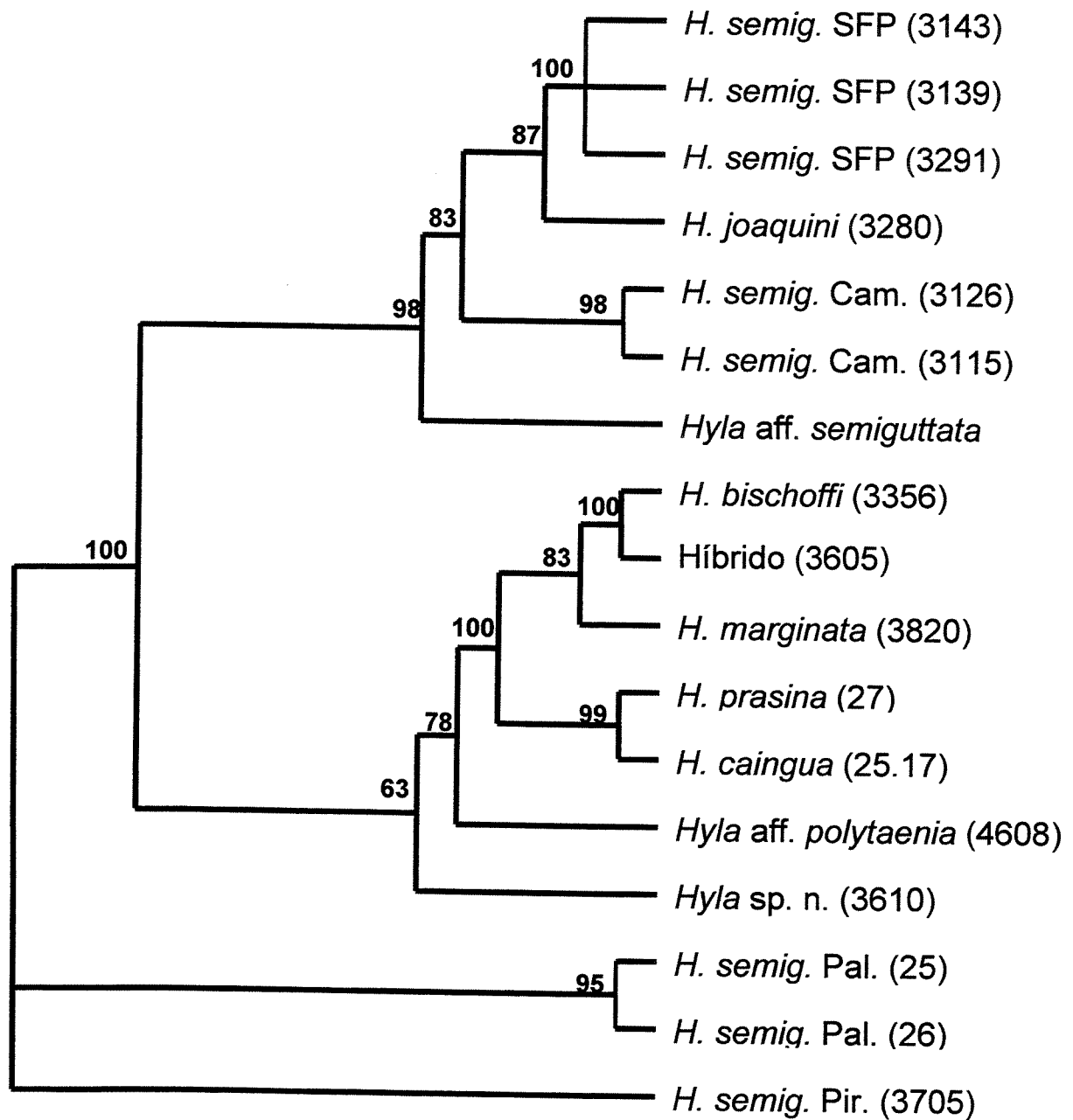


Figura 3

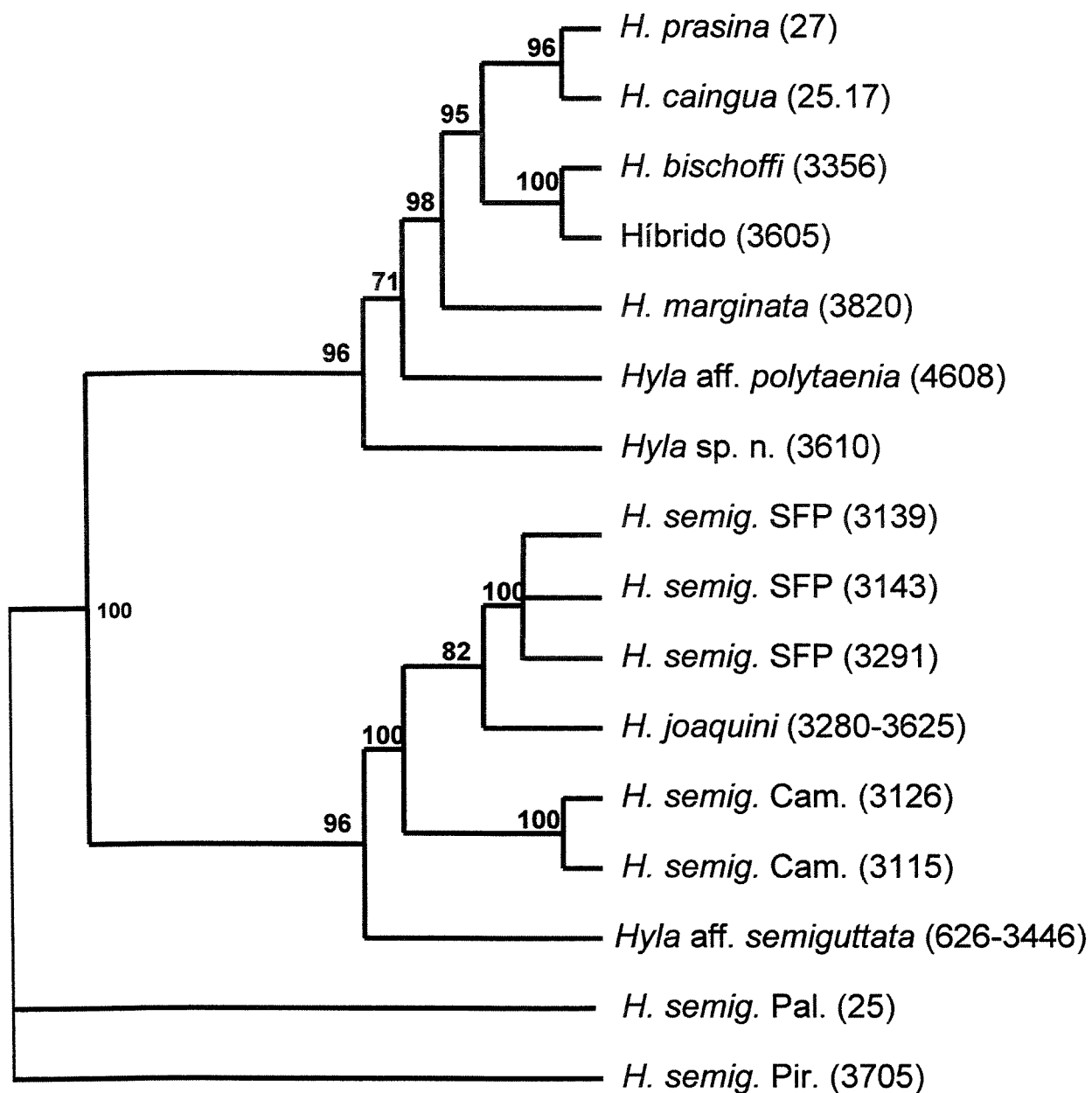


Figura 4

Tabela 1 – Espécimes utilizados nas análises com a descrição da localidade de coleta, as coleções onde foram depositados e o código no mapa da figura 1.

Táxon	Código no Mapa	Origem	Coleção/Nº
<i>H. semiguttata</i> -SFP	a	São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3143
<i>H. semiguttata</i> -SFP	a	São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3291
<i>H. semiguttata</i> -SFP	a	São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3139
<i>H. semiguttata</i> -Cam	b	Cambará do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3119
<i>H. semiguttata</i> -Cam	b	Cambará do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3115
<i>H. semiguttata</i> -Camb	b	Cambará do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3126
<i>H. semiguttata</i> -Cam	b	Cambará do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3135
<i>H. semiguttata</i> -Pal	c	Palmeira, Paraná, Brasil	CFBH 3366
<i>H. semiguttata</i> -Pal	c	Palmeira, Paraná, Brasil	S.D. 25
<i>H. semiguttata</i> -Pal	c	Palmeira, Paraná, Brasil	S.D. 26
<i>H. semiguttata</i> -Pir	d	Piraquara, Paraná, Brasil	CFBH 3679
<i>H. semiguttata</i> -Pir	d	Piraquara, Paraná, Brasil	CFBH 3705

Tabela 1 – Continuação

Táxon	Código no Mapa	Origem	Coleção/Nº
<i>H. aff. semiguttata</i> -S.V.M.Ar	e	San Vicente, Departamento Guarany, Misiones, Argentina	JF 626
<i>H. aff. semiguttata</i> -S.V.M.Ar	e	San Vicente, Departamento Guarany, Misiones, Argentina	CFBH 3446
<i>H. joaquina</i> -Uru	f	Urubici, Santa Catarina, Brasil	CFBH 3625
<i>H. joaquina</i> -Uru	f	Urubici, Santa Catarina, Brasil	CFBH 3280
<i>H. marginata</i>	a	São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3098
<i>H. marginata</i> -SFP	a	São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3820
<i>H. sp. n.</i> -R.Q.	g	Rancho Queimado, Santa Catarina, Brasil	CFBH 3610
<i>H. prasina</i>	h	a ser confirmada	S.D. 27
<i>H. guenther</i>	i	Terra de Areia, Rio Grande do Sul, Brasil	CFBH 3386
<i>H. bischoffi</i> -R.Q.	g	Rancho Queimado, Santa Catarina, Brasil	CFBH 3356
<i>H. circumdata</i>	j	São Bento do Sul, Santa Catarina, Brasil	CFBH 3621
<i>H. albopunctata</i> -Camp	k	Campinas, São Paulo, Brasil	S.D. F06

Tabela 1 – Continuação

Táxon	Código no Mapa	Origem	Coleção/Nº
<i>H. aff. polytaenia</i> -Bor	l	Boracéia, São Paulo, Brasil	CFBH 4608
<i>H. caingua</i> -Cas	m	Cascavel, Paraná, Brasil	S.D. 25.17
Híbrido entre <i>H. bischoffi</i> x <i>H. sp.</i> n. -R.Q.	g	Rancho Queimado, Santa Catarina, Brasil	CFBH 3605

CFBH = coleção Célio Francisco Batista Haddad; JF = coleção Julian Faivovich; SD = será depositado.

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do gene citocromo b e da região controle do DNA mitocondrial.

GENE	PRIMER	SEQÜÊNCIA (5'→3')	Citação Original
Citocromo b	MVZ15-L	GAACATAATGGCCACACWWTACGNAA	Moritz <i>et al.</i> (1992)
	Cytb2-H	AAACTGCAGCCCTCAGAAATGATATTGTCTCTCA	Kocher <i>et al.</i> (1989)
Região Controle	Control	GACATAYTATGTATAATCGAGCATTC	Goebel <i>et al.</i> (1999)
	Wrev-L		
	ControlP-H	GTCCATAGATTCASTTCCGTCAG	Goebel <i>et al.</i> (1999)

Tabela 3 – Análise por máxima parcimônia do gene citocromo b, da região controle e uma combinada entre estas duas regiões do DNA mitocondrial.

Análise	Número de Taxa	Total de Caracteres	Caracteres informativos	AMP	Etapas	IC	IR
Citocromo b	22	361	105	22	360	0,5472	0,6386
Região Controle	17	744	206	3	591	0,6853	0,7452
Combinada	16	1100	291	3	806	0,6675	0,7103

AMP = árvores mais parcimoniosas; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção.

IX. CONCLUSÕES GERAIS

- 1- Os taxa *H. marginata*, *Hyla aff. semiguttata* e as três populações polimórficas de *H. semiguttata* apresentaram $2n = 24$ cromossomos com morfologia muito semelhante,. Este número e morfologia cromossômica também é encontrado em todas as espécies do grupo de *H. pulchella* analisadas até o momento, em outras espécies de *Hyla* neotropicais e holoárticas, sugerindo um estado sinapomórfico destes caracteres neste gênero.
- 2- Heterocromatina centromérica foi detectada em todos os cromossomos. A banda telomérica no braço longo do par 01 e uma banda que se estende do centrômero até quase todo o braço longo do par 10, em *H. marginata*, *Hyla aff. semiguttata* e em *H. semiguttata*, confirmou a grande proximidade entre elas.
- 3- A localização da NOR na região centromérica do braço longo do par 10 em *H. marginata* é o que diferencia esta espécie das demais, as quais apresentaram a marcação no telômero do braço menor do par 01. Assim, a proposta de sinonimização de *H. semiguttata* e de *H. p. joaquini* a *H. marginata* não é confirmada, uma vez que somente *H. semiguttata* (populações de Cambará do Sul, São Francisco de Paula e Piraquara) e *H. p. joaquini* podem ser confundidas citogeneticamente.
- 4- As árvores de consenso estrito geradas a partir das seqüências do gene citocromo b, da região controle e uma combinação entre ambos, revelou que as populações *H. semiguttata* de Cambará do Sul e de São Francisco de Paula possuem estoques gênicos diferentes, formando clados distintos entre si e do clado formado pelas populações de Piraquara e Palmeira.
- 5- Divergência intraespecífica na seqüência do gene citocromo b e da região controle do DNA mitocondrial foi notada nas populações de *H. semiguttata* de Cambará do Sul, Piraquara e Palmeira, apresentando mais de um haplótipo.

- 6- A população de *H. semiguttata* de São Francisco de Paula foi a única que não apresentou divergência intraespecífica entre os três espécimes analisados e que possui uma composição mais conservada na sequência do gene citocromo b e da região controle. Além disso, como esta população difere na morfologia e padrão de canto da população de Cambará do Sul e da espécie *H. p. joaquini*, sugere-se uma revisão taxonômica do mesmo.
- 7- *Hyla aff. semiguttata* da Argentina sempre apareceu como basal e intimamente relacionada com as espécies do clado formado por *H. p. joaquini* e pelas populações de *H. semiguttata* de Cambará do Sul e de São Francisco de Paula, concordando com a grande semelhança citogenética entre esses táxons.
- 8- A presença de um representante do grupo de *H. polytaenia* (*Hyla aff. polytaenia*) no mesmo clado das espécies do grupo de *H. pulchella*, indica que este grupo possa ser parafilético.
- 9- As espécies *H. bishoffi* e *H. guentheri* consideradas próximas ao grupo de *H. pulchella*, sempre estiveram no mesmo clado das espécies do grupo de *H. pulchella*, corroborando a proposta de inclusão nesse grupo.
- 10- Análise filogenética molecular mostra uma grande proximidade de *H. marginata* com *Hyla aff. polytaenia*, *H. bishoffi* e *H. guentheri* mas a análise de caracteres morfológicos claramente a separa deste clado (Garcia *et al. em prep.*). Este resultado indica que diferentes histórias evolutivas podem ser inferidas de acordo com o tipo de caracter analisado.
- 11- A ocorrência de hibridação natural entre *H. bishoffi* e *Hyla sp. n.* demonstra que um processo de especiação possa estar ocorrendo nas populações de *H. bishoffi* e *H. sp. n.*, apesar da pequena semelhança no padrão de canto, uma vez que a vocalização é um dos principais fatores de isolamento reprodutivo pré-gamético em populações simpátricas de anuros. Nas árvores filogenéticas obtidas o suposto híbrido sempre

apareceu como táxon irmão de *H. bischoffi* e não de *Hyla sp. n.*, indicando que uma transferência interespecífica do DNA mitocondrial ocorreu de *H. bischoffi* e não de *Hyla sp. n.*.

- 12- Os resultados moleculares a partir das seqüências do gene citocromo b e da região controle do DNA mitocondrial indicam que a posição da NOR na região centromérica do braço longo do par 10 em *H. marginata* parece ser uma condição derivada em relação a posição no telômero do par 1 em *H. joaquini*, *Hyla aff. semiguttata* e nas populações de *H. semiguttata*.
- 13- Apesar da sugestão da presença de um complexo formado pelas espécies *H. marginata*, *H. semiguttata*, *H. joaquini*, *H. ericae* e *Hyla sp. n.* (em fase de descrição), os resultados obtidos mostram uma origem polifilética das espécies do grupo de *H. pulchella*, uma vez que as espécies e populações acima citadas sempre estiveram em clados distintos.

Apêndice 1 - Sequências do gene citocromo b utilizadas para análise filogenética

		
	10 20 30 40 50	
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	CCCACNATTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	CCCACNATTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	CCCACNATTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-Cam</i> (3119)	CCCACCGTTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	CCCACCGTTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	CCCACNGTTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-Cam</i> (3135)	CCAATTGTTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-Pal</i> (3366)	CCCATCATCA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-Pir</i> (3679)	CCCATCATCA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	CCCATCATCA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. aff. semig</i> (0626)	CCTATTATTA AAGTTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. joaquinii</i> (3625)	CCAATTATTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. marginata</i> (3098)	CCCATCATTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGATCTCC CCACCCAGT	
<i>H. sp. n.</i> (3610)	CCTATTATTA AAATTGTAAA CAGCTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCTGT	
<i>H. prasina</i> (0027)	CCCATTATTA AAATTGTAAA CAGCTCATTC ATTGACCTCC CTACCCAGC	
<i>H. guentheri</i> (3386)	CCCATCATTA AAATTGTCAA CAGCTCATTT ATTGATCTAC CCACCCAGT	
<i>H. bischoffi</i> (3356)	CCTATTATTA AAATTGTCAA CAGCTCATTT ATTGATCTCC CCACCCAGT	
<i>H. circumdata</i> (3621)	CCAATTATAA AAATTATTAA TAATTCATTT ATTGATCTCC CAGCACCTGT	
<i>H. albopuncta</i> (0F06)	CCCGTCATTA AAATTATTAA TGGCTCATTC ATTGACTTAC CAAGCCCCGC	
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	CCCTCCATTA AAATTATTAA TAACTCATTT ATTGACCTCC CCACCCCAT	
Híbrido (3605)	CCCTCCATTA AAATTGTCAA CAGCTCATTT ATTGATCTCC CCACCCAGT	
<i>H. caingua</i> (2517)	NCCNCCATAA AAATTGTTAN CAGCTCATTT ATTGACCTTC CAACCCCAAT	
		
	60 70 80 90 100	
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	CAATATCTCA GCGTGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTCGGT ATTTGTCTAA	
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	CAATATCTCA GCGTGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTCGGT ATTTGTCTAA	
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	CAATATCTCA GCGTGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTCGGT ATTTGTCTAA	
<i>H. semig-Cam</i> (3119)	CAATATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTCGGT ATTTGTCTAA	
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	CAATATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTCGGT ATTTGTCTAA	
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	CAATATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTCGGT ATTTGTCTAA	
<i>H. semig-Cam</i> (3135)	TAATATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTCGGT ATTTGTCTAA	
<i>H. semig-Pal</i> (3366)	CAATATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGTTC TCTCCTAGGT GTCTGCCTAA	
<i>H. semig-Pir</i> (3679)	CAATATTTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTAGGT ATTTGCCTAA	
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	CAATATTTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTAGGT ATTTGCCTAA	
<i>H. aff. semig</i> (0626)	CAATATTTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC CCTTCTCGGT ATTTGTTTAA	
<i>H. joaquinii</i> (3625)	CAATATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTCGGT ATTTGTCTAA	
<i>H. marginata</i> (3098)	TAATATTTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC CCTTCTAGGT ATTTGCTTGA	
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TAATATTTCA GCATGGTGAA ACTTTGGCTC CCTTCTCGGC GTTTCCTAG	
<i>H. prasina</i> (0027)	CAATATCTCA GCCTGATGAA ACTTTGGCTC CCTTCTTGA GTCTGCTTAA	
<i>H. guentheri</i> (3386)	CAATATTTCA GCATGATGAA ACTTTGGTTC CCTTCTCGGT ATTTGTCTTA	
<i>H. bischoffi</i> (3356)	CAATATTTCA GCATGGTGAA ACTTTGGCTC CCTTCTAGGT ATCTGCTTGA	
<i>H. circumdata</i> (3621)	TAATATCTCA TCCTGATGAA ACTTTGGCTC TCTTCTAGGA GTCTGCTTAG	
<i>H. albopuncta</i> (0F06)	CAACATTTCT GCATGATGAA ATTTTGGCTC CCTACTAGGC GTTTGTCTTG	
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	TAATATTTCA GCATGATGAA ACTTTGGCTC CCTTCTTGGT ATTTGCTTAA	
Híbrido (3605)	CAATATTTCA GCATGGTGAA ACTTTGGCTC CCTTCTAGGT ATCTGCTTGA	
<i>H. caingua</i> (2517)	CAATATCTCA GCATGATGAA ACTTTGGTTC CCTTCTCGGT ATCTGCTTAA	

Apêndice 1 - Continuação

					
	110	120	130	140	150
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAT
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAT
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAT
<i>H. semig-Cam</i> (3119)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	TACTGCAGAT
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	TACTGCAGAT
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	TACTGCAGAT
<i>H. semig-Cam</i> (3135)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	TACTGCAGAT
<i>H. semig-Pal</i> (3366)	TTTTACAAAT	CGCTACGGGT	CTGTTCTTAG	CAATACACTA	TACCGCAGAT
<i>H. semig-Pir</i> (3679)	TTTTACAAAT	CGCTACGGGT	CTGTTCTTAG	CAATACACTA	TACCGCAGAT
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	TTTTACAAAT	CGCTACGGGT	CTGTTCTTAG	CAATACACTA	CACCGCAGAT
<i>H. aff.semig</i> (0626)	TTTTACAAAT	CGCTACAGGT	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAC
<i>H. joaquina</i> (3625)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAT
<i>H. marginata</i> (3098)	TTTTACAAAT	TGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAC
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTTCTAG	CAATACACTA	TACCGCAGAT
<i>H. prasina</i> (0027)	TTCTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTTTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAC
<i>H. guentheri</i> (3386)	TTCTACAGAT	TGCCACGGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAC
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TTCTACAGAT	TGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAC
<i>H. circumdata</i> (3621)	TTTTACAGAT	CGCTACAGGG	CTTTTCTTAG	CAATACACTA	CACAGCCGAT
<i>H. albopuncta</i> (0F06)	TTATTCAGAT	CGCTACAGGG	CTATTTCTCG	CTATACACTA	TACTGCAGAT
<i>H. aff.polyt</i> (4608)	TTTTACAAAT	CGCCACAGGC	TTATTTCTAG	CTATACATTA	CACCGCAGAT
Híbrido (3605)	TTCTACAGAT	TGCCACAGGC	TTATTCTTAG	CAATACATTA	CACCGCAGAC
<i>H. caingua</i> (2517)	TTTTACAAAT	TGCCACAGGC	TTATTTTTAG	CTATACATTA	CACCGCGGAC
					
	160	170	180	190	200
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
<i>H. semig-Cam</i> (3119)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
<i>H. semig-Cam</i> (3135)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
<i>H. semig-Pal</i> (3366)	ACCTCTATGG	CCTTTTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTCAACAA
<i>H. semig-Pir</i> (3679)	ACCTCTATGG	CTTTTTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTCAACAA
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	ACCTCTATGG	CTTTTTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTCAACAA
<i>H. aff.semig</i> (0626)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTGAACAA
<i>H. joaquina</i> (3625)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	CGTAGCCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
<i>H. marginata</i> (3098)	ACCTCCATAG	CATTTTCATC	CGTGGCTCAT	ATTTGTCGGG	ACGTCAATAA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	ACCTCTATGG	CCTTTTCATC	CGTAGCCAT	ATCTGCCGAG	ACGTAAACAA
<i>H. prasina</i> (0027)	ACCTCCATAG	CGTTTTCATC	CGTAGCCAT	ATTTGTCGAG	ACGTCAATAG
<i>H. guentheri</i> (3386)	ACCTCTATAG	CATTTTCATC	CGTAGCTCAT	ATTTGTCGAG	ACGTAAATAA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	ACCTCCATAG	CATTTTCATC	CGTGGCTCAT	ATTTGTCGAG	ACGTAAATAA
<i>H. circumdata</i> (3621)	ACGTCACTAG	CTTTTCTTTC	AATCGCTCAT	ATTTGCCGAG	ATGTAAATTA
<i>H. albopuncta</i> (0F06)	ACATCAATAG	CTTTTTCCTC	CATCGCCAT	ATCTGTCGAG	ATGTAAATAA
<i>H. aff.polyt</i> (4608)	ACCTCCATAG	CCTTCTCATC	TGTAGCTCAC	ATCTGTCGAG	ACGTTAACAA
Híbrido (3605)	ACCTCCATAG	CATTTTCATC	CGTGGCTCAT	ATTTGTCGAG	ACGTTAATAA
<i>H. caingua</i> (2517)	ACCTCCATAG	CATTTTCATC	AGTAGCTCAT	ATTTGTCGAG	ACGTTAATAA

Apêndice 1 - Continuação

					
	210	220	230	240	250
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	TGGGGCCTCA	TTTTTCTTCA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	TGGGGCCTCA	TTTTTCTTCA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	TGGGGCCTCA	TTTTTCTTCA
<i>H. semig-Cam</i> (3119)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTCA
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTCA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTCA
<i>H. semig-Cam</i> (3135)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTCA
<i>H. semig-Pal</i> (3366)	CGGGTGGCTT	CTACGGAACC	TTCATGCCAA	CGGGGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. semig-Pir</i> (3679)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCATGCCAA	CGGGGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCATGCCAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. aff. semig</i> (0626)	CGGATGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	TGGAGCCTCA	TTTTTTTTTCA
<i>H. joaquinii</i> (3625)	CGGGTGACTT	CTACGAAACC	TTCACGCCAA	TGGAGCCTCA	TTTTTCTTCA
<i>H. marginata</i> (3098)	CGGCTGACTT	CTTCGAAACC	TTCACGCCAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	CGGTTGACTT	CTACGCAACC	TCCATGCCAA	TGGAGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. prasina</i> (0027)	CGGCTGACTT	CTTCGAAATC	TTCACGCCAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. guentheri</i> (3386)	CGGCTGACTT	CTTCGAAATC	TTCACGCCAA	TGGGGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	CGGCTGACTT	CTTCGAAACC	TTCACGCTAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. circumdata</i> (3621)	CGGCTGACTT	CTCCGTAATC	TGCATGCAAA	CGGAGCCTCT	TTCTTTTTTTA
<i>H. albopuncta</i> (0F06)	TGGCTGACTT	CTACGCAACC	TTCATGCAAA	CGGAGCCTCC	TTCTTTTTTTA
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	TGGCTGACTT	CTGCGAAACC	TTCACGCTAA	CGGGGCCTCA	TTTTTCTTCA
Híbrido (3605)	CGGCTGACTT	CTTCGAAACC	TTCACGCTAA	CGGAGCCTCA	TTTTTCTTTA
<i>H. caingua</i> (2517)	CGGCTGACTT	CTTCGAAACC	TTCATGCCAA	CGGAGCCTCA	TTCTTTTTTTA

					
	260	270	280	290	300
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGGG	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGGG	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGGG	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-Cam</i> (3119)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGGA	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGGA	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGGA	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-Cam</i> (3135)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGGA	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-Pal</i> (3366)	TCTGCATCTA	CCTTCACATC	GGCCGGGGTG	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-Pir</i> (3679)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGTG	TGTACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGTG	TGTACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. aff. semig</i> (0626)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGAA	TATACTACGG	ATCATTTCTTA
<i>H. joaquinii</i> (3625)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGAA	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
<i>H. marginata</i> (3098)	TTTGCATTTA	TCTACACATT	GGTCGAGGGA	TATATTATGG	CTCATTTTTTA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TCTGCATCTA	CCTTCACATT	GGCCGAGGTA	TATACTATGG	GTCAATTTTTA
<i>H. prasina</i> (0027)	TTTGCATTTA	TCTGCACATC	GGACGAGGAT	TATACTATGG	CTCATTTTTTA
<i>H. guentheri</i> (3386)	TTTGCATTTA	CCTACACATC	GGACGGGGTA	TATACTATGG	CTCATTTTCTA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TTTGCATTTA	CCTGCACATC	GGACGAGGTA	TATATTATGG	CTCATTTTTTG
<i>H. circumdata</i> (3621)	TCTGCATCTA	TCTTCACATT	GGACGAGGCA	TATACTACGG	CTCATTTCTT
<i>H. albopuncta</i> (0F06)	TCTGTATTTA	CATACATATT	GGACGGGGCA	TGTACTATGG	CTCTTTTCTT
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	TCTGCATCTA	CCTCCACATC	GGCCGAGGTA	TATACTACGG	CTCATTTTTTA
Híbrido (3605)	TTTGCATTTA	CCTGCACATC	GGACGAGGTA	TATATTATGG	CTCATTTTTTG
<i>H. caingua</i> (2517)	TTTGCATTTA	CTTACATATC	GGACGAGGCG	TGTACTATGG	TTCAATTTTTA

Apêndice 1 - Continuação

					
	310	320	330	340	350
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TTTAAAGAAA	CTTGAAATGT	TGGGGTCATT	TTACTGTTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TTTAAAGAAA	CTTGAAATGT	TGGGGTCATT	TTACTGTTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TTTAAAGAAA	CTTGAAATGT	TGGGGTCATT	TTACTGTTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-Cam</i> (3119)	TTTAAAGAGA	CTTGAAACGT	TGGGGTCATT	TTATTGTTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	TTTAAAGAGA	CTTGAAACGT	TGGGGTCATT	TTATTGTTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	TTTAAAGAGA	CTTGAAACGT	TGGGGTCATT	TTATTGTTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-Cam</i> (3135)	TTTAAAGAAA	CTTGAAACGT	TGGGGTCATT	TTATTGTTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-Pal</i> (3366)	TTTAAAGAGA	CTTGAAATGT	TGGGGTTATT	TTACTATTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-Pir</i> (3679)	TTTAAAGAAA	CTTGAAATGT	TGGAGTTATT	TTACTATTTC	TAGTAATAGC
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	TTTAAAGAGA	CTTGAAATGT	TGGAGTTATT	TTACTATTTC	TAGTAATAGC
<i>H. aff.semig</i> (0626)	TTTAAAGAAA	CTTGAAATGT	TGGGATCATT	TTACTATTTC	TAGTAATAGC
<i>H. joaquini</i> (3625)	TTTAAAGAAA	CTTGAAATGT	TGGGGTCATT	TTACTGTTTC	TAGTAATAGC
<i>H. marginata</i> (3098)	TTTAAAGAGA	CTTGAAATGT	AGGAGTCATT	CTCCTATTTC	TAGTTATAGC
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TTTAAAGAAA	CCTGAAATGT	TGGGGTCATT	TTGCTATTCC	TGGTAATAGC
<i>H. prasina</i> (0027)	TTTAAAGAGA	CCTGAAATGT	CGGGATTATT	CTTCTATTTC	TAGTCATAGC
<i>H. guentheri</i> (3386)	TTTAAAGAGA	CCTGGAATGT	AGGGGTCATT	CTCCTATTTC	TGGTTATAGC
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TTTAAAGAAA	CTTGAAATGT	CGGAGTTATT	CTTCTATTTC	TAGTTATAGC
<i>H. circumdata</i> (3621)	TTTAAAGAAA	CATGAAATGT	TGGAGTAATT	TTACTCTTCT	TACTTATAGC
<i>H. albopuncta</i> (0F06)	TTTAAAGAGA	CCTGAAACAT	CGGAGTTGTT	CTTTTGTTCC	TTGTTATAGC
<i>H. aff.polyt</i> (4608)	TTTAAAGAAA	CCTGAAATGT	TGGGGTAATT	TTACTGTTTC	TAGTTATAGC
Híbrido (3605)	TTTAAAGAAA	CTTGAAATGT	CGGAGTTATT	CTTCTATTTC	TAGTTATAGC
<i>H. caingua</i> (2517)	TTTAAAGAAA	CCTGAAACGT	GGGGGTTATT	CTTCTACTTC	TAGTAATAGC

		.
	360	
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TACTGCCTTT	G
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TACTGCCTTT	G
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TACTGCCTTT	G
<i>H. semig-Cam</i> (3119)	CACCGCCTTT	G
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	CACCGCCTTT	G
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	CACCGCCTTT	G
<i>H. semig-Cam</i> (3135)	TACCGCCTTT	G
<i>H. semig-Pal</i> (3366)	CACAGCCTTT	G
<i>H. semig-Pir</i> (3679)	CACAGCCTTT	G
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	CACAGCCTTT	G
<i>H. aff.semig</i> (0626)	TACTGCCTTT	G
<i>H. joaquini</i> (3625)	TACCGCCTTT	G
<i>H. marginata</i> (3098)	CACAGCCTTC	G
<i>H. sp. n.</i> (3610)	CACAGCCTTT	G
<i>H. prasina</i> (0027)	TACAGCCTTT	G
<i>H. guentheri</i> (3386)	CACAGCCTTC	G
<i>H. bischoffi</i> (3356)	CACAGCCTTT	G
<i>H. circumdata</i> (3621)	CACGGCTTTT	G
<i>H. albopuncta</i> (0F06)	CACAGCTTTT	G
<i>H. aff.polyt</i> (4608)	CACAGCCTTT	G
Híbrido (3605)	CACAGCCTTT	G
<i>H. caingua</i> (2517)	TACAGCCTTT	G

OBS: seqüências 3135, 3366, 3679, 3705, 626, 3625, 3098, 3610, 27, 3386, 3356, 3621 e F06 foram cedidas por Julian Faivovich

Apêndice 2 - Sequências da região controle do DNA mitocondrial utilizadas para análise filogenética. – = gaps, K = T ou G, S = C ou G, R = A ou G, W = A ou T, Y = C ou T e M = A ou C. Foram excluídas das análises as seqüências 34, 152, 159, 184, 217, 240, 245, 267, 361, 400, 431, 462, 522, 552, 577-582, 635, 684 e 686.

					
	10	20	30	40	50
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGAKGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGC
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGC
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGAKGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGC
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGC
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	TGTCCATAGA	TTCA-TTCCG	TCAGAKGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGC
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGT
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGCCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGT
<i>H. prasina</i> (0027)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGACT	CCTKGAAGGG	GGATAACTGc
<i>H. caingua</i> (2517)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGACT	CTTGGAAGGG	GGATAACTGC
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGTCT	TTT-GAAGGG	GAACACCTGT
<i>H. marginata</i> (3820)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGCCT	CTT-GAAGGG	GAACACCTGC
Híbrido (3605)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGTCT	TTT-GAAGGG	GAACACCTGT
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGT
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGAKGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGC
<i>H. joaquinii</i> (3280)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGAKGTCT	TTT-GAAGGG	GAACAACTGC
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGACT	CTTGGAAGGG	GGACACCTGC
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	TGTCCATAGA	TTCACTTCCG	TCAGATGTCT	CTT-GAAGGG	GAACAACTGT

					
	60	70	80	90	100
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	KACTCTTATT	TTAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TACTCTTATT	TTAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TACTCTTATT	TTAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	TACTCTTATT	TTAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	TACTCTTATT	TTAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	TACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	TACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. prasina</i> (0027)	TACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAGTT
<i>H. caingua</i> (2517)	KACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCKACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAGCCATA	AGCTGCCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. marginata</i> (3820)	SACTCTTGTG	GCAGGCCCAT	GGRAACCATA	GGCTGTCAAA	CCCTAGAATT
Híbrido (3605)	TACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAGCCATA	AGCTGCCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	TACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCTACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	KACTCTTGTG	TTAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCKACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. joaquinii</i> (3280)	KACTCTTGTG	TTAGGTCCAT	GGAAACCATA	AGCKACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. sp. n.</i> (3610)	KACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAGCCATA	AGCKACCAAA	CCCTAGAATT
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	KACTCTTGTG	GCAGGTCCAT	GGAAGCCATA	AGCTGCCAAA	CCCTAGAATT

Apêndice 2 - Continuação

					
	110	120	130	140	150
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	CATATGAGGC	CATGTAAGGK	CTGTGTGCTT	GGTGCCAAAG	TCTTGATGAA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	CATATGAGGC	CATGTAAGGT	CTGTGTGCTT	GGTGCCAAAG	TCTTGATGRA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	CATATGAGGC	CATGTAAGGK	CTGTGTGCTT	GGTGCCAAAG	TCTTGATGAA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	CATATGAGGC	CATGTAAGGT	CTGKKGCTT	AGTGCCAAAG	TCTTGRTGAA
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	CATATGAGGC	CATGTAAGGK	CTGTGTGCTT	AGTGCCAAAG	TCTTGRTGRA
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	CATATGAGGC	CATGTAAGGR	CTGTGTGCTT	AGTGCCAAAG	TCTTGATGAA
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	CATATGAGGC	CATGTAAGGR	CTGTGTGCTT	AGTGCCAAAG	TCTTGATGAA
<i>H. prasina</i> (0027)	CAC-TGAGGC	CATGTAAGGK	CTGTGTGTTT	GGTGCCATTA	TCTTGATGAA
<i>H. caingua</i> (2517)	CATATGAGGC	CATGTAAGGR	CTGTGTGCTT	AGTGCCACAA	TCTCAATGAA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	CATATGAGGC	CATGTAAGGT	CTATGTGCTT	AGTGCCATAA	TATTGATGAA
<i>H. marginata</i> (3820)	CATATGAGGC	CATGTAAGGK	CTTTAKGCTT	GGKGCATGA	TCTTGATGAA
Híbrido (3605)	CATATGAGGC	CATGTAAGGT	CTATGTGCTT	AGTGCCATAA	TATTGATGAA
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	CATATGAGGC	CATGTAAGGR	CTGTGTGCTT	GGTGCCAAAG	TCTTGATGAA
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	CATATGAGGC	CATGTAAGGK	CTGTGTGCTT	GGTGCCAAAG	TCTTGATGAA
<i>H. joaquinii</i> (3280)	CATATGAGGC	CATGTAAGGK	CTGTGTGCTT	GGTGCCAAAG	TCTTGATGAA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	CATATGAGGC	CATGTAAGGK	CTATGTGCTT	GGTGCCAAAG	TCTTGATGTA
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	CATATGAGGC	CATGTAAGGK	CTGTGTGCTT	GGTGCCATGA	TACTGATGAA
					
	160	170	180	190	200
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	A-AATAAC-G	AAGGAGGTTT	GAAAAAAAAA	TTC-ATGTGT	TAAGATC-AG
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	A-AATAMC-G	AAGGAGGTTT	GAAAAAAAAA	TTC-ATGTGT	TAAGAYC-AG
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	A-AATAAC-G	AAGGAGGTTT	GAAAAARAAA	TTC-ATGTGT	TAAGATC-AG
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	A-AWTAAC-G	AAGGAGGTTT	GAAAAAAAAA	TTC-ATGTGT	TAAGATC-AG
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	A-AATWACCG	AAGGAGGTTT	GAAAAAAAAA	TTCCATGTGT	TAAGATCCAG
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	A-AATAAC-G	AAGGGTGTTT	GAAGGGAAAA	TTC-ATGTGT	TAAGACCCAG
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	A-AATAAC-G	AAGGGTGTTT	GAAGGGAAAA	TTC-ATGTGT	TAAGACC-AG
<i>H. prasina</i> (0027)	C-AATAAT-G	AAGAGAGTTG	TTAAAGAAAA	TTW-ATGTGT	TTATGAAGTA
<i>H. caingua</i> (2517)	C-AATTAT-G	TAGAGAGTTG	TTAGAGAAAA	TTC-ATGTGT	TTATGGGTTA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	C-GATTAT-G	AAGAGAAGTG	TTAAAGAAAA	TTT-ATGTGT	TTATGAATTT
<i>H. marginata</i> (3820)	CCGATTAT-G	TAGAGAGTTG	TTAAAAAAAA	TTC-ATGTGT	TTATGGATTA
Híbrido (3605)	C-GATTAT-G	AAGAGAAGTG	TTAAAGAAAA	TTT-ATGTGT	TTATGAATTT
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	A-AATAAC-G	AAGGGTGTTT	GAAGGAAAAA	TTC-ATGTGT	TAAGACC-AG
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	A-GATAAC-G	AAGGATATTT	GAAAAAAAAA	TTC-ATGTGT	TAAGATC-AG
<i>H. joaquinii</i> (3280)	A-AATAAC-G	AAGGAAGTTG	GAAAAAAAAA	TTC-ATGCGT	TAAGATCCAG
<i>H. sp. n.</i> (3610)	A-AATAAC-G	AAGGATGTTT	GAAAAARATA	TTC-ATGTGT	TTGAAVA-GG
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	A-ATTAAC-G	AAGGGTGTTT	GAAAAARAAG	TCA-TGTTTT	TTAGATCATT

Apêndice 2 - Continuação

					
	210	220	230	240	250
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TTTAGGG-GA	TAAATC-AAT	TTT-AT-TTT	TAATTAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TTTAGGG-GA	TAAATC-AAT	TTTAAT-TTT	TAATTAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TTTAGGG-GA	TAAATC-AAT	TTT-AT-TTT	TAATTAGAA-	GMCC-ATGGA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	GTTAGGG-TA	TAAATC-AAG	TTYMT-TTC	TAATTAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	GTTAGGG-TA	TAAATCAAGT	TTT-AT-TTC	TAATTAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	GTTAGGG-TA	TAAATC-AAT	TTYATT-T-T	TATATAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	GTTAGGG-TA	TAAATC-AAT	TYCAT-TTT	TATATAGGAA	GACC-ATGGA
<i>H. prasina</i> (0027)	AT--GGGG-T	TAAATC-AAT	TTTAGGAATT	AT-ATAGAA-	GGCC-ATGAA
<i>H. caingua</i> (2517)	AT--GGGG--	TAAATCAAT	TTTAGGAAAT	AA-GTAAAA-	GGCC-ATGGA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TTTATGGGGT	TAAATC-AAT	TTTAGGGAWT	TAAATAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. marginata</i> (3820)	TG--GGGG-T	TAAATC-AAT	CTCAGT-AAT	TAAGTAGAA-	GACC-ATGGA
Híbrido (3605)	TTTATGGG-T	TAAATC-AAT	TTTAGG-AAT	TAAATAGAA-	GACCCATGGA
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	GTTAGGG-TA	TAAATCTATT	TTTATT-TTC	TATATAGAR-	GACC-ATGGA
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	TTTAGGGGAA	TAAATC-AAT	TTTTAT-TTC	TAATTAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. joaquinini</i> (3280)	GTTAGGG-GA	TAAACCCAAT	TTT-AT-TTT	TAATTAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TTTAGGG-TA	TARATC-AGT	TTTTGT-TTT	TAAATAGAA-	GACC-ATGGA
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	GTTAGAG-AG	TAAATCAATT	TTAGGT-AAA	GGAATWGRA-	GACC-ATGAG

					
	260	270	280	290	300
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	AGTATATTCT	TCAAG-TTTT	ATAAA--CGA	GATATGCTGG	TTCTGACGGA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	AGTATATTCT	TCAAG-TTTT	ATAAA--CGA	GATATGCTGG	TTCTGACGGA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	AGTATATTCT	TCAAG-TTTT	ATAAA--CGA	GATATGCTGG	TTCTGACGGA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	AGTGTATTCT	TCAAG-TTTT	ATAAA--CGA	GATATGCTAG	TTCTGACGGG
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	AGTGTATTCT	TCAAG-TTTT	ATAAA--CGA	GATATGCTAG	TTCTGACGGA
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	AGTTTATTAA	GCAAG-TTTT	ATAAA--CGG	GGTATGCTAG	TTTTGACGGA
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	AGCTTATTAT	GCAAG-TTTT	ATAAA--CGG	GGTATGCTMG	TTTTGACGGA
<i>H. prasina</i> (0027)	AGTGTATTTA	TCAAG-GTTA	ATTAT--CGA	GATATTCTTG	CTTTGACGGA
<i>H. caingua</i> (2517)	AGGTGTATTA	ATCAAGGTTA	ATTGG--TGG	GATATTCTTG	CTTTGACGGA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	AGTGGGTTTA	TCAAT-TTTA	TTTAT--CGA	GATATTCTTG	TTTTGACGGA
<i>H. marginata</i> (3820)	AGTGGATTAA	TCAAG-TTTA	TTTAG--CGA	GATATTCTTG	GTTTGACGGA
Híbrido (3605)	AGTGGGCTTA	TCMAT-TTTA	TTTAT--CGA	GATATTCTTG	TTTTGACGGA
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	AGTTTATTAT	ACAAGGTTTT	ATAAAACCGG	GATATGCTAG	TTTTGACGGA
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	AGTATATTCT	TCAAG-TTTT	ATAAA--CGG	GATATGCTAG	TTCTGACGGA
<i>H. joaquinini</i> (3280)	AGTGTATTCT	TCAAG-TTTT	ATAAA--CGA	GATATGCTGG	TTCTGACGGA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	AGGGTATTAT	ACAAG-TTTT	ATAGA--CGA	GATATGCTTG	TTTTGACGGA
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	GGGTATTAT	ACAA--TTTT	GTAAA--CGA	GATATTCTTG	TTTTGACGGA

Apêndice 2 - Continuação

					
	310	320	330	340	350
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TTACTTAAGG	CGCAATTACT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTTAAA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TTACTTAAGG	CGCAATTACT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTTAAA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TTACTTAAGG	CGCAATTACT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTTAAA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	TTACTTAAGG	CACAATTACT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTCAAA
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	TTACTTAAGG	CACAATTACT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTCAAA
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	TAA---TAGG	TACAATTACT	CATGATAAGG	CTTGAGTAAA	GTGGGTCAAA
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	TAA---TAGG	TACAATTACT	CATGATAAGG	CTTGAGTAAA	GTGGGTCAAA
<i>H. prasina</i> (0027)	TTATATAAGG	TGAY-TTTTA	CACTGTAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTTAAA
<i>H. caingua</i> (2517)	TTATATAAGG	TGATATTCTA	CAATTAAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTTAAA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TT--TTAAGA	TGTTACTCTT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTCAAA
<i>H. marginata</i> (3820)	TA-TGCAAGA	TGCTACTCTT	CATGATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTTAAA
Híbrido (3605)	TT--TTAAGA	TGTTACTCTT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTCAAA
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	TAA---TAGG	TACAATTACT	CATGATAAGG	CTTGAGTAAA	GTGGGTCAAA
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	TTACCTGGGG	CACAATTACT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTCAAA
<i>H. joaquini</i> (3280)	TTACTTAAGG	CACAATTACT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	TTGGGTTAAA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TTATTTAGGG	CACAATTACT	CATGATAAGG	CTTGAGTAAA	GTGGGTTAAA
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	TTATTTAAGG	TACAATTACT	CATTATAAGG	CTTGAGTAAA	GTGGGTCAAA
					
	360	370	380	390	400
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	GTTGATCTTA	-TAAAATT-G	TTTATGTATA	GTTAGTTGTA	TTTGAATAT-
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	GTTGATCTTA	-TAAAATT-G	TTTATGTATA	GTTAGTTGTA	TTTGAATAT-
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	GTTGATCTTA	-TAAAATT-G	TTTATGTATA	GTTAGTTGTA	TTTGAATAT-
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	GTTGGTCTTA	-TAAAATT-G	TTTATGTATA	GTTAGTTGTA	TTTGAATAT-
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	GTTGGTCTTA	-TAAAATT-G	TTTATGTATA	GTTAGTTGTA	TTTGAATAT-
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	GTTGTTCTTG	-TTAATTT-G	TTTATGTATA	GTCAGTTGTA	TCAGGATAA-
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	GTTGTTCTTG	-TTAATTT-G	TTTATGTATA	GTCAGTTGTA	TCAGGATAA-
<i>H. prasina</i> (0027)	GCTGATTTTC	-TTAACAATG	TTTATGTATA	GTTAATTGAA	TTTTATGTA-
<i>H. caingua</i> (2517)	GTTGATCTTC	CTTAATAATG	TTTATGTATA	GTCAGTTGAA	TAATGCTTG-
<i>H. bischoffi</i> (3356)	GTTGATCTYC	-TTAATAATG	TTTATATAAA	AATAGTTGTG	TTTT-ATTT-
<i>H. marginata</i> (3820)	GCTGATCTYC	-TTAATAATG	TTTATGTATA	AATAGGTGAA	TCTT-ATTT-
Híbrido (3605)	GTTGATCTTC	-TTAATAATG	TTTATATAAA	AATAGTTGTG	TTTTAATTT-
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	GTKGATCTTG	-TTAATTT-G	TTTAWGTATA	GTCAGTTGTG	TTTAAATAA-
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	GTTGTTCTTG	-TAGTATT-G	TTTATGTATA	GTTAGTTGAG	TTTTAATAAG
<i>H. joaquini</i> (3280)	GTTGATTTTA	-TAAAATT-G	TTTATGTATA	GTTAGTTGTA	TTTGAGTAT-
<i>H. sp. n.</i> (3610)	GTTGTTCTTA	-TTKGATT-G	TTTATGTATA	GTCAGTTGTA	TATGAATAT-
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	GTTGTTTTTG	-TTAAATTTG	TTTATGTATA	GTTAGTTAAA	TTTGAATAT-

Apêndice 2 - Continuação

					
	410	420	430	440	450
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	AAATATGGTA	AAGA-TATTC	AAGTTGTAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	AAATATGGTA	AAGGATATTC	AAGTTGTAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	AAATATGGTA	AAGGATATTC	AAGTTGTAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	AAATATGGTA	AAGAATATTT	AAGCTATAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTA
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	AAATATGGTA	AAGAATATTT	AAGCTATAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTA
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	AAATTGGGTA	AAGGATATTC	AAACTGTAAA	-GGACTGAGG	TTGTGGAGTA
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	AAATTGGGTA	AAG--TATTC	AAGCTGTAAA	-GGACTGAGG	TTGTGGAGTA
<i>H. prasina</i> (0027)	AGGGAGGGAA	AGTAATATTC	AAGTTGTTAA	-GGACTGGGG	TAGTGGAGTA
<i>H. caingua</i> (2517)	GAGG-GGGAA	AATAATATTC	AAGCTGGAGA	-GGACTGGGG	TAGTGGAGTA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	GTTAGGGGAA	AGTGATATTT	AAGTTATAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTG
<i>H. marginata</i> (3820)	AACTTAGGAA	AATA-TATTC	AAGTTGTAAA	-GGACTGGGG	TAGTGGAGTA
Híbrido (3605)	GTTAGGGGAA	AGTGATATTT	AAGTTATAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTG
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	AAATTTGGTA	GGGGATATTT	AAGCTGTAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTA
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	AAATGGGTA	AAGAATATTT	AAGCTGTAAA	-GGACTGAGG	TAGTGGAGTA
<i>H. joaquini</i> (3280)	AAATATGGTA	AAGGATATTT	AAGTTGTAAA	-GGGCTGAGG	TAGTGGAGTA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TATTTGGGTA	AAGAATATTC	AAGTTGTAAA	-GGACTGAGA	TTGTGGGGTA
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	TCCTTKGGTA	AAAGATATTC	AAGTTAAAAA	AGGACTGAGA	AAGTGGAGTA

					
	460	470	480	490	500
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	GATATAAATA	G-TTAGCCTA	TATTCATGAT	ATTGACTTA-	GATAAAGAAT
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	TATTCATGAT	ATTGACTTA-	GATAAAGAAT
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	TATTCATGAT	ATTGACTTA-	GATAAAGRAT
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	CATTCATGAT	ATTAACCTTA-	GATAAAAAAT
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	CATTCATGAT	ATTAACCTTA-	GATAAAARAT
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	TATTCATGAT	ATTAACCTAA-	GGTAAAGAAT
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	TATTCATGAT	ATTAACCTAA-	GGTAAAGAAT
<i>H. prasina</i> (0027)	TAA-TAAATA	G-TAAGTCCA	TAATTATGTT	ATTAACCTTA-	GGTAGAATAA
<i>H. caingua</i> (2517)	TAA-TAAATA	G-TTAGTCTG	TATTCATGAT	ATTAACCTTA	GGTAAAAAAT
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TTA-TAAATA	G-TTAGTCTA	CATTCATGAT	ATTAACCTAA-	GGTAAAAAAT
<i>H. marginata</i> (3820)	TTA-TAAATA	G-TTAGTCTT	TATTCATGAT	ATTAACCTAA-	GGTAAAAARAT
Híbrido (3605)	TTA-TAAATA	G-TTAGTCTA	CATTCATGAT	ATTAACCTAA-	GGTAAAAAAT
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	TATTCATGAT	ATTAACCTAA-	GGTAAAAAAT
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	TATTCATGAT	ATTATCTTA-	GGTAAAAAAT
<i>H. joaquini</i> (3280)	GATATAAATA	G-TTAGTCTA	TATTCATGAT	ATTGACTTA-	GGTAGAGAAT
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TG--TAAATA	GGTTAGTCTT	TATTCATGAT	ATTTAACTAA	GGCAAAAAAT
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	GTA-TAGATA	G-TAAGTCTT	TATTCATGAT	ATTAACCTAA-	GGTAAAAAAT

Apêndice 2 - Continuação

					
	510	520	530	540	550
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TGGGCTG-TT	AAC TATTAAG	G-ATATTTAT	GTTCTTGAAT	TATATTAAGG
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TGGGCTG-TT	AAC TATTAAG	G-ATATTTAT	GTTCTTGAAT	TATATTAAGG
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TGGGCTG-TT	AAC TATTAAG	G-ATATTTAT	GKTCTTGAAT	TATATTAAGG
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	TGGGCTG-TT	AATTATTAGG	G-ATATTTAT	GTTCTTGAAT	TATATTAAGG
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	TGGGCTG-TT	AATTATTAGG	G-ATATTTAT	GTTCTTGAAC	TATATTAAGG
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	TGGGCTG-TT	AATTATTATG	G-ATATTTAT	ACTCTTGAAC	TATATTAAGG
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	TGGGCTG-TT	AATTATTATG	G-ATATTTAT	ACTCTTGAAC	TATATTAAGG
<i>H. prasina</i> (0027)	TTGGGTTGTT	AAC TATTATG	A-ATATTTAT	GTTCTTGAAT	TATATTAAGG
<i>H. caingua</i> (2517)	TGGGGTTGTT	AATTGGTATG	G-ATATTTAT	GTTCTTGAAT	TATATTAAGG
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TGGGTTG-TT	AATTATTATG	G-ATATTTAT	GTTCTTGAAT	TATATTAAGG
<i>H. marginata</i> (3820)	TGGGCTG-TT	AATTATAATG	G-ATATTTAT	GKTCGTGAAC	TATATTAAGG
Híbrido (3605)	TGGGKTGGTT	AATTATTATG	G-ATATTTAT	GKTCGTGAAC	TATATTAAGG
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	TGGGCTG-TT	AATTAGTATG	G-ATATTTAT	ACTCTTGAAC	TATATTAAGG
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	TGGGCTG-TT	AATTGGTGTG	G-AAATTTAC	GTTCTTGAGT	AATATTAAGG
<i>H. joaquinini</i> (3280)	TGGGCTG-TT	AATTATTAGG	GGATATTTAT	GTTCTTGAAT	TATATTAAGG
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TGGGTTG-TT	AARTATTATG	G-ATATTTAT	GTTCTTGATT	TATATTTAGG
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	TGGGCTG-TT	AATTGATGTG	G-ATATTTAT	GTTCTTGATT	TATATTAAGG

					
	560	570	580	590	600
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	G-TTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTATTA--TT	A-ATTGGTTA	TT-AATCCTT
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	GGTTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTATTA--TT	A-ATTGGTTA	TT-AATCCTT
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	G-TTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTAWTA--WT	A-ATTGGKTA	WT-AATCCTY
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	G-KTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTAATTA-TT	A-ATTGGKTA	TT-AATCCTC
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	G-TTCTCCGT	ACATTTGTGK	CTAWTA--WT	A-AWTGGKTA	WT-AATCCYC
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	G-KTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTATTA--TT	A-TTTGATTG	TT-AATCCAC
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	G-TTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTATTA--WT	AATTTGATTG	TT-AATCCAC
<i>H. prasina</i> (0027)	G-TTCTCCGT	ACATRTTTGT	CTATTA--TT	A-ATTGATTR	TT-AATCCAT
<i>H. caingua</i> (2517)	G-TTCTCCGT	ACATTTTTGT	CAAATA--TT	A-ATTGRTT	TTTTATCCAT
<i>H. bischoffi</i> (3356)	G-KTCTCCGT	ACATTTT-GT	CTATTA--TT	A-GTTGATTT	TT-AATCCAT
<i>H. marginata</i> (3820)	G-TTCTCCGT	ACATTATTGT	CTATTA--TT	A-ATTGATTT	TTAATCCAT
Híbrido (3605)	G-KTCTCCGT	ACATTTTTGK	CTATTA--TW	A-GTTGATTT	TTAATCCAT
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	G-TTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTATTA--WT	A-TTTGATTG	TT-AATCCAC
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	G-TTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTAATTGGTT	A-AWTGATTG	TT-AATCCTC
<i>H. joaquinini</i> (3280)	G-TTCTCCGT	ACATTTGTGT	CTATTA--TT	A-ATTGGTTA	TT-AATCCAT
<i>H. sp. n.</i> (3610)	G-TTCTCCGT	ACATTAGTGT	CTATGA--TT	A-ATTGATTA	TT-AATCCAT
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	G-TTCTCCGT	ACATRTTTGT	C-ATTA--TT	A-ATTGATTG	TT-TATCCAT

Apêndice 2 - Continuação

					
	610	620	630	640	650
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	CTTATTGTAC	TAAGTATCTT	CATTCATTCTG	TAAT-ATATT	GATTTT-ATAT
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	CTTATTGTAC	TAAGTATCTT	CATTCATTCTG	TAAT-ATATT	GATRTTATAT
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	CTTATTGTAC	TAAGTATCTT	CATTCAWTCTG	KAAT-AWATT	GATCTRATAT
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	CTTATTGTAC	TAAGTATCTT	TATTCATTCTG	TAAT-ATATT	GATTTTATGT
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	CTWATKGTAC	TAAGTATCTT	TATTCAWTCTG	KAAT-AWATT	GATTTTATGT
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	CCTCTTGTAC	TAAGTATCTT	CATTCATTCTA	TAAT-GTGT	GGT-CTTGT
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	CTTCTTGTAC	TAAGTATCTT	CATTCATTCTA	TAAT-AGTGT	KGGYCTTATR
<i>H. prasina</i> (0027)	CTTATCGTAC	TAAATATCTT	TATTCATTCTA	TTTT-ATGTT	TGTTATARRT
<i>H. caingua</i> (2517)	CTTATCGTAC	TAAATATCTT	CATTCATTCTA	TTTT-ATGTT	AAATATAATR
<i>H. bischoffi</i> (3356)	CTTATCGKAC	TAAATATCTT	CATTCATTCTA	TGKA-ATGTT	TTTT-TATTT
<i>H. marginata</i> (3820)	CTTATCGTAC	TAAATATCTT	CATTCATTCTA	TTTT-ATGTT	ATTAATAATT
Híbrido (3605)	CTTATCGKAC	TAAATATCTT	CATTCATTCTA	TGKA-AKGTT	TTTT--AWTT
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	CTTCTTGTAC	TAAGTATCTT	CATTCATTCTA	TGT--GTGT	GGTTCTTGTR
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	CTTATTGTAC	TAAGTATCTT	TATTCGTTCTA	ATGATGTGT	GATCTTATTR
<i>H. joaquini</i> (3280)	CTTATTGTAC	TAAGTATCTT	TATTCATTCTG	TAAT-ATACT	GATTTTATGT
<i>H. sp. n.</i> (3610)	CTTATCGTAC	TAAATATCTT	CATTCATCTCA	TAAA-ATATT	GATTGTARTT
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	CTTATTGTAC	TAAGTATCTT	CATTCATTCTA	TAAA-ATGTT	AGATTTTCATT

					
	660	670	680	690	700
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	TTAKGTAAAT	CTTAATTTGT	TAAATAMCTA	CTT---TGGG	AAAAGATATG
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	TTATGTAAAT	CTTAATTTGT	TAAATAACTA	CTT---TGGG	AAAAGATATG
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	TTATGTAAAT	CTTAATTTGT	TAAATAACTA	CTT---TGGG	AAAAGATATG
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	TTATGCTAAT	CTTAATTTGT	TATATAATTA	TTTA--TGGG	AAAAGATATG
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	TTATGCTAAT	CTTAATTTGT	TATATAATTA	TTTT--TGGG	AAAAGATATG
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	T-ATGCTAAT	CTTAATTTGT	TATATAATAA	GTTT--TGGG	AAAAGATATG
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	TTATGCTAAT	CTTAATTTGT	TATATAATAA	GTTT--TGGG	AAAAGATATG
<i>H. prasina</i> (0027)	TTATGTAGT	CTTAACATGT	GGTATTCACA	TTTCT-TTGG	TAAAGATATG
<i>H. caingua</i> (2517)	TTATGTAAAT	CTTAATATGT	GGTATTTTCA	TRTCT-TTGG	TAAAGATATG
<i>H. bischoffi</i> (3356)	TTATGTTACT	CTTAATATGT	GGTATATACA	TRTCT-TTGG	TAAAGATATG
<i>H. marginata</i> (3820)	TTATGTTACY	CTTAATATGT	GGTATAAGCT	GTAACCTTGG	TAAAGATATG
Híbrido (3605)	TTATGKWACY	CTTAATATGT	GGTATAAGCT	TRTCT-TTGG	TAAAGATATG
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	TTATGTAAAT	CTTAATTTGT	CATATTATCA	GGTTT-TGGG	AAAAGATATG
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	TTATGCGAAT	CTTAATTT-T	AATATGATTA	TTT---TGGG	AAAAGATATG
<i>H. joaquini</i> (3280)	TTATGCGAAT	CTTAATTTGT	TATATAATTA	TTT---TGGG	AAAAGATATG
<i>H. sp. n.</i> (3610)	TTATGTAAAT	CTTAATTTGT	GATATAATCA	TGTTT-TGGG	AAAAGATATG
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	TTATGTATT	CTTAATATGT	GGTAAAAGCT	TTTAATTTGG	AAAAGATATG

Apêndice 2 - Continuação

					
	710	720	730	740	
<i>H. semig-SFP</i> (3143)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. semig-SFP</i> (3291)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. semig-SFP</i> (3139)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATS	TCAA
<i>H. semig-Cam</i> (3126)	CTTGGGGTAA	GAAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATS	TCAA
<i>H. semig-Cam</i> (3115)	CTTGGGGTAA	GAAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. semig-Pal</i> (0025)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. semig-Pal</i> (0026)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. prasina</i> (0027)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. caingua</i> (2517)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATS	TCAA
<i>H. bischoffi</i> (3356)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAA	-----	----
<i>H. marginata</i> (3820)	CTTGGGGTAA	GTAGATGTAT	GCTCGATTAT	ACATAATATS	TCAA
<i>Híbrido</i> (3605)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. semig-Pir</i> (3705)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATS	TCAA
<i>H. aff. semig.</i> (3446)	CTTGGGGTAA	TTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. joaquini</i> (3280)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA
<i>H. sp. n.</i> (3610)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATS	TCAA
<i>H. aff. polyt</i> (4608)	CTTGGGGTAA	GTAGATGAAT	GCTCGATTAT	ACATAATATG	TCAA