

CINTIA PELEGRINETI TARGUETA DE AZEVEDO BRITO

**"CITOGENÉTICA COMPARATIVA DO GÊNERO *Engystomops*:
UMA ABORDAGEM CLÁSSICA E MOLECULAR"**

**"COMPARATIVE CYTOGENETICS OF *Engystomops*:
CLASSICAL AND MOLECULAR APPROACHES"**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CINTIA PELEGRINETI TARGUETA DE AZEVEDO BRITO

**"CITOGENÉTICA COMPARATIVA DO GÊNERO *Engystomops*:
UMA ABORDAGEM CLÁSSICA E MOLECULAR"**

Orientadora: Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

**"COMPARATIVE CYTOGENETICS OF *Engystomops*:
CLASSICAL AND MOLECULAR APPROACHES"**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Doctorate thesis presented to the Cellular and Structural Biology Postgraduation Programme of the Institute of Biology of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Cellular Biology.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna **Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito** e orientada pela Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini.


Assinatura da Orientadora

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

T174c

Targueta, Cintia Pelegrineti, 1983-
Citogenética comparativa do gênero *Engystomops* :
uma abordagem clássica e molecular / Cintia Pelegrineti
Targueta de Azevedo Brito. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Luciana Bolsoni Lourenço Morandini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citogenética. 2. *Engystomops*. 3. Anura. 4.
Cromossomos. I. Lourenço, Luciana Bolsoni, 1972-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Comparative cytogenetics of the genus *Engystomops* : classical and molecular approaches

Palavras-chave em Inglês:

Cytogenetics

Engystomops

Anura

Chromosomes

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini [Orientador]

Santiago Ron

Diego Baldo

Patrícia Pasquali Parise Maltempi

Marcelo de Bello Cioffi

Data da defesa: 05-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

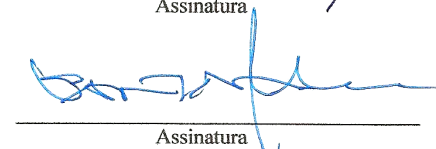
Campinas, 05 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

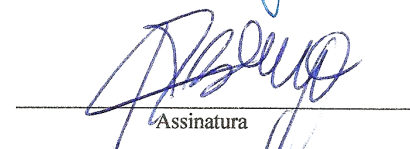
Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini (Orientadora)


Assinatura

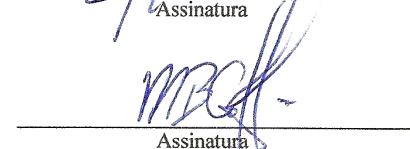
Dr. Santiago Ron


Assinatura

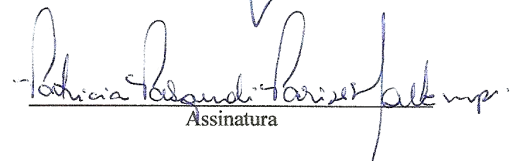
Dr. Diego Baldo


Assinatura

Dr. Marcelo de Bello Cioffi


Assinatura

Dra. Patrícia Pasquali Parise Maltempi


Assinatura

Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri

Assinatura

Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

Assinatura

Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Assinatura

Dedico minha tese de doutorado aos meus
exemplos de vida: meu pai Rogério Targueta e
minha mãe Eloísa Pelegrineti Lourenço Targueta

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a uma das melhores professoras que já conheci durante meus anos de estudo, Profa. Luciana Bolsoni Lourenço. Desde o mestrado, seus ensinamentos foram muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal. Nossas conversas científicas e “filosóficas” foram momentos de reflexão e aprendizagem. Espero que possamos sempre continuar dividindo esses momentos de conhecimento e amizade.

Agradeço também às pessoas especiais da minha vida: Minha família. Pedro, Daniel e João, que me tornaram a pessoa mais feliz desse mundo. Meus pais e meus irmãos, pelo amor incondicional. Minhas avós, Paulina e Maria Helena; ao Sr. Alípio, Sra. Liete e Sr. Marcelo, pelo carinho. Meus tios, tias, primos e primas, por toda alegria. Meus sogros e meus cunhados pelos bons momentos vividos juntos.

Aos meus amigos de Campinho, Vitória, Viçosa e de Campinas. Afinal, de perto ou longe continuamos vivendo muitas histórias boas juntos. Mesmo que os momentos de encontro com os amigos de longe sejam curtos, eles são intensos e cheios de felicidade.

Agradeço à minha comadre Karla, pelo carinho com meus filhos e por ser essa amiga tão presente e tão especial na minha vida.

Agradeço aos professores do Departamento de Biologia Celular pelos ensinamentos passados; agradeço principalmente à profa. Shirlei. Agradeço também aos funcionários, secretárias e técnicos da Unicamp pelo trabalho em conjunto.

Agradeço aos colegas de laboratório pelos momentos de estudo e trabalho: Alessandra, Maurício, Reinaldo, Stênio, Débora, Júlio, Maria, Karin, Livia e William, aos estagiários de iniciação e todos aqueles que passaram pelo laboratório durante esses 4 anos.

Em especial gostaria de agradecer aos amigos: Juliana, pelos momentos de companheirismo; Daniel, pelos momentos de discussões e pelas risadas; Ana, pela amizade; Kaleb, pelos momentos divertidos.

Agradeço também aos colegas de Departamento, obrigada pelos bons momentos vividos juntos.

Agradeço aos amigos do Equador, Profa. Miryan Rivera, Prof. Santiago Ron, Ailin Blasco, Monica Alejandra, Margarita Baquero e Diego Reinolso, pela ajuda na coleta, identificação das espécies e pelos bons momentos vividos em seu país.

Obrigada também ao Prof. Vladimir Krylov e Profa. Kubickova pelos ensinamentos passados durante o estágio na República Tcheca.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de realizar o doutorado.

Agradeço à Capes e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

Obrigada por tudo!

Sumário

I. Resumo.....	VIII
II. Abstract.....	XI
III. Introdução.....	1
III.1. O gênero <i>Engystomops</i>.....	2
III.2. A contribuição da citogenética no estudo dos <i>Engystomops</i>.....	8
III.3. Os estudos dos cromossomos sexuais em anuros.....	10
III.4. Pintura Cromossômica no estudo da evolução cariotípica.....	15
III.5. Busca por novos marcadores citogenéticos de anuros.....	18
IV. Objetivos.....	27
IV.1. Objetivos específicos.....	27
V. Resultados.....	29
Capítulo I.....	31
Capítulo II.....	57
Capítulo III.....	73
VI. Considerações finais.....	95
VII. Referências Bibliográficas.....	97
VIII. Anexo I.....	113

I. Resumo

Dentre as espécies do gênero *Engystomops*, somente as três espécies do clado Edentulus (*E. freibergeri*, *E. petersi* e *E. pustulosus*) e duas das seis espécies do clado Duovox (*E. pustulatus* e *E. puyango*) tinham o número diploide descrito, e a localização cariotípica das NORs (regiões organizadores de nucléolo) e das regiões heterocromáticas era conhecida apenas para *E. freibergeri*, *E. petersi* e *E. puyango*. Os dados disponíveis mostravam que as espécies do clado Duovox já cariotipadas apresentavam $2n=20$, enquanto o número cromossômico diploide de todas as espécies do clado Edentulus era $2n=22$, assim como o das espécies de *Physalaemus* e *Edalorhina*, gêneros mais proximamente relacionados a *Engystomops*. Dessa forma, uma redução do número diploide de $2n=22$ para $2n=20$ era considerada na história de *Engystomops*, mas não era possível inferir se essa era uma sinapomorfia de *E. puyango* e *E. pustulatus* ou de todo o clado Duovox. Em relação ao clado Edentulus, algumas dúvidas também persistiam. Recentes estudos propunham a presença de um complexo de espécies amazônicas sendo confundidas com *E. petersi*. Citogeneticamente puderam ser reconhecidos três grupos nesse complexo, que corresponderam a populações de Puyo (Equador), Yasuní (Equador) e La Selva (Equador), diferentes ainda daquele de *E. freibergeri* (Brasil). Nem sempre é possível a identificação de homeologias cromossômicas entre esses grupos, o que dificulta o reconhecimento dos possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos na divergência cariotípica no gênero em questão. Também permanecia pouco explorada a diferenciação entre os cromossomos sexuais heteromórficos reconhecidos em populações de *E. petersi* e em *E. freibergeri*. Os objetivos do presente trabalho foram estudar citogeneticamente as espécies de *Engystomops* do clado Duovox, melhor caracterizar os cromossomos sexuais de *E. freibergeri* por meio de

pintura cromossômica e buscar novos marcadores citogenéticos para auxiliar na identificação de homeologias cromossômicas nesse gênero. A análise cariotípica mostrou que as espécies *E. randi*, *E. guayaco*, *E. montubio*, *E. pustulatus* e *E. coloradurum* apresentaram $2n=20$, assim como as espécies *E. puyango* e *E. pustulatus*, previamente cariotipadas, corroborando a hipótese de essa característica provavelmente seja uma sinapomorfia do grupo Duovox. Em *E. coloradurum*, foi encontrada uma fêmea triploide, que consistiu no primeiro relato de poliploidia para *Engystomops*. Em todas e somente nas fêmeas dessa espécie foi encontrado um heteromorfismo referente à presença de NOR dentre os cromossomos 10 homólogos o que sugere que esses sejam cromossomos sexuais e que o sistema de determinação do sexo em *E. coloradurum* seja ZZ/ZW. Quanto à análise dos cromossomos sexuais de *E. freibergi*, foi possível isolar por microdissecção os cromossomos X e Y e produzir sondas a partir da amplificação de segmentos desses cromossomos. A utilização da técnica de pintura cromossômica com tais sondas permitiu inferir que as regiões proximais do cromossomo X e do cromossomo Y de *E. freibergi* apresentam similaridade molecular, o que sugere a possibilidade de se tratarem de regiões pseudo-autossômicas. As sondas dos cromossomos sexuais de *E. freibergi* não detectaram os cromossomos X e Y de *E. petersi* de Puyo nem os cromossomos do par 11 homomórfico de *E. petersi* de Yasuní, não evidenciando, portanto, grande similaridade entre eles. O isolamento, a caracterização e a localização cariotípica do DNAr 5S das espécies pertencentes ao grupo Duovox permitiram inferir a possível homeologia do par cromossômico 6 dessas espécies entre si e com o par 6 das espécies do grupo Edentulus. Ainda, o uso de sondas PcP190EcoRI, referentes a uma família de DNA repetitivo derivada de DNAr 5S, permitiu identificar os cromossomos 5 de *E. randi*, *E. guayaco* e *E.*

coloradum e diferenciá-los dos cromossomos 6 dessas espécies, portadores do sítio de DNAr 5S do tipo II. Além disso, essa mesma sonda identificou a região pericentromérica do braço curto do cromossomo 3 (e do cromossomo 5 de *E. petersi* de Yasuní) de todas as espécies do gênero, com exceção de *E. coloradum*, sugerindo outra possível homeologia entre esses cromossomos. Dessa forma, com o emprego de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares foi possível fornecer importante contribuição para o estudo da evolução do gênero *Engystomops*.

II. Abstract

Of the species in the genus *Engystomops*, only three species of the Edentulus clade (*E. freibergeri*, *E. petersi* and *E. pustulosus*) and two species of the Duovox clade (*E. pustulatus* and *E. puyango*) have had their diploid number described, while the NOR (nucleolus organizer region) and the heterochromatic sites were known only for *E. freibergeri*, *E. petersi* and *E. puyango* karyotypes. The species of Duovox clade had $2n=20$, while the diploid chromosome number of all species of Edentulus clade was $2n=22$, which is the same diploid number of species of *Physalaemus* and *Edalohina*, genera closely related to *Engystomops*. Thus, the diploid number reduction from $2n=22$ to $2n=20$ was supposed, but it was not possible to infer if this was a synapomorphy of *E. puyango* and *E. pustulatus* or a synapomorphy of the entire Duovox clade. With regards to the Edentulus clade, some doubts also persisted. Recent studies proposed a complex of Amazonian species misidentified as *E. petersi* and it was possible to cytogenetically recognize three groups in this complex that corresponded to populations from Puyo (Ecuador), Yasuní (Ecuador) and La Selva (Ecuador). All of these karyotypes also differed from the *E. freibergeri* (Brazil) karyotype. Chromosome homologies are not easily recognized between these groups, a fact that makes difficult the identification of chromosome rearrangements involved in karyotypic divergence in this genus. Additionally, the differentiation of the heteromorphic sex chromosomes found in the *E. petersi* and *E. freibergeri* karyotypes remained unexplored. The goals of the present work are (1) to cytogenetically study the species of Duovox clade, (2) to better characterize the sex chromosomes of *E. freibergeri* by means of chromosome painting and (3) to find new cytogenetic markers to identify potential chromosome homologies in this genus. The karyotypic analysis showed that the

species *E. randi*, *E. guayaco*, *E. montubio*, *E. pustulatus* and *E. coloradum* had $2n=20$, as previously described in *E. pustulatus* and *E. puyango*. This corroborates the hypothesis that the diploid number $2n=20$ is likely a synapomorphy of the Duovox clade. Among the specimens of *E. coloradum*, a triploid female was found, which is the first report of polyploidy for the genus *Engystomops*. In all the females of this species, there was a NOR heteromorphism in the homologous chromosomes 10, suggesting that these may be ZZ/ZW sex chromosomes. Regarding the sex chromosomes of *E. freibergi*, it was possible to isolate the X and Y chromosomes by microdissection and to produce probes by amplifying segments of the microdissected chromosomes. The hybridization of these probes in *E. freibergi* metaphases showed that the proximal regions of the X and Y chromosomes of this species had molecular similarity, thus suggesting that they may be pseudoautosomal regions. The sex chromosome probes from *E. freibergi* detected neither the X nor the Y chromosome of *E. petersi* from Puyo nor the chromosomes of homomorphic pair 11 of *E. petersi* from Yasuní. This implies no significant similarity between them and the *E. freibergi* sex chromosomes. The isolation, characterization and karyotypic localization of the rDNA 5S from the species of the Duovox clade made it possible to infer the homeology of chromosome pair 6 of those species, as well as their homeology with chromosome pair 6 of the species of the Edentulus clade. Further, the probes PcP190EcoRI, which are related to a family of satellite DNA derived from rDNA 5S, made it possible to identify chromosome 5 of *E. randi*, *E. guayaco* and *E. coloradum* and to differentiate them from chromosome 6, which carry type II rDNA 5S. In conclusion, both classical and molecular cytogenetic techniques provided important contributions for the study of the evolution of the genus *Engystomops*.

III. Introdução

A classe Amphibia é dividida em três ordens: Anura, Gymnophiona e Caudata. A ordem Anura é a maior delas, sendo composta atualmente por aproximadamente 6200 espécies (Frost, 2013). Apesar da grande quantidade de espécies de anuros já descrita, esse número ainda é uma subestimativa da diversidade existente, que é especialmente elevada nas regiões neotropicais (Funk et al., 2012; Fouquet et al., 2007).

Como muitas espécies de anfíbios ainda continuam desconhecidas ou estão sendo confundidas a outras, ações para o reconhecimento e descrição das espécies, assim como estudos sobre sua biologia reprodutiva, são fundamentais para a criação de planos de preservação mais adequados. Segundo dados de 2008 do Global Amphibian Assessment (GAA), cerca de 159 espécies de anfíbios desapareceram, e cerca de 31,6% das espécies de Anura estão ameaçadas de extinção ou extintas (IUCN). As possíveis causas que levam à extinção estão principalmente relacionadas às mudanças climáticas, como o aumento de temperatura, menor umidade do ar e maiores índices de incidência de raios UV-B (Pounds, 2001; Pounds et al., 2006). Associados às mudanças do clima, doenças causadas por fungos (por exemplo, o fungo Quitrídeo), degradação de habitat entre outros também são possíveis ameaças à sobrevivência de espécies de anuros (Ron et al., 2003; Burrowes et al., 2004).

A América Latina está entre as regiões que possuem maiores números de espécies ameaçadas de extinção ou já extintas. Principalmente em países que se encontram na região neotropical, como Colômbia, México, Equador, República Dominicana, Cuba, Jamaica e Haiti (IUCN). É também nessa região que se encontra alta diversidade de espécies, e por isso, maiores estudos dos anuros dessa área, são de extrema relevância.

Entre os anuros neotropicais, os do gênero *Engystomops*, pertencente à família

Leptodactylidae sensu Pyron e Wiens (2011), constituem um interessante grupo para estudos morfológicos, genéticos, comportamentais entre outros. A distribuição geográfica desse gênero abrange uma grande área que se estende do sudeste do México e nordeste da América Central até o sul da Bolívia (Frost, 2013). Atualmente, o gênero é composto de nove espécies e alguns autores sugerem que ainda existam espécies crípticas, principalmente dentre os *Engystomops* encontrados na região Amazônica (Ron et al., 2006; Funk et al., 2012).

III.1. O gênero *Engystomops*

O gênero *Engystomops* foi descrito por Jimenéz-de-la-Espada (1872) e sinonimizado a *Physalaemus* por Lynch (1970). Em 2005, Nascimento e colaboradores revalidaram o gênero *Engystomops*, que passou a agrupar todas as espécies contidas no grupo de *Physalaemus pustulosus* proposto por Lynch (1970). A revalidação de *Engystomops*, no entanto, é ainda motivo de controvérsia. Alguns autores (Boul et al., 2007; Funk et al., 2007; 2008; 2009) não apoiam a revalidação desse gênero e defenderam o uso do nome genérico *Physalaemus* para as espécies a ele atribuídas. Optamos, no presente estudo, por seguir a revalidação proposta por Nascimento e colaboradores (2005), assim como Funk e colaboradores (2012) e Frost (2013) e Ron e colaboradores (2006, 2010).

Desde que as espécies hoje alocadas em *Engystomops* foram reconhecidas pela primeira vez como proximamente relacionadas (Lynch, 1970), propostas de sinonimização e revalidação de espécies, bem como descrições de novas espécies, têm alterado o conhecimento acerca desses anuros. Após análises morfológicas das sete espécies reunidas

no grupo de *Physalaemus pustulosus* por Lynch (1970), Cannatella e Duellman (1984) propuseram que esse fosse um grupo monofilético formado por apenas quatro espécies, referidas naquele trabalho como *P. pustulosus* (Cope, 1864), *P. petersi* (Jiménez-de-la-Espada, 1872), *P. pustulatus* (Shreve, 1941) e *P. coloradum* (uma nova espécie). As espécies *P. freibergi*, *P. paraensis* e *P. schereri*, contidas no grupo *P. pustulosus* sensu Lynch (1970), foram sinonimizadas a *P. petersi*, enquanto *P. stentor*, outro representante daquele grupo, foi sinonimizada a *P. pustulosus* (Cannatella e Duellman, 1984). Nesse mesmo trabalho, os autores inferiram que *P. pustulosus* e *P. petersi* fossem espécies-irmãs, assim como *P. pustulatus* e *P. coloradum* (Cannatella e Duellman, 1984).

Em 1998, Cannatella e colaboradores estudaram novamente esse grupo de espécies, incluindo, além de dados morfológicos, outros caracteres, como dados de canto, de alozimas e sequências nucleotídicas dos genes mitocondriais 12S e citocromo oxidase I (COI). A filogenia resultante da comparação entre os grupos monofiléticos inferidos pelos diferentes conjuntos de caracteres utilizados foi similar à apresentada por Cannatella e Duellman (1984), possibilitando o reconhecimento de dois grandes clados, um contendo as espécies à época referidas como *P. pustulosus*, *P. petersi* e *P. freibergi* (espécie em sinonímia de *P. petersi*, mas citada pelos autores mesmo sem a apresentação de uma revalidação formal) e o outro contendo *P. coloradum*, *P. pustulatus* e duas espécies putativas referidas como *Physalaemus* sp. B e *Physalaemus* sp. C. Esta última espécie foi descrita como *P. randi* por Ron e colaboradores (2004).

Recentemente, após a revalidação do gênero *Engystomops*, graças aos estudos de Ron e colaboradores (2006, 2010), o relacionamento filogenético das espécies do gênero é bem compreendido. Dois grandes clados puderam ser reconhecidos e foram denominados

Duovox e Edentulus (Ron et al., 2006; 2010). O clado Edentulus é composto pelas espécies *E. petersi* (Jiménez de la Espada, 1872), *E. freibergi* (Donoso-Barros, 1969) e *E. pustulosus* (Cope, 1864), enquanto o clado Duovox é composto por *E. coloradurum* (Cannatella e Duellman, 1984), *E. montubio* e *E. randi* (Ron et al., 2004), *E. guayaco* (Ron et al., 2005), *E. puyango* (Ron et al., 2010) e *E. pustulatus* (Shreve, 1941) (Figura 1).

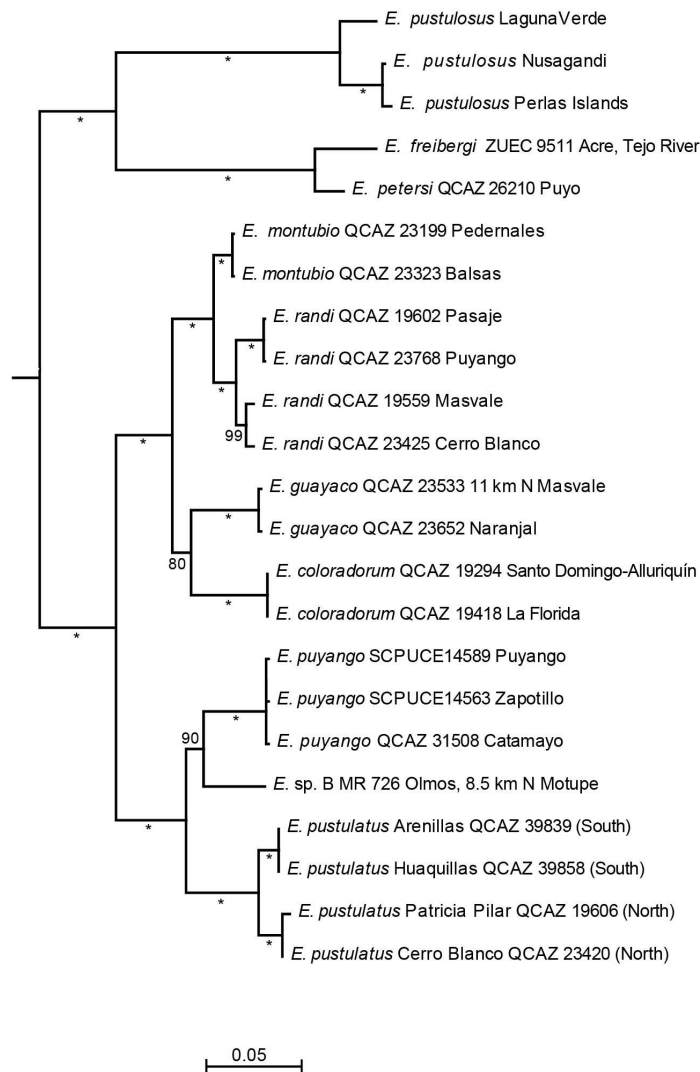


Figura 1. Relacionamentos filogenéticos no gênero *Engystomops* inferidos por Ron e colaboradores, 2010.

A análise da distribuição geográfica das espécies contidas nos dois clados de *Engystomops* tem permitido interessantes inferências acerca da origem desses grupos. As espécies do clado Edentulus ocorrem a leste da Cordilheira dos Andes, tanto na América Central e quanto na região Amazônica da América do Sul (Figura 2), enquanto as espécies do clado Duovox estão distribuídas a oeste da cadeia dos Andes, no Equador e no nordeste do Peru (Ron et al., 2006; Frost, 2013) (Figura 3). Segundo Weigt e colaboradores (2005), a elevação da Cordilheira dos Andes separou populações ancestrais de *Engystomops*, promovendo, assim, a divergência entre os clados Duovox e Edentulus. Esses autores também assumiram que esse evento de vicariância ocorreu no Mioceno, entre 16,4 a 11,2 milhões de anos atrás.



Figura 2. Distribuição geográfica das espécies *Engystomops petersi* e *Engystomops freibergi* pertencentes ao clado Edentulus (fonte: IUCN, - <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57270> e <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=136155>, acessados dia 01/05/2013)



Figura 3. Distribuição geográfica das espécies de *Engystomops* pertencentes ao clado Duovox (fonte: IUCN - <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57273>; <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57271>; <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57264>; <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=61833>; <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=57247> e AmphibiaWebEcuador - <http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/Mapa.aspx?Id=8137>. Todos os sites acessados dia 01/05/2013).

Por outro lado, os processos evolutivos que atuaram na divergência dentro de cada um desses clados ainda permanecem pouco elucidados. Fortes evidências apontam, no entanto, a seleção sexual dirigida pela preferência entre cantos como uma importante força evolutiva atuante na origem de espécies do clado Edentulus (Guerra e Ron, 2008).

Boul e colaboradores (Boul e Ryan, 2004; Boul et al., 2007) foram os primeiros a reportarem a presença de dois tipos de canto dentre espécimes considerados pertencentes a uma única espécie do gênero *Engystomops*, ao estudarem machos de diferentes populações de *E. petersi*. Trabalhando também com espécimes de *E. petersi* de diferentes localidades, Guerra e Ron (2008) observaram que as fêmeas de Puyo (Equador) reconhecem o canto de machos locais de Yasuní (Equador) e não o discriminam do canto de um macho de Puyo, mas que não reconhecem o canto de machos de La Selva (Equador). Com base nesses resultados, que evidenciam o isolamento pré-zigótico entre as populações de Puyo e La Selva, Guerra e Ron (2008) sugeriram que seleção sexual e/ou “reinforcement” sejam relevantes forças atuantes na especiação de populações de *E. petersi*.

Além das variações de canto mencionadas acima, variações citogenéticas (Targueta et al., 2010; ver item III.2) e genéticas (Funk et al., 2007) também foram encontradas em *E. petersi* e *E. freibergi* e corroboram a proposta de Ron e colaboradores (2006) de que as populações de *E. petersi*, na verdade, componham um complexo de espécies. O alto nível de diversidade críptica nas espécies Amazônicas foi estudado também por Funk e colaboradores (2012), que, utilizando dados moleculares, morfológicos e de bioacústica, propuseram que na região Amazônica haja entre cinco e sete espécies em vez de apenas duas (*E. petersi* e *E. freibergi*).

A variação de cantos encontrada nas espécies do clado Edentulus não é a mesma

observada no clado Duovox. As espécies do clado Duovox não apresentam canto composto e as fêmeas não são atraídas pela adição do segundo componente (Ron, 2008). Segundo Ron (2008), o ancestral comum do gênero *Engystomops* não possuía canto composto e o surgimento de um segundo componente no canto teria ocorrido diversas vezes no clado Edentulus. Além disso, Ron (2008) defende que o canto complexo de machos e a preferência das fêmeas por essa característica coevoluíram dentro do gênero.

III.2. A contribuição da citogenética no estudo dos *Engystomops*

A análise citogenética tem fornecido interessantes dados para a investigação dos *Engystomops*. Ainda em 1998-1999, dois cariótipos bastante distintos foram reconhecidos dentre espécimes hoje atribuídos à espécie *E. freibergi*, levantando a hipótese de ocorrência de espécies crípticas no estado do Acre (Lourenço et al., 1998, 1999). A análise de representantes de *E. petersi* de diferentes regiões do Equador também revelou grande variação citogenética, tendo permitido o reconhecimento de três grupos cariotípicos, que corresponderam a diferentes clados inferidos com base em sequências de genes mitocondriais (Targueta et al., 2010).

A grande variação cariotípica encontrada especialmente entre as populações equatorianas de Puyo e de Yasuní, que não apresentam qualquer evidência de isolamento pré-zigótico (Guerra e Ron, 2008), levou Targueta e colaboradores (2010) a propor que a diferenciação cromossômica também pode estar envolvida no processo de especiação desses anuros. Segundo esses autores, um possível híbrido formado do cruzamento de indivíduos de diferentes grupos cariotípicos poderia ter genoma desbalanceado e seria desfavorecido pela seleção natural.

Outra interessante característica revelada pelas análises citogenéticas desse grupo se refere à presença de cromossomos sexuais heteromórficos do sistema XX/XY em *E. freibergi* e na população de *E. petersi* de Puyo, Equador (Targueta et al., 2010). Curiosamente, os espécimes de *E. petersi* de Yasuní não apresentam tais cromossomos sexuais heteromórficos.

Já que os espécimes de *E. petersi* de Yasuní e os de Puyo estão agrupados em um mesmo clado, que por sua vez é grupo-irmão de *E. freibergi*, é possível supor que o heteromorfismo cromossômico sexual tenha sido perdido no grupo que compreende a população de Yasuní. Por outro lado, considerando que algumas diferenças podem ser notadas entre os cromossomos sexuais encontrados em *E. freibergi* e nos representantes de *E. petersi* de Puyo, é também possível que a diferenciação sexual cromossômica sofrida na linhagem que deu origem a *E. freibergi* tenha sido independente daquela ocorrida na linhagem de *E. petersi* de Puyo.

Apesar da grande variação encontrada dentro e entre as populações das espécies Amazônicas do clado Edentulus, todos os exemplares desses táxons apresentam $2n=22$ (Targueta et al., 2010), assim como *E. pustulosus* (Morescalchi et al., 1968; Léon, 1970), a terceira espécie componente do clado Edentulus. No entanto, os exemplares do clado Duovox já cariotipados, que correspondem às espécies *E. pustulatus* e *E. puyango*, apresentaram um número diploide distinto, $2n=20$ (Ron et al., 2010). Embora a identificação do grupo-irmão de *Engystomops* ainda seja controversa, é possível inferir que a condição $2n=22$ seja a plesiomórfica, pois os dois gêneros já indicados como possíveis táxons irmãos de *Engystomops* são *Physalaemus* (Pyron e Wiens, 2011) e *Edalorhina* (Faivovich et al., 2012), e ambos apresentam $2n=22$ (Kuramoto, 1990).

Os dados citogenéticos disponíveis até o momento, entretanto não permitem inferir se o número diploide $2n=20$ é uma sinapomorfia do grupo Duovox, ou apenas das espécies *E. pustulatus*, *E. puyango* e *Engystomops* sp. B., já que essas três espécies constituem um clado que é grupo-irmão de todas as outras espécies de *Engystomops* do grupo Duovox (Ron et al., 2010) (Figura 1).

Nesse contexto, novos estudos citogenéticos, que incluam um detalhamento do cariótipo de *E. pustulatus* e a descrição dos cariótipos das espécies do clado Duovox ainda não analisadas citogeneticamente, são essenciais para uma melhor compreensão dos eventos que levaram à redução do número diploide de 22 para 20 no gênero *Engystomops*.

Além disso, novos marcadores cromossômicos revelados por técnicas de citogenética molecular podem também auxiliar no reconhecimento de homologies cromossômicas entre os cariótipos das espécies Amazônicas de *Engystomops* e, conseqüentemente, fornecer novos elementos para a análise da evolução cromossômica nesse grupo, especialmente em relação aos cromossomos sexuais.

III.3. Os estudos dos cromossomos sexuais em anuros

Em anuros, a determinação do sexo é preferencialmente determinada geneticamente, porém os genes ligados a essa determinação ainda não foram identificados. Segundo alguns autores, outros fatores que poderiam levar à determinação do sexo em anfíbios, ou sua reversão, seriam a administração de hormônios (Chang e Witschi, 1956), o tratamento com temperatura (Hsü et al., 1970), ou por transplante de gônadas (Mikamo e Witschi, 1963). No entanto, Hayes (1998) sugere que a determinação sexual em anfíbios seja determinada geneticamente nas condições normais, visto que os trabalhos que utilizam mudança de

temperatura para troca de sexos em anfíbios utilizam temperaturas fora do padrão natural.

A presença de cromossomos sexuais heteromórficos é uma característica rara em anuros e o heteromorfismo muitas vezes é reconhecido apenas após a utilização de técnicas de bandamento cromossômico. Apesar disso, tanto espécies com sistemas sexuais do tipo XX/XY quanto espécies com sistemas sexuais ZZ/ZW e até com sistemas múltiplos de cromossomos sexuais são encontradas (Tabela 1). É ainda interessante destacar que a diferenciação cromossômica ocorreu mais de uma vez durante a divergência das espécies de anuros e diferentes sistemas de determinação sexual podem ser encontrados inclusive em espécies de uma mesma família (Hillis e Green, 1990; Schmid e Steinlein, 2003). O caso do ranídeo *Glandirana rugosa* é ainda mais intrigante, já que algumas populações dessa espécie apresentam sistema sexual XX/XY, enquanto outras apresentam cromossomos sexuais Z e W e um terceiro grupo é portador de um novo sistema ZZ/ZW, originado secundariamente a partir da hibridação de grupos com heterogametia masculina (Nishioka et al., 1993; Miura et al., 1996; Ogata et al., 2003, 2008). O mapeamento cromossômico (Uno et al., 2008) e a análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (Ogata et al., 2008) de alguns genes considerados relevantes na diferenciação sexual em diferentes organismos permitiu concluir que os cromossomos Z e Y e que os cromossomos W e X, respectivamente, tiveram a mesma origem evolutiva. No entanto, mesmo para essa espécie de anuro que tem seus cromossomos sexuais amplamente estudados, ainda não se conhece o gene responsável pela determinação do sexo (ver trabalho de Uno et al., 2008, que descarta a possibilidade do gene *Dmrt 1* estar relacionado à determinação do sexo em *G. rugosa*).

Tabela 1. Sistemas de determinação sexual dos anuros que possuem cromossomos sexuais heteromórficos já descritos.

Espécie *¹	Sistema Sexual	Referências
Família Bufonidae		
<i>Bufotes viridis</i>	ZZ/ZW	Odierna et al., 2007
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	XX/XY	Siripiyasing et al., 2008
<i>Ingerophrynus macrotis</i>	XX/XY	Siripiyasing et al., 2008
<i>Ingerophrynus parvus</i>	XX/XY	Siripiyasing et al., 2008
<i>Phrynoidis aspera</i>	XX/XY	Siripiyasing et al., 2008
<i>Rhinella marina</i>	ZZ/ZW	Abramyan et al., 2009
Família Ranidae		
<i>Glandirana rugosa</i>	XX/XY e ZZ/ZW	Nishioka et al., 1993; Miura et al., 1996; Uno et al., 2008
<i>Pelophylax lessonae</i>	XX/XY	Schempp e Schmid, 1981
<i>Rana japonica</i>	XX/XY	Miura, 1994; Sumida, 1997
<i>Rana tagoi</i>	XX/XY	Ryuzaki et al., 1999
<i>Rana sakuraii</i>	XX/XY	Ryuzaki et al., 1999
Família Craugastoridae		
<i>Pristimantis euphronides</i>	ZZ/ZW	Schmid et al., 2002b
<i>Pristimantis riveroi</i>	XXAA/XYAA ou XAA(Y)* ²	Schmid et al., 2003
<i>Pristimantis shrevei</i>	ZZ/ZW	Schmid et al., 2002
<i>Strabomantis biporcatus</i>	XXAA/XYAA ou XAA(Y)* ²	Schmid et al., 1992
Família Hemiphractidae		
<i>Gastrotheca ovifera</i>	XX/XY	Schmid et al., 1988; Schmid et al., 2002a
<i>Gastrotheca pseustes</i>	XX/XY	Schmid et al., 1990
<i>Gastrotheca riobambae</i>	XX/XY	Schmid et al., 1983
<i>Gastrotheca walkeri</i>	XX/XY	Schmid et al., 1988; Schmid et al., 2002a
Família Leptodactylidae		
<i>Engystomops freibergi</i>	XX/XY	Targueta et al., 2010
<i>Engystomops petersi</i>	XX/XY	Targueta et al., 2010

<i>Physalaemus ephippifer</i>	ZZ/ZW	Nascimento et al., 2010
<i>Pseudopaludicola saltica</i>	XX/XY	Duarte et al., 2010
Família Alsodidae		
<i>Eupsophus migueli</i>	XX/XY	Iturra e Veloso, 1989
<i>Eupsophus roseus</i>	XX/XY	Iturra e Veloso, 1989
<i>Eupsophus insularis</i>	XX/XY	Cuevas e Formas, 1996
Família Hylidae		
<i>Hyla femoralis</i>	XX/XY	Wiley, 2003; Schmid e Steilein, 2003
<i>Pseudis tocantins</i>	ZZ/ZW	Busin et al., 2008
Família Leiopelmatidae		
<i>Leiopelma hochstetteri</i>	OO/OW	Green, 1988a
<i>Leiopelma hamiltoni</i>	ZZ/ZW	Green, 1988b
Família Pyxicephalidae		
<i>Tomopterna delalandii</i>	XX/XY	Schmid, 1980
<i>Pyxicephalus adspersus</i>	ZZ/ZW	Schmid, 1980
Família Centrolenidae		
<i>Vitreorana antisthenesi</i>	XX/XY	Schmid et al., 1989
Família Dicroglossidae		
<i>Hoplobatrachus tigerinus</i>	ZZ/ZW	Chakrabarti et al., 1983
Família Myobatrachidae		
<i>Crinia bilingua</i>	ZZ/ZW	Mahony, 1991
Família Odontophrynidae		
<i>Proceratophrys boiei</i>	ZZ/ZW	Ananias et al., 2004
Família Rhacophoridae		
<i>Buergeria buergeri</i>	ZZ/ZW	Schmid et al., 1993; Hanada, 2002

*¹Os nomes científicos apresentados seguem Frost (2013).

*²Sistema múltiplo.

De maneira geral, os mecanismos que levaram à diferenciação dos cromossomos sexuais já encontrados em Anura ainda são pouco conhecidos. A heterocromatinização como evento responsável pela assincronia no padrão de replicação do DNA de dois cromossomos homólogos, implicando uma redução na frequência de recombinação entre esses, foi inicialmente sugerida por Singh e colaboradores (1976) como o primeiro passo para a diferenciação de cromossomos sexuais, com base em observações em *Ophidia*. Dentre as espécies de Anura que apresentam cromossomos sexuais diferenciados, apenas os cromossomos de *Pyxicephalus adspersus* (Pyxicephalidae) (Schmid, 1980) e *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae) (Schmid et al., 1983) se adequam a essa hipótese. King (1991), analisando os dados de Green (1988a) sobre *Leiopelma hochstetteri* (Leiopelmatidae), sugere que as variações na quantidade de heterocromatina dos diferentes W encontrados nessa espécie constituem outro exemplo inequívoco de transformação de eucromatina, embora Green não tenha interpretado seus dados dessa maneira. Schempp e Schmid (1981), em estudo de espécies do complexo *Pelophylax* (anteriormente denominado *Rana*) discutem a possibilidade de haver uma concentração diferencial de DNA satélite entre os cromossomos sexuais mesmo que o bandamento C não revele regiões de heterocromatina sexo-específicas.

Por outro lado, o ganho e a perda de heterocromatina, e a perda de DNA ribossomal também já foram considerados fenômenos desencadeadores da diferenciação de cromossomos sexuais em alguns grupos de anuros (Green, 1988b; Iturra e Veloso, 1989; Mahony, 1991; Schmid et al., 1990; Schmid et al., 1993).

Outros dois eventos considerados por John (1988) como possíveis responsáveis pela redução de recombinação entre cromossomos homomórficos que deram origem a

cromossomos sexuais são: a determinação genotípica da localização de quiasmas e rearranjos estruturais, especialmente inversão pericêntrica. Em Anura, alguns casos de rearranjos cromossômicos envolvendo os pares sexuais foram vistos em *Strabomantis biporcatus* (Schmid et al., 1992), *Bufotes viridis* (Odierna et al., 2007), *Pristimantis riveroi* (Schmid et al., 2003), *Pseudis tocantins* (Busin et al., 2008).

O grande desconhecimento acerca da evolução de cromossomos sexuais em anuros se deve, em parte, à escassez de estudos citogenéticos que utilizem técnicas avançadas e amostras mais representativas de diferentes grupos de espécies. A caracterização detalhada dos cromossomos sexuais de espécies proximamente relacionadas, portadoras de diferentes tipos de cromossomos sexuais poderá revelar fenômenos relevantes no processo de acúmulo de diferenças entre os cromossomos sexuais.

III.4. Pintura Cromossômica no estudo da evolução cariotípica

Dentre as técnicas que têm sido bastante utilizadas para o estudo da evolução cromossômica em diversos grupos de animais, destaca-se a de pintura cromossômica total (Yang et al., 1995; Yang et al., 1997; revisão de Ferguson-Smith et al., 2005; Teruel et al., 2009a; Teruel et al., 2009b; Engelbrecht et al., 2011; Rubes et al., 2008; Finotelo et al., 2010).

Esta técnica tem início com o isolamento de um cromossomo inteiro (ou grande parte dele) e a amplificação do DNA nele contido, a fim de se obter um pool de sequências que o represente. Tais sequências são, então, marcadas e utilizadas como sondas em ensaios de hibridação *in situ*. Nessas condições, as sondas hibridam com regiões complementares levando à detecção de homologias dentro do mesmo cariótipo ou de cariótipos relacionados

(Ried et al., 1998; revisão de Ferguson-Smith et al., 2005). O isolamento dos cromossomos pode ser realizado por citometria de fluxo (Gray et al., 1975; Young et al., 1981) ou por microdissecção com agulha (Meltzer et al., 1992) ou a laser (Emmert-Buck et al., 1996). A amplificação do DNA pertencente ao cromossomo isolado pode ser feita por meio de PCR com primers degenerados (DOP-PCR) (Telenius et al., 1992) ou utilizando kits de amplificações de genoma total. As hibridações *in situ* são realizadas em metáfases do próprio organismo em estudo e/ou em metáfases de organismos relacionados a fim de buscar homeologias cromossômicas ou rearranjos que expliquem as diferenças observadas dentro e entre os grupos.

Um interessante exemplo da aplicação da técnica de pintura cromossômica para o estudo da evolução cariotípica em um grupo é dado por Yang e colaboradores (1995, 1997). Com base na pintura de cromossomos de cervídeos com $2n=6/7$, $2n=46$ e $2n=70$, os autores discutiram a redução do número cariotípico nesse grupo e puderam inferir a ocorrência de fusões *in tandem* e fusões centroméricas além de outros rearranjos, tais como inversões.

Embora muito útil em estudos de evolução de cariótipos inteiros, é no estudo de cromossomos específicos, como cromossomos B (Karamysheva et al., 2002; Rubtsov et al., 2004; Teruel et al., 2009a; Teruel et al., 2009b; Vicari et al., 2011) e cromossomos sexuais (Hassanane et al., 1998; Shibata et al., 1999; Marchal et al., 2004; Diniz et al., 2008; Wang et al., 2009; Cioffi et al., 2011a; Henning et al., 2011; Kawagoshi et al., 2012), que a técnica de pintura cromossômica tem sido bastante utilizada em alguns grupos. Um interessante exemplo da aplicação dessa técnica no estudo dos cromossomos sexuais é dado por Cioffi e colaboradores (2011a). Analisando duas espécies de peixes pertencentes à mesma família e com mesmo tipo de sistema cromossômico sexual, os autores propuseram

que a evolução dos cromossomos sexuais tenha ocorrido independentemente nas duas espécies e que os processos de diferenciação, ou por fusão *in tandem* ou por fusão centromérica, foram distintos em ambas.

Apesar de amplamente empregada no estudo de vários organismos, a pintura cromossômica tem sido pouco aplicada em anuros. Apenas em 2010, com o trabalho de Krylov e colaboradores, surgiu o primeiro e único estudo de anuros com essa técnica. Contudo, o objetivo daquele trabalho não foi a caracterização de cromossomos sexuais e sim a origem do cariótipo de *Xenopus laevis*. Krylov e colaboradores (2010) hibridaram sondas fabricadas a partir de *X. tropicalis* no cariótipo da espécie tetraploide *X. laevis*. Algumas regiões de homeologia foram detectadas entre os cromossomos de *X. laevis* e de *X. tropicalis*, o que fez os autores proporem a hipótese de aloploidia para a origem de *X. laevis*.

As espécies de *Engystomops*, anuros em foco em nosso estudo, constituem um interessante grupo para aplicação da técnica de pintura cromossômica na análise dos cromossomos sexuais. Dentro do gênero, é possível encontrar espécies que apresentam cromossomos sexuais heteromórficos (Targueta et al., 2010) e espécies em que não é possível reconhecer cromossomos sexuais (Ron et al., 2010). Além disso, diferentes tipos de cromossomos podem ser encontrados (Targueta et al., 2010) em espécies diferentes. Portanto, a aplicação da técnica de pintura cromossômica nos cariótipos de *Engystomops* poderá auxiliar o estudo dos mecanismos envolvidos na origem e diferenciação desses cromossomos sexuais.

III.5. Busca por novos marcadores citogenéticos de anuros

Recentemente, tem havido uma intensa procura por novos marcadores citogenéticos a fim de promover o conhecimento de diversas regiões cromossômicas e a inferência de rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da divergência das espécies. A maioria dos marcadores utilizados até então tem sido obtida por meio das técnicas de impregnação por prata, bandamento C, bandamento G, bandas de replicação tardia, entre outras. A citogenética de anfíbios, entretanto, está basicamente restrita à aplicação das duas primeiras técnicas anteriormente citadas.

Schmid (1978) realizou um dos primeiros estudos citogenéticos em anfíbios com cerca de 70 espécies de *Bufo* e *Hyla* analisando a presença de regiões heterocromáticas, suas localizações nos cromossomos e nos núcleos. Desde então, a análise cariotípica tem se mostrado uma interessante ferramenta para estudos de anuros. A identificação de uma população poliploide de *Phyllomedusa*, por exemplo, permitiu a descrição de uma nova espécie, *P. tetraploidea*, ocorrendo em simpatria com *P. distincta* (Haddad et al., 1994). As divergências citogenéticas observadas entre diferentes populações do gênero *Pseudis*, provavelmente decorrentes de fissões cêntricas, constituem outro valioso exemplo da contribuição da citogenética no reconhecimento de novas espécies (Busin et al., 2001). Já nos trabalhos de Aprea e colaboradores (2007) e Lourenço e colaboradores (2008), os dados citogenéticos são utilizados para a inferência de sinapomorfias cromossômicas em microhilídeos e leptodactilídeos, respectivamente.

Na busca por novos marcadores cromossômicos, que permitam interpretações mais detalhadas sobre a divergência cariotípica durante a divergência das espécies, a heterocromatina tem recebido especial atenção. Inicialmente a heterocromatina era

considerada como a região do genoma que estava em constante estado de condensação durante todo o ciclo celular e se comportava diferente da eucromatina (Heitz, 1928). Posteriormente, sequências repetitivas de DNA foram descritas para essas regiões de heterocromatina (Pardue e Gall, 1970; Gall et al., 1971). Hoje, já se sabe que heterocromatina inclui proteínas e moléculas de RNA responsáveis por diversas atividades, dentre elas a metilação do DNA, a metilação de histonas e a repressão transcricional e atividades relativas à etapa de replicação do DNA (revisão de Craig, 2004).

Diversos fatores são necessários para formação e manutenção da heterocromatina, dentre eles, a região do cromossomo e do núcleo ocupada pelo segmento heterocromático e a quantidade de DNA repetitivo nele presente. As principais regiões de concentração de heterocromatina são as regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, que apresentam grande quantidade de DNA repetitivo, e que podem estar arrançadas em “cromocentros” durante a intérfase de alguns tipos celulares (para referências, revisão de Grewal e Jia, 2007). Regiões como essas são denominadas, por alguns autores, de heterocromatina constitutiva, pois permanecem condensadas durante todas as fases do ciclo celular. Já as regiões de heterocromatina cujo estado de condensação muda em resposta a sinais celulares e a atividades gênicas são denominadas de heterocromatina facultativa (Brown, 1966; John, 1988). Quando essas regiões de heterocromatina facultativa avançam sobre os domínios gênicos ou sobre os promotores da transcrição de genes são capazes de acarretar o silenciamento desses genes, o que representa uma interessante propriedade de tais regiões no genoma (Heard et al., 2001; Duraisingh et al., 2005).

A heterocromatina constitutiva do centrômero apresenta propriedades fundamentais protegendo a integridade do genoma, já que previne rearranjos cromossômicos e medeia a

segregação cromossômica, orientando a formação dos cinetocoros durante a divisão celular (revisão de Grewal e Jia, 2007). Nos centrômeros, fatores que se ligam ao DNA repetitivo, como proteínas CENP-B, contribuem para a formação da heterocromatina. Outros mecanismos também agem para o eficiente arranjo da heterocromatina nos centrômeros e telômeros, incluindo mecanismos mediados por pequenas moléculas de RNA, ou pequenos RNA de interferência (para referências, revisão de Grewal e Jia, 2007).

Dentre as sequências repetitivas encontradas em regiões heterocromáticas estão aquelas repetidas *in tandem* denominadas de **DNA satélite**, que formam grandes blocos de sequências, geralmente com monômeros com mais de 200 pb (ver revisões de Charlesworth et al., 1994; Elder e Tuner, 1995; Richard et al., 2008). As sequências de DNA satélite estão presentes em grande quantidade nos genomas de eucariotos, e essa quantidade varia em diferentes espécies (revisão de Slamovits e Rossi, 2002). O número e o tamanho das sequências formadoras de blocos de sequências repetitivas podem variar e os mecanismos que afetam essas unidades são replicação escorregadia (*DNA polymerase slippage*), duplicação e recombinação desigual entre elas (Charlesworth et al., 1994). Para Charlesworth e colaboradores (1994), há todo um mecanismo evolutivo diferenciado para esses blocos de sequências repetidas *in tandem*. A troca desigual entre blocos de sequências repetitivas somada à deriva genética e à baixa pressão seletiva podem ter grande efeito no acúmulo de tais sequências no genoma (Charlesworth et al., 1994).

As regiões próximas a centrômero e telômero são fundamentalmente formadas por DNA satélite. Além dessas regiões, segmentos de cromossomos sexuais em geral também são ricos em DNA satélite, principalmente o cromossomo Y de vertebrados (Charlesworth et al., 1994). O tamanho das unidades repetitivas existentes nessas regiões pode variar entre

grupos de organismos sem alterar sua funcionalidade, mesmo na região centromérica (Warburton et al., 2000; revisão Henikoff et al., 2001).

Os padrões de ocorrência de DNA satélite têm sido bastante usados como marcadores citogenéticos em análises comparativas entre grupos de insetos, de peixes e de mamíferos (Yamada et al., 2004; Saito et al., 2007; Acosta et al., 2007; Yoshimura et al., 2006). Esse tipo de estudo envolve o isolamento de sequências repetitivas aleatórias, muitas vezes realizado com a clivagem de DNA genômico por enzimas de restrição e clonagem de fragmentos de restrição recuperados a partir de bandas visualizadas após eletroforese em gel de agarose (exemplos em Yamada et al., 2004; Acosta et al., 2007).

Além das sequências de DNA satélite presentes na heterocromatina, outra classe de sequências repetitivas que tem sido bastante estudada por citogeneticistas é a de **DNA ribossomal** (DNAr). Em geral, o DNA ribossomal nuclear eucarioto é composto por múltiplas cópias repetidas *in tandem*, e pode ser classificado em duas famílias, de acordo com o tipo de RNAr transcrito. A família de DNAr 45S é responsável pela produção dos RNAr maiores (18S; 5,8S e 28S), enquanto a família de DNAr 5S é composta pelos genes que transcrevem o RNAr 5S (Long e Dawid, 1980; revisão de Gerbi, 1985). A região codificadora do RNAr 5S pode ou não estar localizada próximo à região codificadora dos RNAr maiores (Long e Dawid, 1980).

As duas famílias de DNAr, a de DNAr 45S e a de DNAr 5S, têm sido utilizadas como marcadores citogenéticos em diversos grupos (Fagundes et al., 2003; Berjano et al., 2009; Gross et al., 2010; Martinez et al., 2010; Hashimoto et al., 2011; Bolsheva et al., 2012; Marquioni et al., 2013). Recentemente, a família de DNAr 5S tem recebido especial atenção (Mariguela et al., 2011; Scacchetti et al., 2012; Son et al., 2012). Em anfíbios,

alguns estudos já foram feitos isolando o DNAr 5S e utilizando essa sequência como sondas cromossômicas (Vitelli et al., 1982; Schmid et al. 1987; Nietfeld et al., 1988; Nascimento et al., 2010; Vittorazzi et al., 2011; Rodrigues et al., 2012).

Os genes ribossomais 5S estão organizados *in tandem* contendo regiões transcritoras conservadas de 120 pb espaçadas por regiões não transcritas (NTS) de tamanho e composição nucleotídica variáveis (revisão de Korn e Brown, 1978; Gerbi, 1985; Martins e Wasko, 2004). Algumas regiões do gene parecem ser essenciais para que a transcrição ocorra. Dentre elas, destaca-se uma região de controle localizada no segmento transcrito em RNAr (ICR – *Internal Control Region*), onde é possível localizar o Box A, um elemento intermediário e o Box C (Pieler et al., 1987). Além disso, é possível distinguir uma região poli-T na região terminal do segmento de 120 pb transcritos (Korn e Brown, 1978).

Em alguns organismos, como peixes (Martins e Galleti, 2001a), ouriços (Caradonna et al., 2007; Dimarco et al., 2012) e borboletas (Cherevatov e Volkov, 2011) foi possível notar a presença de diferentes classes de DNAr 5S. Em anuros, diferentes classes de DNAr 5S já foram encontradas em espécies de *Xenopus* (Korn e Brown, 1978; Peterson et al., 1980; Nietfeld et al., 1988), em *Physalaemus cuvieri* (Vittorazzi et al., 2011) e nas espécies amazônicas de *Engystomops* (Rodrigues et al., 2012). As duas classes de DNAr 5S descritas para *Xenopus* variavam em relação ao tamanho das unidades repetitivas e ao padrão de expressão dos genes, as quais foram denominadas de tipo oocítico e tipo somático (Carroll e Brown, 1976; Korn e Brown, 1978; Fedoroff e Brown, 1978; Miller et al., 1978; Peterson et al., 1980; Harper et al., 1983; Wolffe e Brown, 1988; Nietfeld et al., 1988; Chipev e Wolffe, 1992). Pardue e colaboradores (1973) fizeram a

localização cromossômica do DNAr 5S em *Xenopus laevis* e sugeriram a presença desse sítio na região terminal de vários cromossomos.

Nas espécies amazônicas de *Engystomops*, *E. petersi* e *E. freibergi* (Rodrigues et al., 2012) e também em *Physalaemus cuvieri* (Vittorazzi et al., 2011), duas classes de DNAr 5S, facilmente diferenciadas pelo tamanho do NTS, foram reconhecidas. As unidades repetitivas do DNAr 5S do tipo I desses anuros apresentou 201 pb (com NTS de 84 pb), enquanto as do tipo II possuíam cerca de 765 pb (com NTS de aproximadamente 650 pb) (Vittorazzi et al., 2011; Rodrigues et al., 2012). As sequências do DNAr 5S do tipo I e do tipo II das espécies de *Engystomops* apresentaram grande similaridade com as sequências de DNAr 5S do tipo I e do II, respectivamente, de *Physalaemus cuvieri*, sugerindo que a origem dessas duas classes de DNAr 5S ocorreu antes da divergência desses dois gêneros, que são considerados proximamente relacionados (Rodrigues et al., 2012).

Além de analisar a composição nucleotídica das sequências de DNAr 5S, Rodrigues e colaboradores (2012) as localizaram nos cariótipos de duas populações de *E. petersi* (população de Puyo e de Yasuní) e de *E. freibergi*. A sonda que continha a unidade repetitiva do DNAr 5S do tipo I inteira e a sonda que continha somente a região do NTS do tipo I detectaram a região proximal do braço curto do cromossomo 3 no cariótipo da população de *E. petersi* de Puyo e no cariótipo de *E. freibergi*. Já a sonda que continha a unidade repetitiva inteira do DNAr 5S do tipo II e a sonda que continha apenas o NTS do tipo II hibridaram na região distal do braço longo do cromossomo 6 em ambos os cariótipos em questão. No cariótipo de espécimes de *E. petersi* de Yasuní, o DNAr 5S do tipo I foi localizado na região proximal do braço curto do cromossomo 5 e o DNAr 5S do tipo II, em

uma região distal do braço longo do cromossomo 6. Baseados nesses dados, apesar do cariótipo encontrado nos espécimes de Yasuní diferir do cariótipo dos espécimes de Puyo e do cariótipo da espécie *E. freibergi*, Rodrigues e colaboradores (2012) puderam inferir que o cromossomo 5 do cariótipo dos espécimes de Yasuní é homeólogo aos cromossomos 3 de *E. petersi* de Puyo e de *E. freibergi*. Além disso, Rodrigues e colaboradores (2012) sugeriram que o cromossomo 6 de *E. freibergi* e o dos cariótipos de *E. petersi* sejam homeólogos. Já em relação ao DNAr 5S das espécies clado Duovox de *Engystomops*, nenhuma informação está disponível até o momento.

Ainda no trabalho de Rodrigues e colaboradores (2012), os autores chamaram a atenção para a detecção do centrômero de diversos cromossomos de *E. freibergi* e de *E. petersi* pela sonda composta pelo NTS do DNAr 5S do tipo I. Os autores discutiram que uma possível explicação para esse resultado é a presença de segmentos de DNA satélite derivados do DNAr 5S presentes nessas regiões centroméricas, semelhante ao que já foi encontrado no peixe *Hoplias malabaricus* (Martins et al., 2006) e no anuro *Physalaemus cuvieri* (Vittorazzi et al., 2011).

Em *Physalaemus cuvieri*, Vittorazzi e colaboradores (2011) identificaram a presença de um DNA satélite derivado do DNAr 5S, que foi denominado de PcP190EcoRI. A sequência repetitiva desse DNA satélite consistiu de cerca de 190 pb e seu alinhamento com as sequências de 120 pb correspondentes a regiões transcritoras do DNAr 5S do tipo I e do tipo II de *P. cuvieri* mostrou cerca de 70% e 66% de similaridade, respectivamente (Vittorazzi et al., 2011). Na análise cromossômica, as sondas contendo a sequência PcP190EcoRI detectaram as regiões centroméricas dos pares cromossômicos 1 a 5. Por outro lado, as sondas contendo as sequências do DNAr 5S do tipo I e do tipo II detectaram

preferencialmente a região pericentromérica do braço curto do cromossomo 3 e uma região intersticial do braço longo do cromossomo 5, respectivamente.

Utilizando a técnica de PCR, com *primers* desenhados a partir das sequências PcP190EcoRI isoladas de *P. cuvieri*, Vittorazzi e colaboradores (em preparação) também constataram a presença dessa classe de sequências também no genoma de *Engystomops freibergi*. No entanto, o mapeamento dessas sequências nos cariótipos dessa e de outras espécies de *Engystomops* ainda não foi realizado.

IV. Objetivos

Tendo em vista os interessantes aspectos já conhecidos da citogenética das espécies de *Engystomops*, nota-se que uma melhor caracterização dos cariótipos das espécies amazônicas e a descrição dos cariótipos das espécies do clado Duovox ainda não estudadas citogeneticamente podem auxiliar o estudo da evolução cariotípica desse grupo. Um dos objetivos gerais do presente trabalho é testar se o número diploide $2n=20$ é uma sinapomorfia de todas as espécies do grupo Duovox ou apenas das duas espécies de Duovox já cariotipadas, *E. pustulatus* e *E. puyango*. Outro objetivo principal deste trabalho é buscar novos marcadores citogenéticos que auxiliem no reconhecimento de homologies cromossômicas no gênero.

IV.1. Objetivos específicos

- Descrever os cariótipos de espécies representantes do clado Duovox de *Engystomops* ainda não estudadas citogeneticamente: *E. coloradum*, *E. guayaco*, *E. randi* e *E. montubio*, com base em metáfases coradas com Giemsa e submetidas ao bandamento C e ao método Ag-NOR. Contribuir com novos dados a análise citogenética para a espécie *E. pustulatus*.
- Isolar, caracterizar e localizar *in situ* sequências do gene ribossomal 5S das espécies de *Engystomops* do clado Duovox.
- Utilizar a técnica de pintura cromossômica para análise da diferenciação dos cromossomos sexuais encontrados nas espécies de *Engystomops* da Amazônia.
- Mapear sequências de DNAr 5S e do DNA repetitivo PcP190EcoRI derivado de DNAr 5S nos cariótipos de *E. freibergi*, *E. petersi* e das espécies do clado Duovox.

V. Resultados

Os resultados estão apresentados em forma de capítulos de acordo com os objetivos citados acima.

O Capítulo I trata da descrição cariotípica das espécies do gênero *Engystomops* pertencentes ao clado Duovox que ainda não haviam sido estudadas.

O Capítulo II trata do uso da técnica de pintura cromossômica no estudo dos cromossomos sexuais das espécies amazônicas de *Engystomops*.

No Capítulo III é abordado o estudo do DNAr 5S das espécies do clado Duovox e da sequência PcP190EcoRI nos clados Duovox e Edentulus.

Capítulo I – Artigo publicado na revista Genetica

Karyotypic differentiation via 2n reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops*

Targueta, C.P.^a, Rivera, M.^b, Lourenço, L.B.^{a*}

^aDepartment of Cell Biology, IB, University of Campinas - UNICAMP, 6109, 13083-863, Campinas, SP, Brazil

^bEscuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, Quito, Ecuador

*Corresponding author. Address: Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Campinas - UNICAMP, 6109, 13083-863, Campinas, SP, Brazil. Phone number: 55-19-35216108. Fax number: 55-19-35216109. E-mail address: bolsoni@unicamp.br

Abstract

The genus *Engystomops* is divided into two groups, namely the Duovox clade and the Edentulus clade. The species of Edentulus clade have karyotypes with $2n=22$, while *E. pustulatus* and *E. puyango*, which belong to Duovox clade, have $2n=20$. To investigate if $2n=20$ is a synapomorphy of Duovox clade, in the present work we cytogenetically analyzed all the species of this group, except *E. puyango*. All of them had $2n=20$, differing from the species of Edentulus clade. Since the species already karyotyped of the genus *Physalaemus*, which is considered to be the sister group of *Engystomops*, also have $2n=22$, we conclude that the $2n$ reduction is a synapomorphy of Duovox clade. Despite the karyotypes of all the species of Duovox clade were very similar, they varied in the NOR pattern. In *E. coloradorum*, an additional NOR was found in one homologue of the chromosome pair 10 exclusively in all females, indicating that this could possibly be a sexual pair of the system ZZ/ZW. Also in this species, it was found the first case of natural polyploidy of the genus *Engystomops*.

Key Words: Chromosome, anuran cytogenetics, *Engystomops*, polyploidy, sex chromosomes

Introduction

The anuran genus *Engystomops*, which was recently revalidated (Nascimento et al. 2005), is composed of nine species distributed in Central America and in the Northwestern part of South America. The phylogeny of the *Engystomops* species proposed by Ron et al. (2006) allocated the species from Western Ecuador and Northwestern Peru in a clade called Duovox, which is composed of the species *Engystomops coloradum* (Cannatella and Duellman 1984), *Engystomops guayaco* (Ron et al. 2005), *Engystomops montubio*, *Engystomops randi* (Ron et al. 2004), *Engystomops pustulatus* (Shreve 1941), and *Engystomops puyango* (Ron et al. 2010). The sister group of this clade was named Edentulus and comprised *Engystomops pustulosus* and the Amazonian species *Engystomops freibergi* and *Engystomops petersi* (Ron et al. 2005).

The presence of undescribed cryptic species under the name *E. petersi* has been considered by some authors, in studies on advertisement call (Guerra and Ron, 2008) and on genetics and cytogenetics (Funk et al. 2007; Targueta et al., 2010). Based on the interpopulational female mate choice assessed in phonotaxis experiments, Guerra and Ron (2008) proposed that sexual selection is involved in speciation between populations of *E. petersi*. In addition, a high interpopulational karyological variation was observed and allowed the recognition of three groups in *E. petersi* (Targueta et al., 2010). It supported the hypothesis that selective pressure against hybrids of diverse karyotypic groups could have played a role in the differentiation of some populations, contributing for their reproductive isolation (Targueta et al., 2010).

Despite the high chromosomal variation, all the karyotypes described for *E. petersi* complex had $2n=22$, as did those found in *E. freibergi* (Lourenço et al. 1999; Targueta et al.

2010), in *E. pustulosus* (León 1970), and in the karyotyped species of *Physalaemus* (De Lucca et al. 1974; Silva et al. 1999; Amaral et al. 2000; Silva et al. 2000; Quinderé et al. 2009; Tomatis et al. 2009; Milani et al. 2010; Nascimento et al. 2010), which is the sister-group of *Engystomops* (Ron et al., 2006). On the other hand, *E. puyango* and *E. pustulatus* showed a karyotype composed of $2n=20$ (Ron et al. 2010), raising a question about when the $2n$ reduction has occurred.

To investigate if $2n=20$ is a synapomorphy of Duovox clade, in the present work we cytogenetically analyzed the four species of this group with unknown karyotype: *E. coloradum*, *E. guayaco*, *E. montubio*, and *E. randi*. We also provide a detailed characterization of *E. pustulatus* karyotype, expanding the cytogenetic data previously reported by Ron et al. (2010) for this species. A triploid specimen was found among the specimens of *E. coloradum* and its karyotype is also described.

Material and Methods¹

Specimens

Specimens of *E. coloradum*, *E. guayaco*, *E. pustulatus*, and *E. randi* were collected at type locality of these species. Six males (QCAZ 47270, QCAZ 47271, QCAZ 47272, QCAZ 47273, QCAZ 47274, QCAZ 47275) and four females (QCAZ 48577, QCAZ 48578, QCAZ 48579, QCAZ 48580) of *E. coloradum* were collected at Santo Domingo de los Colorados, Alluriquín, Provincia Pichincha, Ecuador. Five males of *E. guayaco* (QCAZ 47230, QCAZ 47231, QCAZ 47232, QCAZ 47233, QCAZ 47234) and eight males of *E. randi* (QCAZ 47236, QCAZ 47238, QCAZ 47239, QCAZ 47242, QCAZ

¹ Para detalhes sobre os métodos utilizados, ver Anexo I.

47243, QCAZ 47244, QCAZ 47245, QCAZ 47246) were collected at Cerro Masvale, Provincia del Guayas, Ecuador. Six males (QCAZ 47251, QCAZ 47252, QCAZ 47263, QCAZ 47264, QCAZ 47265, QCAZ 47267) and two females (QCAZ 47253, QCAZ 47266) of *E. pustulatus* were collected at Cerro Blanco, Guayaquil, Provincia del Guayas, Ecuador. Six males (QCAZ 47254, QCAZ 47255, QCAZ 47256, QCAZ 47257, QCAZ 47258, QCAZ 47259) of *E. montubio* were collected at Montañita, Provincia del Manabí, Ecuador, near its type locality, which is Cerro Puerto Rico, Provincia del Manabí, Ecuador. The vouchers were deposited at Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ), Quito, Ecuador.

Chromosome preparation, NOR, and heterochromatin analyses

Mitotic metaphases were obtained from intestine and testis cells of the animals after 5-h pre-treatment with colchicine (Schmid 1978; Schmid et al. 1979, with few modifications). The cells were dropped in clean plates and the chromosomes were stained with 10% Giemsa for morphological analyses. For the localization of the NORs, chromosome preparations were submitted to the Ag-NOR method (Howell and Black 1980) and to *in situ* hybridization with the 28S rDNA fragment isolated by Bruschi et al. (2012). After PCR-labeled with digoxigenin, the 28S rDNA probe was hybridized with the mitotic metaphases following Viegas-Péquignot (1992) and was detected with an anti-digoxigenin antibody conjugated with rhodamine (Roche). The heterochromatin regions were revealed by the C-banding method described by King (1980) with the modifications described by Siqueira et al. (2008). The C-banded metaphases were also stained by DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilidone), after removing the Giemsa stain with 50% acetic acid for about 2

min. From 50 to 220 metaphases of each species were analyzed. Metaphases were photographed under an Olympus microscope and analyzed using Pro-Plus version 4 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Chromosomes were ordered and classified according to Green and Sessions (1991).

Results

Engystomops coloradorum

All the specimens of *E. coloradorum*, except for the female QCAZ 48578, showed a $2n=20$ karyotype (Fig. 1A-E). The female specimen QCAZ 48578 had 30 chromosomes in all the 51 metaphases analyzed and it was considered a case of triploidy, as the chromosomes could be arranged in triplets and the monoploid complement of the $2n=20$ karyotype could be recognized (Fig. 1F).

Chromosomes 1, 5, 6, 7, and 10 were metacentric and chromosomes 2, 3, 4, 8, and 9 were submetacentric (Fig. 1). In all six male specimens analyzed, one secondary constriction was found at the terminal region of the chromosomes of pair 9 and was revealed to be a NOR. In all four diploid females, one additional NOR was detected in one of the homologues of pair 10 (Fig. 1B - inset and 1C). Interestingly, the female triploid karyotype showed the triplet 9 and also one of the homologues of the triplet 10 as NOR-bearing chromosomes (Fig. 1F - inset).

The C-banding revealed strong signals at the centromeric regions of all chromosome pairs, at the pericentromeric region of the short arm of chromosome 3, at the interstitial region of the long arm of chromosome 10, and associated to the NOR in chromosome 9 (Fig. 1D). All of the C-bands were DAPI positive (Fig. 1E). Faint C-bands were detected at

the terminal 1q, 2p, 3q, 5p, 6q, and 8q and at an interstitial region of the long arm of chromosome 3.

Engystomops guayaco, Engystomops randi, Engystomops montubio and Engystomops pustulatus

All the specimens of *E. guayaco*, *E. randi*, *E. montubio* and *E. pustulatus* showed a $2n=20$ karyotype, in which chromosomes 1, 5, 6, 7, and 10 were metacentric, and chromosomes 2, 3, 4, and 8 were submetacentric (Figs. 2-5). In all of these species, different morphs of chromosome 9 were observed. In *E. guayaco*, *E. randi* and *E. montubio*, a metacentric chromosome 9a, which carried a distal NOR in the short arm and another in the long arm, and a submetacentric chromosome 9b, with only a distal NOR in the long arm, were found (Figs. 2-4). Four males of *E. guayaco* (Fig. 2), six males of *E. randi* (Fig. 3 - inset) and all the six males of *E. montubio* (Fig. 4) had a heteromorphic pair 9a/9b, while one male of *E. guayaco* (QCAZ 47230) (Fig. 2 - inset) and two males of *E. randi* (QCAZ 47244, QCAZ47245) (Fig. 3) had a homomorphic pair 9a/9a.

In *E. pustulatus*, four morphs of chromosome 9 and three patterns of pair 9 were observed (Fig. 5). The morph 9a was submetacentric and had one distal NOR in the short arm and one amplified NOR in the long arm (Fig. 5C). The submetacentric morph 9b had only a regular NOR in the long arm (Fig. 5B and 5C), while the submetacentric morph 9c had only one amplified NOR in the long arm (Fig. 5D). The metacentric morph 9d had no NOR (Fig. 5D). Five males and one female of this species had one homomorphic pair 9 composed of two chromosomes 9b (Fig. 5B). The female QCAZ 47266 had a heteromorphic pair 9a/9b (Fig. 5C). The specimen QCAZ 47263 showed only one

amplified NOR, showing a heteromorphic pair 9c/9d (Fig. 5D).

Heterochromatic C-bands were seen at all the centromeres and associated with the NORs of the karyotypes of *E. guayaco* (Fig. 2), *E. randi* (Fig. 3), *E. montubio* (Fig. 4), and *E. pustulatus* (Fig. 5). In all of these species, terminal C-bands were seen in several chromosomes (Figs. 2-5). Except for the karyotype of *E. pustulatus*, a pericentromeric C-band was detected in the short arm of chromosome 3 (Figs. 2-4). In the karyotype of *E. randi*, an interstitial C-band was detected in the long arm of chromosome 10 (Fig. 3C). All of the C-bands were DAPI-positive (Figs. 2-5).

Discussion

The diploid number of the five *Engystomops* species studied here was $2n=20$, the same $2n$ reported previously for *E. pustulatus* and *E. puyango* (Ron et al. 2010). It differs from $2n$ observed for the three remaining species of *Engystomops* ($2n=22$; León 1970; Targueta et al. 2010) and for the genus *Physalaemus* ($2n=22$; De Lucca et al. 1974; Silva et al. 1999; Amaral et al. 2000; Silva et al. 2000; Quinderé et al. 2009; Tomatis et al. 2009; Milani et al. 2010; Nascimento et al. 2010), which is considered to be the sister-group of *Engystomops* (Ron et al. 2005; Nascimento et al. 2005; Ron et al. 2006). Therefore, we conclude that the reduction of the $2n$ reduction from $2n=22$ to $2n=20$ is a synapomorphy of Duovox clade of *Engystomops*.

The $2n=20$ karyotypes found in the six species of the Duovox clade (described herein and in Ron et al. 2010) are very similar to each other, both in the morphology of each chromosome pair and in the NOR location in chromosome 9. Some differences in the arm ratio value/centromeric index could be observed when presumed homeologous

chromosomes of the karyotypes presented here were compared with those of *E. puyango* and *E. pustulatus* described by Ron et al. (2010). However, we believe that these differences most likely represent divergences in measurement techniques, instead of a real chromosomal divergence.

By comparing the $2n=20$ karyotypes of the species of the Duovox clade with the $2n=22$ karyotypes of *E. freibergi*, of *E. petersi* from Puyo (Targueta et al. 2010) and of *Physalaemus* species (De Lucca et al. 1974; Silva et al. 1999; Amaral et al. 2000; Silva et al. 2000; Quinderé et al. 2009; Tomatis et al. 2009; Milani et al. 2010; Nascimento et al. 2010), a great similarity can be identified for the seven first chromosome pairs. Despite that, the chromosomal data already available does not allow us to infer any chromosomal loss or rearrangement that might have resulted in the $2n$ reduction in the Duovox clade.

Among the species of Duovox clade, distinctive cytogenetic characteristics that might be considered species-specific could not be identified. Even the NOR-bearing chromosome 10 found in the females of *E. coloradorum* karyotype cannot be considered an exclusive trait of this species, since females of *E. guayaco*, *E. randi*, and *E. montubio* were not analyzed cytogenetically.

An interesting characteristic to be noted, although it is not exclusive either, is the interstitial C-band observed in chromosome 10 of the *E. randi* karyotype. This C-band was absent in chromosome 10 of the karyotype of *E. guayaco*, a cryptic species of *E. randi* that occurs in sympatry with it. For the correct identification of specimens of these two species, advertisement call characteristics are very important, and, therefore, the description of a chromosomal distinctive characteristic between these species is a very interesting finding. However, we must be aware that this interstitial C-band is not a characteristic exclusive to

E. randi, since it has already been observed in chromosome 10 of the *E. coloradorum* karyotype.

The conservative nature of the karyological characters among the species of the Duovox clade is in contrast with the high chromosomal variability found in the Edentulus clade of *Engystomops* (*E. freibergi* + *E. petersi*) (Targueta et al. 2010). In the Edentulus clade, three distinct karyotypic groups could be recognized in *Engystomops petersi* (Targueta et al. 2010). Besides this cytogenetic variation, a high divergence was also observed in advertisement calls (Boul et al. 2007; Guerra and Ron 2008) and in genetic data (Funk et al. 2007). Altogether, these data support the hypothesis of the existence of a complex of species under the name *E. petersi* (Guerra and Ron 2008; Targueta et al. 2010). Targueta et al. (2010) discussed the possible involvement of karyological variations in speciation processes in this group.

Despite the low interspecific karyological variation, a high intraspecific polymorphism in NOR occurrence was noted in four of the five *Engystomops* species studied here. In *E. guayaco*, *E. randi*, *E. montubio* and *E. pustulatus*, the morphs 9a and 9b, which were characterized by the presence of two and one NOR, respectively, were found. In addition, in *E. pustulatus* a size heteromorphism related to the NOR in the long arm of chromosome 9 and even a morph without NOR were observed. Since morphs 9a and 9b were present in all four of the species, and considering that *E. pustulatus* is in the Vivavox clade and that the three other species are in the Brevivox clade (Ron et al. 2006), we can propose that this NOR polymorphism would have been present in the hypothetical ancestor of the Duovox clade.

With regard to *E. coloradorum*, only chromosome morph 9b was found in the

karyotypes of the 11 specimens analyzed, suggesting that this condition may be fixed in this species. In addition to the NOR present in chromosome 9, all the females of this species also had a NOR in chromosome 10. Therefore, this chromosome-10 heteromorphism may be related to the sex and may suggest the presence of heteromorphic sex chromosomes of the system ZZ/ZW in *E. coloradurum*. Although the NOR has been reported as a distinctive marker between sex chromosomes in some anuran species (*Gastrotheca riobambae* – Schmid et al. 1983; *Buergeria buergeri* – Schmid et al. 1993; *Hyla femoralis* - Schmid e Steinlein 2003; Wiley 2003; *Engystomops petersi* from Puyo – Targueta et al. 2010; *Physalaemus ephippifer*-Nascimento et al. 2010), only in *Buergeria buergeri* (Schmid et al. 1993) and *Hyla femoralis* (Schmid e Steinlein 2003; Wiley 2003) it is the single cytogenetic characteristic that could be found to differentiate the sex chromosomes. A possible role of ribosomal DNA in the first step of sex chromosome differentiation has been proposed by some authors (Reed and Phillips 1997; Cioffi et al. 2010) and we could not discard the possibility that this repetitive DNA was also involved in the differentiation of the chromosomes of *E. coloradurum*.

The presence of heteromorphic sex chromosomes has already been reported in the genus *Engystomops*, for *E. freibergi* and *E. petersi* (Targueta et al. 2010). However, these species have a XX/XY sex determination system (Targueta et al. 2010). In amphibians, the female heterogamety is considered to be the ancestral condition, while distinct XX/XY systems probably arose by independent events more than once during the evolutionary history of this group (Hillis and Green 1990). The coexistence of XX/XY and ZZ/ZW systems in the same genus was already reported for the genus *Pristimantis*, previously called *Eleutherodactylus* (Schmid et al. 2002; Schmid et al. 2003). The most intriguing case

was found in *Rana rugosa* (Nishioka et al. 1993; Ogata et al. 2008), in which different populations had distinct sex determination systems.

Based on the data available for the *Engystomops* genus, another open question for further studies is whether a female-restricted heteromorphism like that observed in *E. coloradorum* is also present in any of the other species of the Duovox clade, since females of *E. guayaco*, *E. randi*, and *E. montubio* have not been analyzed. Anyway, it was possible to conclude that *E. pustulatus* (a species of Edentulus clade) has no heteromorphic sex chromosomes.

It was also among the *E. coloradorum* specimens that another interesting cytogenetic feature was found, the presence of a triploid female. Apparently, this was a normal female, and no external morphological abnormality was detected. Polyploidy cases have already been reported for several lower vertebrates. Fish are the group with more cases of polyploidy among the vertebrates. The Salmonidae and the Catostomidae are fish families composed entirely of species with high levels of nuclear DNA content, probably resulting from polyploidization events (Gregory et al. 2005). In salamanders, there are some cases of hybridization generating triploids, as seen in the genus *Ambystoma* (Bogart et al. 1985).

For anurans, cases of polyploid species/specimens have been reported for several genera from different families. Tetraploid species, for example, were seen in the genera *Neobatrachus* (Mahony and Robinson 1980), *Odontophrynus* (Beçak et al. 1966), *Phyllomedusa* (Beçak et al. 1970; Haddad et al. 1994) and *Hyla* (Ptacek et al. 1994). Triploidy, on the other hand, is rarer in natural populations, but triploid specimens have already been reported, for example, for *Rana palustris* (Wiley and Braswell 1986),

Eupsophus vertebralis (Formas 1994), *Rana esculenta* (Gunther et al. 1979), *Rana pipens* (Richards and Nace 1977), *Leiopelma hochstetteri* (Green et al. 1984) and *Odontophrynus* sp. (Rosset et al. 2006). Cavallo et al. (2002) also reported cases of triploidy involving *Bufo viridis*. Their hypothesis was that those triploid animals could be originated by hybridization of the two populations (one diploid and one tetraploid). Stöck et al. (2009) also proved that triploidy in the *Bufo viridis* complex is a result of hybridization. For the same species complex, Stöck et al. (2002) reported a triploid species, *Bufo pseudoraddei baturae*.

²The polyploidy specimens can arise from allopolyploidy, when complete chromosome sets come from different species, seen for example in *Rana esculenta* (Gunther et al. 1979), but polyploidy specimens can also arise from autopolyploidy [examples of autotriploidy were seen in *Rana paulstris* (Wiley and Braswell 1986), *Eupsophus vertebralis* (Formas 1994), *Rana pipens* (Richards and Nace 1977) and *Leiopelma hochstetteri* (Green et al. 1984)]. In the case of the triploid female of *E. coloradum*, it is more plausible to consider the hypothesis of autopolyploidy, since none of the other *Engystomops* species occurs sympatrically with *E. coloradum*. The geographic distribution of *Engystomops coloradum* extends from the Pacific lowlands to Andean foothills, between the river Cupa and Baba (Cannatella and Duellman, 1984; Ron et al., 2006; Frost, 2013; IUCN, 2011) and it does not overlap with the geographic distribution of any other *Engystomops* species. Otherwise, the hypothesis of allopolyploidy cannot be ruled out. As the karyotypes of the *Engystomops* species of Duovox clade are

² Esse parágrafo e o anterior estão diferentes no artigo publicado, entretanto se adequam ao que foi sugerido por um dos membros da Banca de Defesa de Tese de Doutorado.

very similar, the cytogenetic analyses cannot help to decide between allopolyploidy and autopolyploidy hypotheses. Therefore, further analyses that include nuclear and mitochondrial species-specific DNA sequences would help in this issue.

Since the triploid female of *E. coloradurum* had only one NOR-bearing chromosome 10 and if the hypothesis of autopolyploidy is correct, one can suppose that the monoploid genome that was duplicated in this female had no NOR in chromosome 10. Considering the hypothesis that the chromosomes of pair 10 of *E. coloradurum* actually are sex chromosomes, this triploid female would have a ZZW set of sex chromosomes. Since the genetic cascade that leads to sex differentiation is not well understood in anurans, the finding of this triploid female would be also relevant for further studies on sex determination.

In conclusion, while we could ascertain that the $2n = 20$ is a synapomorphy of Duovox clade, responding to the major question of this paper, the cytogenetic data used here indicate that these anurans are a very interesting group, which deserves further studies, specially because of the possibility of occurrence of heteromorphic sex chromosomes among them.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Dr. Santiago R. Ron for identification of the specimens, and Diego Almeida Reinoso, Margarita Baquero, and Ailin Blasco for helping in the field work. This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and the Ecuadorian agencies SENESCYT

(Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología y Innovación and PUCE (Pontificia Universidad Católica del Ecuador).

References

- Amaral MJV, Cardoso AJ, Recco-Pimentel SM. (2000) Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). *Caryologia* 53(2): 283-288.
- Beçak ML, Beçak W, Rabello MN (1966) Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma* 19(2):188–193.
- Beçak ML, Denaro L, Beçak W (1970) Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics* 9:225–238.
- Bogart JP, Licht LE, Oldham, MJ, Darbyshire SJ (1985) Eletrophoretic identification of *Ambystoma laterale* and *Ambystoma texanum* as well as their diploid and triploid interespecific hybrids (Amphibian: Caudata) on Pelee Island, Ontario. *Can J Zool* 63:340–347.
- Boul KE, Funk WC, Darst CR, Cannatella DC, Ryan MJ (2007) Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. *Proc R Soc B Biol Sci* 274:399–406.
- Bruschi DP, Busin CS, Siqueira S, Recco-Pimentel SM (2012) Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). *Hereditas* 149:34–40.
- Cavallo D, De Vita R, Eleuteri P, Borkin L, Ermechenko V, Odierna G, Balletto E (2002) Karyological and flow cytometric evidence of triploid specimens in *Bufo viridis* (Amphibia, Anura). *Eur J Histochem* 46:159–164.
- Cannatella DC, Duellman W (1984) Leptodactylidae frogs of the *Physalaemus pustulosus* group. *Copeia* 1984:902–921.
- Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC (2010) Differentiation of the XY sex chromosomomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sex Dev* 4:176–185.

- De Lucca EJ (1974) Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia* 27:183–191.
- Formas RJ (1994) A Triploid Individual of the Chilean Leptodactylid Frog *Eupsophus vertebralis*. *J Herpetol* 28 (3):394–395.
- Frost DR (2013) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January, 2013). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Funk WC, Caldwell JP, Peden CE, Padial JM, De la Riva I, Cannatella DC (2007) Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog *Physalaemus petersi*. *Mol Phylogenet Evol* 44(2):825–837.
- Green D, Kesser J, Nussbaum R (1984) Triploidy in Hochstetter's frogs, *Leiopelma hochstetteri*, from New Zealand. *New Zealand J Zool* 11:457–460.
- Green DM, Sessions SK (1991) Nomenclature for chromosomes. In: Green DM and Sessions SK (eds) *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, pp 431–432.
- Gregory TR, Mable BK (2005) Polyploidy in animals. In: Gregory TR (ed) *The Evolution of the genome*. Elsevier, Amsterdam, Boston, Tokyo, pp 428–501.
- Gunther R, Uzzel T, Berger L (1979) Inheritance patterns in triploid *Rana "esculenta"* (Amphibia, Salientia). *Mitt Zool Mus Berlin* 55:35–57.
- Guerra MA, Ron SR (2008) Mate choice and courtship signal differentiation promotes speciation in an Amazonian frog. *Behav Ecol* 19:1128–1135.
- Haddad C, Pombal JPr, Batistic RF, (1994) Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). *J Herpetol* 28(8):425–430.
- Hillis DM, Green D (1990) Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *J Evol Biol* 3:49–64.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014–1015.
- IUCN (2011) The IUCN red list of threatened species. Version 2011.2. Electronic database accessible at <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 17 November 2011.

- Léon PE (1970) Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. *Rev Biol Trop* 17:119–124
- Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1999) Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). *Can J Zool* 77:624–631.
- King M (1980) C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80:191–217.
- Mahony MJ, Robinson ES (1980) Polyploidy in the Australian leptodactylid frog genus *Neobatrachus*. *Chromosoma* 81:199–212.
- Milani M, Cassini CS, Recco-Pimentel SM, Lourenço LB (2010) Karyotypic data detect interpopulational variation in *Physalemus olfersii* and the first case of supernumerary chromosome in the genus. *Animal Biology Journal* 2:25–33.
- Nascimento LB, Caramaschi U, Cruz CAG (2005) Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq Mus Nac Rio de Janeiro* 63:297–320.
- Nascimento J, Quinderé YRSD, Recco-Pimentel SM, Lima JRF, Lourenço LB (2010) Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). *Genetica* 138:1127–1132.
- Nishioka M, Miura I, Saitoh K (1993) Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanism. *Sci Rep Lab Amphibian Biol* 12:55–81.
- Ogata M, Hasegawa Y, Ohtani H, Mineyama M, Miura I (2008) The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog, *Rana rugosa*. *Heredity* 100:92–99
- Ptacek MB, Gerhardt HC, Sage RD (1994) Speciation by polyploidy in Treefrogs: Multiple Origins of the Tetraploid, *Hyla versicolor*. *Evolution* 48 (3):898–908.
- Quinderé YRSD, Lourenço LB, Andrade GV, Tomatis C, Baldo D, Recco-Pimentel SM (2009) Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing regions. *Biol Res* 42:79–92.

- Reed KM, Phillips RB (1997) Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. *Chromos Res* 5:221–227.
- Richards C, Nace GW (1977) The occurrence of diploid ova *Rana pipiens*. *J Hered* 68:307–313.
- Ron SR, Cannatella DC, Coloma LA (2004) Two new species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from western Ecuador. *Herpetologica* 60(2):261–275.
- Ron SR, Coloma LA, Cannatella DC (2005) A new, cryptic species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Western Ecuador with comments on the call structure of the *P. pustulosus* species group. *Herpetologica* 61(2):178–196.
- Ron SR, Santos JC, Cannatella DC (2006) Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Mol Phylogenet Evol* 39:392–402.
- Ron S (2008) The evolution of female mate choice for complex calls in túngara frogs. *Anim Behav* 76:1783–1794.
- Ron SR, Toral E, Rivera M, Terán-Valdez A (2010) A new species of *Engystomops* (Anura :Leiuiperidae) from southwestern Ecuador. *Zootaxa* 2606:25–49.
- Rosset SD, Baldo D, Lanzone C, Basso NG (2006) Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *J Herpetol* 40(4):465–477.
- Schmid M (1978) Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361–388.
- Schmid M, Olert J, Klett C (1979) Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma* 71:29–55.
- Schmid M, Haaf T, Geile B, Sims S (1983) Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 88:69–82.
- Schmid M, Ohta S, Steinlein C, Guttenbach M (1993) Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeria* (Anura, Rhacophoridae). *Cytogenet Cell Genet* 62:238–246.

- Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Rupprecht A, Haaf T, Kaise H (2002) Chromosome banding in Amphibia. XXIII. Giant W sex chromosomes and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Leptodactylidae). Cytogenet Genome Res 97:81–94.
- Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Visbal Garcia R, Fernández Badillo A (2003) Chromosome banding in Amphibia. XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). Cytogenet Genome Res 101:62–73.
- Schmid M, Steinlein C (2003) Chromosome banding in Amphibia. XXIX. The primitive XY/XX sex chromosomes of *Hyla femoralis* (Anura, Leiuperidae). Cytogenet Genome Res 101:74–79.
- Shreve B (1941) Notes on Ecuadorian and Peruvian reptiles and amphibians with description of new forms. Proc New Engl Zoo Club 18:71–84.
- Silva AP, Haddad CFB, Kasahara S (1999) Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hereditas 131:135–141.
- Silva APZ, Baldissera Jr FA (2000). Karyotypes and nucleolus organizer regions in four species of the genus *Physalaemus*, (Anura, Leptodactylidae). Ihering Ser Zool, 88:159–164.
- Siqueira S, Aguiar OJ, Strüssmann C, Del-Grande ML, Recco-Pimentel SM (2008) Chromosomal analysis of three Brazilian “eleutherodactyline” frogs (Anura: Terrarana), with suggestion of a new species. Zootaxa 1860:51–59.
- Stöck M, Lamatsch DK, Steinlein C, Epplen JT, Grosse WR, Hock R, Klapperstück T, Lampert KP, Scheer U, Schmid M, Scharl M (2002) A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. Nature Genetics, 30:325–328.
- Stöck M, Ustinova J, Lamatsch DK, Scharl M, Perrin N, Moritz C (2009) A vertebrate reproductive system involving three ploidy levels: hybrid origin of triploids in a contact zone of diploid and tetraploidpalearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup). Evolution 64(4):944–995.
- Targueta CP, Rivera M, Souza MB, Recco-Pimentel SM, Lourenço LB (2010) Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura,

- Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetics relationships. *Mol Phylogenet Evol* 54:709–725.
- Tomatis C, Baldo D, Kolenc F, Borteiro C (2009) Chromosomal variation in the species of the *Physalaemus henselii* group (Anura: Leiuperidae). *J Herpetol* 43(3):555–560.
- Viegas-Péquignot E. (1992) *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. (ed). *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford University Press-IRL Press, Oxford, pp137–158.
- Wiley JE, Braswell AL (1986) A Triploid Male *Rana palustris*. *Copeia* 2:531–533.
- Wiley JE (2003) Replication banding and FISH analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 101:80–83.

Figures

Figure 1

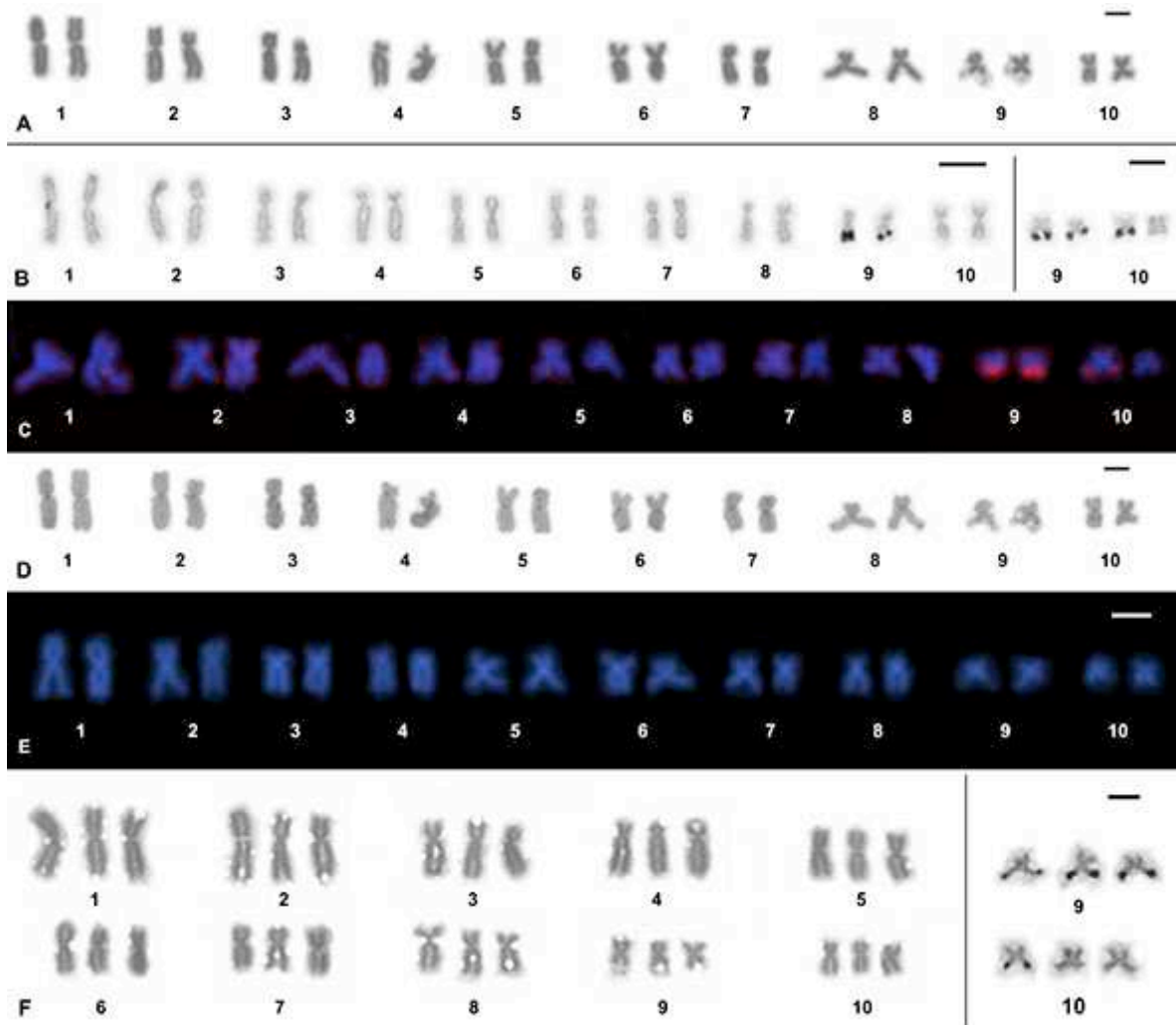


Figure 1. Male (A, B and E) and female (C and D) karyotype of *Engystomops coloradolum* arranged from (A) Giemsa-stained (QCAZ 47271), (B) Ag-stained (QCAZ 47270), (C) hybridized with 28S rDNA probe (QCAZ 48579), (D) C-banded (QCAZ 48579) and (E) DAPI-fluorescent (QCAZ 47271) chromosomes. In the inset in B, the NOR-bearing chromosome pairs No. 9 and 10 of QCAZ 48579 female *E. coloradolum*. In F, the Giemsa-stained karyotype of the triploid female (QCAZ 48578) *E. coloradolum*. In the inset in F, the Ag-stained NOR-bearing triplets No. 9 and 10. Bar = 4 μ m.

Figure 2

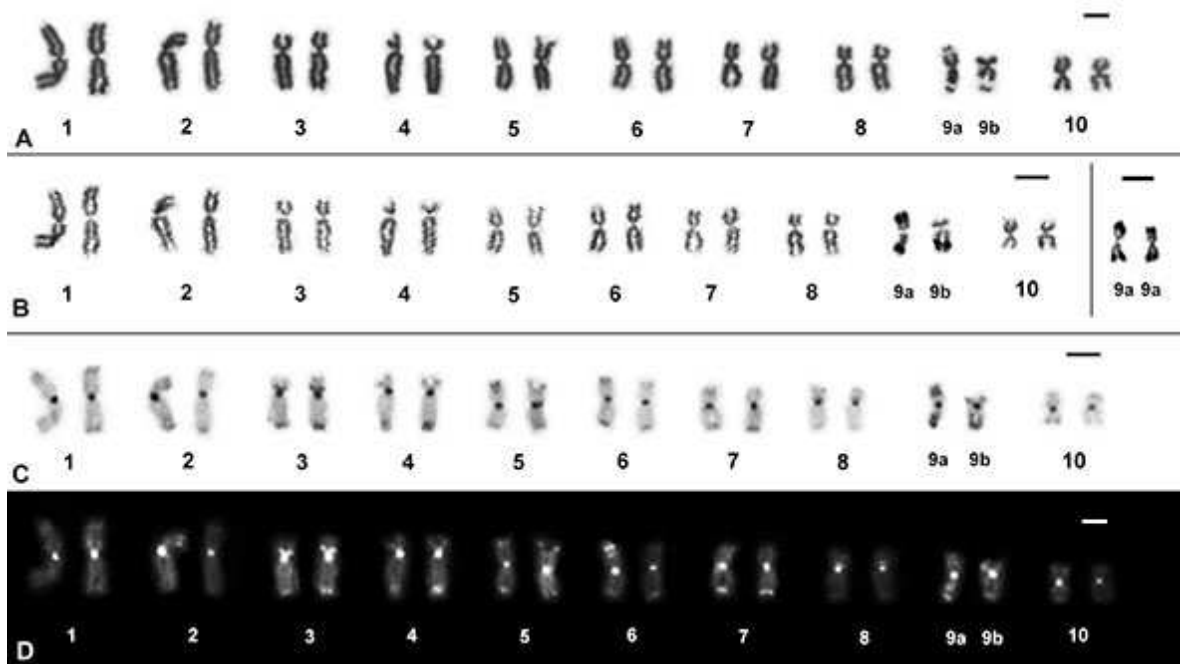


Figure 2. Karyotype of QCAZ 47232 male *Engystomops guayaco* arranged from (A) Giemsa-stained, (B) Ag-stained, (C) C-banded, and (D) DAPI-fluorescent chromosomes. In the inset in **B**, the homomorphic NOR-bearing chromosome pair No. 9, with a terminal NOR on the long arm (QCAZ 47230). Bar = 4 μ m.

Figure 3

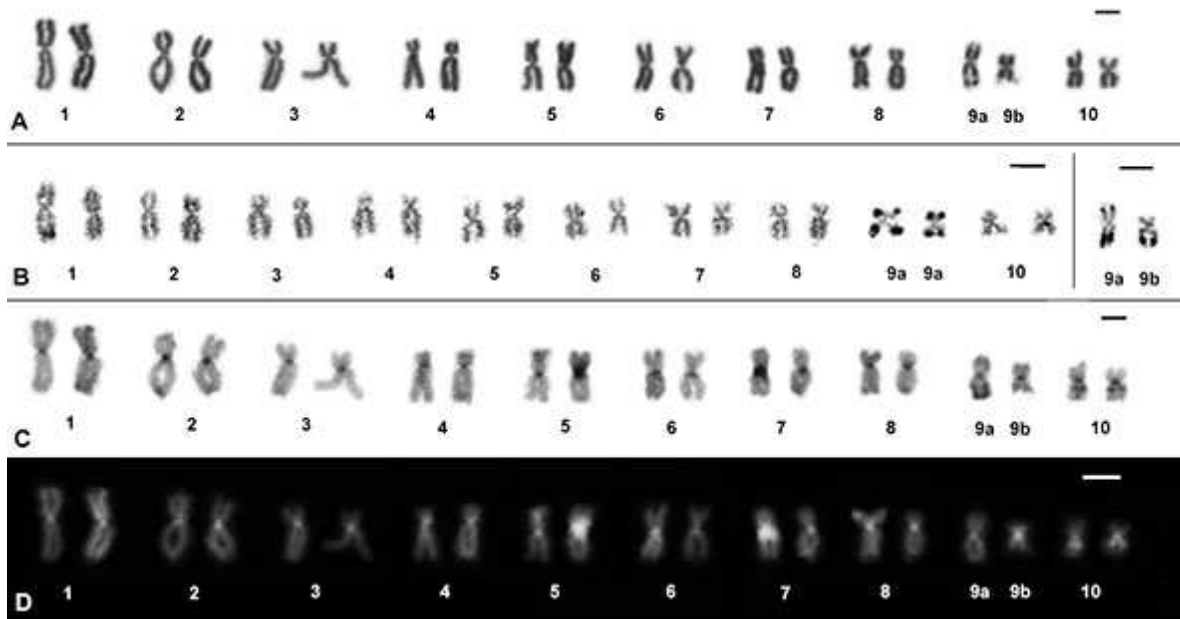


Figure 3. Karyotype of *Engystomops randi* arranged from (A) Giemsa-stained (QCAZ 47244), (B) Ag-stained (QCAZ 47245), (C) C-banded (QCAZ 47244), and (D) DAPI-fluorescent chromosomes (QCAZ 47244). In the inset in B, the heteromorphous NOR-bearing chromosome pair No. 9 (QCAZ 47238). Bar = 4 μ m.

Figure 4

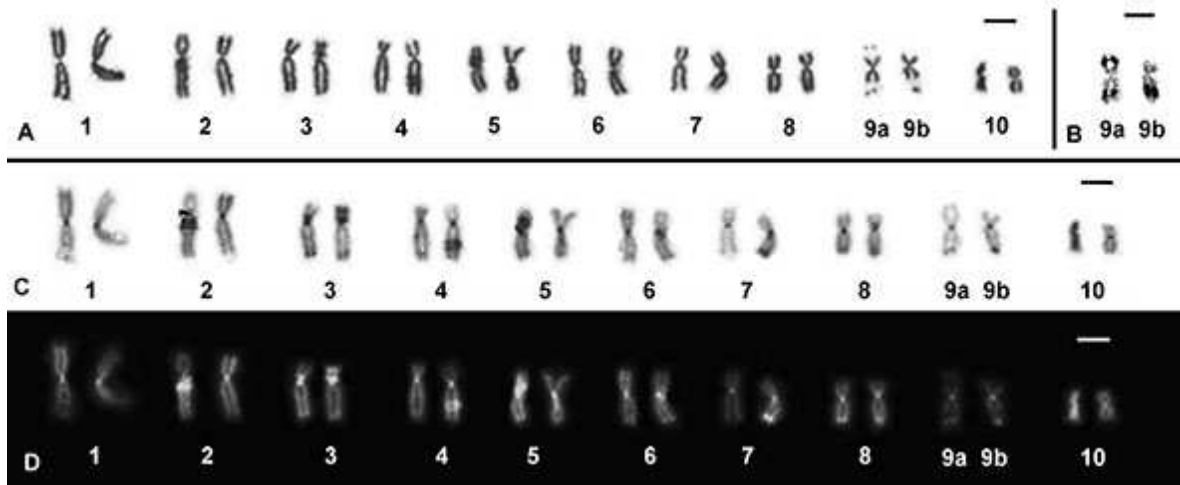


Figure 4. Karyotype of QCAZ 47257 male *Engystomops montubio* arranged from (A) Giemsa-stained, (B) NOR-bearing chromosome number 9 submitted to the Ag-NOR technique, (C) C-banded, and (D) DAPI-fluorescent chromosomes. Bar = 4 μm.

Figure 5

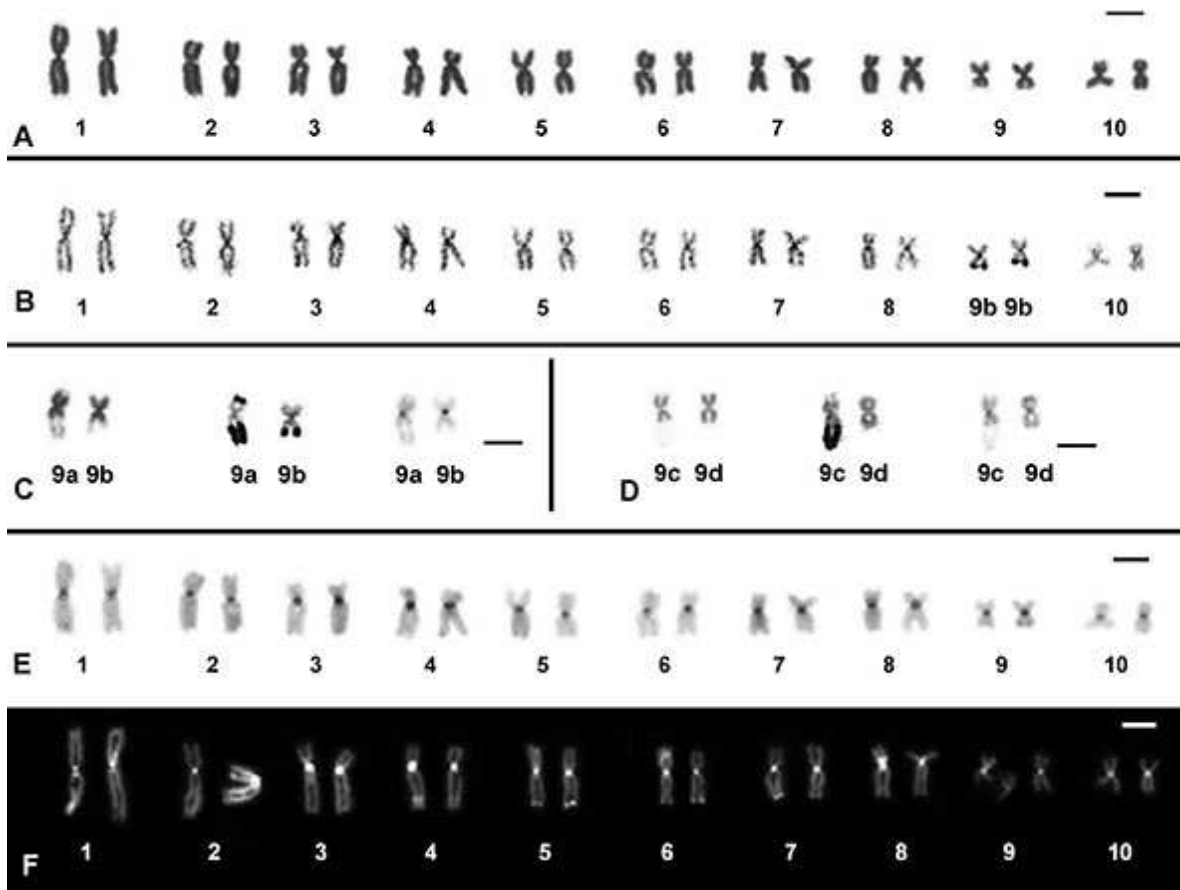


Figure 5. Karyotype of *Engystomops pustulatus* arranged from (A) Giemsa--stained (QCAZ 47250), (B) Ag-stained (QCAZ 47250), (E) C-banded (QCAZ 47250) and (F) DAPI-fluorescent (QCAZ 47263) chromosomes. In C-D, the Giemsa-stained (left), Ag-stained (middle) and C-banded (right) NOR-bearing chromosome pair No. 9 of the specimens QCAZ 47266 (C) and QCAZ 47263 (D). Bar = 4 μm.

Capítulo II

Estudo dos cromossomos sexuais de *Engystomops* (Anura; Leptodactylidae) por pintura cromossômica

Materiais e Métodos³

Espécimes

Foram utilizados seis espécimes machos de *E. freibergi* (ZUEC14443, ZUEC14440, ZUEC14450, ZUEC14454, ZUEC14456, ZUEC14465), coletados no Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (UFAC), Acre, Brasil, com a autorização do Ibama/SISBIO (Proc. 10678-2). Todos esses exemplares foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas Prof. Adão José Cardoso, Campinas, Brasil. Foram também utilizados um macho e três fêmeas de *E. petersi* (QCAZ34935, QCAZ34937, QCAZ34940, QCAZ34942), coletados na localidade de Puyo, Província de Pastaza, Equador, e um macho de *E. petersi* (QCAZ34947), procedente da Estación Científica Yasuní, Província de Orellana, Equador. Esses indivíduos foram depositados no Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Equador.

Preparações cromossômicas e análises citogenéticas

As preparações cromossômicas utilizadas foram geradas por Targueta e colaboradores (2010) e estavam disponíveis no banco de suspensões celulares do Laboratório de Estudos Cromossômicos, no Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp.

Para comparação e identificação dos cromossomos sexuais, as preparações cromossômicas foram tratadas segundo a técnica de bandamento C (King, 1980), modificada por Siqueira et al. (2008). Após bandamento C, as metáfases foram coradas com DAPI (0,5 µg/mL). Regiões organizadoras de nucléolo foram detectadas utilizando

³ Para detalhes sobre os métodos utilizados, ver Anexo I.

sondas de DNAr nucleolar HM123 (Meunier-Rotival et al., 1979) de acordo com a técnica descrita por Viégas-Péquignot (1992).

Microdissecção cromossômica

Suspensões celulares de indivíduos de *E. freibergi* (ZUEC14465 e ZUEC14454), fixadas em metanol: ácido acético (3:1), foram gotejadas em lamínulas recobertas por membrana de polietileno (PEN). As preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa 10% e os cromossomos X e Y foram isolados com o auxílio do sistema de micromanipulação a laser P.A.L.M. MicroBean da Zeiss. Paralelamente, também foi isolada a região do braço longo do cromossomo X que compreende grandes blocos heterocromáticos, que se estende da região adjacente à NOR até o telômero. Após a microdissecção, os tubos contendo material microdissecado foram mantidos a -20°C.

Amplificação do DNA de cromossomos microdissecados e obtenção das sondas

Após a microdissecção dos cromossomos, 9 µL de água foram colocados na tampa de cada tubo eppendorf utilizado para a coleta do material. Depois de 16 horas, os tubos foram centrifugados para a deposição do material cromossômico. Para a amplificação de segmentos de DNA ali presentes, foi utilizado o sistema GenomePlex Single Cell Amplification Kit WGA4 (Sigma-Aldrich), seguindo instruções do fabricante. O resultado da amplificação foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%. O produto amplificado (cerca de 40 ng/µL) foi purificado utilizando o sistema GeneJet PCR Purification Kit (Fermentas) e quantificado em NanoDrop. O DNA purificado foi reamplificado com o sistema GenomePlex Single Cell Reamplification Kit WGA3 (Sigma-

Aldrich), substituindo o mix de dNTP sugerido pelo fabricante por um mix composto por 10 mM de dATP, 10 mM de dCTP, 10 mM de dGTP, 6,5 mM de dTTP e 3,5 mM de dUTP-DIG (ou 3,5 mM de dUTP-biotina). As sondas obtidas foram quantificadas em NanoDrop e mantidas a -20°C até o uso.

As sondas construídas conforme descrito acima foram denominadas de pY, pXe e pXh, e foram derivadas, respectivamente, da microdissecção de 15 cromossomos Y, 15 cromossomos X e 15 braços longos do cromossomo X de *E. freibergi* (ZUEC14465 e ZUEC14454).

Para os ensaios de hibridação *in situ*, as sondas foram diluídas, de tal maneira que a mistura utilizada em cada área de hibridação apresentava volume final de 22 µL e continha sonda (cerca de 20 ng/µL), formamida (50%), dextran sulfato (10%), SSC (2X) e, como DNA competidor, fragmentos de DNA da espécie em estudo (cerca de 200 ng/µL). Os fragmentos de DNA usados como competidores da sonda apresentaram entre 75 pb e 500 pb, e foram obtidos após autoclavar, por 30 minutos a 1,4 atm/120°C, amostras de DNA genômico mantidas em NaCl 0,3 M.

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Suspensões celulares de *E. freibergi* foram gotejadas em lâminas e mantidas a -20°C por pelo menos uma noite. Para a desnaturação do DNA cromossômico, as lâminas foram mantidas em solução de formamida 70% a 72°C por 2 minutos. Em seguida, as preparações cromossômicas foram desidratadas em série alcoólica composta por soluções de metanol 70%, 90% e 100% em temperatura ambiente. As preparações cromossômicas foram mantidas em temperatura ambiente até a completa desnaturação das sondas.

As sondas foram desnaturadas a 72°C por 10 minutos e renaturadas a 37°C por 80 minutos. Depois dessa etapa, 22 µL de uma mistura contendo sonda (pY, pXe, pXh ou combinação 1:1 de sondas pY e pXe) (ver descrição da mistura no item anterior) foram gotejados nas preparações cromossômicas já desnaturadas. As lâminas foram mantidas a 37°C por uma noite.

Após esse período, as preparações cromossômicas expostas às sondas pY e pXe foram submetidas a dois banhos consecutivos de 5 minutos em solução de formamida 50%, a 42°C. Depois foram lavadas em 0,4X SSC à temperatura ambiente (3 banhos com duração de 5 minutos). Já as preparações cromossômicas expostas à sonda pXh foram lavadas em solução de formamida 50% a 37°C por 5 minutos e, em seguida, em 2X SSC. Todas as preparações cromossômicas foram, então, colocadas em solução de PBT [PBS pH 7,4 (NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 3 mM), BSA 8,33%, Tween 20 0,1%] por 5 minutos. Para detecção das sondas, o material foi exposto a uma solução de PBT contendo o anticorpo anti-digoxigenina (Roche) (1:200) ou anti-biotina (Roche) (3:500), por 60 minutos. As preparações cromossômicas foram lavadas em PBT (3 banhos com duração de 5 minutos), cobertas com solução de DAPI 0,5 µg/mL em Vectashield (Vector), visualizadas em microscópio de fluorescência Olympus e fotografadas. As imagens foram editadas no programa Adobe Photoshop.

Para comparação das marcações das sondas pXe e pXh, as mesmas preparações cromossômicas foram submetidas a ensaios de hibridação *in situ* sequenciais. Primeiramente, foi realizado o experimento com a sonda pXe como descrito acima. Após a detecção e captura das imagens, as preparações cromossômicas foram tratadas para remoção das sondas. Para tal procedimento, as preparações foram lavadas em água

corrente, incubadas em solução de formamida 70% a 70°C por 2 minutos, lavadas em 2X SSC gelado por 2 minutos e desidratadas em série alcoólica composta por soluções de etanol 70%, 85% e 100%. As preparações foram então submetidas à hibridação com a sonda pXh, seguindo os mesmos passos acima descritos.

FISH interespecífica

As sondas obtidas a partir dos cromossomos X (pXe e pXh) e Y (pY) de *E. freibergi* foram hibridadas em metáfases mitóticas e meióticas de exemplares de *E. petersi* provenientes de Puyo e de Yasuní. Para tanto, os mesmos protocolos descritos nos itens anteriores foram testados, aumentando o tempo de incubação com as sondas para três dias e procedendo a lavagem para a remoção do excesso de sonda em formamida 50% a 37°C.

Resultados

A sonda produzida a partir da microdissecção de cromossomos Y de *E. freibergi* (pY) detectou, em metáfases dessa espécie, todo o cromossomo Y, conforme esperado. No entanto, essa sonda hibridou também com um pequeno segmento do cromossomo X, que incluiu uma região do braço curto, o centrômero e uma região pericentromérica do braço longo desse cromossomo (Figura 1A).

Já a sonda pXe, produzida a partir de cromossomos X de *E. freibergi*, não foi eficiente na detecção desse cromossomo em experimentos de hibridação *in situ*. Em metáfases mitóticas de *E. freibergi*, a sonda pXe detectou apenas uma região do braço curto, a região centromérica, a região pericentromérica do braço longo do X (Figura 1B). Em algumas metáfases, essa sonda também detectou fracamente a região centromérica do

cromossomo Y e a região centromérica de alguns autossomos. No entanto, em nenhum dos experimentos realizados com a sonda pXe foi possível detectar a maior parte do braço longo do cromossomo X (Figura 1B e 2D). Já a sonda pXh, produzida a partir da microdissecção do braço longo desse cromossomo, evidenciou claramente o grande bloco heterocromático DAPI positivo presente em Xq (Figuras 1C e 2C). Dessa forma, a combinação das sondas pXe e pXh acarretou a detecção quase total do cromossomo X (Figuras 2).

Foi interessante observar, em preparações meióticas de *E. freibergi*, que a região cromossômica do X detectada pela sonda pY e a do Y detectada pela sonda pXe estão próximas à região do quiasma que une os braços curtos dos cromossomos X e Y (Figura 3G).

Quando as sondas construídas a partir de *E. freibergi* foram utilizadas na hibridação *in situ* em preparações cromossômicas da espécie-irmã, *E. petersi*, não foi possível detectar nenhum cromossomo inteiro. As sondas pY e pXh não evidenciaram nenhuma região de qualquer par cromossômico de *E. petersi* (dados não mostrados). No entanto, a sonda pXe evidenciou as regiões centroméricas da maioria dos cromossomos autossômicos tanto nas preparações de espécimes de *E. petersi* de Puyo, quanto nas de espécimes de Yasuní (Figura 4). Nas preparações cromossômicas de *E. petersi* de Puyo, foi possível observar um sinal mais acentuado de hibridação da sonda pXe na região centromérica do cromossomo X. É interessante destacar que o cromossomo 11 dos espécimes de Yasuní, considerado possivelmente homeólogo ao cromossomo X dos espécimes de Puyo (ver Targueta et al., 2010), não mostrou sinais evidentes da hibridação da sonda pXe além daquele observado na região centromérica, também presente em outros cromossomos do cariótipo (Figura 4).

Discussão

Os dados acima descritos mostram que tanto a sonda pXe quanto a pY marcaram regiões presentes em ambos os cromossomos sexuais de *E. freibergi*. Esse resultado pode ser uma evidência de que os cromossomos X e Y dessa espécie ainda compartilham sequências similares. Em análises de metáfases meióticas, foi possível observar que a região do cromossomo X detectada pela sonda pY e a região do cromossomo Y detectada pela sonda do X estão próximas à região do quiasma e, portanto, é possível que estejam envolvidas no emparelhamento desses cromossomos sexuais. Tais características permitem classificar tais regiões como pseudo-autossômicas, já que, segundo a definição de Burgoyne (1982), regiões pseudo-autossômicas são segmentos dos cromossomos sexuais que apresentam similaridade entre si e são responsáveis pelo pareamento durante a meiose dos cromossomos homólogos mesmo no sexo heterogamético.

Enquanto os resultados utilizando as sondas pXe e pY de *E. freibergi* apresentaram evidências de possíveis regiões pseudoautossomais, a sonda pXh foi específica para a região heterocromática do braço longo do cromossomo X, que também é fortemente corada com DAPI. Essa é uma região bastante diferenciada em relação ao cromossomo Y, que não apresenta nenhuma região heterocromática intersticial (Figura 3). É possível que, ao longo da evolução desses cromossomos sexuais, essa região heterocromática exclusiva do cromossomo X tenha exercido importante papel na redução da recombinação entre os homólogos.

Durante a evolução e diferenciação dos cromossomos sexuais, os primeiros passos envolvem a aquisição de genes determinantes sexuais em um dos cromossomos, seguido do suprimento da recombinação entre os genes envolvidos na determinação sexual presentes

nos cromossomos homólogos (Charlesworth, 1991; Charlesworth et al., 2005). A heterocromatinização é apontada como uma das causas ou consequências da supressão da recombinação durante a diferenciação dos cromossomos sexuais (Bull, 1983; Charlesworth, 1991, Kejnovsky et al., 2009). Na maioria dos casos, o acúmulo de heterocromatina ocorre no cromossomo exclusivo do sexo heterogamético (W e Y) (exemplos em Ray-Chaudhuri et al., 1971; Singh et al., 1980; Green, 1988b; Chakrabarti et al., 1983; Schmid et al., 1983; Mahony, 1991; Schmid et al., 2002a; Ananias et al., 2004; Busin et al., 2008; Siripiyansing et al., 2008; Vicari et al., 2008; Nascimento et al., 2010) e está ligado à degeneração/diferenciação desses cromossomos (Schemberger et al., 2011; Schmid, 1980). No entanto, há estudos que demonstram a presença da região rica em heterocromatina no X e no Z (em anfíbios, exemplos em Miura, 1994; Sumida, 1997; Cuevas e Formas, 1996; Schmid et al., 1993).

O acúmulo de sequências repetitivas em regiões heterocromáticas de cromossomos X já foi identificado em alguns organismos, como nos peixes *Hoplias malabaricus* (Cioffi et al., 2010) e espécies de *Eigenmannia* (Henning et al., 2011), em que o estudo das sequências repetitivas ali presentes foi detalhado por técnicas de citogenética molecular. Cioffi e colaboradores (2010) propõem que a ausência de recombinação entre os cromossomos X e Y de *H. malabaricus*, provavelmente causada pelo acúmulo de sequências repetitivas de diferentes classes, poderia ter levado ao acúmulo de mutações em um dos cromossomos, o que explicaria a não observação, no cromossomo Y, de uma região de DNAr 18S presente no cromossomo X.

Como em *H. malabaricus*, em *E. freibergi*, o cromossomo X é portador de uma NOR pericentromérica na maioria dos espécimes, enquanto nenhuma NOR

pericentromérica foi encontrada no cromossomo Y de diversos indivíduos dessa espécie. É possível, portanto, que o mesmo processo sugerido para *H. malabaricus* possa explicar o heteromorfismo observado em relação à NOR nos cromossomos sexuais de *E. freibergi*. No entanto, não descartamos a possibilidade de que o heteromorfismo de NOR tenha exercido importante papel nas etapas iniciais da diferenciação dos cromossomos sexuais de *E. freibergi*, assim como já evidenciado para algumas espécies de salmonídeos e caracídeos (Reed e Phillips, 1997; Artoni e Bertollo, 2002).

Além de auxiliar na análise das similaridades e diferenças dos cromossomos sexuais de *E. freibergi*, a hibridação das sondas pXe, pXh e pY em preparações cromossômicas de *E. petersi* falhou na detecção de similaridades entre os cromossomos sexuais dessas espécies. Algumas diferenças entre o cromossomo X de *E. freibergi* e o de espécimes de *E. petersi* de Puyo já tinham sido notadas, como a presença de uma banda heterocromática intersticial somente no cromossomo X de *E. freibergi* (Targueta et al., 2010). Já os machos de *E. petersi* de Yasuní apresentam, compondo o par 11 do cariótipo, cromossomos homomórficos semelhantes ao cromossomo X dos indivíduos de Puyo (Targueta et al., 2010).

Com as análises utilizando a sonda pXe, foi possível observar, no cromossomo X de *E. petersi* de Puyo, uma marcação mais acentuada do que aquelas encontradas nos centrômeros dos autossomos, indicando que essa região possa apresentar maior similaridade com o cromossomo X de *E. freibergi*. A mesma diferença de intensidade não foi observada entre os sinais de hibridação da sonda pXe encontrados nos cromossomos do par 11 de *E. petersi* de Yasuní (cromossomo hipoteticamente homeólogo ao cromossomo X dos espécimes de Puyo) e aqueles observados nos demais cromossomos desse cariótipo.

Portanto, é possível que haja maior similaridade entre o cromossomo X de *E. petersi* de Puyo e o cromossomo X de *E. freibergi* do que entre o cromossomo X de *E. petersi* de Yasuní e o de *E. freibergi*.

Além dessa relação, o resultado da hibridação *in situ* com a sonda pXh permitiu observar que os blocos heterocromáticos do braço longo do cromossomo X de *E. freibergi* e os de *E. petersi* diferem não apenas quanto à localização e tamanho, mas também em relação à composição molecular (seja em relação ao tipo de sequência ali presentes ou à quantidade de repetições destas). Portanto, o acúmulo de sequências heterocromáticas nos cromossomos X das duas espécies parece ter ocorrido independentemente. A ausência de sinais de hibridação da sonda pY no cromossomo Y de *E. petersi* (de Puyo) também pode ser explicada pela origem independente desses cromossomos a partir de cromossomos autossomos ancestrais. Por outro lado, o alto grau de diferenciação dos cromossomos X e Y das espécies em questão pode também ter sido resultado do grande tempo de divergência das espécies. Dessa forma, embora os resultados aqui apresentados não evidenciem que os cromossomos sexuais de *E. petersi* (de Puyo) e de *E. freibergi* tenham compartilhado a mesma história evolutiva, outros estudos ainda são necessários para elucidar se algumas etapas da divergência desses cromossomos ocorreu ou não no ancestral comum dessas espécies.

Figuras

Figura 1

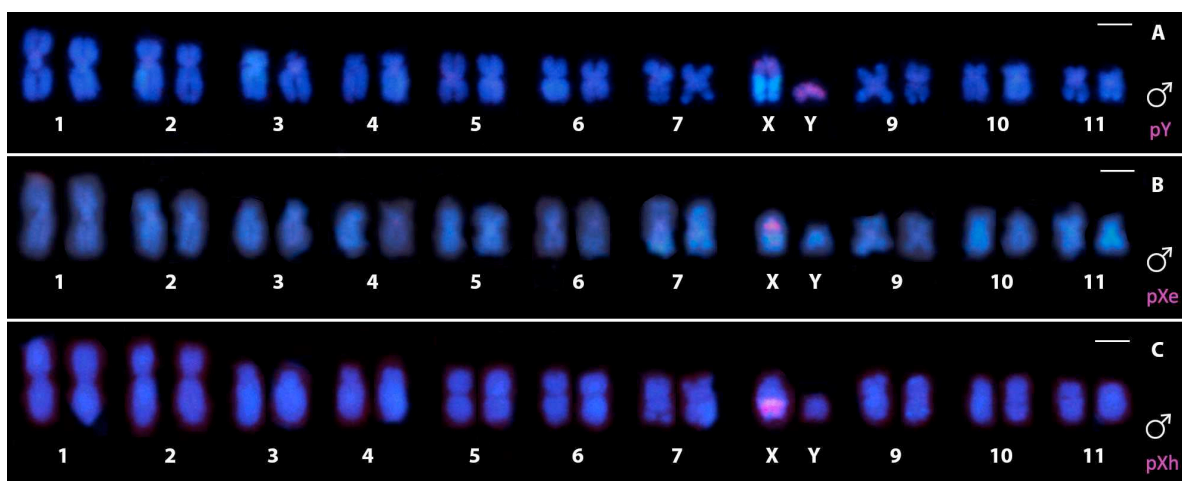


Figura 1. Hibridação das sondas pY (A), pXe (B) e pXh (C) no cariótipo de *Engystomops freibergi*. Barra 4 μm.

Figura 2

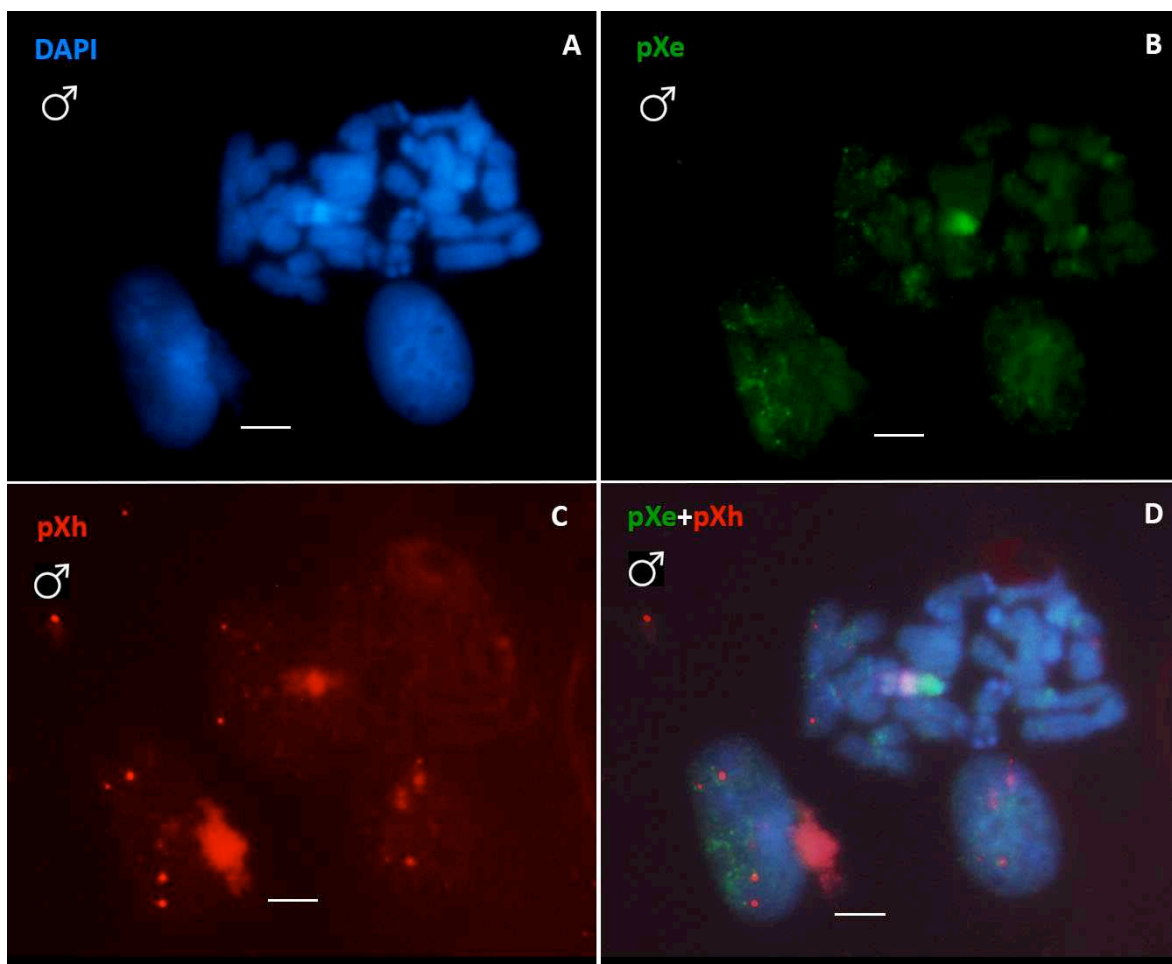


Figura 2. Metáfase mitótica de *E. freibergi* hibridada com as sondas pXe e pXh. A. Metáfase corada com DAPI. B. Sinal da sonda pXe. C. Sinal da sonda pXh. D. Sobreposição dos sinais das sondas pXe (verde) e pXh (vermelho). Note que as regiões detectadas pela sonda pXh são blocos heterocromáticos DAPI-positivos. Barra 4 μm .

Figura 3

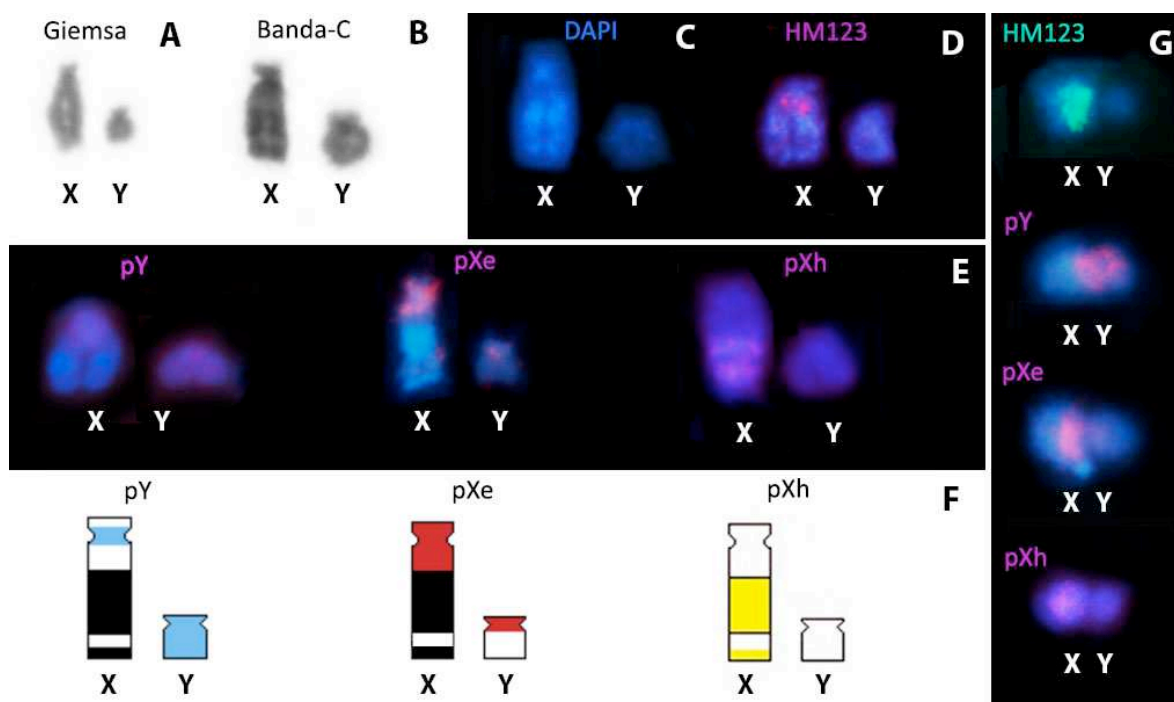


Figura 3. Comparação entre os cromossomos X e Y de *Engystomops freibergeri*. A. Cromossomos mitóticos corados com Giemsa. B. Cromossomos mitóticos submetidos à técnica de Bandamento C. C. Cromossomos mitóticos corados por DAPI após bandamento C. D. Cromossomos mitóticos hibridados com a sonda HM123. E. Cromossomos mitóticos submetidos à hibridação com as sondas pY(esquerda), pXe (centro) e pXh (direita). F. Esquema demonstrando as regiões de hibridação das sondas produzidas nesse trabalho. A cor azul identifica as regiões de hibridação da sonda pY, a cor vermelha, as regiões de hibridação da sonda pXe e a cor amarela, as regiões de hibridação da sonda pXh. Em preto estão indicadas as regiões evidenciadas pela técnica de Bandamento C. G. Anéis meióticos hibridados com as sondas HM123 , pY, pXe e pXh.

Figura 4

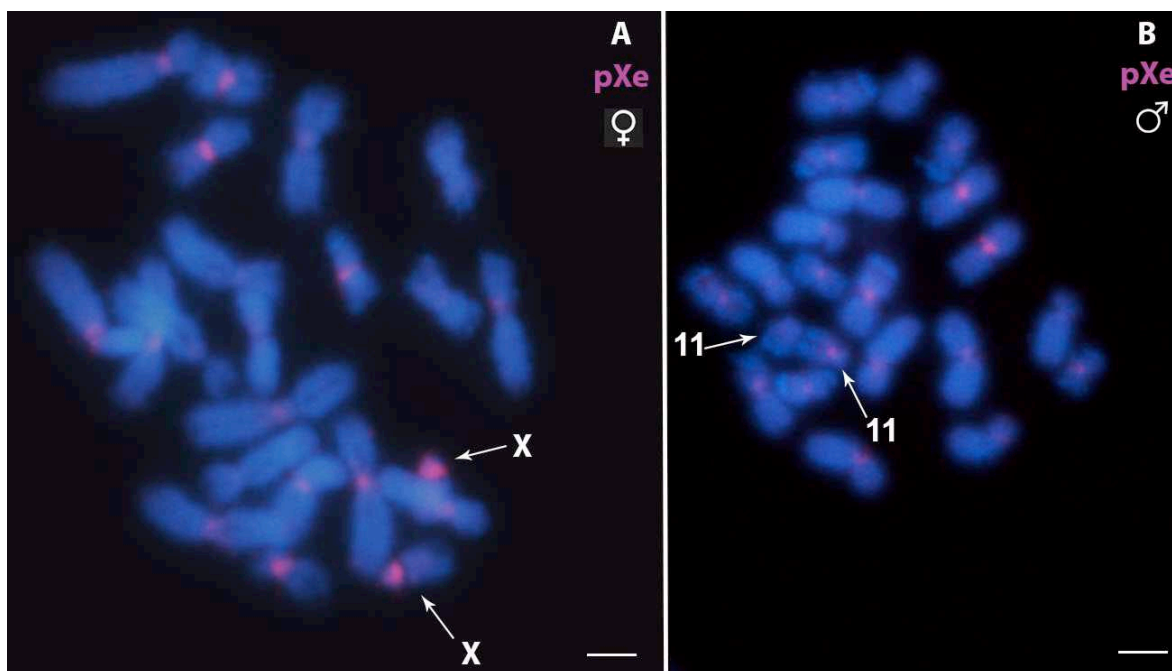


Figura 4. Hibridação da sonda pXe nos kariótipos de indivíduos de *E. petersi* de Puyo (Equador) (A) e de Yasuní (Equador) (B). Os cromossomos X do indivíduo de Puyo e os cromossomos 11 do indivíduo de Yasuní estão apontados. Barra 4 μ m.

Capítulo III

Localização de sequências de DNA satélite PcP190EcoRI e de DNAr 5S nos cromossomos das espécies do gênero *Engystomops*

Materiais e Métodos⁴

Espécimes

As amostras de tecidos e de suspensões celulares utilizadas, respectivamente, para a extração de DNA genômico e a obtenção de preparações cromossômicas, tanto de *E. freibergi* e quanto de *E. petersi*, foram as mesmas produzidas por Targueta et al. (2010) e Targueta et al. (2011), disponíveis no Laboratório de Estudos Cromossômicos, do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os vouchers estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas Prof. Adão José Cardoso, Campinas, Brasil (ZUEC) e no Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Equador (QCAZ).

Para o isolamento do DNAr 5S foram utilizadas amostras de suspensões celulares de indivíduos das seguintes espécies do clado Duovox: *E. coloradum* (QCAZ47273), *E. randi* (QCAZ47237), *E. guayaco* (QCAZ47230) e *E. pustulatus* (QCAZ47251).

Para análise da localização cromossômica das sequências de DNAr 5S e PcP190EcoRI foram utilizadas preparações cromossômicas de *E. coloradum* (QCAZ47270, QCAZ47270, QCAZ48577, QCAZ47271, QCAZ47273, QCAZ47275), *E. pustulatus* (QCAZ47249, QCAZ47253, QCAZ47263, QCAZ47266), *E. randi* (QCAZ47236, QCAZ47244, QCAZ47245), *E. guayaco* (QCAZ47230, QCAZ47232, QCAZ47233), *E. montubio* (QCAZ47257), *E. freibergi* (ZUEC14440, ZUEC14450, ZUEC14452, ZUEC14454) e *E. petersi* da localidade de Puyo (QCAZ34934, QCAZ34935, QCAZ34937, QCAZ34942) e Yasuní (QCAZ34946, QCAZ34947).

⁴ Para detalhes sobre os métodos utilizados, ver Anexo I.

Obtenção de DNA genômico a partir de suspensões celulares

Para o isolamento de sequências de DNAr das espécies do gênero *Engystomops* pertencentes ao clado Duovox foram primeiramente obtidas amostras de DNA genômico a partir de suspensões celulares fixadas em metanol:ácido acético (3:1). O fixador das suspensões celulares foi substituído por tampão Tris-EDTA pH 8,0 e, em seguida, foi realizada a extração de DNA segundo Bruschi et al. (2012). A integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 0,8%.

Isolamento de cromossomos por microdissecção a laser

Suspensões celulares de um indivíduo de *E. freibergi* (ZUEC14465), fixadas em metanol: ácido acético (3:1), foram gotejadas em lamínulas recobertas por membrana de polietileno (PEN). O material foi corado com Giemsa 10% e os experimentos de microdissecção de cromossomos do par 3 foram realizados com o auxílio do micromanipulador a laser P.A.L.M. MicroBean da Zeiss. Após a microdissecção, os tubos contendo os cromossomos foram mantidos a -20°C.

Isolamento de sequências de DNAr 5S de espécies do clado Duovox

A unidade repetitiva inteira do DNAr 5S foi isolada de amostras de DNA genômico utilizando os primers 5S-A e 5S-B (Pendás et al., 1994) (Figura 1). Os fragmentos obtidos foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega). Os fragmentos foram então clonados como descrito no item Clonagem e Sequenciamento.

Isolamento de sequências de *E. freibergi* pertencentes à família de DNA satélite PcP190EcoRI

O isolamento de sequências da família de DNA satélite PcP190EcoRI derivada do DNAr 5S descrita por Vittorazzi e colaboradores (2011) foi feita por PCR a partir de cópias do cromossomo 3 microdissecadas de *E. freibergi* (ZUEC14465), com o emprego dos primers P190F e P190R (Vittorazzi et al., 2011). A escolha dessa estratégia se baseou em estudos paralelos realizados em nosso grupo de pesquisa, que detectaram, com sondas derivadas de sequências PcP190EcoRI de *P. cuvieri*, a região pericentromérica do cromossomo 3 de *E. freibergi*. Considerando que essa região é também o sítio cromossômico de DNAr 5S do tipo I (Rodrigues et al., 2012) e que há grande similaridade entre as sequências PcP190EcoRI e de DNAr 5S do tipo I, o isolamento de sequências PcP190EcoRI de cópias do cromossomo 3 microdissecadas é importante estratégia para a comprovação da presença desse tipo de sequência no cromossomo em questão.

Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos isolados por PCR foram clonados em plasmídeos pGEM-T (pGEM-T easy Vector – Promega) de acordo com instruções do fabricante. Os vetores recombinantes foram utilizados para a transformação de bactérias *E.coli* da linhagem JM 109, com o auxílio do sistema TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific). As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB na presença de ampicilina (100 µg/mL de meio), X-gal (4 µg/mL de meio) e IPTG (0,1 mM). Colônias brancas de bactérias foram selecionadas e plaqueadas em novo meio sólido, contendo ampicilina (100 µg/mL de meio). Amostras de cada colônia foram utilizadas para a

extração de DNA plasmidial, segundo o método de mini-prep descrito por Sambrook et al. (1989). As amostras foram amplificadas com os primers T7 e SP6, e purificadas com kit de purificação Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega). O DNA purificado foi usado como molde em reações de sequenciamento com BigDye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystem). As sequências obtidas foram analisadas no programa BioEdit versão 7.0.1 e comparadas com sequências depositadas no GenBank.

Hibridação *in situ* Fluorescente

Sondas foram produzidas a partir da amplificação por PCR, na presença de dUTP marcado com digoxigenina (Roche), de sequências de DNAr 5S de 650 pb isoladas de *E. coloradorum* e de sequências da família de DNA satélite PcP190EcoRI isoladas de *E. freibergi*. A sonda de DNAr 5S foi hibridada em preparações cromossômicas de *E. coloradorum*, *E. pustulatus*, *E. randi* e *E. montubio*. A sonda do DNA satélite PcP190EcoRI foi hibridada em preparações cromossômicas de *E. coloradorum*, *E. pustulatus*, *E. randi*, *E. montubio*, *E. guayaco*, *E. petersi* e *E. freibergi*. As reações de hibridação foram realizadas segundo descrito em Viegas-Péquignot (1992) e a detecção das sondas marcadas com digoxigenina foi realizada com anticorpo anti-digoxigenina acoplado a rodamina (Roche). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0,5 µg/mL). As metáfases foram visualizadas em microscópio Olympus e analisadas nos programas Image Pro Plus versão 4.5.0.19 e Adobe Photoshop.

Para a análise comparativa da localização das sondas de DNAr 5S de 650 pb e do DNA satélite PcP190EcoRI foram realizados ensaios sequenciais de hibridação *in situ* nas mesmas preparações cromossômicas. Primeiramente, foi realizado o experimento com a

sonda de DNAr 5S de 650 pb como descrito acima. Após a detecção e captura das imagens, as preparações cromossômicas foram tratadas para remoção das sondas. Para tal procedimento, as preparações foram lavadas em água corrente, incubadas em solução de formamida 70% a 70°C por 2 minutos, lavadas em 2X SSC gelado por 2 minutos e desidratadas em série alcoólica composta por soluções de etanol 70%, 85% e 100%. As preparações cromossômicas foram, então, hibridadas com a sonda de DNA satélite PcP190EcoRI. Novas imagens foram capturadas e o sinal em verde da sonda do DNA satélite PcP190EcoRI foi alterado artificialmente antes da sobreposição dessas imagens com aquelas resultantes da hibridação com a sonda de DNAr 5S.

Resultados

Análise das sequências de DNAr 5S das espécies de *Engystomops* do clado Duovox

Clones recombinantes contendo insertos de aproximadamente 700 pb, correspondentes a unidades repetitivas de DNAr 5S isoladas por PCR com os primers 5S-A e 5S-B, foram obtidos para todas as espécies de *Engystomops* do clado Duovox, *E. coloradorum*, *E. randi*, *E. guayaco* e *E. pustulatus* (Figura 2). Uma pequena variação de tamanho foi observada entre os fragmentos clonados, resultante exclusivamente de diferenças nas sequências de NTS, as quais apresentaram tamanhos variando entre 527 pb e 560 pb (Figura 2).

As sequências de aproximadamente 700 pb das quatro espécies do clado Duovox apresentaram cerca de 88% de similaridade entre si. Quando as regiões que possivelmente transcrevem o RNAr 5S de cada espécie foram comparadas (120 pb), estas apresentaram

maior similaridade, sendo que entre as sequências de *E. randi* e *E. guayaco* foi possível notar 100% de similaridade entre elas. Ao contrário, a região de NTS mostrou maior variação, apresentando cerca de 88,3% de similaridade entre as espécies em questão.

Quando comparadas com as sequências repetitivas do DNAr 5S do tipo II de *E. petersi* e *E. freibergi* (descritas por Rodrigues et al., 2012), as sequências de cerca de 700 pb isoladas das espécies do clado Duovox apresentaram aproximadamente 70% de similaridade. Se consideradas apenas as regiões de 120 pb possivelmente transcritoras de RNAr 5S, a similaridade entre as sequências em questão foi de cerca de 93%.

Além dos insertos acima descritos, foi também clonado um fragmento de 201 pb, isolado de *E. coloradum*. A diferença de tamanho entre esse inserto e as demais sequências é devido à região do NTS, que nesse caso é de apenas 82 pb (Figura 3). A comparação entre essa sequência de 201 pb e as unidades repetitivas do DNAr 5S do tipo I isoladas de *E. petersi* e *E. freibergi* (descritas por Rodrigues et al., 2012) mostrou cerca de 99% de similaridade.

Devido à diferença de tamanho e composição nucleotídica do NTS, o inserto menor e os insertos maiores foram denominados de DNAr 5S tipo I e DNAr 5S tipo II, respectivamente.

Tanto na unidade repetitiva do DNAr 5S do tipo I quanto na sequência do DNAr 5S do tipo II, foi possível identificar regiões possivelmente envolvidas na regulação da transcrição. Nas duas classes de sequências foi possível identificar uma região rica em T entre as posições -119 e -130 (Figuras 2 e 3), que pode corresponder à sequência poli-T de terminação da transcrição originalmente descrita por Korn e Brown (1978). Dentro da região transcritora foi possível localizar o Box-A, o elemento intermediário e o Box-C,

previamente descritos para as sequências de DNAr 5S de *Xenopus* (Pieler et al., 1987) (Figuras 2 e 3). No NTS da unidade repetitiva de DNAr 5S do tipo I isolada de *E. coloradorum* foi ainda possível encontrar uma região de TATA-Box na posição -26 (Figura 3).

Localização do DNAr 5S do tipo II nos cariótipos das espécies de *Engystomops* do clado Duovox

As sondas constituídas de DNAr 5S do tipo II foram mapeadas em uma região distal do braço longo do cromossomo 6 de *E. coloradorum* (Figura 4A), *E. randi* (Figura 4B) e *E. montubio* (dados não mostrados). No cariótipo de *E. pustulatus*, a região detectada pela sonda de DNAr 5S do tipo II está localizada intersticialmente no braço longo do cromossomo 6 (Figura 4C).

Nos ensaios de hibridação *in situ* realizados em preparações cromossômicas de *E. coloradorum*, que utilizaram como sonda a sequência de DNAr 5S do tipo I isolada dessa espécie, não foi possível localizar nenhuma região cromossômica.

Análise de sequências de *E. freibergi* isoladas com os primers PcP190EcoRI

A amplificação, utilizando os primers PcP190, de segmentos de DNA contidos em amostras de cromossomos 3 de *E. freibergi* microdissecados geraram fragmentos de 156 pb. A análise da composição nucleotídica de quatro fragmentos clonados mostrou cerca de 97% de similaridade entre eles. A sequência em questão apresentou 90% de similaridade com as sequências pertencentes à família de DNA satélite PcP190EcoRI descritas por Vittorazzi e colaboradores (2011) (Figura 5). Quando comparada com as unidades

repetitivas inteiras do DNAr 5S do tipo I e do tipo II de *E. freibergi* (Rodrigues et al., 2012), a sequência PcP190EcoRI isolada de *E. freibergi* apresentou 56% e 55% de similaridade, respectivamente.

Localização cromossômica das sequências PcP190EcoRI nos cariótipos das espécies de *Engystomops* dos clados Duovox e Edentulus

No cariótipo de *E. freibergi* a sequência PcP190EcoRI foi mapeada no braço curto do cromossomo 3 (Figura 6A). Em algumas metáfases dessa espécie, foi possível observar que a marcação se estendia ao braço longo do cromossomo 3, porém os sinais presentes no braço longo desse cromossomo eram mais dispersos.

As hibridações realizadas nos cariótipos de espécimes de *E. petersi* das localidades de Puyo e Yasuní mostraram o acúmulo de sequências de DNA satélite PcP190EcoRI na região proximal do braço curto do cromossomo 3 e do cromossomo 5, respectivamente, além de duas regiões pontualmente localizadas na região intersticial no braço longo desses cromossomos (Figuras 6B e 6C).

A localização cromossômica das sequências PcP190EcoRI variou entre as espécies pertencentes ao clado Duovox (Figura 6). Nos cariótipos de *E. montubio*, *E. randi* e *E. guayaco*, a sonda detectou a região pericentromérica dos dois braços do cromossomo 3 (Figura 6D). Nos cariótipos de *E. randi* e de *E. guayaco*, a sonda PcP190EcoRI também detectou uma região pericentromérica do braço longo do cromossomo 5 (Figuras 6E e 6F). No cariótipo de *E. coloradum*, somente uma região pericentromérica do braço longo do cromossomo 5 foi evidenciada pela sonda em questão (Figura 6G).

No cariótipo da espécie *E. pustulatus* foi possível detectar 3 pares de cromossomos

portadores de sequências PcP190EcoRI. As regiões detectadas estavam localizadas na região pericentromérica de ambos os braços dos cromossomos do par 1, na região pericentromérica do braço curto dos cromossomos do par 3 e na região pericentromérica do braço longo dos cromossomos do par 4 (Figura 6H).

Mapeamento simultâneo das sondas de DNAr 5S do tipo II e PcP190EcoRI

A hibridação *in situ*, em uma mesma metáfase de *E. randi*, das sondas de DNAr 5S do tipo II e PcP190EcoRI permitiu observar que os sítios de hibridação dessas sondas não são os mesmos, embora ambas hibridem em cromossomos metacêntricos de tamanho médio (Figura 7). Com base nessa informação e nos resultados acima descritos, ideogramas representativos dos cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S do tipo I e do tipo II, e de sequências PcP190EcoRI das espécies de *Engystomops* do clado Duovox foram construídos e apresentados na Figura 8, que também sumariza os dados relativos ao clado Edentulus.

Discussão

A semelhança entre as sequências de DNAr 5S de cerca de 700 pb obtidas das espécies de Duovox e aquelas unidades repetitivas do DNAr 5S do tipo II previamente encontradas no clado Edentulus (Rodrigues et al., 2012) sugere que todas sejam pertencentes à mesma classe de sequências. Da mesma maneira, a grande similaridade encontrada entre a sequência de DNAr 5S de cerca de 200 pb isolada de *E. coloradum* e as unidades repetitivas do DNAr 5S do tipo I de *E. freibergi* e de *E. petersi* (descritas por Rodrigues et al., 2012) sugere a origem comum dessas sequências.

A identificação de uma sequência do DNAr 5S do tipo I somente na espécie *E. coloradorum* não descarta a possibilidade de que essa sequência esteja presente no genoma das outras espécies do clado Duovox. Maiores estudos com objetivo específico de isolar tais sequências são necessários, visto que a presença dessa classe de DNAr 5S já foi relatada para anuros do clado Edentulus do gênero *Engystomops* (Rodrigues et al., 2012) e também para *Physalaemus* (Vittorazzi et al., 2011), gênero proximamente relacionado a *Engystomops*.

É interessante notar que a presença de mais de um tipo de DNAr 5S é uma característica comum também dentre outros organismos, tendo sido descrita, por exemplo, para *Xenopus* (Korn e Brown, 1978; Peterson et al., 1980; Nietfeld et al., 1988), várias espécies de peixes (Martins e Galetti, 2001a; Martins e Galetti, 2001b; revisão de Martins e Wasko, 2004) e moluscos (Freire et al., 2010). Outros variantes funcionais de DNAr 5S também foram encontrados em todos os estágios de desenvolvimento embrionário em ouriço, de oócito a larva (Dimarco et al., 2012).

Embora nenhum teste de expressão gênica tenha sido realizado, tanto na sequência de DNAr 5S do tipo I de *E. coloradorum* quanto nas sequências de DNAr 5S do tipo II de *E. guayaco*, *E. coloradorum*, *E. randi* e *E. pustulatus* foram observadas sequências similares às regiões Box-A, elemento intermediário, Box-C e região poli-T (descritas por Pieler et al., 1987; Korn e Brown, 1978), o que sugere a funcionalidade desses segmentos de DNA.

Por outro lado, diferentes classes de sequências repetitivas, aparentemente não transcritoras de RNAr, mas com composição nucleotídica semelhante àquela de sequências de DNAr 5S, já foram encontradas por diversos autores (Wu e Wu, 1987; Murakami e

Fujitani, 1998; Martins et al., 2006; Zhao et al., 2008; Vittorazzi et al., 2011). Uma família de DNA satélite derivada de DNAr 5S encontrada no genoma do peixe *Hoplias malabaricus* foi mapeada na região centromérica de vários cromossomos dessa espécie (Martins et al., 2006), resultado semelhante ao observado por Vittorazzi e colaboradores (2011) ao mapearem sequências da família PcP190EcoRI, derivada de DNAr 5S, em cariótipos de espécimes de *Physalaemus cuvieri*. Vittorazzi e colaboradores (2011) apontam ainda a co-localização de sequências dessa família de DNA satélite com sequências de DNAr 5S do tipo I no cromossomo 3 desse anuro.

O mapeamento de sequências de DNAr 5S e de sequências PcP190EcoRI nos cariótipos de *Engystomops* permitiu interessante comparação entre esses cariótipos. Rodrigues e colaboradores (2012), com base na localização do sítio de DNAr 5S do tipo II, sugeriram a homeologia dos cromossomos 6 das espécies de *Engystomops* do clado Edentulus (*E. freibergi* e *E. petersi*) com os cromossomos 5 de *P. cuvieri*. No presente trabalho, foi possível localizar um sítio de DNAr 5S do tipo II nos cromossomos 6 em quatro espécies de *Engystomops* do grupo Duovox aqui analisadas (*E. coloradurum*, *E. randi*, *E. montubio*, *E. pustulatus*) e inferir assim a homeologia desses cromossomos entre si e também com o cromossomo 6 das espécies de *Engystomops* do grupo Edentulus e o cromossomo 5 de *P. cuvieri*.

De maneira semelhante ao observado em *P. cuvieri*, em *E. freibergi* e em *E. petersi*, as sondas de sequências de DNAr 5S do tipo I (Rodrigues et al., 2012) e as sondas do DNA satélite PcP190EcoRI (presente trabalho) evidenciaram as mesmas regiões cromossômicas (região pericentromérica do braço curto do cromossomo 3 do *E. freibergi* e em *E. petersi* de Puyo; e região pericentromérica do cromossomo 5 de *E. petersi* de Yasuní). Essas

sobreposições dos sinais de hibridação na análise microscópica de cromossomos metafásicos sugerem a co-localização das sequências de DNAr 5S do tipo I e de PcP190EcoRI em sítios adjacentes ou intercaladas em um único sítio. A presença do DNA satélite no cromossomo 3 de *E. freibergi* foi comprovada pela obtenção de sequências PcP190EcoRI por meio de reações de PCR realizadas a partir de uma amostra desses cromossomos 3 microdissecados.

Rodrigues e colaboradores (2012) sugeriram que o cromossomo submetacêntrico classificado como 3 em *E. freibergi* e em *E. petersi* de Puyo e o cromossomos 5 dos espécimes de *E. petersi* de Yasuní são homeólogos devido à semelhante morfologia e à presença de um sítio de DNAr 5S tipo I. A detecção de sequências PcP190EcoRI nesses mesmos sítios cromossômicos corroboram essa hipótese de homeologia.

Em três das espécies de *Engystomops* do clado Duovox (*E. coloradorum*, *E. guayaco* e *E. randi*), as sequências de DNAr 5S do tipo II e PcP190EcoRI também foram importantes para a diferenciação dos cromossomos 5 e 6, que morfologicamente são bastante semelhantes. Enquanto a sequência de DNAr 5S do tipo II foi mapeada no cromossomo 6, o cromossomo 5 é portador de um sítio PcP190EcoRI.

Por fim, é interessante observar que a localização das sequências PcP190EcoRI diferiu entre as espécies de *Engystomops*. Embora o cromossomo 3 de todas as espécies estudadas do clado Duovox, o cromossomo 3 de *E. freibergi* e os homeólogos a ele nos cariótipos de *E. petersi* (cromossomo 3 de *E. petersi* de Puyo e 5 de *E. petersi* de Yasuní) tenham apresentado um sítio de PcP190EcoRI, esse não foi o único cromossomo portador da sequência em três das espécies do clado Duovox. Tal resultado abre caminho para novos estudos, que auxiliem no entendimento da dinâmica evolutiva dessa família de DNA

repetitivo e sua relação com o DNAr 5S.

Figuras

Figura 1

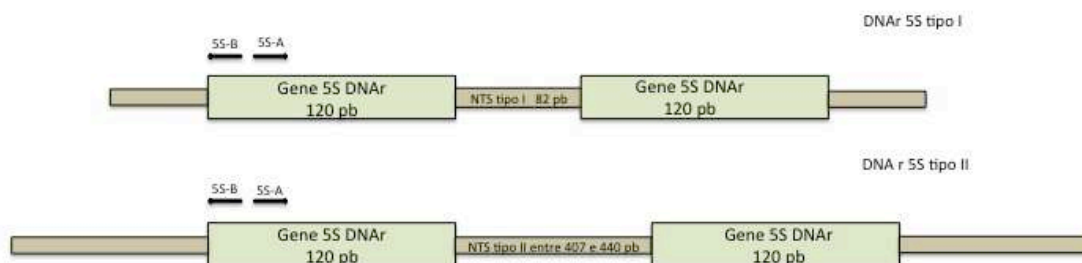


Figura 1. Esquema da organização *in tandem* dos genes ribossomais 5S do tipo I e do tipo II de *Engystomops coloradorum*. As setas pretas mostram as regiões de anelamento dos primers 5S-A e 5S-B.

Figura 2

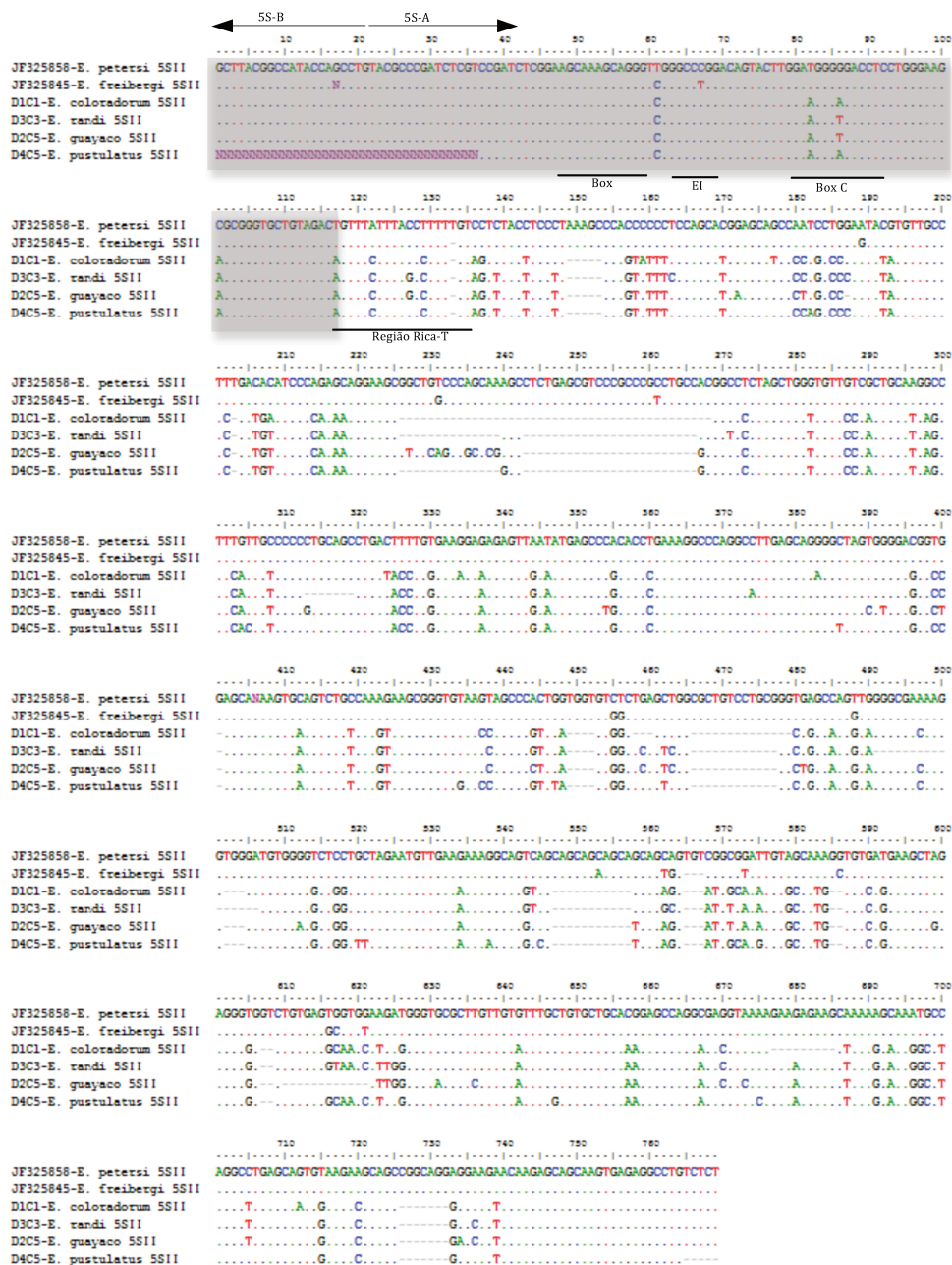


Figura 2. Alinhamento das sequências de DNAr 5S do tipo II das espécies de *Engystomops* do grupo Duovox obtidas nesse trabalho com as sequências do DNAr 5S do tipo II de *Engystomops petersi* e de *Engystomops freibergeri*, depositadas no GenBank (JF325858 e

JF325845). A caixa cinza representa a sequência provavelmente transcrita. As setas indicam a região de anelamento dos primers utilizados para isolamento das sequências. Os elementos regulatórios estão indicados (Box-A, elemento intermediário - EI, Box-C, Região rica em T).

Figura 3

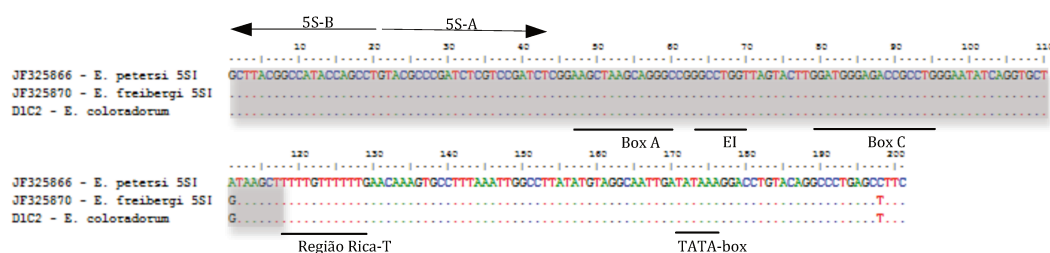


Figura 3. Alinhamento das sequências de DNAr 5S do tipo I de *E. coloradorum* com as sequências do DNAr 5S do tipo I de *Engystomops petersi* e *Engystomops freibergi* depositadas no GenBank (colocar os números de acesso JF325866 e JF325870). A caixa cinza representa a sequência provavelmente transcrita. As setas indicam a região de anelamento dos primers utilizados para isolamento das sequências. Os elementos regulatórios estão indicados (Box-A, elemento intermediário - EI, Box-C, Região rica em T, Box TATA).

Figura 4

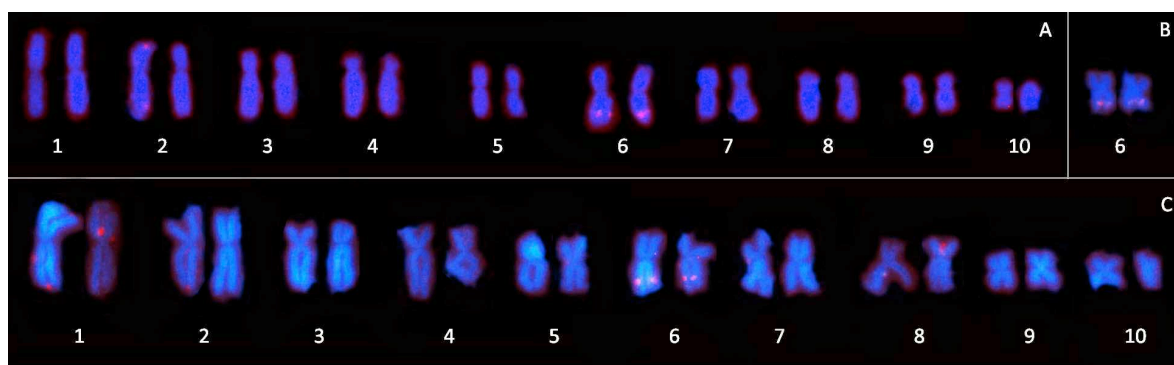


Figura 4. Hibridação da unidade repetitiva do DNAr 5S do tipo II utilizando como sonda a sequência obtida da espécie *E. coloradolum* nos kariótipos de *E. coloradolum* (A), *E. randi* (B) e *E. pustulatus* (C). Barra 4 μm.

Figura 5

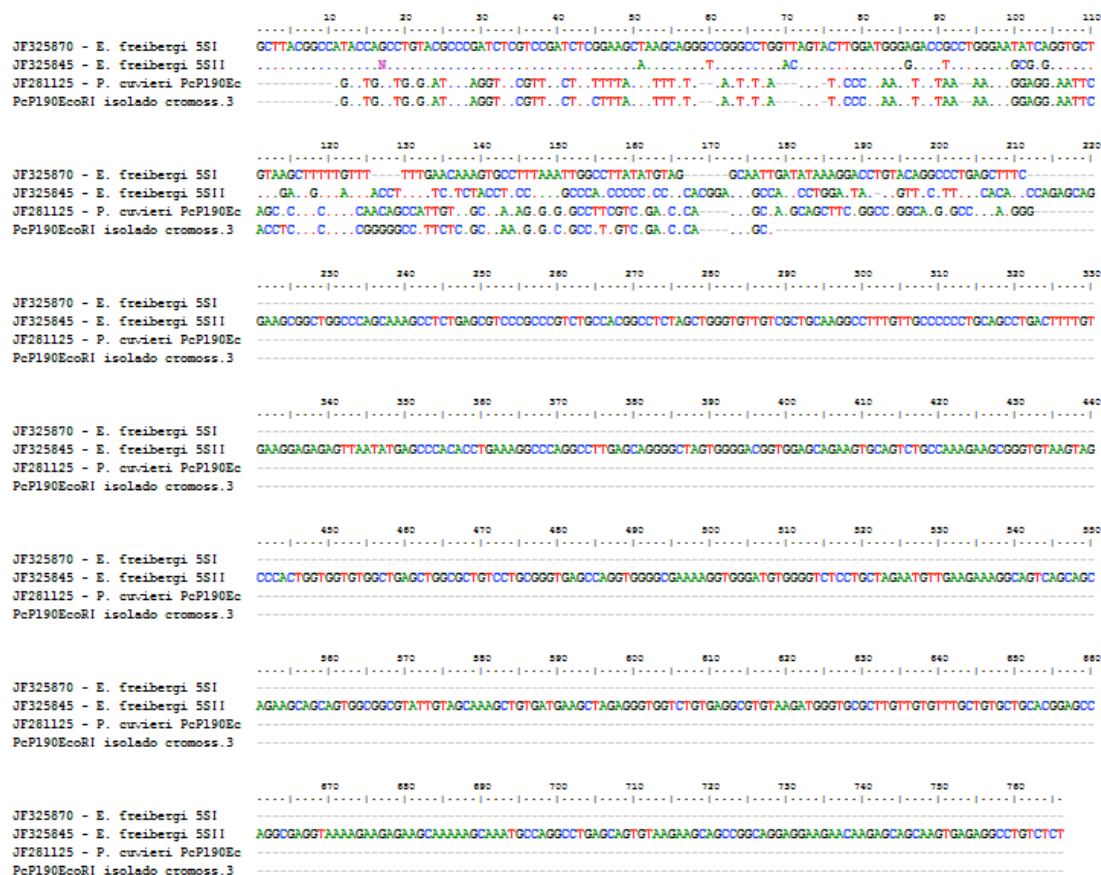


Figura 5. Alinhamento das sequências de DNAr 5S do tipo I e do tipo II de *E. freibergeri* disponíveis no GenBank (JF325870 e JF325845, respectivamente), com a sequência de DNA satélite PcP190EcoRI de *Physalaemus cuvieri* disponível no GenBank (JF281125) e com a sequências de DNA satélite PcP190EcoRI isolada do cromossomo 3 microdissecado de metáfases de *E. freibergeri*.

Figura 6

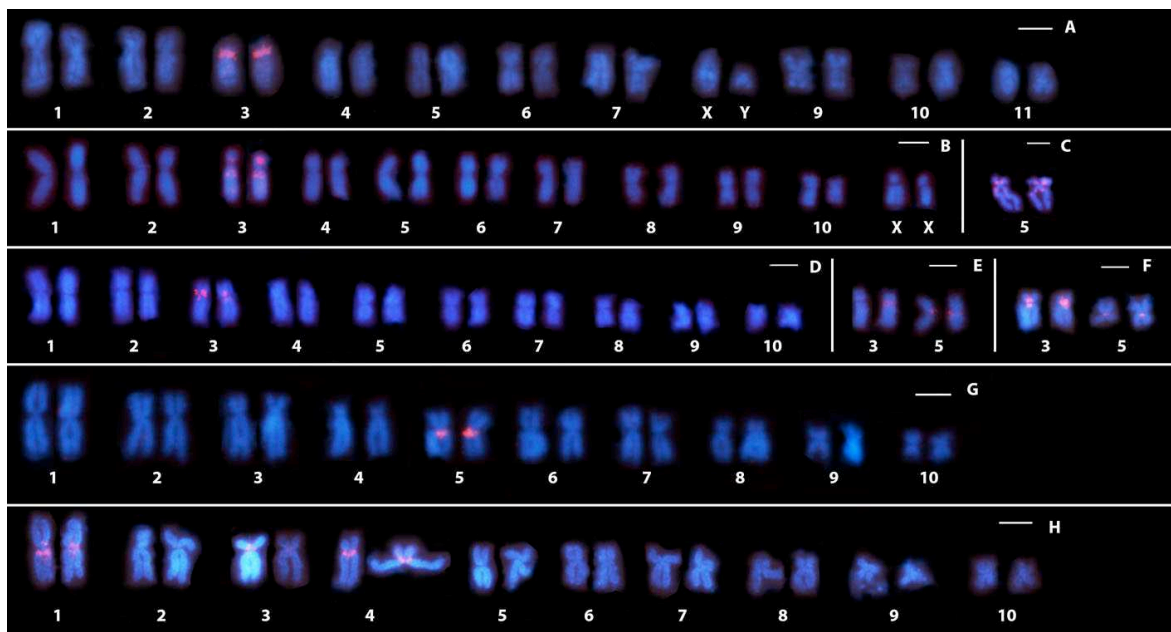


Figura 6. Hibridação da sequência PcP190EcoRI no cariótipo das espécies do gênero *Engystomops*: *E. freibergeri* (A), *E. petersi* de Puyo (B), *E. petersi* de Yasuní (C), *E. montubio* (D), *E. randi* (E), *E. guayaco* (F), *E. coloradorum* (G), *E. pustulatus* (H). Barra 4 μm .

Figura 7

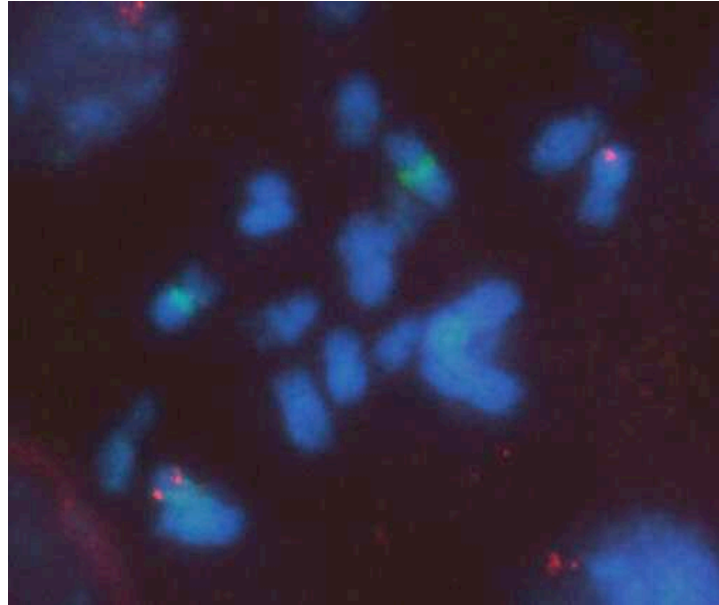


Figura 7. Hibridação da sequência PcP190EcoRI (sinal em verde) e da sonda contendo o DNAr 5S do tipo II de *Engystomops coloradorum* (sinal em vermelho) em metáfase de espécime de *Engystomops randi*. Barra 2 μ m.

Figura 8

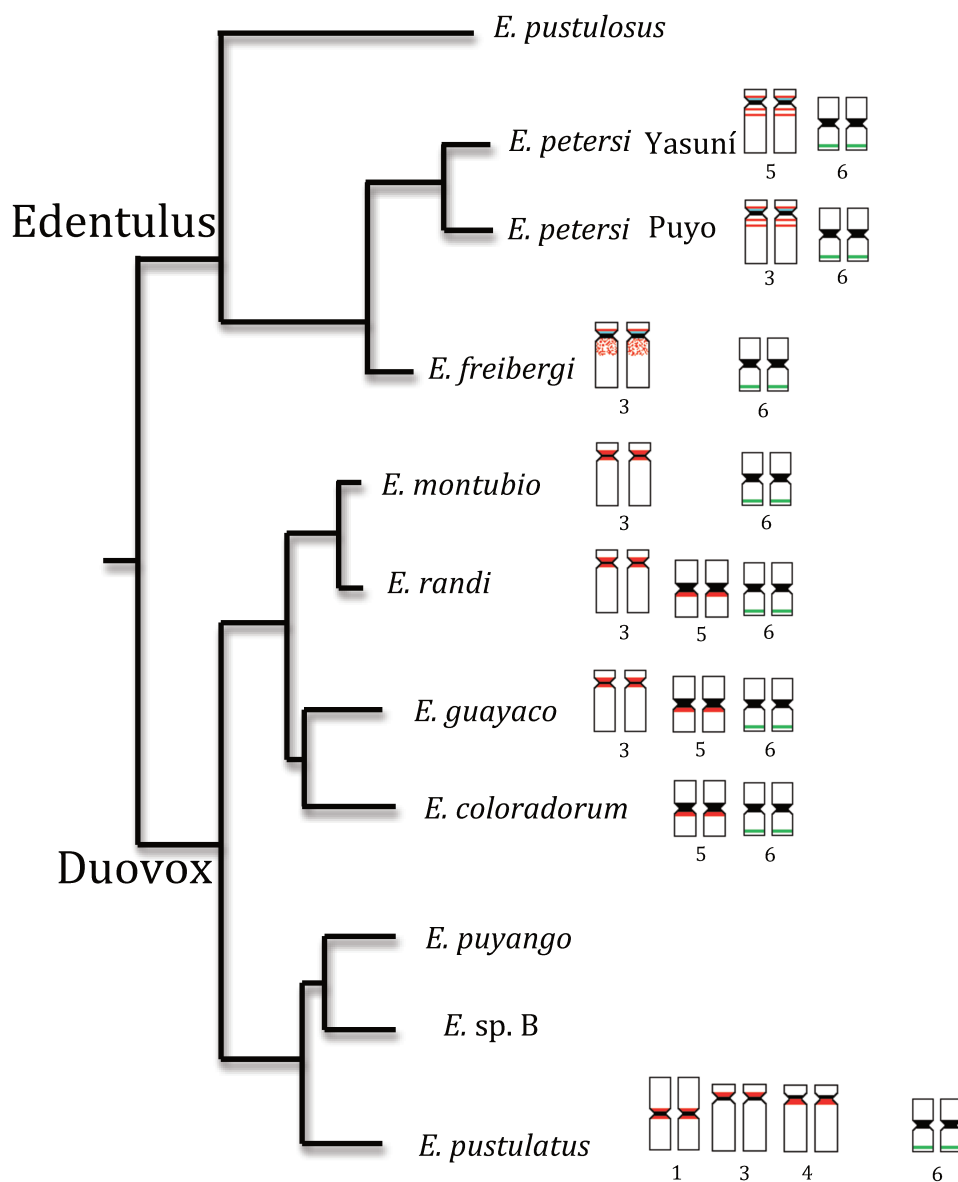


Figura 8. Cladograma baseado na filogenia proposta por Ron et al. (2010) e Funk et al. (2012) para o gênero *Engystomops*. Ao lado, esquema demonstra os sinais de hibridação da sonda PcP190EcoRI em vermelho (obtidos no presente trabalho) e da sonda de DNAr 5S do tipo II em verde (obtidos nesse trabalho e por Rodrigues et al., 2012). Em azul, a localização da sonda de DNAr 5S do tipo I proposta por Rodrigues et al. (2012), que se

encontra co-localizada a sonda PcP190EcoRI no cromossomo 3 de *E. freibergi* e em *E. petersi* de Puyo e no cromossomo 5 de *E. petersi* de Yasuní.

VI. Considerações finais

O estudo citogenético clássico de espécies de *Engystomops* pertencentes ao clado Duovox que ainda não haviam sido cariotipadas mostrou que o número diploide $2n=20$ é uma sinapomorfia do grupo Duovox. Apesar dos cariótipos de *E. coloradorum*, *E. randi*, *E. montubio*, *E. guayaco* e *E. pustulatus* aqui descritos serem muito semelhantes entre si e também com o de *E. puyango* (Ron et al., 2010), foi possível detectar a presença de possíveis cromossomos sexuais heteromórficos do sistema ZZ/ZW na espécie *E. coloradorum*. Também dentre os indivíduos dessa espécie foi encontrado um indivíduo triploide, que consistiu no primeiro relato de poliploidia natural para o gênero.

Por outro lado, utilizando técnicas modernas de citogenética, foi possível melhor caracterizar os cromossomos sexuais de *E. freibergi*, espécie pertencente ao clado Edentulus. Os dados mostraram que a região heterocromática do braço longo do cromossomo X de *E. freibergi* apresenta características moleculares específicas, não compartilhadas pelo cromossomo Y ou qualquer autossomo desse cariótipo. Tal resultado sugere que esse segmento heterocromático possa ter exercido importante papel nos processos de diferenciação dos cromossomos sexuais de *E. freibergi*. Já as regiões proximais dos cromossomos X e Y dessa espécie podem representar regiões pseudo-autossômicas envolvidas no pareamento desses cromossomos durante a meiose.

Além dessas análises, algumas homeologias cromossômicas entre os cariótipos do gênero *Engystomops* puderam ser apontadas após o mapeamento cromossômico de sequências de DNAr 5S e de sequências PcP190EcoRI, referentes a uma família de DNA repetitivo derivada de DNAr 5S. A hipótese de homeologia entre o cromossomo 3 de *E.*

freibergi e os cromossomos 3 e 5 de *E. petersi* de Puyo e Yasuní, respectivamente, proposta previamente por Rodrigues e colaboradores (2012), foi corroborada pela marcação da região pericentromérica do braço curto desses cromossomos com a sonda PcP190EcoRI. Além disso, foi possível sugerir a homeologia desses cromossomos com o cromossomo 3 de *E. montubio*, *E. randi*, *E. guayaco* e *E. pustulatus*, já que esses também tiveram, no braço curto, sinais pericentroméricos de hibridação da sonda PcP190EcoRI. A sonda DNAr 5S do tipo II permitiu inferir a homeologia entre os cromossomos 6 de todas as espécies de *Engystomops* incluídas em nosso estudo. A utilização em conjunto do DNAr 5S do tipo II e PcP190EcoRI ainda tornou possível a diferenciação dos cromossomos 5 e 6 de algumas espécies de *Engystomops* do clado Duovox.

VII. Referências Bibliográficas

- Abramyan, J.; Ezaz, T.; Graves, J. A. M.; Koopman, P. Z and W sex chromosomes in the cne toad (*Bufo marinus*). Chromosome Research, 17:1015–1024, 2009.
- Acosta, M. J.; Marchal, J. A.; Martínez, S.; Puerma, E.; Bullejos, M.; Dias de La Guardiã, R.; Sánchez, A. Characterization of the satellite DNA Msat-160 from the species *Chionomys nivalis* (Rodentia, Arvicolinae). Genetica, 130:43–51, 2007.
- Ananias, F.; Garcia, P. C. A.; Recco-Pimentel, S. M. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). Hereditas, 140:42–48, 2004.
- Apra, G.; Odierna, G.; Andreone, F.; Glaw, F.; Vences, M. Karyological evolution and systematics of Malagasy microhylid frogs. Zoologischer Anzeiger, 246:23–41, 2007.
- Artori, R. F.; Bertollo, L. A. C. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome systems in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. Hereditas, 89:15–19, 2002.
- Berjano, R.; Roa, F.; Talavera, S.; Guerra, M. Cytotaxonomy of diploid and polyploidy *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. Plant Systematics and Evolution, 280:219–227, 2009.
- Bolsheva, N. L.; Gokhman, V. E.; Muravenko, O. V.; Gumovsky, A. V.; Zelenin, A. V. Comparative cytogenetic study on two species of the genus *Entedon* Dalman, 1820 (Hymenoptera, Eulophidae) using DNA-binding fluorochromes and molecular and immunofluorescent markers. Comparative Cytogenetics, 6(1):79–92, 2012.
- Boul, K. E.; Ryan, M. J. Population variation of complex advertisement calls in *Physalaemus petersi* and comparative laryngeal morphology. Copeia, 2004:624–631, 2004.
- Boul, K. E.; Funk, W. C.; Darst, C. R.; Cannatella, D. C.; Ryan, M. J. Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. Proceedings of the Royal Society B: Biological Science, 274:399–406, 2007.
- Brown, S. W. Heterochromatin. Science, 151(3709):417–425, 1966.
- Bruschi, D. P.; Busin, C. S.; Siqueira, S.; Recco-Pimentel, S. M. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). Hereditas, 149:34–40, 2012.
- Bull, J. J. Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publication Co. Menlo Park, California, 1983.
- Burgoyne, P. S. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. Human Genetics, 61:85–90, 1982.

Burrowes, P. A.; Joglar, R. L.; Green, D. E. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica*, 60(2):141–154, 2004.

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*, 110:131–141, 2001.

Busin, C. S.; Andrade, G. V.; Bertoldo, J.; Del Grande, M. L.; Uetanabaro, M.; Recco-Pimentel, S. M. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genetica*, 133:119–127, 2008.

Cannatella, D. C.; Duellman, W. Leptodactylid frogs of the *Physalaemus pustulosus* group. *Copeia*, 1984:902–921, 1984.

Cannatella, D. C.; Hillis, D. M.; Chippindale, P. T.; Weigt, L.; Rand, A. S.; Ryan, M. Phylogeny of frogs of the *Physalaemus pustulosus* species group, with an examination of data incongruence. *Systematic Biology*, 47:311–335, 1998.

Caradonna, F.; Bellavia, D.; Clemente, A. M.; Sisino, G.; Barbieri, R. Chromosomal localization and molecular characterization of three different 5S ribosomal DNA clusters in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Genome*, 50:867–870, 2007.

Carroll, D.; Brown, D. D. Repeating units of *Xenopus laevis* Oocyte-Type 5S DNA are heterogeneous in length. *Cell*, 7:467–475, 1976.

Chakrabarti, S.; Banerjee, S. N.; Neogi, L. N.; Roy-Choudhuri, S. C-band positive W chromosome in the female Indian frog. *Experientia*, 39:321–322, 1983.

Chang, C. Y.; Witschi, E. Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology*, New York, 93:140–144, 1956.

Charlesworth, B. The evolution of sex chromosomes. *Science*, 251:1030–1033, 1991.

Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371:215–220, 1994.

Charlesworth, D.; Charlesworth, B.; Marais, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95:118–128, 2005.

Cherevatov, O. V.; Volkov, R. A. Organization of 5S ribosomal DNA of *Melitaea trivia*. *Cytology and Genetics*, 45(2):115–120, 2011.

Chipev, C. C.; Wolffe, A. P. Chromosomal Organization of *Xenopus laevis* Oocyte and somatic 5S rRNA genes in vivo. *Molecular Cell Biology*, 12(1):45–55, 1992.

Cioffi, M. B.; Martins, C.; Vicari, M. R.; Rebordinos, L.; Bertollo, L. A. C. Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes,

Erythrinidae): Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sexual Development*, 4:176–185, 2010.

Cioffi, M. B.; Sánchez, A.; Marchal, J. A.; Kosyakova, N.; Liehr, T.; Trifonov, V.; Bertollo, L. A. C. Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamiliar Erythrinidae fishes. *BMC Evolutionary Biology*, 11:186, 2011.

Cope, E. D. Contributions to the herpetology of tropical America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 16:166–181, 1864.

Craig, J. Heterochromatin – many flavours, common themes. *BioEssays*, 27:17–28, 2004.

Cuevas, C. C.; Formas, J. R. Heteromorphic sex chromosomes in *Eupsophus insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Chromosome Research*, 4:467–470, 1996.

Dimarco, E.; Cascone, E.; Bellavia, D.; Caradonna, F. Functional variants of 5S rRNA in the ribosomes of common sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Gene*, 508:21–25, 2012.

Diniz, D.; Laudicina, A.; Cioffi, M. B.; Bertollo, L. A. C. Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triportheus* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 122:163–168, 2008.

Donoso-Barros, R. Un nuevo anuro de Bolivia, *Eupemphix freibergi*, nov. Sp. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción*, 41:183–187, 1969.

Duarte, T. C.; Veiga-Menoncello, A. C.; Lima, J. F. R.; Strüssmann, C.; Del-Grande, M. L.; Giaretta, A. A.; Pereira, E. G.; Rossa-Feres, D. C.; Recco-Pimentel, S. M. Chromosome analysis in *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae), with description of sex chromosomes XX/XY in *P. saltica*. *Hereditas*, 147:43–52, 2010.

Duraisingh, M. T.; Voss, T. S.; Marty, A. J.; Duffy, M. F.; Good, R. T.; Thompson, J. K.; Freitas-Junior, L. H.; Scherf, A.; Crabb, B. S.; Cowman, A. F. Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 121:13–24, 2005.

Elder Jr, J. F.; Turner, B. J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, 70(3):297–320, 1995

Emmert-Buck, M. R.; Bonner, R. F.; Smith, P. D.; Chuaqui, R. F.; Zhuang, Z.; Goldstein, S. R.; Weiss, R. A.; Liotta, L. A. Laser capture microdissection. *Science*, 274:998–1001, 1996.

Engelbrecht, A.; Taylor, P. J.; Daniels, S. R.; Rambau, R. V. Chromosomal polymorphisms in african vleis rats, *Otomys irroratus* (Muridae: Otomyini), detected by banding techniques and chromosome painting: inversions, centromeric shifts and diploid number variation. *Cytogenetic and Genome Research*, 133:8–15, 2011.

Fagundes, V.; Christoff, A. U.; Amaro-Ghilard, R. C.; Scheibler, D. R.; Yonenaga-Yassuda, Y. Multiple interstitial ribosomal sites (NORs) in the Brazilian squirrel *Sciurus aestuans ingrani* (Rodentia, Sciuridae) with 2n=40. An overview of *Sciurus* cytogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 26(3):253–257, 2003.

Faivovich, J.; Ferraro, D. P.; Basso, N. G.; Haddad, C. F. B.; Rodrigues, M. T.; Wheeler, W. C.; Lavilla, E. O. A phylogenetic analysis of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with comments on the evolution of anuran foam nests. *Cladistics*, 1:1–23, 2012.

Fedoroff, N. V.; Brown, D. D. The nucleotide sequence of oocyte 5S DNA in *Xenopus laevis*. I. The AT-rich spacer. *Cell*, 13:701–716, 1978.

Ferguson-Smith, M. A.; Yang, F.; Rens, W.; O'Brien, P. C. M. The impact of chromosome sorting and painting on the comparative analysis of primate genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 108:112–121, 2005.

Finotelo, L. F. M.; Amaral, P. J. S.; Pieczarka, J. C.; de Oliveira, E. H. C.; Pissinati, A.; Neusser, M.; Müller, S.; Nagamachi, C. Chromosome phylogeny of the subfamily Pitheciinae (Platyrrhini, Primates) by classic cytogenetics and chromosome painting. *BMC Evolutionary Biology*, 10:189, 2010.

Fouquet, A.; Vences, M.; Salducci, M. D.; Meyer, A.; Marty, C.; Blanc, M.; Gilles, A. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43:567–582, 2007.

Freire, R.; Arias, A.; Ínsua, A. M.; Méndez, J.; Eirín-López, J. M. Evolutionary dynamics of the 5S r DNA gene Family in the Mussel *Mytilus*: mixed effects of birth-and-death and concerted evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 70:413–426, 2010.

Frost, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January, 2013). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA, 2013.

Funk, W. C.; Caldwell, J. P.; Peden, C. E.; Padial, J. M.; De la Riva, I.; Cannatella, D.C. Tests of Biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian Forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44:825–837, 2007.

Funk, W. C.; Angulo, A.; Caldwell, J. P.; Ryan, M. J.; Cannatella, D. C. Comparison of morphology and calls of two cryptic species of *Physalaemus* (Anura; Leiuperidae). *Herpetologica*, 64:290–304, 2008.

Funk, W. C.; Cannatella, D. C.; Ryan, M. J. Genetic divergence is more tightly related to call variation than landscape features in the Amazonian frogs *Physalaemus petersi* and *P. freibergi*. *Journal of Evolutionary Biology*, 22:1839–1853, 2009.

Funk, W. C.; Caminer, M.; Ron, S. R. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 279(1734):1806–1814, 2012.

Gall, J. G.; Cohen, E. H.; Polan, M. L. Repetitive DNA sequences in *Drosophila*. *Chromosoma*, 33:319–344, 1971.

Gerbi, S. A. Evolution of Ribosomal DNA. In: MacIntyre RJ, ed. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenum Publishing, pp.419–517, 1985.

Gray, J. W.; Carrano, A. V.; Steinmetz, L. L.; Van Dilla, M. A.; Moore, D. H.; Mayall, B. H.; Mendelsohn, M. L. Chromosome measurement and sorting by flow systems. *Proceedings of National Academic Science*, 72(4):1231–1234, 1975.

Green, D. M. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. *Chromosoma*, 97:55–70, 1988a.

Green, D. M. Heteromorphic sex chromosomes in the rare and primitive frog *Leiopelma hamiltoni* from New Zealand. *Journal of Heredity*, 79:165–169, 1988b

Grewal, S. I. S.; Jia, S. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics*, 8:35–46, 2007.

Gross, M. C.; Schneider, C. H.; Valente, G. T.; Martins, C.; Feldberg, E. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76:1117–1127, 2010.

Guerra, M. A.; Ron, S. R. Mate choice and courtship signal differentiation promotes speciation in an Amazonian frog. *Behavioral Ecology*, 19:1128–1135, 2008.

Haddad, C.; Pombal, J. P. Jr.; Batistic, R. F. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). *Journal of Herpetology*, 28(4):425–430, 1994.

Hanada, H. G and C banding show structural differences between the Z and W chromosomes in the frog *Buergeria buergeri*. *Hereditas*, 136:151–154, 2002.

Harper, M. E.; Price, J.; Korn, J. Chromosomal mapping of *Xenopus* 5S genes: somatic versus oocyte-type. *Nucleic Acids Research*, 11(8):2313–2323, 1983.

Hashimoto, D. T.; Ferguson-Smith, M. A.; Rens, W.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 134:64–71, 2011.

Hassanane, M. S.; Chaudhary, R.; Chowdhary, B. P.; Microdissected bovine X chromosome segment delineates homoeologous chromosomal regions in sheep, goat and

buffalo. *Chromosome Research*, 6:213–217, 1998.

Hayes, T. B. Sex determination and primary sex differentiation in Amphibians: Genetic and developmental mechanisms. *The Journal of Experimental Zoology*, 281:373–399, 1998.

Heard, E.; Rougeulle, C.; Arnaud, D.; Avner, P.; Allis, C. D.; Spector, D. L. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell*, 107:727–738, 2001.

Heitz, E. Das Heterochromatin der Moose. I. jahrb. Wiss. Bot., 69:762–818, 1928.

Henikoff, S.; Ahmad, K.; Malik, H. S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science*, 293:1098–1102, 2001.

Henning, F.; Moysés, C. B.; Calcagnotto, D.; Meyer, A.; de Almeida-Toledo, L. F. Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). *Heredity*, 106:391–400, 2011.

Hillis, D. M.; Green, D. Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *Journal of Evolutionary Biology*, 3:49–64, 1990.

Hsü, C. Y.; Yü, N. W.; Liang, H. M. Induction of sex reversal in female tadpoles of *Rana catesbeiana* by temperature treatment. *Endocrinology Japan*, 18(3):243–251, 1970.

Iturra, P.; Veloso, A. Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. *Genetica*, 78:25–31, 1989.

IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>. Acessado 31 de janeiro de 2013 e 01 de maio de 2013.

Jiménez-de-la-Espada, D. M. Nuevos batracios americanos. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural*, Madrid, 1:85–88, 1872.

John, B. The biology of heterochromatin. In *Heterochromatin: molecular and structural aspects* (R.S. Verma, ed.), pp. 1–128, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1988.

Karamysheva, T. V.; Andreenkova, O. V.; Bochkaev, M. N.; Borissov, Y. M.; Bogdanchikova, N.; Borodin, P. M.; Rubtsov, N. B. B chromosomes of Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) analysed by microdissection and FISH. *Cytogenetic and Genome Research*, 96:154–160, 2002.

Kawagoshi, T.; Nishida, C.; Matsuda, Y. The origin and differentiation process of X and Y chromosomes of the black marsh turtle (*Siebenrockiella crassicollis*, Geomydidae, Testudines). *Chromosome Research*, 20:95–110, 2012.

Kejnovsky, E.; Hobza, R.; Cermak, T.; Kubat, Z.; Vyskot, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*, 102:533–541, 2009.

King, M. C-banding studies on Australian hyloid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma*, 80:191–217, 1980.

King, M. The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In *Amphibian Cytogenetics and Evolution* (D.M. Green and S.K. Sessions eds), pp.359–391, Academic Press, San Diego, 1991.

Korn, L. J.; Brown, D. D. Nucleotide sequence of *Xenopus borealis* oocyte 5S DNA: Comparison of sequences that flank several related eucaryotic genes. *Cell*, 15:1145–1156, 1978.

Krylov, V.; Kubickova, S.; Rubes, J.; Macha, J.; Tlapakova, T.; Seifertova, E.; Sebkova, N. Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. Laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. *Chromosomes Research*, 18:431–439, 2010.

Kuramoto, M. A list of chromosome numbers of anuran amphibians. *Bulletin of Fukuoka University of Education*, 39(3):83–127, 1990.

Léon, P. E. Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. *Revista de Biología Tropical*, 17:119–124, 1970.

Long, E. O.; Dawid, I. B. Repeated genes in Eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49:727–764, 1980.

Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M.; Cardoso, A. J. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver-staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Research*, 6:621–628, 1998.

Lourenço, L. B.; Recco-Pimentel, S. M.; Cardoso, A. J. Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Anura, Leptodactylidae). *Canadian Journal of Zoology-revue Canadienne de Zoologie*, 77:624–631, 1999.

Lourenço, L. B.; Bacci-Júnior, M.; Martins, V. G.; Recco-Pimentel, S. M.; Haddad, C. F. B. Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132:255–266, 2008.

Lynch, J. D. Systematic status of the american Leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix*, and *Physalaemus*. *Copeia*, 1970(3):488–496, 1970.

Mahony, M. J. Heteromorphic sex chromosomes in the Australian frog *Crinia bilineata* (Anura: Myobatrachidae). *Genome*, 34:334–337, 1991.

Marchal, J. A.; Acosta, M. J.; Nietzel, H.; Sperling, K.; Bullejos, M.; Díaz de la Guardia, R.; Sánchez, A. X chromosome painting in *Microtus*: Origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Research*, 12:767–776, 2004.

Mariguela, T. C.; Paiva, L. R. S.; Foresti, F. 5S rDNA chromosomal mapping and COI sequence analysis reveal differentiation among distinct populations of a characid fish *Serrapinnus notomelas*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21:779–788, 2011.

Marquioni, V.; Bertollo, L. A. C.; Diniz, D.; Cioffi, M. B. Comparative chromosomal mapping in *Triportheus* fish species. Analysis of synteny between ribosomal genes. *Micron*, 45:129–135, 2013.

Martinez, P. A.; Ezaz, T.; Valenzuela, N.; Georges, A.; Graves, J. A. M. An XX/XY heteromorphic sex chromosome system in the Australian chelid turtle *Emydura macquarii*: A new piece in the puzzle of sex chromosome evolution in turtles. *Chromosome Research*, 16:815–825, 2010.

Martins, C.; Galetti, P. M. Jr. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44:903–910, 2001a.

Martins, C.; Galetti, P. M. Jr. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*, 111:439–446, 2001b.

Martins, C.; Wasko, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: *Focus on Genome Research*. Ed: Nova Science Publishers, Inc. 335–363, 2004.

Martins, C.; Ferreira, I. A.; Oliveira, C.; Foresti, F.; Galetti, M. J. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, 127:133–141, 2006.

Meltzer, P. S.; Guan, X. Y.; Burgess, A.; Trent, J. M. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Natura Genetics*, 1:24–28, 1992.

Meunier-Rotival, M.; Cortadas, J.; Macaya, G.; Bernardi, G. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. *Nucleic Acids Research*, 6(6):2109–2123, 1979.

Mikamo, K.; Witschi, E. Functional sex-reversal in genetic females of *Xenopus laevis*, induced by implanted testes. *Genetics*, 48:1411–1421, 1963.

Miller, J. R.; Cartwright, E. M.; Brownie, G. G. The nucleotide sequence of oocyte 5S DNA in *Xenopus laevis*. II. The GC-Rich region. *Cell*, 13:717–725, 1978.

Miura, I. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog, *Rana japonica* I. Sex-related heteromorphism of the distribution pattern of constitutive heterochromatin in chromosome no.4 of the Wakuya population. *Zoological Science*, 11:797–806, 1994.

Miura, I.; Ohtani, H.; Kashiwagi, A.; Hanada, H.; Nakamura, M. Structural differences between XX and ZW sex lampbrush chromosomes in *Rana rugosa* females (Anura: Ranidae). *Chromosoma*, 105:237–241, 1996.

Morescalchi, A.; Gargiulo, G.; Galgano, M. Su alcune relazioni kariologiche Del genere *Bufo* (Amphibia Salientia). Rendiconto dell'Accademia delle Scienze Fisiche e Matematiche, Napoli, 117–120, 1968.

Murakami, M.; Fujitani, H. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid gimbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). Genes & Genetics Systems, 73:9–20, 1998.

Nascimento, L. B.; Caramaschi, U.; Cruz, C. A. G. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arquivo Museu Nacional do Rio de Janeiro, 63:297–320, 2005.

Nascimento, J.; Quinderé, Y. R. S. D.; Recco-Pimentel, S. M.; Lima, J. R. F., Lourenço, L. B. Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). Genetica, 138:1127–1132, 2010.

Nietfeld, W.; Digweed, M.; Mentzel, H.; Meyerhof, W.; Köster, M.; Knöchel, W.; Erdmann, V. A.; Pieler, T. Oocyte and somatic 5S ribosomal RNA and 5S RNA encoding genes in *Xenopus tropicalis*. Nucleic Acids Research, 16(18):8803–8815, 1988.

Nishioka, M.; Miura, I.; Saitoh, K. Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanism. Scientific Report of Laboratory for Amphibian Biology of the Hiroshima University, 12:55–81, 1993.

Odierna, G.; Aprea, G.; Capriglione, T.; Castellano, S.; Balletto, E. Cytological evidence for population-specific sex chromosome heteromorphism in Palaearctic green toads (Amphibia, Anura). Journal of Bioscience, 32(4):763–768, 2007.

Ogata, M.; Ohtani, H.; Igarashi, T.; Hasegawa, Y.; Ichikawa, Y.; Miura, I. Change of the heterogametic sex from male to female in the frog. Genetics, 164:613–620, 2003.

Ogata, M.; Hasegawa, Y.; Ohtani, H.; Mineyama, M.; Miura, I. The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog, *Rana rugosa*. Heredity, 100:92–99, 2008.

Pardue, M. L.; Gall, J. G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science, 168:1356–1358, 1970.

Pardue, M. L.; Brown, D. D.; Birnstiel, M. L. location of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. Chromosoma, 42:191–203, 1973.

Pendas, A. M.; Moran, P.; Freije, J. P.; Garcia-Vazquez, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. Cytogenetics and Cell Genetics, 67:31–36, 1994.

Peterson, R. C.; Doering, J. L.; Brown, D. D. Characterization of two *Xenopus* somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA. *Cell*, 20:131–141, 1980.

Pieler, T.; Hamm, J.; Roeder, R. G. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell*, 48:91–100, 1987.

Pounds, J. A. Climate and amphibian declines. *Nature*, 410:639–640, 2001.

Pounds, J. A.; Bustamante, M. R.; Coloma, L. A.; Consuegra, J. A.; Fogden, M. P. L.; Foster, P. N.; La Marca, E.; Masters, K. L.; Merino-Vitero, A.; Puschendorf, R.; Ron, S. R.; Sánchez-Azofeifa, A.; Still, C. J.; Young, B. E. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439:161–167, 2006.

Pyron, R. A.; Wiens, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61:543–583, 2011.

Ray-Chaudhuri, S. P.; Singh, L.; Sharma, T. Evolution of sex-chromosomes and formation of W-chromatin in snakes. *Chromosoma*, 33:239–251, 1971.

Reed, K. M.; Phillips, R. B. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR) on the putative sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. *Chromosome Research*, 5:221–227, 1997.

Richard, G. F.; Kerrest, A.; Dujon, B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4):686–722, 2008.

Ried, T.; Schröck, E.; Ning, Y.; Wienberg, J. Chromosome painting: a useful art. *Human Molecular Genetics*, 7(10):1619–1626, 1998.

Rodrigues, D. S.; Rivera, M.; Lourenço, L. B. Molecular organization and chromosomal localization of 5S rDNA in Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). *BMC Genetics*, 13:17, 2012.

Ron, S. R.; Duellman, W. E.; Coloma, L. A.; Bustamante, M. R. Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology*, 37(1):116–126, 2003.

Ron, S. R.; Cannatella, D. C.; Coloma, L. A. Two new species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Western Ecuador. *Herpetologica*, 60:261–275, 2004.

Ron, S. R.; Coloma, L. A.; Cannatella, D. C. A new, cryptic species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Western Ecuador with comments on the call structure of the *P. pustulosus* species group. *Herpetologica*, 61:178–198, 2005.

Ron, S. R.; Santos, J. C.; Cannatella, D. C. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39:392–403, 2006.

Ron, S. R. The evolution of female mate choice for complex calls in túngara frogs. *Animal Behavior*, 76:1783–1794, 2008.

Ron, S. R.; Toral, E.; Rivera, M.; Terán-Valdez, A. A new species of *Engystomops* (Anura :Leiodactylidae) from southwestern Ecuador. *Zootaxa*, 2606:25–49, 2010.

Rubes, J.; Kubickova, S.; Pagacova, E.; Cernohorska, H.; Di Bernardino, D.; Antoninova, M.; Vahala, J.; Robinson, T. J. Phylogenomic study of spiral-horned antelope by cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*, 16:935–947, 2008.

Rubtsov, N. B.; Karamysheva, T. V.; Andreenkova, O. V.; Bochkaev, M. N.; Kartavtseva, I. V.; Roslik, G. V.; Borissov, Y. M. Comparative analysis of micron and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:289–294, 2004.

Ryuzaki, M.; Hanada, H.; Okumoto, H.; Takizawa, N.; Nishioka, M. Evidence for heteromorphic sex chromosomes in males of *Rana tagoi* and *Rana sakuraii* in Nishitama district of Tokyo (Anura: Ranidae). *Chromosome Research*, 7:31–42, 1999.

Saito, Y.; Edpaulina, R. R.; Abe, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. *Genetica*, 131:157–166, 2007.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., p.125–128, 1989.

Scacchetti, P. C.; Alves, J. C. P.; Utsunomia, R.; Claro, F. L.; Almeida Toledo, L. F.; Oliveira, C.; Foresti, F. Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the genomes of *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 136:131–137, 2012.

Schemberger, M. O.; Bellafronte, E.; Nogaroto, V.; Almeida, M. C.; Schühli, G. S.; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M. R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica*, 139:1499–1508, 2011.

Schempp, W.; Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. *Chromosoma*, 83:697–710, 1981.

Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66:361–388, 1978.

Schmid, M. Chromosome banding in Amphibia. V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). *Chromosoma*, 80:69–96, 1980.

Schmid, M.; Haaf, T.; Geile, B.; Sims, S. Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). *Chromosoma*, 88:69–82, 1983.

Schmid, M.; Vitelli, L.; Batistoni, R. Chromosome banding in Amphibia. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. *Chromosoma*, 95:271–284, 1987.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Feichtinger, W.; de Almeida, C. G.; Duellman, W. E. Chromosome banding in Amphibia. XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). *Chromosoma*, 97:33–42, 1988.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Feichtinger, W. Chromosome banding in Amphibia. XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). *Chromosoma*, 97:434–438, 1989.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Friedl, R.; Almeida, C. G.; Haaf, T.; Hillis, D. M.; Duellman, W. E. Chromosome banding in Amphibia. XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). *Chromosoma*, 99:413–423, 1990.

Schmid, M.; Steinlein, C.; Feichtinger, W. Chromosome banding in Amphibia. XVII. First demonstration of multiple sex chromosomes in amphibians: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma*, 101:284–292, 1992.

Schmid, M.; Ohta, S.; Steinlein, C.; Guttenbach, M. Chromosome banding in Amphibia. XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeria* (Anura, Rhacophoridae). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 62:238–246, 1993.

Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steinlein, C.; Nanda, I.; Mais, C.; Haaf, T.; Visbal García, R.; Fernández Badillo, A. Chromosome banding in Amphibia XXII. Atypical Y chromosomes in *Gastrotheca walkeri* and *Gastrotheca ovifera* (Anura, Hylidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 96:228–238, 2002a.

Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steinlein, C.; Rupprecht, A.; Haaf, T.; Kaiser, H. Chromosome banding in Amphibia. XXIII. Giant W sex chromosomes and extremely small genomes in *Eleutherodactylus euphronides* and *Eleutherodactylus shrevei* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 97:81–94, 2002b.

Schmid, M.; Feichtinger, W.; Steinlein, C.; Visbal Garcia, R.; Fernández Badillo, A. Chromosome banding in Amphibia. XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 101:62–73, 2003.

Schmid, M.; Steinlein, C. Chromosome banding in Amphibia XXIX. The primitive XY/XX sex chromosomes of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). Cytogenetic and Genome Research, 101:74–79, 2003.

Shibata, F.; Hizume, M.; Kuroki, Y. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. Chromosoma, 108:266–270, 1999.

Shreve, B. Notes on Ecuadorian and Peruvian reptiles and amphibians with descriptions of new forms. Proceedings of the New England Zoölogical Club. Cambridge, Massachusetts, 18:71–84, 1941.

Singh, L.; Purdom, I. F.; Jones, K. W. Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. Chromosoma, 59:43–62, 1976.

Singh, L.; Purdom, I. F.; Jones, K. W. Sex chromosome associated satellite DNA: Evolution and conservation, 79:137–157, 1980.

Siripiyasing, P.; Chulalaksananukul, W.; Pariyanonth, P.; Kaewsri, S.; Sittigul, S.; Seatung, N.; Tanomtong, A. The identification of the sex chromosome and the karyotype of four toad species (Genus *Bufo*) in Thailand by T-lymphocyte cell culture. Cytologia, 73(3):229–241, 2008.

Siqueira, S.; Aguiar-Jr., O.; Strüssmann, C.; Del-Grande, M. L.; Recco-Pimentel, S. M. Chromosomal analysis of three Brazilian “eleutherodactyline” frogs (Anura: Terrarana), with suggestion of a new species. Zootaxa, 1860:51–56, 2008.

Slamovits, C. H.; Rossi, M. S. Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. A review. Journal of Neotropical Mammalian, 9(2):297–308, 2002.

Son, J. H.; Park, K. C.; Lee, S. I.; Jeon, E. J.; Kim, H. H.; Kim, N. S. Sequence variation and comparison of the 5S r RNA sequences in *Allium* species and their chromosomal distribution in four *Allium* species. Journal of Plant Biology, 55:15–25, 2012.

Sumida, M. Mitochondrial DNA differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica* as revealed by restriction endonuclease analysis. Genes & Genetic Systems, 72:79–90, 1997.

Targueta, C. P.; Rivera, M.; Souza, M. B.; Recco-Pimentel, S. M.; Lourenço, L. B. Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetics relationships. Molecular Phylogenetics and Evolution, 54:709–725, 2010.

Targueta, C. P.; Rivera, M.; Lourenço, L. B. Karyotypic differentiation via 2n reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). Genetica, 139:1339–1347, 2011.

Telenius, H.; Carter, N. P.; Bebb, C. E.; Nordenskjöld, M.; Ponder, B. A. J.; Tunnacliffe, A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13:718–725, 1992.

Teruel, M.; Cabrero, J.; Montiel, E. E.; Acosta, M. J.; Sánchez, A.; Camacho, J. P. M. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Research*, 17:11–18, 2009a.

Teruel, M.; Cabrero, J.; Perfectti, F.; Acosta, M. J.; Sánchez, A. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research*, 125:286–291, 2009b.

Uno, Y.; Nishida, C.; Oshima, Y.; Yokoyama, S.; Miura, I.; Matsuda, Y.; Nakamura, M. Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangements in the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, Ranidae) with ZW and XY sex chromosome systems. *Chromosome Research*, 16:637–647, 2008.

Vicari, M. R.; Artoni, R. F.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L. A. C. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in Characidium fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica*, 134:311–317, 2008.

Vicari, M. R.; Pistune, H. F. M.; Castro, J. P.; Almeida, M. C.; Bertollo, L. A.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J. P.; Artoni, R. F. New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica*, 139:1073–1081, 2011.

Viégas-Péquignot, E. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson D (ed) *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford University: press IRL Press, Oxford, pp.137–158, 1992.

Vitelli, L.; Batistini, R.; Andronico, F.; Nardi, I.; Barsacchi-Pilone, G. Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. *Chromosoma*, 84:475–491, 1982.

Vittorazzi, S. E.; Lourenço, L. B.; Del-Grande, M. L.; Recco-Pimentel, S. M. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) *Cytogenetic and Genome Research*, 134:101–107, 2011.

Yamada, K.; Nishida-Umehara, C.; Matsuda, Y. A new family of satellite DNA sequences as a major component of centromeric heterochromatin in owls (Strigiformes). *Chromosoma*, 112:277–287, 2004.

Yang, F.; Carter, N. P.; Shi, L.; Ferguson-Smith, M. A. A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma*, 103:642–652, 1995.

Yang, F.; O'Brien, P. C. M.; Wienberg, J.; Ferguson-Smith, M. A. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome

painting. *Chromosome Research*, 5:109–117, 1997.

Yoshimura, A.; Nakata, A.; Kuro-o, M.; Obara, Y.; Ando, Y. Molecular cyogenetic characterization and chromosomal distribution of the satellite DNA in the genome of *Oxyhyla intricate* (Orthoptera: Catantopidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 112:160–165, 2006.

Young, B. D.; Ferguson-Smith, M. A.; Sillar, R.; Boyd, E. High-resolution analysis of human peripheral lymphocyte chromosomes by flow cytometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12):7727–7731, 1981.

Wang, X.; Zhang, Q.; Ren, J.; Jiang, Z.; Wang, C.; Zhuang, W.; Zhai, T. The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture*, 297:78–84, 2009.

Warburton, P. E.; Dolled, M.; Mahmood, R.; Alonso, A.; Li, S.; Naritomi, K.; Tohma, T.; Nagai, T.; Hasegawa, T.; Ohashi, H.; Ovaerts, L. C. P.; Eussen, B. H. J.; Van Hemel, J. O.; Lozzio, C.; Schwartz, S.; Dowhanick-Morrisette, J. J.; Spinner, N. B.; Rivera, H.; Crolla, J. A.; Yu, C.; Warburton, D. Molecular cytogenetic analysis of eight inversion duplications of human chromosome 13q that each contain a neocentromere. *American Journal of Human Genetics*, 66:1794–1806, 2000.

Weigt, L. A.; Crawford, A. J.; Stanley Rand, A.; Ryan, M. J. Biogeography of the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*: a molecular perspective. *Molecular Ecology*, 14:3857–3876, 2005.

Wiley, J. E.; Replication banding and FISH analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 101:80–83, 2003.

Wolffe, A. P.; Brown, D. D. Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. *Science*, 241:1626–1632, 1988.

Wu, T.; Wu, R. A new rice repetitive DNA shows sequence homology to both 5S RNA and tRNA. *Nucleic Acids Research*, 15(15):5913–5923, 1987.

Zhao, G.; Yu, Q. X.; Zhang, W. W.; Zhang, Y. M.; Chen, J.; Long, H.; Liu, J. D. The 5S rDNA related repetitive sequences in the sex chromosomes of the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*). *Cytogenetic and Genome Research*, 121(2):143–148, 2008.

VIII. Anexo I

Detalhamento das Metodologias

Extraído de: “Protocolos do Laboratório de Estudos
Cromossômicos de anuros”

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional -
Instituto de Biologia - Unicamp

Índice:

I. Obtenção direta de preparações cromossômicas.....	115
II. Coloração por Giemsa.....	116
III. Bandamento C.....	117
IV. Impregnação por prata (Método Ag-NOR).....	118
V. Coloração com Fluorocromo 4'-6 diamidino-2-fenilindole (DAPI).....	119
VI. Extração de DNA de anfíbio.....	120
VII. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	122
VIII. Eletroforese em gel de agarose.....	124
IX. Purificação de produto de PCR.....	126
X. Sequenciamento de DNA.....	130
XI. Meio de cultura de bactérias.....	132
XII. Clonagem.....	133
XIII. Extração de plasmídeo – Mini-Prep.....	137
XIV. Técnica de hibridação in situ fluorescente (FISH).....	139
XV. Microdissecção e pintura cromossômica	146

I. Obtenção direta de preparações cromossômicas

Soluções

- Colchicina 2%;
- Xilocaína em pomada;
- Etanol 100%;
- Citrato de sódio 0,9%;
- Fixador Metanol:Ácido Acético (3:1).

Procedimentos

1. Injetar subcutaneamente solução de colchicina 2% (0,02 mL de solução por grama do animal).
2. Após 4-5 horas (esse tempo pode chegar a cerca de 8 horas), anestesiá-lo com pomada de xilocaína.
3. Realizar a remoção primeiramente do coração, do fígado e de músculos da perna. Colocar os tecidos em tubo eppendorf contendo etanol 95 ou 100%.
4. Realizar a remoção do intestino. Abri-lo com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, para a exposição do epitélio intestinal, e coloca-lo em recipiente contendo citrato de sódio 0,9%.
5. Em seguida, realizar a remoção dos testículos, que serão imediatamente submersos em água gelada.
6. Após incubar o intestino por 35-50 minutos em citrato de sódio 0,9%, transferi-lo para uma placa de Petri com metanol-ácido acético (3:1) e vigorosamente raspar o seu epitélio. Desagregar o material com o auxílio de pipeta Pasteur e manter no fixador por mais 5 minutos.
7. Após incubar os testículos em água gelada por 15-20 minutos, transferi-los para placa de Petri contendo metanol-ácido acético (3:1) e recortá-lo várias vezes com tesoura cirúrgica. Desagregar com o auxílio de pipeta Pasteur e manter no fixador por mais 5 minutos.
8. Centrifugar as suspensões celulares a 800 rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante, ressuspender os precipitados em metanol-ácido acético (3:1). Repetir essa operação duas vezes.
9. Gotejar as suspensões em lâminas para análise inicial e manter os tubos a -20°C para uso futuro.

II. Coloração por Giemsa

Soluções

- Solução-mãe de Giemsa;
- Metanol 100%;
- Tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 (25,5 mL de fosfato de sódio mono básico NaH_2PO_4 0,2M; 24,5 mL de fosfato de sódio dibásico Na_2HPO_4 0,2M, água qsp 100 mL; acertar o volume final após corrigir o pH)

Procedimentos

1. Gotejar as suspensões celulares em lâminas limpas.
2. Preparar solução Giemsa 10%:
 - 10 mL de solução-mãe de Giemsa;
 - 1 mL de metanol;
 - 60 mL de água destilada;
 - 29 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,0.
3. Cobrir a lâmina com a solução de Giemsa e manter por 10 minutos.
4. Lavar com água destilada e deixar secar.

III. Bandamento C

[King M. (1980) Chromosoma 80:191-217 com modificações segundo Siqueira et al. (2008) Zootaxa 1860:51-59]

Soluções

- Ácido acético 50%;
- HCl 0,2N;
- Solução de Ba(OH)₂ 5%;
- 2x SSC
- Giemsa 10%.

Procedimentos

1. Gotejar as suspensões celulares em lâminas limpas. Deixar envelhecer por pelo menos 3 dias na geladeira ou a -20°C, ou em estufa a 37°C por 1 a 2 dias.
2. Incubar as lâminas coradas ou não em ácido acético 50% por 30 minutos. Lavar em água destilada.
3. Incubar as lâminas em HCl 0,2N por 30 minutos. Lavar em água destilada e deixar secar.
4. Enquanto isso, esquentar a solução de hidróxido de bário [Ba(OH)₂ 5%] a 51°C em borel plástico.
5. Incubar as lâminas na solução de hidróxido de bário. O tempo de permanência das lâminas nessa solução é variável e os testes devem começar com poucos segundos (15 a 30 segundos). Antes de mergulhar as lâminas na solução de hidróxido de bário, agitar vigorosamente a solução para dissolver a película que se forma quando a solução permanece sem agitação.
6. Assim que completar o tempo de incubação em hidróxido de bário, acrescentar água destilada no borel para que a solução de hidróxido de bário seja removida. (É importante não retirar a lâmina do borel enquanto a película de Ba(OH)₂ ainda estiver presente.
7. Em seguida, incubar as lâminas em 2x SSC por 30 minutos a 60°C.
8. Lavar em água destilada e deixar secar. Corar com Giemsa 10%.

IV. Impregnação por prata (Método Ag-NOR)

[baseada em Howell W.M. & Black, D.A. (1980) *Experientia* 36:1014-1015]

Soluções

- Solução nitrato de prata 50%;
- Solução gelatina 2% com ácido fórmico 1%.

Procedimentos

1. Gotejar as suspensões celulares em lâminas limpas. Deixar envelhecer por pelo menos 3 dias na geladeira ou a -20°C, ou em estufa a 37°C 1 a 2 dias.
2. Preparar a solução de nitrato de prata 50% (AgNO_3) em água MilliQ. Utilizar espátulas de plástico ou vidro. Após dissolver, filtrar a solução e armazenar em vidro âmbar.
3. Preparar solução de gelatina 2% com ácido fórmico 1%. Dissolver a gelatina em água MilliQ com aquecimento e mexendo sempre. Depois de dissolvida a gelatina, adicionar o ácido fórmico. Filtrar a solução e armazenar.
4. Em cima de cada lâmina, gotejar as soluções de gelatina e de nitrato de prata, na proporção 1 : 2. Por exemplo: 2 gotas de gelatina para 4 de nitrato de prata.
5. Misturar e colocar lamínula por cima. Incubar na estufa a 60°C. O tempo de incubação pode variar. Examinar o resultado antes de repetir o método com outra lâmina.

V. Coloração com Fluorocromo 4'-6 diamidino-2-fenilindole (DAPI)

Soluções

1. Tampão McIlvaine pH 7,0:

- 17,65 mL de *Solução A* (ácido cítrico 0,1M);
- 82,35 mL de *Solução B* (fosfato de sódio dibásico 0,2M);
- Completar o volume para 200 mL com água destilada (corrigir o pH antes de acertar o volume final).

2. DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) (Solução-mãe: 2,5 mg/mL; Solução de uso: 0,5 mg/mL)

Procedimentos

1. Após a técnica de bandamento C, descorar a lâmina com 50% ácido acético.
2. Incubar a lâmina em solução de uso de DAPI recém-preparada por 15 minutos, preferencialmente no escuro. USAR LUVAS
3. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina com tampão McIlvaine com auxílio de uma pipeta Pasteur. Alternativamente, lavar em três banhos sucessivos em tampão McIlvaine, de aproximadamente 1 minuto cada. A lavagem também pode ser feita com jatos fortes de água de torneira, por aproximadamente 3 minutos. Nesse caso, após a lavagem, incubar as lâminas em tampão McIlvaine por cerca de 1 minuto.
4. Deixar a lâmina secar ao ar e montá-la com uma nova lamínula, utilizando solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso, ou Vecta shield (12 µL).
5. Analisar em microscópio de epifluorescência.

VI. Extração de DNA de anfíbio

Método do TNES

Soluções

- TNES 5x (solução estoque): 250 mM Tampão Tris (pH7,5); NaCl (2M); 100 mM EDTA; 2,5% SDS; Completar com água destilada. Armazenar a -20°C .

- Proteinase K;
- NaCl (5M);
- Isopropanol 100%
- Etanol 70%;
- Tampão TE pH 8.
- Fenol equilibrado
- Clorofórmio

Procedimentos

1. Colocar 50 μL de TNES 1x*¹ gelado em um tubo de 1,5 mL;
2. Adicionar um pequeno fragmento de tecido no tubo e macerá-lo com auxílio de uma ponteira fechada ou com um pistilo esterilizado;
3. Acrescentar 550 μL de TNES no tubo e inverter para homogeneizar a solução;
4. Adicionar 3 μL de proteinase K (20 mg/mL) e incubar por 3 horas (no mínimo) a 55°C , agitando periodicamente;
5. Etapa opcional: deixar a amostra retornar à temperatura ambiente e acrescentar 3 μL de RNase A (10 mg/mL). Incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Deixar o material voltar à temperatura ambiente e adicionar 200 μL de NaCl 5M. O volume total agora é de 800 μL ;
7. Agitar vigorosamente;
8. Centrifugar a 15.000 g por 5 minutos;
9. Transferir o sobrenadante resultante (cerca de 600 μL) para um novo tubo com 600 μL de isopropanol*²;
10. Inverter gentilmente os tubos algumas vezes;
11. Centrifugar a 15.000 g por 5 minutos;

12. Descartar o sobrenadante e adicionar 200 μ L (aproximadamente) de etanol 70% para fazer a lavagem;
13. Inverter o tubo e centrifugar a 15.000 g por 5 min;
14. Descartar o sobrenadante e deixar os tubos invertidos em papel absorvente até secar;
15. Ressuspender o DNA em tampão (TE pH 8) (o volume de TE vai depender da quantidade de precipitado recuperado).

*¹ A solução de uso de TNES (TNES 1x) é obtida pela diluição da solução-estoque em água milli-Q autoclavada (1:5).

*² Em vez de 1 volume de isopropanol, pode ser usado 2,5 volumes de etanol absoluto gelado.

Observação: Para avaliar a qualidade (integridade) e a quantidade de DNA nas amostras obtidas, aplicar uma pequena quantidade dessas (em geral de 1 a 6 μ L) em gel de agarose (0,8 ou 1%) e submeter o DNA aí presente a eletroforese. Nesse caso, para a estimativa da concentração do DNA extraído, deverá ser utilizada uma amostra de DNA lambda, com concentração conhecida. Para uma quantificação mais precisa do DNA contido nas amostras e para uma avaliação de sua pureza, poderá ser utilizado um espectrofotômetro (ou NANODROP). Deverão ser feitas medidas de absorbância a 260 nm e 280 nm. A razão absorbância a 260 nm/absorbância a 280 nm deve estar entre 1,7 e 1,9. Um valor inferior a esse indica contaminação com proteínas e superior a ele, contaminação com RNA.

VII. Polymerase Chain Reaction (PCR)

A. PCR com reagentes avulsos

Soluções

- H₂O milli-Q autoclavada;
- Tampão 10x (Tris HCl 100 mM (pH 8,4); KCL 500 mM)
- MgCl₂ 50mM;
- dNTP 40 mM;
 - 10 µL de dATP 100 mM
 - 10 µL de dCTP 100 mM
 - 10 µL de dGTP 100 mM
 - 10 µL de dTTP 100 mM
 - 60 µL de H₂O milli-Q autoclavada
(para 100 µL de solução final)
- Primers (na concentração de 7 ou 10 pmoles/ µL);
- Amostra do DNA;
- *Taq* polimerase.

Procedimentos

1. Adicionar em um tubo de 0,2 mL, os componentes listados abaixo, seguindo corretamente a ordem estabelecida:

- 12,5 µL de H₂O milli-Q autoclavada*;
- 2,5 µL de Tampão 10x;
- 3 µL de MgCl₂ 50mM (Esse volume pode ser ajustado se necessário);
- 2 µL de dNTP 40 mM;
- 2 µL de cada Primer;
- 0,5 µL da amostra de DNA*.
- 0,5 µL de *Taq* polimerase

*Esses volumes devem ser ajustados conforme a concentração do DNA a ser utilizado, de tal forma que o volume final seja de 25µL.

2. Colocar os tubos no Termociclador (configurar de acordo com o programa desejado).

B. PCR com o kit RTG (GE Healthcare)

Soluções

- Kit RTG-PCR beads (GE Healthcare);
- H₂O milli-Q autoclavada;
- Primers (na concentração de 7 ou 10 pmoles/ μ L);
- Amostra do DNA.

Procedimentos

1. Adicionar nos tubos do Kit, para um volume final de 25 μ L:

- 20,5 μ L de H₂O milli-Q autoclavada;
- 2 μ L de cada Primer;
- 0,5 μ L da amostra de DNA (Esse volume pode ser alterado conforme a concentração do DNA, porém o volume final dever ser de 25 μ L.)

2. Colocar os tubos no Termociclador (programar de acordo com o programa desejado).

Ao final do PCR, verificar o produto da amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%.

VIII. Eletroforese em gel de agarose

Soluções

- Agarose;
- Brometo de etídio 5 µg/mL (Preparar essa solução a partir da solução-mãe existente. Usar TBE para fazer a diluição.)
- Loading Dye;
 - 0,25% de azul de bromofenol;
 - 0,25% de xilenocianol;
 - 40% de sacarose.
- Tampão de Diluição (TE para DNA):
 - Tris-HCL 10 mM pH 7,4;
 - NaCl 5 mM;
 - EDTA 0,1 mM.
- Tris-Borato-EDTA (TBE 5x)*
 - 54 g de Tris-base;
 - 27,5 g de ácido bórico;
 - 20 mL de EDTA 0,5M (pH8,0);
 - Complete o volume com água destilada para 1 litro de solução.

Procedimentos

1. Pesar a agarose de acordo com a concentração desejada (0,8%, no caso da eletroforese de DNA genômico; 1%, para eletroforese de produtos de PCR; 1,2% para análise de fragmentos de restrição).
2. Dissolver a agarose em TBE* (0,5x ou 1x) em microondas, agitando periodicamente (aproximadamente 2 minutos à potência média-baixa).
3. Esperar a solução esfriar um pouco (até chegar a uma temperatura que permita que o erlenmeyer seja tocado) e derramá-la no suporte com o pente.
4. Esperar cerca de 20 minutos para que o gel solidifique.
5. Transferir o gel, sem o pente, para uma cuba contendo TBE* na mesma concentração daquela utilizada para a confecção do gel.

6. Aplicar as amostras e ligar a fonte elétrica. Ajustar a voltagem conforme o tamanho da cuba utilizada (cuba pequena para mini-gel: ajustar para 80-100V).
7. Corar o gel em solução de brometo de etídio (5 µg/mL) por 10-20 minutos.

OBS: Pode-se usar tampão TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA) no lugar de TBE. Nesse caso, o preparo do gel também deve ser realizado com esse mesmo tampão. TAE 5x: 24,2 g de Tris-Base; 5,7 mL de ácido acético glacial; 10 mL de EDTA 0,5M pH8,0; Completar com água para 1 litro.

IX. Purificação de produto de PCR

Kit GFX PCR and Gel Band DNA Purification (GE Healthcare) (Ler o manual que acompanha o produto antes de iniciar o procedimento)

A. Partindo do gel de agarose

1. Pesar um tubo (1,5 mL) vazio.
2. Recortar do gel de agarose a banda de interesse e colocá-la no tubo.
3. Pesar o tubo novamente, agora com o conteúdo acrescentado.
4. Calcular o peso do fragmento de agarose contendo o DNA de interesse.

A partir dessa etapa, utilizar o Kit GFX PCR and Gel Band DNA Purification (GE Healthcare):

5. Adicionar 300-500 µL do Tampão de Captura (10 µL a cada 10 mg de gel recortado).
6. Misturar e incubar a 60°C até a agarose dissolver completamente (aproximadamente 15 minutos).
7. Centrifugar rapidamente (dar um *spin*) os tubos com as amostras.
8. Transferir todo o conteúdo para uma coluna, colocada sobre um tubo coletor.
9. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos.
11. Descartar o conteúdo do tubo coletor.
12. Adicionar 500 µL do Tampão de Lavagem (com etanol previamente adicionado) na coluna.
13. Centrifugar a 13.000 rpm por 30-50 segundos.
14. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo novo (1,5 mL).
15. Aplicar de 10 – 50 µL do Tampão de Eluição diretamente no centro do filtro da coluna.
16. Manter as colunas por 1 minuto em temperatura ambiente.
17. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto e guardar a amostra a – 20°C.

B. Partindo do produto de PCR

1. Colocar uma coluna em um tubo coletor.
2. Adicionar 500 µL do Tampão de Captura e todo o produto de PCR a ser purificado na coluna (Lavar o tubo de PCR com um pouco desse tampão e homogeneizar o conteúdo na coluna. Cuidado para não tocar o filtro na base da coluna).
3. Centrifugar a 13.00 rpm por 30 segundos.
4. Descartar o conteúdo do tubo coletor.
5. Adicionar 500 µL do Tampão de Lavagem (com etanol previamente adicionado) na coluna.
6. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 segundos (Contar o tempo depois de atingida a velocidade indicada.).
7. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo novo (1,5 mL).
8. Aplicar de 10 – 50 µL do Tampão de Eluição diretamente no centro do filtro da coluna.
9. Manter a coluna por 1 minuto em temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto e guardar a amostra a – 20°C.

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (Ler o manual que acompanha o produto antes de iniciar o procedimento)

A. Partindo do gel de agarose

1. Pesar um tubo (1,5 mL) vazio.
2. Recortar do gel de agarose a banda de interesse e colocá-la no tubo.
3. Pesar o tubo novamente, agora com o conteúdo acrescentado.
4. Calcular o peso do fragmento de agarose contendo o DNA de interesse.

A partir dessa etapa, utilizar o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega):

5. Adicionar 10 µL de Membrane Binding Solution a cada 10 mg de gel recortado.
6. Misturar e incubar a 50-65°C até a agarose dissolver completamente (aproximadamente 15 minutos).
7. Centrifugar rapidamente (dar um *spin*) os tubos com as amostras.
8. Transferir todo o conteúdo para uma coluna, colocada sobre um tubo coletor.
9. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente.

10. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto.
11. Descartar o conteúdo do tubo coletor.
12. Adicionar 700 µL do Tampão de Lavagem - Membrane Wash Solution (com etanol previamente adicionado) na coluna.
13. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto.
14. Repetir passo 12 com 500 µL do Tampão de Lavagem - Membrane Wash Solution e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
15. Esvaziar o tubo coletor e centrifugar novamente a coluna por mais 1 minuto para evaporação de qualquer resíduo de etanol.
16. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo novo (1,5 mL).
17. Aplicar de 10 – 50 µL do Tampão de Eluição diretamente no centro do filtro da coluna.
18. Manter as colunas por 1 minuto em temperatura ambiente.
19. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto e guardar a amostra a – 20°C.

B. Partindo do produto de PCR

1. Adicionar volume igual de Membrane Binding Solution ao volume de PCR.
2. Centrifugar rapidamente (dar um *spin*) os tubos com as amostras.
3. Transferir todo o conteúdo para uma coluna, colocada sobre um tubo coletor.
4. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto.
6. Descartar o conteúdo do tubo coletor.
7. Adicionar 700 µL do Tampão de Lavagem - Membrane Wash Solution (com etanol previamente adicionado) na coluna.
8. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto.
9. Repetir passo 12 com 500 µL do Tampão de Lavagem - Membrane Wash Solution e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
10. Esvaziar o tubo coletor e centrifugar novamente a coluna por mais 1 minuto para evaporação de qualquer resíduo de etanol.
11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo novo (1,5 mL).
12. Aplicar de 10 – 50 µL do Tampão de Eluição diretamente no centro do filtro da coluna.
13. Manter as colunas por 1 minuto em temperatura ambiente.

14. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto e guardar a amostra a – 20°C.

OBS: Para visualização do produto purificado, submeter uma amostra a eletroforese em gel de agarose 1%. Se necessário, acrescentar na amostra a ser aplicada 1 µL de glicerina.

X. Sequenciamento de DNA

1. Preparar uma mistura que contenha BigDye Terminator (Amersham), tampão “save money” ou tampão fornecido pelo kit BigDye Terminator e água milli-Q autoclavada. Se a amostra a ser sequenciada estiver com boa concentração de DNA, utilize 8 µL dessa mistura por amostra. Cada 8 µL da mistura deve conter:

- 3 µL de tampão Save Money Applied Biosciences (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂);

- 4 µL de água milli-Q autoclavada

- 1 µL de BigDye Terminator (deve ser colocado por último, protegido da luz).

2. Manter a mistura em gelo, protegida da luz.

3. Colocar 1 µL do primer e 1 µL da amostra de DNA a ser sequenciado em cada tubo de PCR (de 0,5 µL) ou em cada poço da placa de sequenciamento.

4. Colocar 8 µL dessa mistura contendo BigDye Terminator em cada tubo de PCR (de 0,5 µL) ou em cada poço da placa de sequenciamento.

5. Centrifugar rapidamente os tubos/a placa para que todo o conteúdo vá ao fundo.

6. Submeter ao seguinte programa em uma termocicladora:

a. 96°C por 60 s;

b. 96 °C por 10 s;

c. 57 °C por 6 s;

d. 60 °C por 4 min;

e. Repetir b-d por 35 vezes;

f. 10 °C (*hold*).

7. Acrescentar em cada tubo/poço 80 µL de etanol 80% e armazenar as amostras no escuro por 15 minutos.

8. Centrifugar a velocidade máxima por 30 minutos.

9. Inverter os tubos/poços para a remoção do sobrenadante.

10. Acrescentar 150 µL de etanol 70% e centrifugar por 10 minutos.

11. Inverter os tubos/placa para a remoção do sobrenadante. (No caso da utilização da placa, centrifugar rapidamente (um *spin*) com a placa invertida, sobre uma folha de papel absorvente.)

12. Deixar secar no escuro em local seco. (Alternativamente secar com o auxílio de centrífuga *speed vac*.)
13. Fechar os tubos ou selar as placas.
14. Cobrir os tubos/a placa com papel alumínio e enviar para o setor de sequenciamento.

XI. Meio de cultura de bactérias

A. Preparo do Meio LB Líquido

Material

- Água destilada;
- Meio DifcoTM LB Broth, Miller (Luria-Bertani)

Procedimento

1. Pesar 25 g do meio em pó e adicionar a 1 L de água destilada.
2. Agitar até dissolver completamente.
3. Autoclavar a solução a 121°C por 20 minutos.
4. Guardar a 4°C até o uso.

B. Preparo do Meio LB Sólido (AGAR)

Material

- Água destilada
- Meio DifcoTM LB AGAR, Miller (Luria-Bertani)

Procedimento

1. Pesar 20 g do meio em pó e adicionar a 500 mL de água destilada.
2. Agitar e ferver até dissolver completamente.
3. Autoclavar a solução a 121°C por 20 minutos.
4. Guardar a 4°C até o uso.

XII. Clonagem

A. Ligação do produto de PCR ao vetor pGEM-T easy Vector (Promega) (Ler o manual que acompanha o produto antes de iniciar o procedimento)

OBS: Fazer em câmara de fluxo laminar!

Soluções

- Tampão 2x;
- Amostra do DNA a ser clonado;
- Vetor pGEM-T easy Vector;
- Enzima T4 DNA ligase.

Procedimento

1. Em um tubo com capacidade para 1,5 mL, adicionar:

- 5 µL do Tampão 2x
- 3 µL do DNA
- 1 µL do Vetor pGEM-T easy Vector
- 1 µL da DNA ligase T4

2. Incubar a 4°C *overnight*.

B. Transformação de bactérias com o kit da Fermentas (Ler o manual que acompanha o produto antes de iniciar o procedimento)

Materiais

- Solução de Ligação com o vetor pGEM-T easy Vector;
- Bactérias *E. coli* da linhagem JM 109 (Promega);
- Bactérias *E. coli* da linhagem DH 5α (Fermentas);
- Meio Líquido LB

Procedimentos

1. Descongelar as bactérias (JM109 não-competentes) na mão. Transferir 150 μ L da cultura para 2 mL de Meio C pré-aquecido (fornecido pelo kit).
2. Incubar *overnight* a 37°C no shaker.
3. Aquecer 1,5 mL de Meio C em um tubo de 15 mL. Transferir 150 μ L da cultura bacteriana para esse tubo. Incubar por 20 minutos a 37°C no shaker.
4. Preparar a solução-T do TransformationAid™ Bacterial Transformation Kit misturando volumes iguais da Solução-T (A) e da Solução-T (B) (500 μ L é suficiente para 2 transformações). Manter no gelo.
5. Transferir o volume de 1,5 mL do tubo de 15 mL para um tubo eppendorf e centrifugar o tubo com as bactérias a 13.000 rpm por 1 minuto e descartar o sobrenadante.
6. Ressuspender o pellet com 300 μ L da Solução-T e incubar no gelo por 5 minutos.
7. Centrifugar novamente os tubos com as bactérias a 13.000 rpm por 1 minuto e descartar o sobrenadante.
8. Ressuspender o pellet com 120 μ L da Solução-T e incubar no gelo por 5 minutos.
9. Separar 5 μ L da Solução de Ligação em novos tubos e incubar no gelo por 2 minutos.
10. Adicionar 50 μ L da solução de bactérias em cada tubo contendo a ligação, misturar e incubar no gelo por 5 minutos.
11. Plaquear todo o conteúdo em placas de petri contendo meio LB sólido (25 mL), ampicilina (100 μ L), X-Gal (100 μ L) e IPTG (15 μ L) (ver item E), previamente aquecidas a 37°C.

C. Preparo das placas com ampicilina, X-Gal e IPTG

Materiais e Solução

- Placas com o Meio Sólido LB;
- Meio Líquido LB;
- Ampicilina 25 mg/mL
- IPTG 50 mM;
- X-Gal 2% em dimetilformamida (solução de uso);
- Solução de bactérias com o plasmídeo recombinante.

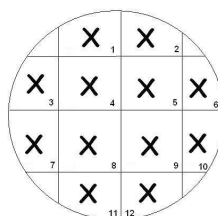
Procedimentos

1. No fluxo, preparar as placas de meio sólido, colocando aproximadamente 25 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL de meio) em cada placa e deixar endurecer e ficar bem seca.
2. Aplicar 80 µL de Ampicilina em cada placa se a placa permanecer muito tempo na geladeira antes de ser utilizada. Espalhar com alça de vidro e deixar secar.
3. Aplicar 100 µL de X-Gal, 15 µL de IPTG. Misturar com alça e deixar secar.
4. Incubar a 37°C por 1 hora e plaquear as bactérias.

D. Seleção dos clones recombinantes

Procedimentos

1. Em câmara asséptica, coletar com o auxílio de ponteiros esterilizados as colônias brancas que estiverem mais isoladas e maiores.
2. Plaquear o material coletado de cada colônia em forma de “X” em uma nova placa com meio sólido LB contendo ampicilina (100 µg/mL de meio), conforme ilustra a figura abaixo:



3. Incubar a 37°C por 24 horas.
4. Realizar o PCR e/ou a extração plasmidial seguindo os procedimentos descritos nos itens F e XI a seguir.

F. PCR a partir de amostra de bactérias

Procedimentos

1. Com o auxílio de uma ponteira de plástico, coletar as bactérias contidas em metade de uma das hastes do “X”;
2. Colocar em um tubo plástico de 0,5mL contendo 20 µL de água milli-Q autoclavada;
3. Incubar por 5 minutos a 95°C por 5-10 minutos em termocicladora.
4. Utilizar 5-10 µL dessa amostra em uma reação de PCR com volume total de 25 µL, realizada na presença dos primers T7 e SP6, seguido a seguinte programação:
 - 1 Ciclo de 94°C por 1 min.;
 - 29 Ciclos de: 94°C por 1 min. – 55°C por 2 min. - 72°C por 2 min.;
 - 1 Ciclo de 72°C por 1 minuto.

XIII. Extração de plasmídeo – Mini-Prep

Soluções

Solução I:

-25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

-10 mM EDTA (pH 8,0)

Preparar 100 mL, autoclavar e estocar a 4°C.

Solução II:

- 0,2 mL NaOH 10N (0,2N final)

- 0,5 mL SDS 20% (1% final)

- 9,3 mL de água destilada

Manter estoque à temperatura ambiente por no máximo uma semana.

Solução III:

- Acetato de potássio 3M (pH 5,4)

- Acertar o pH com ácido acético glacial.

- Essa solução não precisa ser autoclavada. Manter a 4°C.

Etanol 100%

Álcool 70%

Procedimentos

1. Em um tubo com capacidade para 1,5 mL, colocar 1 mL de Meio Líquido LB e 4µL de Ampicilina (25 mg/mL).
2. Selecionar com uma ponteira ou palito de dente autoclavado apenas metade de uma haste da colônia de bactérias e colocar no tubo.
3. Inverter até o Meio Líquido ficar turvo.
4. Incubar a 37°C por 1 hora. Inverter os tubos periodicamente.
5. Centrifugar a 12.000g em temperatura ambiente por 2 minutos e descartar o sobrenadante, deixando o precipitado o mais seco possível.
6. Ressuspender o precipitado em 100 µL de solução I gelada e misturar por vortex.

7. Deixar de 1-5 minutos no gelo.
8. Adicionar 200 μ L de solução II a RT.
9. Fechar o tubo e misturar por inversão 5 vezes.
10. Manter em gelo por 3 minutos.
11. Adicionar 150 μ L de solução III gelada.
12. Fechar o tubo e inverter gentilmente por 10 segundos.
13. Manter o tubo em gelo por 15 minutos a 3 dias.
14. Centrifugar a 12.000g por 3 minutos e transferir 400 μ L de sobrenadante a um tubo limpo.
15. Adicionar 1 mL de etanol 100% gelado, misturar bem por inversão e manter a -20°C de 1 hora a 3 dias.
16. Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos.
17. Dispensar o sobrenadante, lavar com álcool 70%, centrifugar por 2 minutos e manter o tubo invertido até secar bem.
18. Ressuspender em 30 μ L de H₂O milli-Q autoclavada ou TE (Tris-EDTA) pH 8;
19. Manter a -20°C e utilizar 10 μ l para correr o gel.
20. Fazer PCR das amostras desejadas.

XIV. Técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A. Marcação do DNA - Por amplificação por PCR

1. Colocar em um tubo (volume final de 25 µL):

- 2,5 µL Tampão 10X;
- 3 µL MgCl₂ 50 mM;
- 1 µL Mix de dNTP para marcação*;
- 1 µL dUTP-bio (1mM) ou de dUTP-dig (1mM);
- 2 µL de cada primer;
- 2 µL da amostra de DNA;
- 1 ou 0,5 µl *Taq* polimerase;
- Completar para 25 µl com H₂O milli-Q autoclavada;

Procedimentos:

1. Colocar os tubos no Termociclador (configurar de acordo com o programa desejado).

*mix de nucleotídeos para marcação por PCR:

1 µL dATP 100 mM (Cf: 4mM); 1 µL dCTP 100 mM (Cf: 4mM); 1 µL dGTP 100 mM (Cf: 4mM); 0,75 µL dTTP 100 mM (Cf: 3mM); 21,25 µL de água milli-Q autoclavada.

A proporção dTTP:dUTP-DIG é de 3:1. Essa proporção pode ser alterada conforme o experimento.

B. Precipitação da sonda

Soluções

- Água destilada autoclavada;
- DNA de esperma de salmão sonificado (10 mg/ml);
- Acetato de sódio 3 M, pH 5.4;
- Etanol absoluto gelado;
- Etanol 70°GL gelado;
- Solução de hibridação a 37°C
- Meio de hibridação

Para 10 mL:

- Formamida deionizada: 5 mL (concentração final: 50%)
- 20xSSC: 1 mL (concentração final: 2xSSC)
- Tampão fosfato 1 M: 0,4 mL (concentração final: 40 mM)
- Solução Denhardt 50x: 0,2 mL (concentração final: 1x)
- SDS 10%: 1 mL (concentração final: 1%)
- Água milli-Q: 0,4 mL
- Dextran sulfato 50%: 2 mL (concentração final: 10%)

Acertar pH para 7,0.

Obs.: Não usar agitador magnético

Filtrar em milipore antes de acrescentar o dextran sulfato.

-Solução Denhardt (50 x)

Para 100 mL:

- 1 g de ficoll
- 1 g de PVP (polivinilpirrolidone)
- 1 g de BSA (Sigma Fr. V)
- Completar o volume com água milli-Q autoclavada.

Dissolver c/ agitador magnético.

Após a dissolução, filtrar em papel de filtro Watmann 3MM.

Estocar em alíquotas a -20°C .

Obs.: Pode ser estocado por mais de um ano.

Procedimentos

1. Completar com água destilada (ou milli-Q) o volume da solução contendo a sonda para 100 μL .
2. Adicionar 10 μL de DNA de esperma de salmão sonificado (10 mg/mL).
3. Adicionar 1/10 do volume existente (= 110 μL) de acetato de sódio 3 M, pH 5.4. Portanto adicionar 11 μL .
4. Adicionar $2 \frac{1}{2} \times$ o volume (=121 μL) de etanol absoluto gelado. Portanto adicionar 302,5 μL .

5. Inverter gentilmente o tubo e colocá-lo em freezer por cerca de 2hs (no mínimo 20 minutos e no máximo 1 semana).
6. Centrifugar a 12000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada.
7. Remover o sobrenadante invertendo cuidadosamente o tubo ou como auxílio de uma pipeta.
8. Adicionar 800 µL de etanol 70°GL gelado. Centrifugar a 12000 g por 5 minutos ou simplesmente descartar o sobrenadante.
9. Secar a parede do tubo com um papel de filtro. Não deixar a sonda secar por mais do que 10-15 minutos.
10. Adicionar 20 µL de solução de hibridação a 37°C (concentração final da sonda = 50 ng/µL). Vortexar, dar um spin e deixar a 37°C por cerca de 10 minutos (para melhor homogeneização da sonda).
11. Alternativamente ao item 10, adicionar ao DNA precipitado resultante do item 9: água (6 µL), formamida (15 µL), dextran sulfato (6 µL) e 20x SSC (3 µL). Vortexar, dar um spin e deixar a 37°C por cerca de 10 minutos.

Observação 1: Se a sonda não dissolver ao acrescentar solução de hibridação, deixá-la a 4°C *overnight*. Algumas sondas necessitarão de incubação a 37°C por cerca de 15-20 minutos para dissolver.

Observação 2: Fazer as diluições necessárias da sonda e estocar a solução-mãe no freezer (por até vários meses). Vortexar e dar um spin nas soluções de sonda em uso. Deixá-las em gelo.

C. Hibridação e lavagem

Soluções

- RNase 100 µg/mL;
- 2xSSC, pH 7.0;
- etanol 50°GL;
- etanol 75°GL;

- etanol absoluto;
- solução de 70% de formamida em 2xSSC (a 70°C) (80 mL). Manter a solução em banho-maria a 75°C por cerca de 20 minutos antes do uso. Utilizar a vidraria específica para uso com formamida. Essa solução deve ser preparada pouco antes do uso, utilizando-se luvas plásticas (que devem ser descartadas em seguida), e deve ser guardada em frascos de vidro depois de usada na desnaturação das lâminas, para ser reaproveitada para umedecer câmaras de hibridação.
- 2xSSC gelado;
- etanol 50°GL gelado;
- etanol 75 °GL gelado;
- etanol absoluto gelado;
- solução de 50% formamida para lavagem (a 37°C) - 160 mL:
- Sonda
 - Para FISH comum, diluir a sonda em meio de hibridação. A concentração ideal deve ser inferida por testes.
 - Para Double-FISH fazer um mix com as sondas marcadas com biotina e com digoxigenina.

Procedimentos

1. Colocar 150 µL de RNase (100 µL/mL) em cada lâmina, cobrir com lamínula de vidro 24x50cm e incubar por 1h a 37°C em câmara úmida.
2. Deixar as lâminas em 3 banhos de 3 minutos em solução de 2xSSC.
3. Desidratar as lâminas em álcool 50^o%, 75^o% e absoluto. Cada banho deve durar cerca de 3 minutos.
4. Colocar as sondas a 37°C por cerca de 10 minutos para melhor homogeneização.
5. Secar as lâminas à temperatura ambiente.
6. Desnaturar as lâminas em solução de 70% de formamida por 2 minutos a 70°C. Colocar 3 lâminas por vez em um mesmo borel para a desnaturação. A mesma solução pode ser usada para a desnaturação de até 10 lâminas no mesmo dia. **(Ver item 9)**
7. Lavar as lâminas em 2xSSC gelado por 2 minutos.

8. Desidratar as lâminas em álcool 50%, 75% e absoluto, gelados (2 minutos em cada álcool). Deixar no último álcool até a sonda ficar pronta. (Manter o borel de 2xSSC e os boréis de álcool em isopor com gelo.)
9. Quando as lâminas saírem da solução de formamida, colocar as sondas para desnaturar em banho-maria com água em ebulição ou a 96°C em banho-seco por 10 minutos. Após esse tempo, colocar rapidamente os tubos em gelo, dar um *spin* e voltá-los para o gelo.
10. Secar um pouco as lâminas ao ar. Quando ainda existirem algumas gotas de álcool, colocar 10ul de sonda por área de hibridação e cobrir com lamínula de plástico medindo 24x24cm.
11. Incubar as lâminas *overnight* (ou por 36 horas) a 37°C em um recipiente forrado com papel toalha umedecido com solução de formamida já utilizada para desnaturação.
12. Lavar as lâminas em 2 banhos de 2 minutos cada em solução de 50% de formamida a 37°C. Lavar em 2 banhos de 2 minutos em 2xSSC a 37°C.

D. Detecção das sondas

Soluções

1-BSA (Sigma A3912- Fração 5) 30% w/v

- Diluir em água destilada em béquer a 37°C overnight. Estocar em freezer.

2- PBT

- 0.4% de BSA 30% w/v
- 0.1% de tween 20 (Sigma ULTRA)
- Completar com PBS 1X

Filtrar antes do uso.

3- Anti-biotina (VECTOR) (SP 3000)

- solução-mãe

Diluir em água milli-Q (1 mL) e aliquotar. Manter a 4°C.

- solução de uso

Diluir em PBT 3:500 v/v na hora do uso em gelo.

4- Anti-goat IgG-FITC (VECTOR) (FI 5000)

- solução-mãe, estocar a -20°C

- solução de uso

Diluir em PBT 1:100 v/v na hora do uso em gelo.

5- Anti-dig-rodamina

- Diluir em PBT 0,5:100 na hora do uso

6- Double-FISH

- Fazer um mix com as soluções 4 e 5 nas mesmas concentrações.

7- PBS

8- Iodeto de propídio 1-2 µg/mL (diluir em água milli-Q)

9 - DAPI (Sol. estoque: 5 mg/mL em água).

10- antifading – Vecta shield (H 1000)

Procedimentos

1. Colocar as lâminas em PBT (2 banhos de 5 minutos cada).
2. Retirar uma lâmina por vez do PBT. Acrescentar 100 µL de anti-biotina (3:500 v/v em PBT) em cada lâmina e cobrir com lamínula de vidro 24x32cm.
3. Incubar em placa de Petri umedecida com PBS ou PBT por 45 minutos, a 37°C.
4. Lavar as lâminas em PBT por 5 minutos (1º banho).
5. Colocar as lâminas em novo PBT (2º banho). Não precisa no caso de detecção com anti-digoxigenina-rodamina. Nesse caso pular para o passo 8.
6. Retirar uma lâmina de cada vez. Acrescentar 100 µL de anti-goat IgG-FITC (1:100 v/v em PBT) e cobrir com lamínula de vidro 24x32cm.
7. Incubar em placa de Petri umedecida com PBS ou PBT por 45 minutos no escuro a 37°C.
8. Com luvas sem talco, remover as lamínulas, acrescentar 100 µL de iodeto de propídio (1-2 µL/mL) e colocar as mesmas lamínulas novamente. Após 1 minuto retirar as lamínulas e lavar cada lâmina com 3 jatos de PBS com uma pipeta Pasteur. Colocar 15-20 µL de Vecta shield em cada lâmina e cobrir com lamínula de acordo com o tamanho da área de análise da lâmina.
9. Comprimir a lâmina contra a lamínula para retirar o excesso de Vecta shield.
10. Para armazenar as lâminas, remover o Vecta shield com jatos de PBS e colocar a lamínula sobre um filme de PBS. Manter as lâminas no escuro.

Obs.: Os corantes PI e DAPI podem ser colocados no Vecta shield, o que dispensa a etapa de coloração.

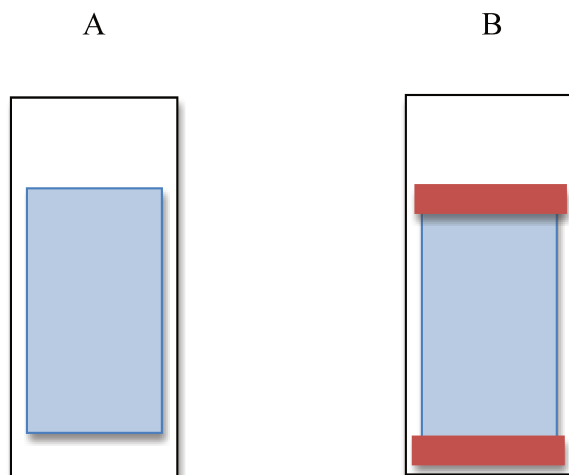
E. Técnica para remoção de sondas para reaproveitamento de preparações em experimentos de FISH

1. Lavar as lâminas com um jato de água para retirada da lamínula.
2. Lavar lâminas várias vezes com água destilada.
3. Incubar em formamida 70% a 70°C por 2'.
4. Incubar em 2XSSC gelado por 2'.
5. Incubar nos alcoóis 70%, 85% e 100% por 2'.
6. Manter no álcool 100% na geladeira até a hibridação.

XV. Microdissecção e pintura cromossômica

Preparação das lamínulas para microdissecção:

1. Utilizar lamínulas 25 x 75mm (código:1916-25075 Coverslips 25 x 75mm - Bellco Glass)
2. Recortar membranas de Polietileno naftaleno (PEN código ES361010; espessura: 0,0013 mm, www.goodfellow.com) do tamanho que caiba na lamínula, como no desenho A.
3. Antes de aderir a membrana na lamínula, colocar 30 µL de etanol absoluto e ajustar esticando a membrana.
4. Colar as extremidades da membrana na lamínula com esmalte como no desenho B.
5. Pingar a suspensão celular como de costume em cima da membrana.



Soluções

- Óleo mineral
- Kit WGA4 (GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification – Sigma-Aldrich)
- Kit de purificação de PCR
- Kit WGA3 (GenomePlex WGA Reamplification Kit –Sigma-Aldrich)
- Mix dNTP para sonda (10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 6,5 mM dTTP)
- dUTP-digoxigenina ou outro nucleotídeo marcado
- DNA competidor (ver próximo item)
- Formamida 70%

- Formamida 50%
- Dextran sulfato 10%
- 2x SSC
- Metanol
- PBT (vide item Hibridação *in situ*)

Procedimentos

1. Microdissecção dos cromossomos – microdissecar pelo menos 15 cromossomos de cada em tubos de 0,2 μ L com 2 μ L de óleo para PCR na tampa do tubo
2. Primeira amplificação: fazer segundo protocolo do kit WGA4 (GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification – Sigma-Aldrich)
3. Purificação do produto de amplificação WGA4 – ressuspender em 30 μ L de Elution Buffer. Olhar se no kit de purificação pede pra adicionar isopropanol para reter moléculas menores de DNA. Se pedir, usar.
4. Quantificação do produto purificado no Nanodrop
5. Segunda amplificação –Preparação da Sonda – usar 20 ng do produto para fazer a segunda amplificação pelo kit WGA3 (GenomePlex WGA Reamplification Kit –Sigma-Aldrich) com algumas modificações:
 - Não usar o dNTP mix que vem no kit. Utilizar um preparado para sonda que deve ter: 10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 6,5 mM dTTP.
 - O mix deve conter:
 - DNA – quantid necessária para 20 ng
 - dNTP mix para sonda(não do kit) – 1,5 μ L
 - dUTP-DIG (1mM) – 2 μ L
 - tampão do kit – 7,5 μ L
 - DNA polymerase do kit – 5 μ L
 - Água – completar para 75 μ L
6. Purificação do produto da reamplificação com WGA3 – ressuspender em 30 μ L de Elution Buffer e utilizar isopropanol também se o kit disser.
7. Quantificar o produto. Deve estar em torno de 200 ng/ μ L.
8. Quantificar o DNA competidor – não usar esperma de salmão – Usar o DNA competidor da própria espécie e usar 5 μ g na preparação da sonda.

9. Preparação da sonda:

- Master mix (formamida 50%, dextran 10%, 2x SSC) – 17,6 μ L
DNA competidor – 5 μ g
Produto do WGA3 purificado – 2 μ L
Água – completar para 22 μ L

10. Hibridação:

- Desnaturar a sonda a 72°C por 10 minutos, colocar no gelo por 3 minutos e depois a 37°C por 80 minutos.
- Desnaturar as lâminas em 70% formamida a 72°C por 2 minutos. Em seguida, desidratar as lâminas em soluções alcoólicas de metanol 70%, 90% e 100% por 3 minutos cada, com agitação e temperatura ambiente. Deixar a lâmina secando até a sonda ficar pronta.
- Assim que a sonda estiver pronta, colocar a sonda na região do material e cobrir com lamínula. Colocar em cuba de formamida e deixar ON.
- Lavagem: 2 banhos de formamida a 50% por 5 minutos a 42°C. Agitar as lâminas de vez em quando e esperar a lamínula sair sozinha.
- 3 banhos de 2xSSC por 5 minutos a temperatura ambiente – com agitação horizontal, mais ou menos 150 mL por placa de petri.
- 1 banho de PBT 1x por 5 minutos a temperatura ambiente – também com agitação horizontal.
- Incubar as lâminas em cuba úmida por 30 minutos com tampão PBT 1x em cima da lâmina.
- Detecção da sonda: diluir o anti-DIG em PBT (1:200) e aplicar 150 μ L em cada lâmina. Deixar a 37°C por 60 minutos.
- Lavar em 3 banhos de PBT 1x por 5 minutos cada com agitação.
- Montar as lâminas usando meio de montagem com DAPI.

DNA competidor

1. Diluir o DNA genômico a 100 – 500 ng/μL em NaCl 0,3M.
2. Aliquotar 500 μL do DNA em tubo eppendorf de 1,5 mL.
3. Autoclavar durante 30 minutos a 1,4 atm/120°C.
4. Checar a degradação do DNA em gel de agarose 1% (ideal obter fragmentos de 100 a 1000 pb).