



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



**Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia
Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

DIVERSIDADE GENÉTICA DE HILÍDEOS DO BRASIL CENTRAL

Goiânia, 2012



**Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia
Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

DIVERSIDADE GENÉTICA DE HILÍDEOS DO BRASIL CENTRAL

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biologia óÁrea de Concentração: Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás ó UFG, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientando: Hugo Henrique Pádua de Oliveira

Orientador: Dr. Aparecido Divino da Cruz, *Ph.D.*

Co-orientadora: Dr^a. Daniela de Melo e Silva

Goiânia, 2012



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

O48d Oliveira, Hugo Henrique Pádua de.
Diversidade genética de hilídeos do Brasil central
[manuscrito] / Hugo Henrique Pádua de Oliveira. - 2012.
xv, 72 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof^º. Dr. Aparecido Divino da Cruz; Co-
orientadora: Prof^ª. Dr^a. Daniela de Melo e Silva
Dissertação (Mestrado) ó Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Ciências Biológicas, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Hilídeos ó Evolução (biologia) ó Goiás 2. Anuros ó
Evolução (biologia) 3. Citogenética 4. Evolução das
espécies I. Título.

CDU: 597.8:575.8(817.3)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ter me permitido a vida e me concedido saúde, perseverança e por ter me dado condições de lutar e alcançar os objetivos pretendidos.

Agradeço aos meus pais, **Odenir Sales de Oliveira** e **Maria Abadia de Pádua Oliveira**, por todos os sacrifícios por eles realizados e que sem eles, nada disso seria possível.

A minha amada namorada **Dayane Cristina da Costa** pela paciência, compreensão e principalmente pelo grande carinho concedido para o sucesso na conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor **Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D** pelo incentivo e ensinamentos que contribuíram e contribuem a cada dia para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, o meu MUITO obrigado.

A Professora **Dr^a. Daniela de Melo e Silva**, minha querida co-orientadora, por te me acolhido desde o primeiro momento dos meus passos científicos ainda na graduação, e por todos os ensinamentos que levarei para o resto da vida.

Agradeço aos Professores **Cristiano Luiz Ribeiro M.Sc. e Dr. Claudio Carlos da Silva** pelas sugestões dos métodos utilizados, apoios fornecidos e o mais importante, pela grande amizade e eterno carinho sempre demonstrados a mim.

Ao Professor **Dr. Rogério Pereira Bastos**, da Universidade Federal de Goiás, pelas coletas dos espécimes estudados e imagens de alguns dos exemplares utilizados no presente estudo.

A Professora **Caroline Oliveira de Araújo Melo**, do Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás pela elaboração do Abstracto.

Aos meus amigos e professores de bancada, **Alex Silva da Cruz e Fernanda Godoy**, por serem tão positivos e acharem que tudo estava dando certo mesmo quando absolutamente tudo estava dando errado. Sem eles, tudo seria mais difícil.

Aos meus companheiros de cada dia, **José Silonardo e Wanessa Fernandes** que sempre acreditaram em meu potencial, estando sempre ao lado e auxiliando na solução de toda e qualquer dificuldade.

Ao meu grande amigo **Caio Cesar Neves Sousa**, pelas dezenas de vezes que realizou a leitura deste trabalho em busca dos pequenos erros que tanto passam aos nossos olhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos que facilitou bastante a realização deste trabalho.

A todos aqueles que colaboraram na realização e conclusão desse trabalho, minha gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
OBJETIVOS.....	XI
Objetivo Geral.....	XI
Objetivos Específicos.....	XI
CAPÍTULO I. Caracterização Citogenética de Hilídeos do Brasil Central.....	12
Resumo.....	12
Abstract.....	13
1. Anurofauna e o Bioma Cerrado.....	14
2. Morfologia, Sistemática e Taxonomia de Hilídeos.....	15
2.1. Morfologia e Distribuição das Espécies em Estudo.....	18
3. Um Panorama Geral da Citogenética de Anuros.....	20
3.1. Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).....	22
3.2. O Cariótipo dos Hilídeos.....	23
4. Materiais e Métodos.....	25
4.1. Área de Coleta e Anfíbios Estudados.....	25
4.2. Obtenção dos Preparados Cromossômicos.....	26
4.3. Coloração Convencional pelo Giemsa.....	27
4.4. Coloração pelo Nitrato de Prata (Ag-RON).....	27
4.5. Análise das Lâminas e Captura das Metáfases.....	28
5. Resultados e Discussão.....	28
Gênero <i>Hypsiboas</i>	30
Gênero <i>Pseudis</i>	32
Gênero <i>Scinax</i>	33
6. Considerações Finais.....	34

Genômica de Hilídeos do Brasil Central.....	35
.....	35
<i>Abstract</i>	36
1. Caracterização Ecológica dos Organismos de Estudo.....	37
2. Marcadores Moleculares: Mensurando a Variabilidade Genética.....	38
2.1. Marcadores Microsatélites.....	42
2.1.1. Transferibilidade de Marcadores Microsatélites.....	44
3. Ferramentas Genéticas para a Conservação de Anfíbios.....	46
4. Materiais e Métodos.....	48
4.1. Coletas de Material Biológico.....	48
4.2. Extração e Isolamento de DNA genômico.....	49
4.3. <i>Primers</i> para a Amplificação dos Loci Microsatélites.....	49
4.4. Caracterização dos Loci Microsatélites.....	51
5. Resultados e Discussão.....	51
6. Considerações Finais.....	58
Referências Bibliográficas.....	59

CAPÍTULO I. Caracterização Citogenética de Hilídeos do Brasil Central

- Figura 1.** Hipótese filogenética da família Hylidae, proposta por Faivovich *et al.* (2005)í .17
- Figura 2.** Espécies do gênero *Hypsiboas* (Anura, Hylidae) caracterizadas no presente estudo.....19
- Figura 3.** Espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) caracterizadas no presente estudo.....20
- Figura 4.** Representante da espécie *Pseudis bolbodactyla* (Anura, Hylidae) caracterizada no presente estudo.....20
- Figura 5.** Cariótipo do gênero *Hypsiboas* (Anura, Hylidae) indicando cariótipos simétricos e gradativos para as 4 espécies estudadas do Cerrado Goiano. Cromossomos corados com solução aquosa de Giemsa a 8%.....31
- Figura 6.** Cariótipo da espécie *Pseudis bolbodactyla* (Anura, Hylidae) indicando cariótipo simétrico e gradativos para as 3 espécimes estudadas do Cerrado Goiano. Cromossomos corados com solução aquosa de Giemsa a 8%.....32
- Figura 7.** Cariótipo do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) indicando cariótipos simétricos e gradativos para as 2 espécies estudadas do Cerrado Goiano. Cromossomos corados com solução aquosa de Giemsa a 8%.....33

CAPÍTULO II. Transferibilidade Genômica de Hilídeos do Brasil Central

- Figura 1.** Representação do mecanismo de *slippage*. Formação de alças de DNA durante o processo de replicação celular. Caso ocorra reanelamento de forma incorreta, haverá a adição ou a retirada de um motivo da fita de DNA nascente. Fonte: Ellegren (2004).....44
- Figura 2.** Gel de agarose a 2% indicando o padrão de bandas (alelos) dos produtos de PCR do loco *Hran1* transferido para espécie *Hypsiboas albopunctatus*.....53
- Figura 3.** Gel de agarose a 2% indicando o padrão de bandas (alelos) dos produtos de PCR do loco *Hran4* transferido para espécie *Hypsiboas albopunctatus*.....54
- Figura 4.** Relação Filogenética baseada em genes nucleares e mitocondriais para o Grupo *albopunctatus* com destaque para as espécies *Hypsiboas raniceps* e *Hypsiboas albopunctatus* utilizadas para o estudo de transferibilidade de marcadores microssatélites. Modificado de Wiens *et al.*, (2010).....56

CAPÍTULO I. Caracterização Citogenética de Hilídeos do Brasil Central

Tabela 1. Número de indivíduos e espécies e local de coleta dos exemplares no estado de Goiás usados para o estudo da diversidade citogenética dos Anuros do Brasil Central.....26

Tabela 2. Critérios de classificação cromossômica baseado no índice centromérico (ic) e razão entre os braços cromossômicos (q/p).....28

Tabela 3. Dados morfométricos apresentando os valores de comprimento relativo, valor médio e desvio padrão dos índices centroméricos e posição do centrômero dos cromossomos mitóticos de *Hypsiboas multifasciatus*, *H. raniceps*, *H. lundii*, *H. albopunctatus*, *Pseudis bolbodactyla*, *Scinax similis* e *S. constrictus* usados no estudo da diversidade Citogenética de Anuros do Brasil Central, coletados no estado de Goiás.....29

CAPÍTULO II. Transferibilidade Genômica de Hilídeos do Brasil Central

Tabela 1. Descrição dos marcadores genéticos frequentemente utilizados em estudos de conservação e genética de populações.....41

Tabela 2. Descrição das seqüências dos *primers* testados para locos microssatélites e tamanhos dos alelos amplificados em *Hypsiboas raniceps* (Arruda *et al.*, 2010).....50

Tabela 3. Protocolo de termociclagem de marcadores microssatélites desenvolvidos por Arruda *et al.* (2010) otimizados para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*.....52

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos por Arruda *et al.* (2010) para espécie *Hypsiboas raniceps* que apresentaram transferência positiva para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*.....53

Tabela 5. Caracterização dos locos transferidos com sucesso para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*.....57

GLAS E ABREVIATURAS

µL: Microlitro

AFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado

cm: Centímetros

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

FISH: Hibridação in situ fluorescente

IBAMA: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

IC: Índice Centromérico

ISAG: Sociedade Internacional de Genética Animal

IUCN: União Internacional para a Conservação da Natureza

M: Molar

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

ml: Mililitro

mM: Micromolar

ng: Nanograma

PB: Pares de base

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RAPD: Polimorfismo de DNA de Amplificação Aleatória

RFLP: Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição

RNAs: Ácido Ribonucléico

RONs: Região organizadora de Nucléolo

RPM: Rotações por minuto

rRNA: Ácido Ribonucléico ribossomal

SBH: Sociedade Brasileira de Herpetologia

SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único

STR: Repetições Curtas em Tandem

TBE: Tampão de Borato e EDTA

U: Unidade

VDS: Sistema de vídeo documentação

RESUMO

Dois componentes que contribuem para a evolução das espécies. Existem várias formas de se avaliar a estrutura genética de um organismo, população ou espécie. Entre estas formas destacam-se as técnicas baseadas em ferramentas citogenéticas e moleculares. O objetivo desse trabalho foi analisar citogeneticamente sete espécies da família Hylidae de áreas do cerrado goiano, por métodos de citogenética convencional, pela coloração por nitrato de prata e avaliar a transferibilidade de marcadores microsatélites previamente desenvolvidos para a espécie *Hypsiboas raniceps* em indivíduos da espécie *Hypsibos albopunctatus*, para a obtenção de marcadores moleculares, de forma rápida e de baixo custo que possam ser utilizados em estudos de genética de populações. Os estudos citogenéticos revelaram que as espécies *Hypsiboas multifasciatus* e *Hypsiboas raniceps* apresentaram o número diplóide $2n=24$ e número fundamental $NF=48$ com marcações positivas para as RONS nos pares cromossômicos 8 e 10 respectivamente. Já a espécie *Hypsiboas lundii* apresentou número diplóide $2n=24$ e número fundamental $NF=46$ devido a presença do cromossomo acrocêntrico no par 6. As RONS para esta espécie foram identificadas em regiões pericentroméricas dos braços curtos do cromossomo 5 e em regiões teloméricas dos braços curtos do cromossomo 8. Dentro do gênero *Hypsiboas*, apenas a espécie *Hypsiboas albopunctatus* apresentou número diplóide $2n=22$ e o número fundamental $NF=44$, sendo que a técnica de coloração por prata identificou a presença de RONS nos braços curtos das regiões teloméricas do par cromossômico 8. A espécie *Pseudis bolbodactyla* apresentou número diplóide $2n=24$ e $NF=46$ evidenciado pelo par acrocêntrico 4. A espécie *Scinax similis* apresentou cariótipo $2n=24$ e $NF=48$ com os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Foi encontrado para a espécie *Scinax constrictus* a notação cariotípica $2n=22$ e $NF=44$. Para o método de transferibilidade de *primers*, as ampliações por PCR foram otimizadas para o volume final de 25 μ l com 70ng de DNA template. Dos 16 *primers* testados, apenas os *primers* *Hrani μ 1* e *Hrani μ 4* foram transferidos com sucesso, indicando baixa homologia genética entre as espécies *H. raniceps* e *H. albopunctatus*. Os parâmetros, heterozigidade observada e esperada, índice de exclusão de parentesco (Q) e índice de identidade genética (I) também foram avaliados indicando baixa eficiência destes marcadores para os estudos populacionais. A baixa taxa de amplificação se justifica tanto pela diferença genética em sítios de anelamentos dos primers quanto pelo extenso tamanho genoma dos anfíbios.

Palavras-Chave: Citogenética, transferibilidade, Hylidae, anuros e Cerrado

ABSTRACT

Genetic diversity is one of the major components that contribute to the evolution of species. There are several ways to evaluate the genetic structure of an organism population or species. Among these forms, there are the techniques based on molecular and cytogenetic tools. The aim of this study was to analyze cytogenetically species of the family Hylidae of areas of the Cerrado of Goiás, by the technique of conventional cytogenetics, by silver nitrate staining and evaluate the transferability of microsatellite markers previously developed for the *Hypsiboas raniceps* species in individuals of *Hypsibos albopunctatus*, to obtain molecular markers, quickly and low cost that can be used in studies of genetics population. The cytogenetic study revealed that the *Hypsiboas multifasciatus* and *Hypsiboas raniceps* species presented the diploid number $2n=24$ and fundamental number $FN=48$ with positive marks for NORs in chromosomes 8 and 10 respectively. The species *Hypsiboas lundii* presented diploid number $2n=24$ and fundamental number $FN = 46$ due to the presence of acrocentric chromosome in pair 6. The RONS for this species were identified in pericentromeric regions of short arms of chromosome 5 and in telomeric regions of short arms of chromosome 8. Within the genus *Hypsiboas*, only the species *Hypsiboas albopunctatus* presented diploid number $2n=22$ and fundamental number $FN=44$, and by silver staining technique we identified the presence of NORs on the short arms of the telomeric regions of chromosome pair 8. The species *Pseudis bolbodactyla* presented diploid number $2n=24$ and $FN=46$ evidenced by the acrocentric pair 4. The species *Scinax similis* presented karyotype $2n=24$ and $FN=48$ with metacentric and submetacentric chromosomes. We found for the species *Scinax constrictus* the karyotype notation $2n=22$ and $FN=44$. For the method of portability of primers, the PCR amplifications were optimized for a final volume of 25 μ l with 70ng of template DNA. Of the sixteen primers tested, only the primers *Hrani μ 1* and *Hrani μ 4* were successfully transferred, indicating low genetic homology between the species *H. raniceps* and *H. albopunctatus*. The parameters, observed and expected heterozygosity, parentage exclusion index (Q) and index of genetic identity (I) were also evaluated indicating low efficiency of these markers for population studies. The low rate of amplification is justified both by the difference in genetic anenaling sites of the primers and the extensive genome size of amphibians.

Keywords: Cytogenetic, transferability, Hylidae , anuran, Cerrado

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética de hilídeos do Cerrado goiano, utilizando técnicas de citogenética clássica e biologia molecular.

Objetivos Específicos

- Avaliar o número e a morfologia dos cromossomos de hilídeos do Cerrado goiano.
- Verificar a existência de cromossomos supranumerários ou cromossomos B em populações de hilídeos do Brasil Central.
- Identificar a ocorrência de polimorfismos em regiões organizadoras de nucléolo e as diferentes populações de hilídeos do Cerrado goiano com amostras previamente caracterizadas de outras populações em outros biomas.
- Testar marcadores moleculares já existentes em espécies geneticamente próximas.
- Associar os resultados das análises das transferências dos marcadores moleculares encontrados com aqueles descritos na literatura para outros animais com ênfase no grupo dos anfíbios.

Resumo

Os anuros são um grupo de vertebrados de ampla distribuição geográfica que obtiveram um grande sucesso evolutivo, fazendo parte de uma linhagem descendente dos primeiros tetrápodes, os primeiros vertebrados a conquistarem o ambiente terrestre. Os anuros encontram-se divididos em duas subordens: Archaeobatrachia e Neobatrachia. Dentro da subordem Neobatrachia há a superfamília Bufonoidea, que inclui as três famílias de maior abundância na região neotropical: Leptodactylidae, Bufonidae e Hylidae. O objetivo desse estudo foi analisar citogeneticamente espécies da família Hylidae de áreas do cerrado goiano, pela técnica de citogenética convencional e pela coloração por nitrato de prata. As metáfases foram obtidas diretamente a partir de suspensões celulares de baço, fígado e medula óssea. As lâminas foram coradas com Giemsa a 8%, para determinação do número diplóide e morfologia cromossômica. As espécies *Hypsiboas multifasciatus* e *Hypsiboas raniceps* apresentaram o número diplóide $2n=24$ e número fundamental $NF=48$ com marcações positivas para as RONS nos pares cromossômicos 8 e 10 respectivamente. Já a espécie *Hypsiboas lundii* apresentou número diplóide $2n=24$ e número fundamental $NF=46$ devido a presença do cromossomo acrocêntrico no par 6. As RONS para esta espécie foram identificadas em regiões pericentroméricas dos braços curtos do cromossomo 5 e em regiões teloméricas dos braços curtos do cromossomo 8. Dentro do gênero *Hypsiboas*, apenas a espécie *Hypsiboas albopunctatus* apresentou número diplóide $2n=22$ e o número fundamental $NF = 44$, sendo que a técnica de coloração por prata identificou a presença de RONS nos braços curtos das regiões teloméricas do par cromossômico 8. A espécie *Pseudis bolbodactyla* apresentou número diplóide $2n=24$ e $NF=46$ evidenciado pelo par acrocêntrico 4. As espécies do gênero *Scinax* apresentaram diferentes notações cariotípicas. *Scinax similis* apresentou cariótipo $2n=24$ e $NF=48$ com os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, enquanto que *Scinax constrictus* apresentou notação cariotípica $2n=22$ e $NF=44$. A morfologia de alguns dos cromossomos encontrados no presente estudo difere de seus representantes descritos na literatura. As diferenças observadas podem ser explicadas através da adoção de diferentes critérios utilizados para a classificação dos cromossomos.

Palavras-Chave: Citogenética, anuros, Hylidae, Cerrado

Abstract

The anurans are a group of vertebrates with wide geographical distribution that obtained highly evolutionary success, being part of a lineage descendant of early tetrapods, the first vertebrates to conquer the terrestrial environment. Anurans are divided into two suborders: Archaeobatrachia and Neobatrachia. Within the suborder Neobatrachia there is Bufonoidea superfamily, which includes the three families of higher abundance in the neotropical region: Leptodactylidae, Bufonidae and Hylidae. The aim of this study was to analyze cytogenetically species of the family Hylidae of areas of the Cerrado of Goiás, by the technique of conventional cytogenetics and by silver nitrate staining. The metaphases were obtained directly from cell suspensions of spleen, liver and bone marrow. The slides were stained with Giemsa at 8%, to determine the diploid number and chromosome morphology. The species *Hypsiboas multifasciatus* and *Hypsiboas raniceps* presented the diploid number $2n=24$ and fundamental number $FN=48$ with positive marks for NORs in chromosomes 8 and 10 respectively. The species *Hypsiboas lundii* presented diploid number $2n=24$ and fundamental number $FN=46$ due to the presence of acrocentric chromosome in pair 6. The RONS for this species were identified in pericentromeric regions of short arms of chromosome 5 and in telomeric regions of short arms of chromosome 8. Within the genus *Hypsiboas*, only the species *Hypsiboas albopunctatus* presented diploid number $2n=22$ and fundamental number $FN = 44$, and by silver staining technique we identified the presence of NORs on the short arms of the telomeric regions of chromosome pair 8. The species *Pseudis bolbodactyla* presented diploid number $2n=24$ and $FN=46$ evidenced by the acrocentric pair 4. The species *Scinax similis* and *Scinax constrictus* showed different karyotypic notations. The species *Scinax similis* presented karyotype $2n=24$ and $FN=48$ with methacentric and submethacentric chromosomes. We found for the species *Scinax constrictus* the karyotype notation $2n=22$ and $FN=44$. Differences in the morphology of chromosomes with respect to literature data can be explained by the different criteria used for classification of the chromosomes. The morphology of some of the chromosomes found in this study differs from their representatives described in the literature, and such differences may be explained by adopting different criteria for the classification of chromosomes.

Keywords: Cytogenetic, anuran, Hylidae, Cerrado

1. Anurofauna e o Bioma Cerrado

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando cerca de 2.000.000 Km² distribuídos pelos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, parte sul do Mato Grosso, o Oeste e Norte de Minas Gerais, Sul do Maranhão, grande parte do Piauí. O cerrado prolonga-se ainda em forma de corredor até Rondônia e de forma disjunta ocorre em algumas áreas do Nordeste brasileiro e em São Paulo (Barbosa, 2006).

Estudos sobre o cerrado indicam que este é um sistema biogeográfico composto por diversos subsistemas intimamente ligados. Tais características aliadas a um elevado índice de degradação (apenas 20% de sua área total se encontra preservada e somente 1,2 % encontra-se protegida em áreas de conservação) contribuíram para que este bioma se tornasse uma das 25 áreas de conservação prioritárias do planeta (Myers *et al.*, 2000; Brasileiro *et al.*, 2005; Marris, 2005). Esta diversidade de ambientes é um fator que contribui para diversificação faunística, permitindo a ocorrência de animais de pequeno e médio porte, adaptados a ambientes secos e úmidos, totalizando uma riqueza biológica estimada em aproximadamente 160.000 espécies (Barbosa, 2006; Dias, 1992).

Os anfíbios foram os primeiros vertebrados a conquistarem o ambiente terrestre, há cerca de 350-400 milhões de anos, no período Devoniano (Kwet; Di-Bernardo, 1999). As três ordens viventes que compõem a classe Amphibia são facilmente distinguidas entre si. Os Gymnophionas, conhecidos como cobras-cegas ou cecílias, não tem membros e o corpo é longo e cilíndrico. Os Urodelas, representados pelas salamandras e tritões que possuem corpo alongado, membros e cauda e os Anuros, que incluem os sapos, rãs e pererecas que apresentam corpo curto e membros, sendo as posteriores mais longos e adaptadas para o salto, com cauda apenas em sua fase larval. O grupo dos anuros são os vertebrados mais antigos entre os que possuem quatro membros, mas também são os animais mais complexos que ainda possuem larvas (Izecksohn; Carvalho-e-Silva, 2001).

Atualmente são conhecidas 6.638 espécies de anfíbios em todo o mundo, sendo que 5.858 pertencentes à ordem anura. Os anuros são animais cosmopolitas apresentando uma distribuição heterogênea com predominância nas regiões tropicais (Pough *et al.*, 2002; Frost, 2011). Possuem adaptações características ao grupo como membros posteriores alongados e as últimas vértebras fundidas adaptadas para saltos. Desempenham importante papel ecológico no controle de populações de insetos e outros invertebrados, principais itens de sua

dos vertebrados mais sensíveis a variação do meio ambiente, sendo utilizados como sistemas de biomarcadores ambientais (Eterovick; Sazima, 2004).

Os anuros apresentam características morfológicas conservadas, o que dificulta o uso dos mesmos em estudos taxonômicos e filogenéticos, nesse contexto, outros métodos de análises como a citogenética são necessários para esclarecer conflitos de natureza biológica (Veiga-Menoncello *et al.*, 2003).

A anurofauna da América do Sul é a mais abundante do mundo. O Brasil possui a maior riqueza e a segunda maior diversidade ecológica de espécies de anuros, com 875 espécies descritas. Das espécies brasileiras, aproximadamente 131 ocorrem no bioma cerrado, correspondendo a pouco mais de 15% do total das nacionais (Colli *et al.*, 2002; SBH, 2011). Entretanto, o conhecimento sobre a anurofauna do cerrado ainda é muito limitado, devido aos poucos estudos relacionados a este grupo de animais, ainda é comum a descoberta de novas espécies de anuros no bioma Cerrado, já que a maioria dos estudos no Brasil foram conduzidos na região Sudeste do país (Bastos *et al.*, 2003; Bastos, 2005).

2. Morfologia, Sistemática e Taxonomia de Hilídeos

A família Hylidae está entre os mais diversificados e bem sucedidos anuros que ocorrem em áreas da Europa, norte da África e da Ásia, América do Sul e Central, oeste da Índia, Austrália e Nova Guiné. Os Hilídeos atualmente compõem a família mais numerosa dentre os anuros, sendo constituída por aproximadamente 901 espécies, das quais 338 espécies de 27 gêneros são encontradas no território brasileiro (Frost, 2011).

De natureza arborícola, os hilídeos possuem cabeça e olhos grandes e frequentemente membros alongadas com cintura afinada. São extremamente variáveis no tamanho, atingindo de 1,7 a 14 cm de comprimento. A aparência externa dos hilídeos também é variável, porém a presença de discos adesivos arredondados nas pontas dos dedos é uma característica comum descrita na maioria das espécies, o que os diferencia facilmente das demais famílias (Lima *et al.*, 2006).

A família Hylidae foi inicialmente dividida em quatro subfamílias: Amphignathodontinae, Hemiphractinae, Hylinae e Phyllomedusinae por Duellman (1970). Após os estudos de Trueb (1974), observou-se uma semelhança inerente entre os indivíduos das subfamílias Amphignathodontinae e Hemiphractinae sugerindo, portanto, que fossem incluídas em uma mesma subfamília, a Hemiphractinae, reduzindo as subfamílias a três.

onamentos sobre a sistemática dos anuros, apoiados pelo uso de técnicas de biologia molecular e estudos cladísticos, o grupo foi reestruturado (Figura 1) apresentando três subfamílias: Phyllomedusinae; Pelodryadinae e Hyalinae, sendo esta última a maior delas, com 646 espécies divididas em quatro tribos: Cophomantini, Lophiohylini, Hylini e Dendropsophini (Faivovich *et al.*, 2005; Frost, 2011; SBH, 2011). Após a revisão da sistemática dos hílídeos baseada em análises cladísticas realizadas a partir de dados de sequenciamento de genes nucleares e mitocondriais obtidos por Faivovich *et al.* (2005), a tribo Cophomantini passou a abrigar os gêneros *Aplastodiscus*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus*, *Hypsiboas* e *Myersiohyla*.

As atuais espécies *Hypsiboas lundii*, *Hypsiboas raniceps*, *Hypsiboas albopunctatus*, *Hypsiboas multifasciatus* e *Hypsiboas goianus* que inicialmente pertenciam ao gênero *Hyla*, foram transferidas para o gênero *Hypsiboas*. O gênero *Hyla* ficou restrito às espécies *Hyla arborea*, *Hyla cinerea*, *Hyla eximia*, *Hyla femoralis* e *Hyla versicolor*, cujos representantes não ocorrem em território brasileiro (Faivovich *et al.*, 2005).

A tribo Dendropsophini passou a agrupar os gêneros *Dendropsophus*, *Lysapsus*, *Pseudis*, *Scarthyla*, *Scinax*, *Sphaenorhynchus* e *Xenohyla*. Contudo, após estudos mais recentes baseados em sequenciamento de DNA, pode-se concluir que o gênero *Pseudis* possui origem parafilética em relação ao gênero *Lysapsus*, portanto, os espécimes de *Lysapsus* devem ser sinonimizadas ao grupo dos *Pseudis* (Aguiar Jr. *et al.*, 2007).

A tribo Hylini contempla os gêneros *Acris*, *Duellmanohyla*, *Exerodonta*, *Hyla*, *Plectrohyla*, *Pseudacris*, *Ptychohyla*, *Smilisca*, *Triprion*, *Bromeliohyla*, *Charadrahyla*, *Ecnomiohyla*, *Isthmohyla*, *Megastomatohyla* e *Tlalocohyla* (Smith *et al.*, 2007; Faivovich *et al.*, 2005; Frost, 2011). Na tribo Lophiohylini, estão os gêneros *Aparasphenodon*, *Argenteohyla*, *Corythomantis*, *Itapotihyla*, *Nyctimantis*, *Osteopilus*, *Phyllodytes*, *Tepuihyla*, *Osteocephalus* e *Trachycephalus*.

A subfamília Phyllomedusinae abriga os gêneros *Agalychnis*, *Cruziohyla*, *Hylomantis*, *Pachymedusa*, *Phasmahyla*, *Phrynomedusa* e *Phyllomedusa* sendo agora considerada uma subfamília irmã da Pelodryadinae, subfamília esta composta apenas pelo gênero *Litoria*, que juntas, formam o taxon-irmão da subfamília Hyalinae.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

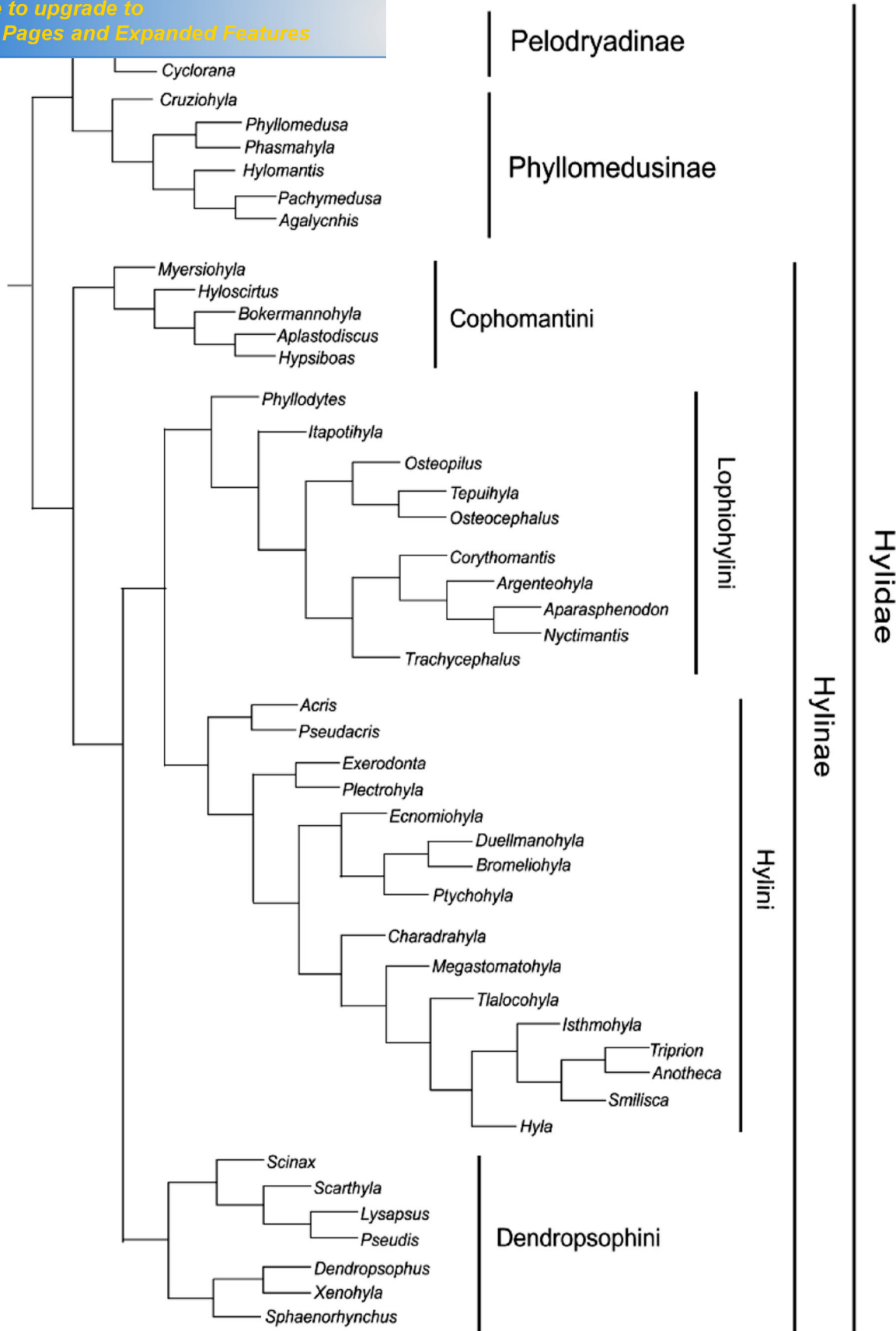


Figura 1. Hipótese filogenética da família Hylidae, proposta por Faivovich *et al.* (2005).

espécies em Estudo

e ilustram o gênero *Hypsiboas*. Na figura 2A observa-se a espécie *Hypsiboas multifasciatus* (Gunther, 1859), que apresenta uma ampla distribuição no Brasil, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela. Possuem hábitos noturnos e são encontradas em ambientes abertos, matas de galeria, próxima de árvores, samambaias e arbustos ou em vegetações próximas a lagos e lagoas, sendo altamente abundantes em muitas áreas de cerrado e da floresta amazônica (Azevedo-Ramos *et al.*, 2004). É característico para esta espécie o corpo alongado com focinho pontudo e cabeça e membros posteriores muito longos. A espécie *H. multifasciatus* difere das espécies *Hypsiboas raniceps* e *Hypsiboas albopunctatus* pela ausência de manchas nas coxas e nos flancos (Eterovick; Sazima, 2004).

A espécie *Hypsiboas raniceps* (Cope, 1862) é bastante difundida na América do Sul em países como o Brasil, Argentina, Paraguai, Colômbia e Guiana Francesa (Figura 2B). Essa espécie caracteriza-se por possuir cabeça larga, coloração marrom clara e a presença dos discos adesivos, comum a esta família. É encontrada no interior de florestas tropicais sob folhas e ramos, em áreas de rios e lagos ou na vegetação do entorno (La Marca *et al.*, 2004; Frost, 2011).

Apresentando cabeça e olhos grandes (Figura 2C), a espécie *Hypsiboas lundii* (Burmeister, 1856) possui hábitos noturnos e está distribuída pelos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal podendo ser encontrada por todo o cerrado do Brasil Central (Bastos *et al.*, 2003; Eterovick; Sazima, 2004).

Nas regiões Central, Sul e Sudeste do Brasil, em grande parte da Argentina, Paraguai e no Norte do Uruguai encontra-se a espécie *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824), espécie de ampla distribuição geográfica, sendo encontrada principalmente próximas a corpos d'água em florestas tropicais e em áreas abertas (Figura 2D).

Espécimes representantes da espécie *H. albopunctatus* apresentam porte médio variando de 30 a 65mm de comprimento rostro-cloacal (CRC). Possuem um colorido que vai do amarelo ao marrom-claro e pintas na face posterior das coxas de tonalidade amarelada. É uma espécie resistente a ação antrópica e por isso é comum sua presença em ambientes urbanos (Bastos *et al.*, 2003; Aquino *et al.*, 2004; Eterovick; Sazima, 2004).

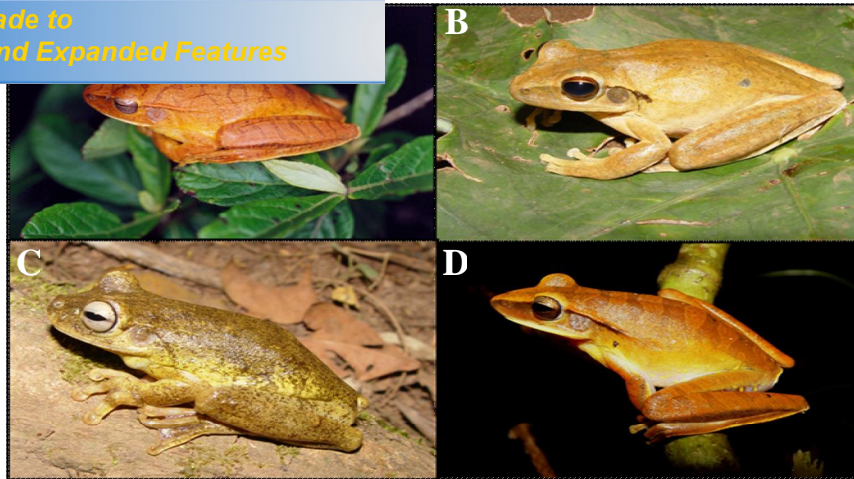


Figura 2. Espécies do gênero *Hypsiboas* (Anura, Hylidae) caracterizadas no presente estudo. Legenda: A- *Hypsiboas multifasciatus*; B- *Hypsiboas raniceps*; C- *Hypsiboas lundii*; D- *Hypsiboas albopunctatus*.

O gênero *Scinax* pertencente à subfamília Hylinae e apresenta 102 espécies descritas divididas em dois clados: *Scinax ruber* e *Scinax catharinae*. Pertencente ao clado *ruber* estão as espécie *Scinax constrictus* e *Scinax similis* (Faivovich, 2002; Faivovich *et al.*, 2005).

A espécie *Scinax constrictus* (Lima, Bastos; Giaretta, 2004), que pode ser observada na (Figura 3A) ocorre exclusivamente em áreas de cerrado possuindo uma ampla distribuição pelo estado de Goiás. Esta espécie é caracterizada por apresentar pequeno comprimento rostro-anal, variando de 20 a 29 mm e de 28 a 35mm para machos e fêmeas respectivamente. Possuem narinas protuberantes, pigmentação no saco vocal, presença de tubérculos nas pálpebras superiores e constrictões dérmicas sobre os ombros dos adultos, com período reprodutivo ocorrendo entre os meses de dezembro a março em lagoas permanentes de áreas abertas (Lima *et al.*, 2004; Frost 2011).

Já a espécie *Scinax similis* (Cochran, 1952) (Figura 3B) é distribuída em áreas abertas, como em savanas ou cerrados, podendo também ser encontradas em ambientes artificiais. (Rodriguez; Telles, 2004; Stuart, 2006). Apresentam porte médio e cor acinzentada, com manchas irregulares dispostas, mais claras e mais escuras, e dois pares de manchas mais escuras no dorso. Tem o hábito, durante seu crescimento, após a metamorfose, de penetrar nas habitações humanas das zonas rurais, adaptando-se a caçar insetos atraídos pelas lâmpadas nos banheiros ou em outros cômodos com umidade. Após a maturidade retornam para seu habitat natural. Vocalizam e se reproduzem em brejos expostos e áreas abertas, onde desenvolvem seus girinos (Izecksohn; Carvalho-e-Silva 2001).



Figura 3. Espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) caracterizadas no presente estudo.
Legenda: A- *Scinax constrictus*; B- *Scinax similis*.

A espécie *Pseudis bolbodactyla* (Lutz, 1925) (Figura 4) possui membros posteriores robustos e membranas interdigitais que auxiliam na sua propulsão em água além de possuir toda a morfologia externa adaptada para ambientes aquáticos, característica comum ao gênero. Possui os olhos em uma posição mais dorsal e seus polegares opositores são utilizados para agarrar na vegetação aquática. Sua distribuição se dá de forma contínua em regiões de mata aberta da América do Sul (Kwet, 2000; Brandão *et al.*, 2003, Busin *et al.*, 2008).



Figura 4. Representante da espécie *Pseudis bolbodactyla* (Anura, Hylidae) caracterizada no presente estudo.

3. Um Panorama Geral da Citogenética de Anuros

Os anuros compõem um grupo de grande interesse para as pesquisas sobre os mecanismos de evoluções cariotípicas, devido a sua ampla distribuição geográfica e variabilidade cromossômica. Nesse contexto, a citogenética se apresenta como uma ferramenta auxiliar para estudos taxonômicos e filogenéticos, tornando-se cada vez mais poderosa à medida que tais técnicas evoluem (Catroli, 2008).

iniciou-se nos anos de 1930 e eram realizados apenas técnicas obtidas através de técnicas de esmagamento.

Inicialmente o estudo citogenético da anurofauna brasileira se restringia apenas aos métodos de coloração convencional dos cromossomos com a avaliação numérica e morfológica dos mesmos, sendo raras as informações sobre a presença de regiões satélites e constricções secundárias. Com a evolução do método, a partir da utilização da colchicina e o tratamento das células por hipotonização, a qualidade dos preparados cromossômicos melhoraram significativamente permitindo a utilização da citogenética de forma mais eficiente para estudos citotaxonômicos (Foresti, 1972; Bogart, 1973; Lucca *et al.*, 1974; Catroli, 2008).

A evolução das técnicas de coloração diferencial que inicialmente eram restritas a citogenética humana, como os métodos de bandamento Q, G, R, C e coloração de regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON), começaram a ser utilizadas a partir dos anos de 1970 em vertebrados. Entre estas técnicas, obteve-se destaque com o estudo dos anfíbios o método de bandamento C para a detecção de heterocromatina e Ag-RON para a avaliação de polimorfismo das regiões organizadoras de nucléolo, já que forneciam melhores informações sobre os cariótipos do grupo. Com o decorrer do tempo, outros procedimentos foram então desenvolvidos, com destaque para o método de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com a utilização de sondas teloméricas e de DNA ribossomal (King, 1990; Schmid *et al.*, 1990; Catroli, 2008).

Os avanços das técnicas citogenéticas permitiram o estudo comparativo de diferentes espécies de forma mais eficiente auxiliando principalmente na identificação de rearranjos estruturais, mecanismos de determinação sexual e cromossomos supranumerários, contribuindo para esclarecer mecanismos presentes na diferenciação cariotípica e na compreensão da evolução cromossômica entre as diferentes espécies (Kasahara *et al.*, 1996; Kasahara *et al.*, 1998; Lourenço *et al.*, 1998; Baldissera Jr *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000; Aguiar Jr *et al.*, 2002; Lourenço *et al.*, 2003; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006).

Atualmente, as análises citogenéticas vêm contribuindo cada vez mais para os estudos evolutivos, taxonômicos e de sistemática, não só da classe anura, mas de todos os vertebrados, proporcionando muitos recursos que auxiliam na elucidação das relações de diferentes categorias taxonômicas (Kasahara *et al.*, 1996; Kasahara *et al.*, 1998; Lourenço *et al.*, 1998; Baldissera Jr *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000; Aguiar Jr *et al.*, 2002; Lourenço *et al.*, 2003; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006).

lo (RONs)

lo ou apenas RONs são numerosas cópias gênicas que codificam os RNAs ribossomais 18S, 5,8S e 28S, dispostas em tandem e separadas por espaçadores externos não transcritos (NTS) ou espaçadores intergênicos (IGS) entre cada unidade repetida e por espaçadores internos transcritos (ITS) (Miller, 1981; Summer, 1990).

Nem todas as RONs de uma célula transcrevem durante a intérfase, mas as ativas originam nucléolos. Nos nucléolos ocorre tanto a síntese do transcrito primário como o seu processamento para a produção do rRNA. A associação dos rRNA com proteínas ribossomais e com os rRNA 5S, sintetizado fora do nucléolo e transportado para esse, resultam na formação das subunidades ribossomais (Schwarzacher; Wachtler, 1993).

A localização e o número das RONs tendem a ser característicos de cada espécie ou população embora algumas variações já tenham sido descritas em *Hyla ebraccata* (Kaiser *et al.*, 1996), *Physalaemus cuvieri* (Silva *et al.*, 1999) e *Hyla nana* (Medeiros *et al.*, 2003). Em cromossomos homólogos, o tamanho das RONs pode variar entre indivíduos de uma espécie, devido a diferentes números de cópias dos genes ribossomais presentes em cada um deles (Suzuki *et al.*, 1990; Mellink, 1994).

A maioria dos anuros apresenta um par de RONs por genoma diplóide, característica observada tanto em grupos ancestrais como em grupos derivados. Esta característica é um indicativo de que nos anuros, a presença de apenas um par de RONs por genoma diplóide possa ser uma condição primitiva em relação à ocorrência de RONs múltiplas (King, 1990).

O método de identificação de RONs utilizando a coloração pela prata é baseado na afinidade argirófila específica das proteínas associadas às RONs, chamadas genericamente de òproteínas Ag-NORö. Assim esse método de coloração identificaria apenas RONs nas quais a transcrição está ocorrendo devido à presença destas proteínas e, portanto, RONs inativas não responderiam ao método de coloração por prata (Buys; Osinga, 1984; Summer, 1990; Hernandez-Verdun *et al.*, 1993; Busin, 2005). A marcação por prata, embora seja um método bastante utilizado, não é específico para RONs, pois estruturas como heterocromatina e cinetócoro também podem ser marcadas (Busin, 2005). No entanto, análises realizadas quanto ao número, à localização cromossômica e as características moleculares das RONs de diferentes indivíduos permitem a identificação de homologies entre diferentes populações e espécies, possibilitando o reconhecimento de rearranjos cromossômicos auxiliando nos estudos taxonômicos e evolutivos dos cariótipos.

ente entre os hilídeos, contudo variações nesse número também são observadas, $2n=18, 20, 22, 26, 30, 34, 48$ e 52 , sendo estes dois últimos possivelmente resultados de uma poliploidização. Além disso, é característica da família Hylidae o cariótipo simétrico e unimodal. A morfologia cromossômica também é conservada no grupo, apresentando cromossomos metacêntricos e submetacêntricos predominantemente e com o Número Fundamental (NF) em geral próximo de 48 (Gruber *et al.*, 2007, Catroli; Kasahara, 2009).

O Número Fundamental corresponde ao total de braços cromossômicos quando se considera o conjunto dos cromossomos metafásicos. Quando o valor do NF é muito maior do que o número diplóide da espécie, indica que o cariótipo possui uma predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (cromossomos de dois braços). Porém se o valor do NF for muito baixo ou equivalente ao número diplóide, indica uma ocorrência de cromossomos unibraquiais, isto é, acrocêntricos e telocêntricos (Kasahara, 2009).

Portando dados dos NF dos cariótipos são de fundamental utilidade no estudo de citogenética comparativa já que através destes é possível deduzir a constituição cariotípica morfológica das espécies e até os mecanismos responsáveis pela evolução cromossômica dentro de um grupo particular. Cromossomos acrocêntricos indicam um possível mecanismo evolutivo, seja ele por fusão ou fissão cromossômica. Isso foi observado em hilídeos neotropicais que apresentaram seu número diplóide igual a $2n=24, 26$ ou 30 com a presença de cromossomos acrocêntricos (Kasahara, 2009).

Segundo King (1990) e Kuramoto (1990), os hilídeos apresentam o maior número de espécies cariotipadas, com destaque para subfamília Hylinae, gênero *Hyla*. Para esse gênero eram reconhecidos dois agrupamentos, um com espécies com cariótipo $2n=24$ e outro com espécies $2n=30$. A explicação para estes agrupamentos era fundamentada na idéia de um único ancestral comum com cariótipo com $2n=26$ que teria originado o agrupamento $2n=30$ por um processo de fissão cêntrica seguido por inversões pericêntricas responsáveis pela alteração morfológica do cariótipo. Já o grupo $2n=24$ teve sua origem através do processo de fusão cêntrica.

Após a revisão de Faivovich *et al.* (2005), os representantes do gênero *Hyla* foram drasticamente reduzidos, e segundo aquele autor, existe a possibilidade de que o número diplóide $2n=24$ seja uma sinapomorfia da subfamília Hylinae e que esse número cariotípico deva ser encontrado nos gêneros mais basais das tribos Cophomantini e Lophiolylini.

foi realizada em sua maior parte por coloração avanço das técnicas de bandamento cromossômico, informações mais detalhadas foram obtidas, o que permitiu a identificação de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados, verificação de polimorfismo quanto ao número e posição das RONS, presença e origem de cromossomos supranumerários e padrão de distribuição de heterocromatina (Gruber *et al.*, 2007, Catroli; Kasahara 2009).

Entre as tribos que compõem a subfamília Hyliinae, a tribo Cophomantini apresenta o cariótipo padrão $2n=24$, no entanto alguma variabilidade no número diplóide é observada. Este fato é evidenciado nas espécies do gênero *Aplastodiscus* que apresentam o número diplóide $2n=18$, 20 , 22 e 24 . Nos gêneros *Bokermannohyla* e *Hypsiboas* também são encontrados cariótipos com o número diplóide não convencional. Espécimes da espécie *H. albopunctatus* apresentam um cariótipo $2n=22$ ou $2n=23$ devido a presença ou não dos cromossomos supranumerários ou cromossomos B. De forma semelhante é observado na espécie *Bokermannohyla luctuosa* cujo cariótipo padrão pode ser $2n=24$ ou $2n=25$ caso ocorra a presença do cromossomo B (Gruber *et al.*, 2007, Carvalho *et. al* 2009; Catroli; Kasahara 2009).

Dentro da tribo Hylini, quase todas as espécies dos gêneros *Anotheca*, *Charadrahyla*, *Duellmanohyla*, *Exerodonta*, *Hyla*, *Isthmohyla*, *Plecotrochyla*, *Pseudacris*, *Ptycohyla*, *Smilisca*, *Tlalocohyla* e *Triprion* possuem o cariótipo com $2n=24$. O número diplóide $2n=22$ ocorrem nas três espécies do gênero *Acris*, (*A. crepitans*, *A. blanchardi* e *A. gryllus*), além da existência da variação intraespecífica ocasionada pelos cromossomos B (Gruber *et al.*, 2007; Catroli; Kasahara, 2009).

As espécies da tribo Lophiolylini, esporadicamente apresentam números diplóides maiores do que $2n=24$. Este cariótipo é característico de várias espécies incluídas nos gêneros *Aparasphenodon*, *Argenteohyla*, *Corythomantis*, *Itapotihyla*, *Osteocephalus*, *Trachycephalus* e *Osteopilus*, com exceção para as espécies *Osteopilus wilderi* com $2n=28$ e *Osteopilus brunneus* com $2n=34$ (Catroli; Kasahara, 2009).

Dentro da tribo Dendropsophini, a maioria das espécies pertencentes aos gêneros *Pseudis*, *Scinax* e *Sphaenorhynchus* possuem o cariótipo $2n=24$ com exceção para as espécies *Pseudis cardosi* e *Scinax fuscovarius* que apresentam $2n=28$ e $2n=24+1B$ respectivamente. Ainda na tribo Dendropsophini, todos os cariótipos para o gênero *Dendropsophus* apresentaram o cariótipo $2n=30$, sendo que para as espécies *D. nanus* e *D. berthaltzae* também foram relatados a presença de cromossomos B (Rabello, 1970; Catroli; Kasahara, 2009).

apresenta predominantemente o cariótipo $2n=26$, com *L. maculata*, *L. infrafrenata* e *L. angiana* com os cariótipos $2n=24$, $2n=30$ e $2n=26$, respectivamente. A subfamília Phyllomedusinae também apresenta uma tendência para cariótipo $2n=26$, apesar de já ter sido descrito o cariótipo $2n=52$ para a espécie *Phyllomedusa tetraploidea* (número cariotípico explicado a partir de uma origem poliplóide) e $2n=40$ para um espécime de *P. rohdei*. Os autores sugerem que tais números cariotípicos discrepantes tenham sido originados a partir de um cariótipo ancestral $2n=26$ que sofreu sucessivas fissões cêntricas seguidas e inversões pericêntricas (Batistic, 1989; Catroli; Kasahara, 2009).

Heteromorfismo dos cromossomos sexuais também já foram identificados para algumas espécies de hílideos, como para as espécies *Hyla squirella* e *Pseudis tocantis*, que apresentaram heteromorfismo do tipo ZZ e ZW. Heteromorfismo do tipo XX e XY também já foram encontrados nas espécies *Hyla femoralis*, *H. japonica* e *H. savignyi*. Contudo, em ambos os casos, a presença dos cromossomos sexuais não foram confirmados por análises futuras (Yosida, 1957; Anderson, 1991; Busin *et al.*, 2008).

4. Materiais e Métodos

4.1 Área de Coleta e Anfíbios Estudados

Foram coletados 33 indivíduos de sete espécies de anuros do cerrado goiano (Tabela 1), todos indivíduos eram machos e foram coletados com autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), pelo professor Dr. Rogério Pereira Bastos (número de registro: 2007948) durante as estações chuvosas de 2007 a 2009.

espécies e local de coleta dos exemplares no estado de Goiás e de citogenética dos Anuros do Brasil Central.

Espécies*	Número de exemplares coletados	Local de Coleta
<i>Hypsiboas raniceps</i>	4	Rio Verde
<i>Hypsiboas multifasciatus</i>	3	Serranópolis
<i>Hypsiboas lundii</i>	2	Pirenópolis
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	8	Pirenópolis
<i>Pseudis bolbodactyla</i>	3	Pirenópolis
<i>Scinax similis</i>	4	Pirenópolis
<i>Scinax constrictus</i>	9	Barro Alto/Nazário
Total	33	

*Todos os gêneros estudados pertenciam a família Hylidae.

4.2 Obtenção dos Preparados Cromossômicos

Os espécimes coletados foram acondicionados em sacos plásticos, mantidos vivos e conduzidos até o Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás para a realização dos estudos citogenéticos.

Na preparação direta dos órgãos, foi utilizada solução de Fitohemaglutinina M (10%) (Invitrogen), para se estimular a divisão celular. A solução foi injetada intraperitonealmente, na proporção de 0,1mL/10g de peso do animal durante três dias consecutivos antes da eutanásia.

Para a obtenção de cromossomos metafásicos utilizou-se a metodologia descrita por Baldissera-Jr *et al.* (1993), com modificações. Esse procedimento foi realizado inicialmente injetando intraperitonealmente solução de colchicina a 0,1%, na proporção aproximada de 0,1mL/10g de peso do animal 4 horas antes da eutanásia, mantendo o animal em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo os animais foram eutanasiados com xilocaína. Posteriormente foram retirados o fígado, o baço e os fêmures, que tiveram a musculatura dissecada e as epífises cortadas.

Com o auxílio de uma seringa, foram realizadas lavagens sucessivas do fígado, baço e da medula óssea, com cerca de 3 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio a 0,075M. A solução hipotônica foi mantida em banho-maria a 37°C durante 1 hora. Decorrido o tempo

ção das células adicionando-se à suspensão cerca de 6
preparado no momento do uso. A solução fixadora foi
pipetada lentamente e suspensão foi deixada em repouso por 10 minutos. Após, foram
adicionadas à solução mais 3 mL de fixador Carnoy, deixando a suspensão em repouso por
mais 10 minutos. A suspensão de células fixadas foi centrifugada a 1200 rpm durante 8
minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento despeitado com a pipeta de Pasteur. Este
procedimento foi repetido por quatro vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi
descartado e adicionado uma quantidade de fixador suficiente para o preparo das lâminas.
Para a confecção posterior das lâminas após a lavagem, a suspensão celular ficou guardada
em geladeira em tubos cônicos com tampa.

Sobre lâminas limpas e secas, mantidas horizontalmente sobre um suporte colocado no
banho-maria a 60°C, foram gotejadas de uma a duas gotas da suspensão celular. Em seguida,
a lâmina foi retirada do banho-maria e deixada exposta para secagem ao ar livre. Da
suspensão preparada para cada espécime, foram confeccionadas em média 10 lâminas.

4.3 Coloração Convencional pelo Giemsa

Para a coloração das lâminas seguiu-se a metodologia convencional descrita por
Baldissera-Jr *et al.* (1993), com modificações. As lâminas foram incubadas em solução de 1M
de ácido clorídrico a 60°C por 8 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas em
água destilada e em seguida coradas em solução de Giemsa diluído a 8% em solução tampão
fosfato pH 6,8 por 8 minutos. Após esse tempo as lâminas foram lavadas em água destilada e
deixadas para secar a temperatura ambiente.

4.4 Coloração pelo Nitrato de Prata (Ag-RON)

Para a coloração de regiões organizadoras de nucléolo (RONs), seguiu-se a
metodologia de Howell; Black (1980) com modificações. As lâminas foram hidrolisadas,
mediante a incubação em solução de 1M de ácido clorídrico a 60°C por 7 minutos. Sobre o
material das lâminas, foi colocada 1 gota de solução coloidal reveladora (gelatina+ácido
fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO_3) a 50%. As lâminas foram
cobertas com uma lamínula e incubadas por 5 minutos em câmara úmida a 60°C. Após este
tempo, a lamínula foi retirada com água destilada e corada por 30 segundos em solução de
Giemsa a 4%.

as Metáfases

etáfases foi utilizado o sistema de vídeo-microscopia Axioplan-Imaging® (Carl-Zeiss) acoplado ao software Metafer 4® (Metasystem Corporation, Alemanha) e analisadas com o auxílio do software Ikaros®, versão 4.0 (Metasystems), próprios para captura e análise cromossômica. Foram mensurados os braços curtos e longos, assim como o tamanho total do cromossomo. A partir dos valores obtidos foram calculados, segundo Guerra (1988):

a- razão entre os braços cromossômicos (q/p) onde q corresponde ao comprimento do braço longo e p ao braço curto;

b- índice centromérico (ic), que reflete a posição do centrômero, dado o tamanho relativo do braço curto em relação ao tamanho total do cromossomo .

A identificação cromossômica foi feita seguindo a nomenclatura proposta por Guerra (1988) conforme Tabela 2.

Tabela 2. Critérios de classificação cromossômica baseado no índice centromérico (ic) e razão entre os braços cromossômicos (q/p).

Tipo Cromossômico	Índice Centromérico (ic)	Razão (q/p)
Metacêntricos	50,0 - 40,01	1,00 - 1,49
Submetacêntricos	40,0 - 25,1	1,50 - 2,99
Acrocêntricos	25,0 - 0,001	3,00 - ∞

Fonte: Guerra (1988).

5. Resultados e Discussão

Os hilídeos analisados no presente estudo apresentaram número diplóide $2n=22$ ou $2n=24$, números condizentes com os dados bibliográficos que afirmavam valores cariotípicos para a família Hylidae variando entre $2n=22$ a $2n=52$ com uma predominância cariotípica em $2n=24$ (Tabela 3).

entando os valores de comprimento relativo, valor médio e desvio padrão dos índices centroméricos e dos mitóticos de *Hypsiboas multifasciatus*, *H. raniceps*, *H. lundii*, *H. albopunctatus*, *Pseudis bolbodactyla*, *Saxidomina* e *Saxidomina* usados no estudo da diversidade Citogenética de Anuros do Brasil Central, coletados no estado de Goiás.

	Pares Cromossômicos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>H. multifasciatus</i>												
CR	14,63%	12,24%	11,04%	10,60%	9,55%	7,61%	7,01%	6,72%	6,12%	5,82%	4,48%	4,18%
IC	45,7±2,7	37,8±1,3	38,6±2,8	35,2±0,7	28,3±1,1	30,3±2,2	32,8±1,8	40,1±1,4	34,2±3,1	41,1±2,3	49,6±1,7	30,1±3,1
PC	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	SM	M	M	SM
<i>H. raniceps</i>												
CR	15,14%	12,07%	11,56%	10,71%	10,54%	8,50%	6,63%	5,44%	5,27%	4,93%	4,76%	4,42%
IC	47,2±4,2	38,9±3,1	36,2±3,6	25,9±2,5	32,4±5,7	34,8±3,3	38,3±6,5	42,6±1,7	29,3±3,7	43,6±2,7	25,3±2,1	25,7±0,8
PC	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	SM	M	SM	SM
<i>H. lundii</i>												
CR	15,13%	11,99%	11,25%	10,52%	10,15%	8,12%	7,38%	6,09%	5,72%	5,17%	4,61%	3,87%
IC	30,4±6,7	37,6±3,2	35,2±2,1	38,9±4,4	33,9±5,3	24,4±2,1	44,3±2,9	38,9±1,8	44,4±3,1	46,8±2,6	42,5±2,7	44,7±3,7
PC	SM	SM	SM	SM	SM	A	M	SM	M	M	M	M
<i>H. albopunctatus</i>												
CR	16,46%	12,65%	11,76%	11,42%	10,19%	8,85%	6,61%	6,16%	5,71%	5,49%	4,70%	-
IC	45,5±2,3	42,4±3,5	25,6±1,7	33,1±4,5	28,2±2,2	26,5±3,1	34,8±4,2	46,1±2,8	36,5±1,9	48,7±1,1	36,8±3,1	-
PC	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	M	SM	M	SM	-
<i>P. bolbodactyla</i>												
CR	15,34%	12,27%	11,66%	10,63%	10,02%	7,98%	6,13%	5,93%	5,73%	5,11%	4,91%	4,29%
IC	45,2±3,5	38,3±2,4	37,5±1,8	17,4±2,1	33,6±3,9	28,3±2,1	42,8±4,6	32,7±2,8	43,3±3,2	32,8±3,1	46,7±2,7	49,5±5,1
PC	M	SM	SM	A	SM	SM	M	SM	M	SM	M	M
<i>S. similis</i>												
CR	13,76%	12,32%	10,06%	9,45%	9,24%	8,62%	8,42%	6,57%	6,16%	5,75%	5,13%	4,52%
IC	47,4±2,7	33,6±2,9	28,1±2,8	38,9±3,2	35,3±3,9	31,2±4,1	34,4±2,2	44,2±3,6	48,9±5,1	42,6±1,9	32,5±1,3	37,9±3,2
PC	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	SM	SM
<i>S. constrictus</i>												
CR	16,67%	15,15%	13,64%	12,12%	10,61%	9,09%	7,58%	6,06%	4,55%	3,03%	1,52%	-
IC	47,4±5,1	34,7±2,1	33,2±3,3	29,6±2,1	28,3±2,6	35,1±3,1	39,2±4,7	48,2±4,3	44,7±4,2	41,5±3,5	42,8±4,5	-
PC	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	-

Legenda: CR=comprimento relativo (%), IC=índice centromérico, PC= posição do centrômero, M= metacêntrico, SM= submetacêntrico, A= acrocêntrico.

espécies *Hypsiboas multifasciatus* e *Hypsiboas raniceps*

apresentaram o número diplóide $2n=24$ e número fundamental $NF=48$ em todos os exemplares analisados, evidenciando o padrão de conservação cariotípica no gênero (Figura 5). A espécie *Hypsiboas lundii* também apresentou o número diplóide $2n=24$, mas devido a presença do cromossomo acrocêntrico no par 6 seu número fundamental foi de $NF=46$ (Figura 5C). Os dados encontrados reforçam aqueles obtidos por King (1990), Gruber *et al.* (2007) e Carvalho *et al.* (2009) para as espécies desta família.

A espécie *Hypsiboas multifasciatus* apresentou três pares de cromossomos metacêntricos (1, 8 e 11) e nove pares submetacêntricos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 12). A técnica de marcação das regiões organizadoras de nucléolo por nitrato de prata (Ag-RON) identificou as RONS em regiões teloméricas dos braços curtos do par cromossômico 08.

Para a espécie *Hypsiboas raniceps*, os cromossomos classificados como metacêntrico foram os cromossomos 1, 8 e 10 e como submetacêntricos os cromossomos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 e 12. As RONS foram identificadas nas regiões teloméricas do braço longo do cromossomo 10.

A caracterização cromossômica para os espécimes de *Hypsiboas lundii* revelou a presença de cinco cromossomos metacêntricos (7, 9, 10, 11 e 12), seis submetacêntricos (1, 2, 3, 4, 5 e 8) e um par cromossômico acrocêntrico, cromossomo 6. Esta foi a única espécie pertencente ao gênero *Hypsiboas* a apresentar um par cromossômico acrocêntrico, tendo, portanto o seu $NF=46$. As RONS para esta espécie foram identificadas em regiões pericentroméricas dos braços curtos do cromossomo 5 e em regiões teloméricas dos braços curtos do cromossomo 8.

Dentro do gênero *Hypsiboas*, apenas a espécie *Hypsiboas albopunctatus* apresentou número diplóide $2n=22$ e o número fundamental $NF=44$ (Figura 5), sendo classificado como metacêntricos os cromossomos 1, 2, 8 e 10 e os demais submetacêntricos. Estes resultados apresentam similares a aqueles revelados pelos estudos citogenéticos de Beçak (1968) Baldissera; Batistic (1992), Feitosa *et al.* (1995) e Gruber *et al.* (2007).

Ainda para esta espécie, nenhum cromossomo supranumerário foi encontrado nas metáfases dos indivíduos analisados, diferente dos dados apresentados por Cardoso (1986) e Gruber *et al.* (2007), que observaram diploidias de $2n=23$ ($2n=22+B$) devido à presença dos cromossomos B. A técnica de coloração por prata identificou a presença de RONS nos braços curtos das regiões teloméricas do par cromossômico 08.

RONs em apenas um par cromossômico de um anuro, é possível verificar a presença de RONs em mais de um par cromossômico, como ocorreu no cariótipo da *H. lundii* e em trabalhos similares apresentados por King *et al.* (1990), Silva *et al.* (1999), Campos *et al.* (2006).

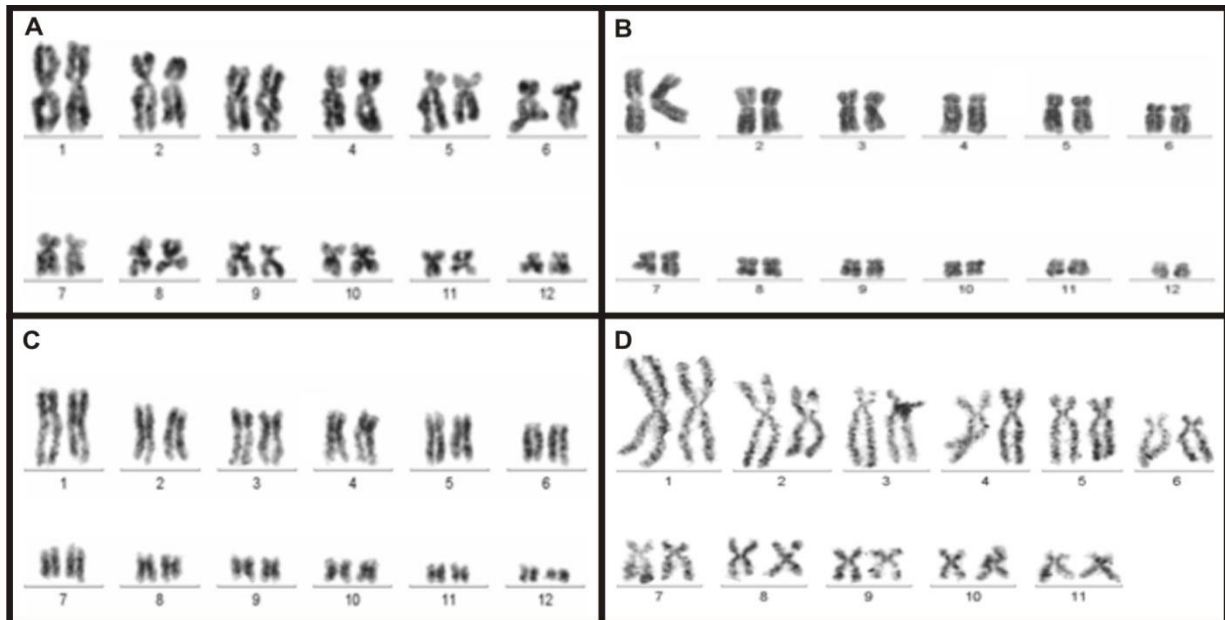


Figura 5. Cariótipo do gênero *Hypsiboas* (Anura, Hylidae) indicando cariótipos simétricos e gradativos para as 4 espécies estudadas do Cerrado Goiano. Cromossomos corados com solução aquosa de Giemsa a 8%. Legenda: A- *Hypsiboas multifasciatus* (2n=24 e NF=48); B- *Hypsiboas raniceps* (2n=24 e NF=48); C- *Hypsiboas lundii* (2n=24 e NF=46); D- *Hypsiboas albopunctatus* (2n=22 e NF=44).

A forma mais eficiente de se verificar a autenticidade das RONs é submeter o cariótipo a técnica de FISH, tendo em vista que a coloração por prata marca regiões repetitivas de cromossomos de anuros que podem não representar verdadeiras RONs (Kasahara *et al.*, 1996).

As marcações por prata para as espécies *H. multifasciatus* e *H. albopunctatus* foram identificados no mesmo par cromossômico e na mesma posição apesar de possuírem diferentes números diplóides, identificando uma conservação cariotípica do grupo.

Estudo citogenéticos anteriores para espécimes de *H. albopunctatus*, coletadas em Rio Claro São Paulo, as marcações das RONs foram localizadas na mesma região e par cromossômico que foi observado nos espécimes goianos, sugerindo uma conservação cariotípica (Gruber *et al.*, 2007), contudo, nos estudos de Baldissera; Batistic (1992) as RONs para esta espécie foi encontrada no par cromossômico 7. Essa diferenciação pode ser explicada devida as diferenças populacionais que podem, por isolamento, gerar variações genéticas não compartilhadas caracterizando portanto um polimorfismo genético ou, mais

enação dos pares cromossômicos e a utilização de
nossômica existentes na literatura .

Gruber *et al.* (2007) ao estudar a espécie *H. raniceps*, encontraram marcações positivas nos braços longos do par 11, diferente do presente estudo aonde esta marcação ocorreu no cromossomo 10. Novamente, acreditamos que a causa desta variação seja a diferença da ordenação dos mesmos na montagem do cariótipo, contudo não se pode descartar a possibilidade de variação genética pelo isolamento das populações.

Gênero *Pseudis*

A espécie *Pseudis bolbodactyla* apresentou número diplóide $2n=24$ e $NF=46$ evidenciado pelo par acrocêntrico 4 (Figura 6). O número diplóide encontrado foi o mesmo obtido por Busin *et al.* (2008) para as espécies do gênero *Pseudis* (*Pseudis paradoxa paradoxa*, *P. platensis*, *P. bolbodactyla*, *P. fusca* e *P. tocantins*). Embora vários autores já tenham proposto que na evolução cariotípica de anfíbios a tendência é de redução no número de cromossomos (Beçak *et al.*, 1970; Miura, 1995) a ocorrência do cariótipo $2n=24$ cromossomos para espécies deste gênero é considerada uma característica sinapomórfica.

Apesar de não ter obtido a marcação de RONS para esta espécie no presente estudo, relatos anteriores indicaram a presença das RONS nos braços longos dos homólogos do cromossomo 7, comum a todas as espécies do gênero exceto para a espécie *P. cardosoi* para a qual, a marcação ocorreu nos braços do cromossomo 5, provavelmente homeólogo ao cromossomo 7 das outras espécies.

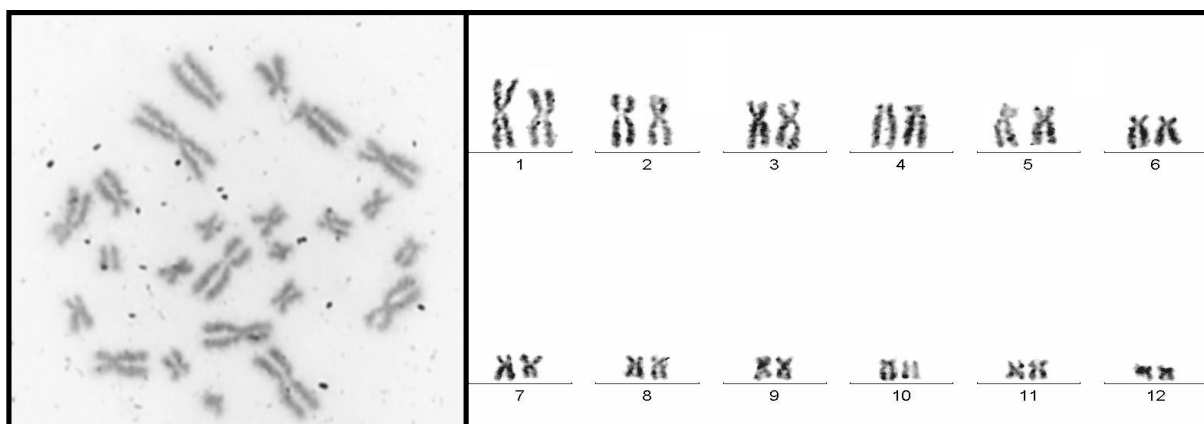


Figura 6. Cariótipo da espécie *Pseudis bolbodactyla* (Anura, Hylidae) indicando cariótipo simétrico e gradativos para as 3 espécimes estudadas do Cerrado Goiano. Cromossomos corados com solução aquosa de Giemsa a 8%.

Scinax constrictus apresentaram diferentes notações cariotípicas. A espécie *Scinax similis* apresentou cariótipo $2n=24$ e $NF=48$ com os cromossomos metacêntricos (1, 8, 9 e 10) e submetacêntricos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 e 12) corroborando o número cariotípico apresentado por Rabello (1970); Kasahara *et al.* (2003); Leme *et al.* (2004), contudo diferença na morfologia dos cromossomos foi verificada, provavelmente devido a utilização de diferentes critérios de classificação cromossômica (Figura 7A).

Apesar da notação cariotípica usual para o gênero *Scinax* ser $2n=24$ (Rabello, 1970; Leme *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2007) foi encontrado para a espécie *Scinax constrictus* a notação cariotípica $2n=22$ e $NF=44$ com os cromossomos metacêntricos (1, 8, 9, 10 e 11) e submetacêntricos (2, 3, 4, 5, 6 e 7) (Figura 7B).

Esse fato sugere uma possível evolução cariotípica através da redução do número de cromossomos através de rearranjos ocasionados por fusões cêntricas, reduzindo um cariótipo ancestral $2n=24$ ao cariótipo atual $2n=22$, fato este bastante semelhante ao observado no gênero *Hypsiboas*, para o qual ocorreu uma predominância do cariótipo $2n=24$, mais também se observa cariótipos com valor $2n=22$ como já foi observado no presente trabalho e em estudos anteriores (Bogart 1973, Gruber *et al.*, 2007).

Para se confirmar a hipótese de rearranjos cromossômicos serão necessários estudos citogenéticos e moleculares mais refinados, analisando mais espécimes, inclusive fêmeas da espécie, para que assim possa confirmar quais eventos evolutivos contribuíram para essa notação cariotípica diferenciada.

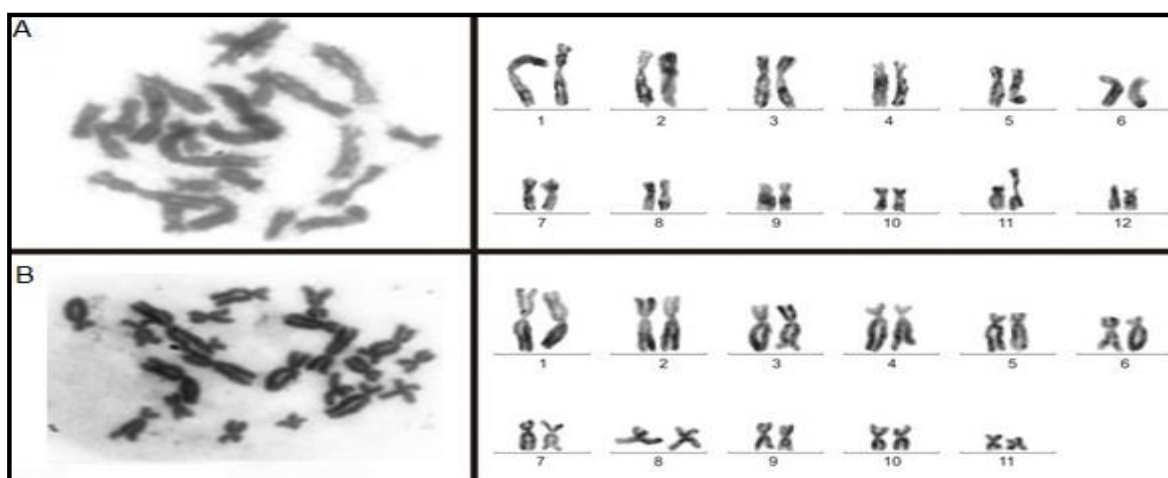


Figura 7. Cariótipo do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) indicando cariótipos simétricos e gradativos para as 2 espécies estudadas do Cerrado Goiano. Cromossomos corados com solução aquosa de Giemsa a 8%. Legenda: A- *Scinax similis* ($2n=24$ e $NF=48$); B- *Scinax constrictus* ($2n=22$ e $NF=44$).

o cariótipo padrão $2n=24$ em três das quatro espécies estudadas, com cromossomos predominantemente metacêntricos e submetacêntricos. Para a espécie *H. albopunctatus* o cariótipo encontrado foi o de $2n=22$, conforme já descrito na literatura e explicado por processos evolutivos como fusões e fissões cêntricas. Foi possível identificar as marcações por nitrato de prata apenas para espécies deste gênero, contudo, mesmo com a presença da marcação, não foi possível a construção do cariótipo tendo em vista que as metáfases que foram marcadas não estavam em condições de pareamento devido à sobreposição excessiva de cromossomos. Para as outras espécies analisadas as marcações não ocorreram, seja pela necessidade restritiva de RONS ativas na interfase anterior ou simplesmente por uma deficiência da técnica de marcação.

A espécie *Pseudis bolbodactyla* também apresentou o cariótipo com $2n=24$ cromossomos, tendo sido observado a presença de um cromossomo acrocêntrico no par 4. As espécies do gênero *Scinax* também obtiveram o cariótipo com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. A espécie *Scinax constrictus* apresentou seu número diplóide $2n=22$, número que difere do valor cariotípico do grupo que é $2n=24$, sendo a explicação para esse desvio dada pelo mesmo processo que é observado para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*.

Diferença na morfologia dos cromossomos foi encontrada nos dados obtidos neste estudo com aqueles apresentados em outras bibliografias, contudo essa diferença se deve por diferentes critérios utilizados para a classificação dos cromossomos ou apenas pela diferença da ordenação dos mesmos na montagem dos cariótipos.

É extremamente importante o estudo do cariótipo dos hilídeos pelas técnicas convencionais, já que apenas 35% das espécies deste grupo tiveram seu cariótipo descrito. Contudo, como alguns hilídeos apresentam cariótipo muito similar, é necessário a realização de mais estudos através de diferentes abordagens como as técnicas de citogenética molecular, incorporação por BrdU e até mesmo a otimização da técnica de coloração por nitrato de prata para a realização de análises comparativas de diferentes famílias, espécies ou populações elucidando assim os mecanismos envolvidos na evolução cromossômica deste grupo de anfíbios.

Resumo

Existem várias formas de se avaliar a estrutura genética de um organismo, população ou espécie. Entre estas formas destacam-se as técnicas baseadas em ferramentas moleculares, que permitem a verificação direta das sequências nucleotídicas do genoma de um organismo. Dos diversos marcadores moleculares utilizados em estudos de genética de populações, destacam-se os marcadores microssatélites. Os métodos de obtenção dos marcadores microssatélites são exaustivos e caros o que dificulta o desenvolvimento destes marcadores para espécies que não possuem o genoma ainda sequenciados. Uma forma de se amenizar os problemas encontrados na construção destes marcadores é a utilização de marcadores previamente desenvolvidos e caracterizados em espécies filogeneticamente próximas, processo este denominado de transferibilidade. O objetivo desse estudo foi avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites previamente desenvolvidos para a espécie *Hypsiboas raniceps* em indivíduos da espécie *Hypsibos albopunctatus*. Foram testados 16 locos microssatélites em 8 espécimes de *Hypsiboas albopunctatus*, machos, coletados nos municípios de Nazário, Pirenópolis e Barro Alto. Além da variação na temperatura de anelamento, variações nas concentrações de DNA, *Primers*, $MgCl_2$, também foram realizadas buscando otimizar a reação de amplificação destes marcadores pela técnica de PCR. As amplificações por PCR foram otimizadas para o volume final de 25 μ l com 70ng de DNA template. A concentração final para a otimização da reação foi realizada com Tampão de PCR 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,3mM de cada DNTP (Invitrogen), 2,5 pmol de cada primer, 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Dos 16 *primers* testados, apenas os *primers Hrani μ 1* e *Hrani μ 4* foram transferidos com sucesso. O *primer Hrani μ 1* se apresentou polimórfico contendo 3 diferentes alelos nos indivíduos testados. Ainda para este loco, foram calculados os parâmetros os seguintes parâmetros: heterozigosidade observada (0,37) e heterozigosidade esperada (0,68). Já o *primer Hrani μ 4* se apresentou monomórfico, com a presença de uma única banda de aproximadamente 360 pares de base. O baixo índice de transferência pode ser explicado tanto pela divergência genética encontrada entre as espécies como pelo tamanho de seus genomas, tendo em vista que o sucesso de amplificação de locos microssatélites pelo método de PCR pode está negativamente correlacionado com o tamanho do genoma.

Palavras-Chave: Anuros, microssatélites, transferibilidade

Abstract

There are several ways to evaluate the genetic structure of an organism, population or species. These forms include the techniques based on molecular tools, which allow direct verification of the nucleotide sequences of the genome of an organism. Of the various molecular markers that are used in studies of population genetics, we highlight the microsatellite markers. The methods of obtaining microsatellite markers are exhaustive and expensive which hampers the development of these markers for species not yet have the genome sequenced. One way to minimize the problems found in the construction of these markers is the use of markers previously developed and characterized in phylogenetically related species, a process known as transferability. The aim of this study was to evaluate the transferability of microsatellite markers previously developed for the species in *Hypsiboas raniceps* in individuals of the species *Hypsibos albopunctatus*. Were tested 16 microsatellite loci in eight specimens of *Hypsiboas albopunctatus*, male, collected in the municipalities of Nazário, Pirenópolis and Barro Alto. Besides the variation in the cities of Nazário, Pirenópolis and Barro Alto. annealing temperature, variations in the concentrations of DNA primers, MgCl₂, were also performed to optimize the amplification reaction of these markers by PCR. Besides the variation in the annealing temperature, variations in the concentrations of DNA, Primers, MgCl₂, were also performed to optimize the amplification reaction of these markers by PCR. The PCR amplifications were optimized for a final volume of 25 l with 70ng of template DNA. The final concentration to optimize the reaction was carried out using 1X PCR buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 0.3 mM of each dNTP (Invitrogen), 2.5 pmol of each primer, 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Of the 16 primers tested, only the primers *Hrani 1* and *Hrani 4* were successfully transferred. The primer *Hrani 1* presented polymorphic containing three different alleles in the individuals tested. Further for this loci, were calculated the following parameters: observed heterozygosity (0,37) and expected heterozygosity (0,68). The primer *Hrani 4* presented monomorphic, with the presence of a single band of approximately 360 base pairs. The low transfer rate can be explained by both genetic diversity found among species and by the size of their genomes, considering that the success of amplification microsatellite loci by PCR can be negatively correlated with the size of the genome.

Keywords: anurans, microsatellites, transferability

1. Caracterização Ecológica dos Organismos de Estudo

O cerrado brasileiro é atualmente considerado uma das áreas de maior biodiversidade existente, estando presente na lista das 25 áreas de conservação prioritárias do planeta (Myers, *et al.*, 2000). Contudo, a partir da década de 1950, com a modernização da agricultura, grande parte de seu território foi destruído, sendo a sua destruição a principal ameaça para a população de anfíbios que nele habitam, prejudicando o papel deste grupo na cadeia ecológica como controladores de insetos e outros invertebrados (Silvano; Segalla, 2005).

Mesmo com altos níveis de degradação ambiental, algumas espécies parecem apresentar resistência a alterações no ambiente, podendo ampliar sua distribuição geográfica mesmo em decorrência das ações antrópicas (Pedralli *et al.*, 2001). Dotado desta característica, está a espécie *Hypsiboas albopunctatus*, descrita por Spix em 1824 que se comporta como generalista no uso de habitats (Brandão; Araújo, 1998), ocorrendo em áreas de cerrado do Planalto Central, do sudeste do Brasil e Paraná. Mesmo sendo uma espécie de ampla distribuição geográfica, aspectos relacionados à sua ecologia têm sido pouco estudados (Araujo *et al.*, 2007).

A espécie *Hypsiboas albopunctatus* é um hilídeo agrupado na subfamília Hyliinae, tribo Cophomantini, que juntamente com as espécies, *H. raniceps*, *H. multifasciatus*, *H. lanciformes*, *H. fasciatus* e *H. calcaratus* formam o grupo *albopunctatus* (Faivovich *et al.*, 2005). Os machos medem em média cerca de 5,3 cm e as fêmeas 6,5 cm possuindo como ambiente reprodutivo riachos, poças e brejos temporários ou permanentes. A vocalização ocorre em alturas variadas, utilizando desde o solo até ramos e arbustos de árvores. As desovas ocorrem na forma de monocamadas flutuantes entre pedras e vegetação ou diretamente na água (Bastos *et al.*, 2003; Eterovick; Sazima, 2004).

Hypsiboas raniceps (Cope, 1862) possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em formações abertas tropicais da América do Sul. Esta espécie geralmente ocorre em maior abundância em áreas de inundações e sua reprodução está associada a extensas áreas alagadas próximas a vegetação aberta (Guimarães, 2001; La Marca *et al.*, 2004; Frost, 2011). As fêmeas de *H. raniceps* variam seu comprimento rostro-cloacal entre 7,4 e 8,0 cm enquanto que nos machos esta variação está entre 6,8 e 7,2 cm. Os machos geralmente utilizam como sítios de vocalização a vegetação arbustiva e apresentam comportamento territorialistas. Assim como observado para a espécie *H. albopunctatus*, a

a resistência a ambientes antropizados podendo ser
eza, qual espécie ocorre associada a habitats florestais,
poças, rios e lagoas (Guimarães, 2001; La Marca *et al.*, 2004; Frost, 2011).

2. Marcadores Moleculares: Mensurando a Variabilidade Genética

A estrutura genética é um dos principais componentes na evolução das espécies, já que é por ela que os indivíduos se mantêm ao longo do tempo, permitindo a adaptação evolutiva em decorrência das alterações ambientais. A estruturação genética de um grupo é diretamente influenciada por processos como: mutação, seleção, deriva genética, fluxo gênico e padrão reprodutivo da espécie (Wright, 1978; Angrizani, 2008).

Existem várias maneiras de se acessar a estrutura genética de um indivíduo, população ou espécie. A variabilidade morfológica é o indicador de variabilidade genética mais simples que se pode avaliar. Porém, como o fenótipo é diretamente relacionado ao ambiente, o uso da variação morfológica é ineficaz, já que estas características se apresentam em uma variação constante e contínua (Blouin; Brown, 2000; Castellano *et al.*, 2000). Outra forma de se avaliar a diversidade genética baseia-se de ferramentas moleculares, que permitem a verificação direta de variações do genoma de um organismo (Hedrick, 2005).

Os marcadores moleculares são definidos como sendo qualquer fenótipo molecular derivadas de regiões expressas ou não do genoma e que possa ser utilizada para a diferenciação entre indivíduos. Quando os marcadores moleculares apresentam comportamento mendeliano simples, podem ser empregados como marcadores genéticos (Ferreira; Gattapaglia, 1998).

Os marcadores genéticos apresentam grande potencialidade para estudos populacionais, permitindo a avaliação da diversidade em dois níveis básicos: 1-avaliação genética entre diferentes espécies; 2-avaliação genética dentro de uma mesma espécie (intra-específica ou interpopulacional) (Zuchi, 2002).

A amplificação *in vitro* das moléculas de DNA tornou-se possível com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, do inglês, Reação em Cadeia da Polimerase), desenvolvida por Kary Mullis em meados da década de 1980. Pela PCR, milhões de cópias de um segmento específico de DNA podem ser gerados em laboratório a partir de pequenas quantidades de amostras de DNA (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Ramalho *et al.*, 2000).

As análises genéticas em estudos de conservação geralmente são realizadas a partir de marcadores genéticos neutros, como as aloenzimas, marcadores microssatélites, RFLPs

phism, do inglês, Polimorfismos de Comprimento de
SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*, do inglês,
Polimorfismos de Único Nucleotídeo). Todos estes marcadores são classificados como
codominantes já que em organismos diplóides, é possível diferenciar os indivíduos
homozigotos dos heterozigotos (Tabela 1) (Hoglund, 2009).

A análise da variação genética através das aloenzimas consiste na avaliação da
diversidade genética em nível de proteína utilizando eletroforese em gel, normalmente gel de
amido. Embora os estudos aloenzimáticos ainda sejam realizados, eles, tornaram-se menos
comuns. Estratégias investigativas contemporâneas tendem a utilizar marcadores
microsatélites como melhor alternativa para mensurar a variação genética das espécies
estudadas (Hoglund, 2009).

Existem duas razões básicas para a mudança do uso das aloenzimas para marcadores
microsatélites como principal ferramenta em estudos de conservação. A primeira é devido as
variações aloenzimáticas, em alguns casos, se comportam como marcadores não-neutros, o
que significa que parte das variações observadas dentro e entre as populações podem ser
atribuídas à seleção. E a segunda razão é que estudos aloenzimáticos requerem grandes
quantidades de amostra biológica e de alta qualidade, o que implica frequentemente no abate
do organismo em estudo.

Marcadores RFLPs são obtidos através da fragmentação do DNA de estudo por meio
da utilização de diferentes enzimas de restrição. Diversos padrões de clivagem do DNA
ocorrem em diferentes indivíduos, devido às variações nucleotídicas existentes ao longo do
genoma de cada organismo. Os segmentos de DNA clivado podem ser identificados com a
utilização de sondas específicas marcadas com fluorescência. A grande disponibilidade de
centenas de enzimas de restrição permite a obtenção de um grande número de locos RFLPs
alcançando uma ampla cobertura no genoma (Lopes *et al.*, 2002).

Variações nas técnicas de RFLPs também são descritas na literatura, principalmente
aquelas onde se amplificam uma região genômica de interesse a partir das técnicas de PCR e
em seguida faz-se o tratamento do produto de amplificação por enzimas de restrição para a
verificação de polimorfismo em sítios de restrição. A variante desta técnica dispensa o uso de
sondas, já que apenas a região previamente amplificada se apresentará em géis de
identificação (Lopes *et al.*, 2002; Hoglund, 2009).

Os SNPs tem se tornado cada vez mais popular em estudos genéticos, contudo sua
utilização é restrita a organismos que possuem seu genoma amplamente seqüenciado. Estes
marcadores evoluem por mutações pontuais e ou através de inserções ou deleções, eventos

de mutação na ordem de 10^{-6} por geração) (Hoglund,

Outra classe de marcadores moleculares amplamente utilizados em estudos de diversidade genética são os marcadores dominantes. Para estes marcadores compreendem-se aqueles em que os alelos de um mesmo loco são revelados apenas pela presença ou ausência de uma banda, visualizados em géis de agarose ou poliacrilamida, não sendo possível a distinção de locos homocigotos dos heterocigotos. Neste grupo destacam-se principalmente os marcadores RAPDs e AFLPs. (Lopes *et al.*, 2002; Hoglund, 2009).

Marcadores RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, do inglês, Amplificação Randômica de DNA Polimórfico) amplificam locos cromossômicos utilizando-se de pequenos oligonucleotídeos *primers*. Para esta técnica, utilizam-se primers inespecíficos, que se anelam em diferentes regiões do genoma em estudo, revelando vários locos do DNA estudado. A baixa reprodutibilidade de marcadores RAPDs vem fazendo com que este marcador venha caindo em desuso (Lopes *et al.*, 2002; Hoglund, 2009).

Assim como os marcadores RAPDs, os marcadores AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, do inglês, Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado) também são técnicas baseadas em PCR, aonde um conjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA por enzimas de restrição, são amplificados *in vitro* após a ligação de adaptadores em suas extremidades terminais. Esta técnica detecta um grande número de locos possibilitando uma ampla cobertura do genoma a um baixo custo.

Estas características fazem com que os marcadores AFLPs venham substituindo marcadores os RAPDs em estudos de diversidade genética (Lopes *et al.*, 2002; Hoglund, 2009).

métodos frequentemente utilizados em estudos de conservação e genética de populações.

	Aloenzimas	Microssatélites	RFLP	RAPD	AFLP
Dominância	<i>Codominante</i>	<i>Codominante</i>	<i>Codominante</i>	<i>Dominante</i>	<i>Dominante</i>
Alelos nulos	<i>Raro</i>	<i>Comum</i>	<i>Extremamente raros</i>	<i>Não aplicável</i>	<i>Não aplicável</i>
Transferibilidade	<i>Entre famílias e gêneros</i>	<i>Dentro de gêneros</i>	<i>Entre gêneros</i>	<i>Dentro de espécies</i>	<i>Dentro de gêneros</i>
Reprodutibilidade	<i>Alta</i>	<i>Alta</i>	<i>Alta</i>	<i>Baixa</i>	<i>Alta</i>
Quantidade de amostra necessária	<i>Vários miligramas de tecido</i>	<i>10-20 ng DNA</i>	<i>2-10 mg DNA</i>	<i>2-10 ng DNA</i>	<i>0,2-1 µg DNA</i>
Custo relativo	<i>Baixo</i>	<i>Alto</i>	<i>Médio</i>	<i>Baixo</i>	<i>Médio</i>
Potencial de mapeamento comparativo	<i>Excelente</i>	<i>Limitado</i>	<i>Bom</i>	<i>Muito limitado</i>	<i>Muito limitado</i>
Potencial para estudos de variação genética adaptativa	<i>Bom</i>	<i>Limitado</i>	<i>Limitado</i>	<i>Limitado</i>	<i>Limitado</i>

Legenda: RFLP, polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição; RAPD, Amplificação Randômica de DNA Polimórfico; AFLP, Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado. Modificado de Hoglund (2009).

ra a identificação de seres humanos, animais e plantas, estão os marcadores moleculares denominados microssatélites ou STRs (*Short Tandem Repeats*, do inglês, Pequenas Repetições em Tandem). Os microssatélites são sequências de DNA formadas por 2 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em sequências distribuídas pelo genoma (Ferreira; Grattapaglia, 1995).

Os STRs são considerados marcadores neutros, já que são geralmente encontrados em regiões não codificadoras do genoma, não sofrendo pressão seletiva, fato que, aliado as altas taxas de mutações, contribui para que se tornem marcadores extremamente abundantes e polimórficos, possuindo, portanto um grande número de alelos para um determinado loco em uma espécie. São marcadores codominantes, possuindo padrão de herança mendeliana, sendo de ampla utilização em estudos de vínculo genético e genética de populações (Ferreira; Grattapaglia, 1995; Small *et al.*, 1998).

Diferenças a respeito da definição dos microssatélites com relação ao número de repetições são constantemente encontrados na literatura. Schlotterer (1998) classifica microssatélites como repetições *in tandem* de sequências de 1 a 5 pares de base; Armour *et al.* (1999) sugerem repetições nucleotídicas de 2 a 8 pares de base. Recentemente, uma das classificações mais citadas na literatura foi proposta pelos autores Chambers; MacAvoy (2000) na qual os microssatélites são definidos como repetições de sequências de 2 a 6 nucleotídeos com um tamanho mínimo de 8 pares de base para que sua estrutura seja validada como um microssatélite. Portanto, para que um microssatélite de 2 nucleotídeos seja validado, o mesmo deve possuir no mínimo 4 repetições. Sequências menores que 8 nucleotídeos são consideradas arranjos simples de DNA.

Segundo Goldstein; Schotterer (1999), os microssatélites podem ser classificados em três diferentes grupos: sequências perfeitas, compostas e interrompidas, sendo possível a combinação desses três grupos no mesmo STR. Dotados apenas de um único motivo de repetição estão os microssatélites perfeitos, não havendo nenhuma outra base nitrogenada que altere o padrão de repetição (GTGTGTGTGT). Existem regiões microssatélites que apresentam diferentes unidades de repetição em sua estruturação sendo assim classificados como sequências compostas (CTCTCTCTATATATAT). Microssatélites interrompidos apresentam bases adjacentes aos seus motivos interrompendo o padrão de repetição da cadeia (GTGTGTGTAAGTGTGT).

Os microssatélites ainda podem ser classificados de acordo com o número de nucleotídeos que compõe sua unidade de repetição: mononucleotídeos, dinucleotídeos,

anucleotídeos e hexanucleotídeos se apresentarem em cinco ou seis nucleotídeos, respectivamente (Queller *et al.*, 1993; Ellegren, 2004).

Sistemas para identificação individual em seres humanos padronizados de microssatélites são baseados em tetranucleotídeos. Da mesma forma ocorre em cães e gatos. Para eqüinos, bovinos e ovinos os microssatélites recomendados pela Sociedade Internacional para Genética Animal ó ISAG ainda são derivados de dinucleotídeos (Halverson; Basten, 2005; Menotti-Raymond, 2005; Isag, 2011) .

Dois mecanismos são propostos para explicar as taxas elevadas de mutação que são observadas em locos microssatélites:

- 1- Ocorrência de *crossing-over* desigual durante o processo de recombinação meiótica;
- 2- O *slippage* da DNA polimerase durante o processo de replicação.

O *slippage* atualmente é o fenômeno mais aceito para explicar as altas taxas de mutação em locos microssatélites, sendo o responsável pela formação de novos alelos pela adição ou remoção de um motivo de repetição, modelo conhecido como *stepwise* (Ellegren, 2004). Durante o processo de replicação do DNA, seja a fita molde ou a fita nascente, podem se dissociar e formarem alças internas de DNA, levando a um pareamento incorreto gerando o aumento ou a diminuição no comprimento em uma das fitas de DNA através da inserção ou perda de uma unidade de repetição (Figura 1). A maioria das alterações são corrigidas pelo sistema de reparo de DNA, assim, somente uma pequena fração destes eventos mutacionais irá gerar um novo alelo microssatélite (Li *et al.*, 2002; Ellegren, 2004).

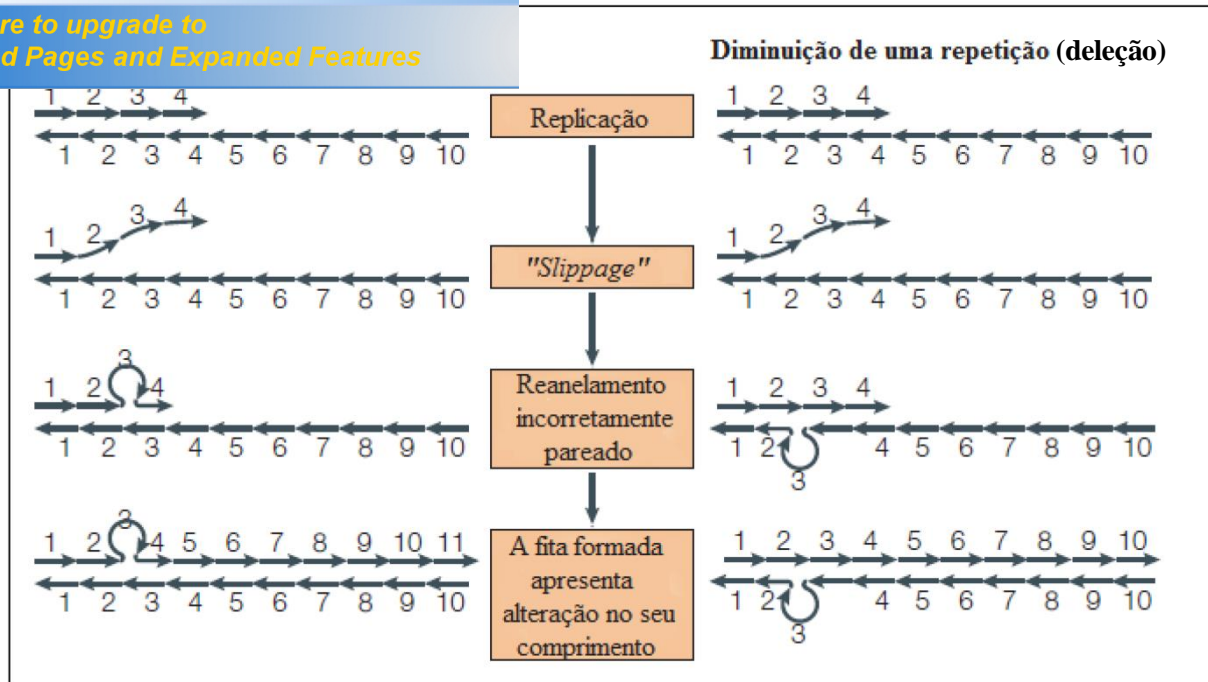


Figura 1. Representação do mecanismo de *slippage*. Formação de alças de DNA durante o processo de replicação celular. Caso ocorra reanelamento de forma incorreta, haverá a adição ou a retirada de um motivo da fita de DNA nascente. Fonte: Ellegren (2004).

Percebe-se uma correlação positiva entre o tamanho do genoma e a quantidade de locos microssatélites nele presente. Contudo, apenas em plantas essa frequência se apresenta de forma contrária, ou seja, a quantidade de microssatélites está negativamente correlacionada com o tamanho do genoma. Entre os genomas de eucariotos seqüenciados até o presente momento, são os mamíferos que apresentam maior densidade de regiões microssatélites (Ellegren, 2004).

Como as seqüências flanqueadoras de diferentes táxons possuem uma alta homologia, os *primers* para locos microssatélites isolados para uma espécie também podem ser utilizados em espécies relacionadas, contudo, a porcentagem de lócus microssatélites transferíveis entre as espécies decresce à medida que as distâncias genéticas das mesmas aumentam.

2.1.1 Transferibilidade de Marcadores Microssatélites

Os métodos de isolamento e caracterização de marcadores microssatélites são exaustivos e caros, sendo que, para cada nova espécie a ser trabalhada, aonde não há o genoma já seqüenciado, faz-se necessário um novo isolamento e caracterização de locos microssatélites, sendo esta a maior dificuldade de se utilizar estes marcadores em estudos populacionais (Silva, 2008).

as problemáticas encontradas no processo de
os marcadores microssatélites implica no uso de
marcadores previamente desenvolvidos e caracterizados para espécies filogeneticamente
próximas, processo este denominado de transferibilidade. Através deste procedimento, os
primers projetados para uma espécie podem ser testados em espécies correlacionadas, e a
amplificação cruzada poderá ocorrer se as regiões flanqueadoras do loco analisado forem
conservadas em relação à sequência da espécie para a qual os microssatélites foram isolados
(Selkoe; Toonen, 2006).

Gale; Devos (1998) afirmaram que a genômica comparativa seria uma abordagem
promissora na utilização de informações e ferramentas genéticas entre diferentes espécies, já
que o conteúdo nucleotídico é geralmente conservado se as espécies forem evolutivamente
relacionadas.

Inicialmente acreditava-se que as regiões de anelamento de *primers* microssatélites
estavam sob fortes restrições seletivas, possivelmente relacionadas a uma funcionalidade para
estas regiões. Contudo, novos estudos indicaram que as taxas de alterações nucleotídicas nas
sequências flanqueadoras dos microssatélites são iguais àquelas encontradas nos íntrons,
sugerindo que, se os íntrons são neutros, portanto as regiões flanqueadoras dos microssatélites
também devem ser (Rico *et al.*, 1996; Brohede; Ellegren, 1999). Esta teoria é compatível com
os dados que mostram que regiões microssatélites são mais numerosos dentro de regiões não-
gênicas do genoma.

Altos índices de transferência de marcadores microssatélites intra-específica e inter-
específica já foram descritos, contudo o sucesso da transferência decai a medida que se
aumenta a distância genética entre as espécies (Gaitán-Solís *et al.*, 2002).

Em um estudo realizado por Barbará *et al.* (2007), verificou-se uma maior
predominância de sucesso de transferência de marcadores quando a amplificação cruzada era
realizada em organismos pertencentes a um mesmo gênero. Ao avaliarem as taxas de sucesso
na transferências de STRs, os répteis, as aves, os mamíferos e os invertebrados foram os que
apresentaram os maiores índices de transferência. Contudo, a medida em que se aumenta a
distância filogenética dos organismos, observa-se um declínio na transferência dos
marcadores STRs.

Vários estudos de transferibilidade têm sido realizados envolvendo o grupo dos
anfíbios, quase sempre na ordem Anura. Primmer; Merila (2002) testaram a transferência de
72 marcadores microssatélites em 6 espécies do gênero *Rana* (*Rana arvalis*, *Rana esculenta*,
Rana latastei, *Rana lessonae*, *Rana temporaria* e *Rana catesbeiana*). Dos 339 testes de

apresentaram amplificação positiva, sendo que apenas polimorfismo. Contudo, mesmo havendo uma baixa taxa total de amplificação positiva, o estudo identificou 26 locos heterólogos que puderam ser utilizados em outras espécies de *Rana*.

Conte *et al.* (2009) isolaram e caracterizaram 10 marcadores microssatélites para a espécie *Physalaemus cuvieri*. Estes marcadores foram testados nas espécies *Physalaemus cf. cuvieri*; *Physalaemus ephippifer* e *Physalaemus albonotatus*, havendo amplificação positiva para todos os marcadores, contudo, nem todos foram polimórficos para todas as espécies.

Oito marcadores desenvolvidos por Jourdan-Pineau *et al.* (2009) para a espécie *Pelodytes punctatus* foram testados nas espécies *Pelobates cultripes*, *Pelodytes ibericus* e *Pelodytes caucasicus*. Apenas a espécie *Pelobates cultripes* não obteve nenhuma amplificação para os marcadores testados. Para a espécie *Pelodytes ibericus* cinco dos oito marcadores amplificaram positivamente enquanto que para a espécie *Pelodytes caucasicus* houve duas ampliações positivas.

Em conjunto estes dados indicam que a transferibilidade de marcadores microssatélites são uma boa opção para a obtenção de regiões microssatélites em espécies para as quais estes tipos de marcadores ainda não tenha sido descritos. Os dados atuais indicam que para espécies geneticamente relacionadas é possível identificar um número adequado de marcadores para estudos de genômica comparativa, contribuindo significativamente para a redução de tempo e dinheiro gastos relacionados aos experimentos para identificação de microssatélites em uma dada espécie.

3. Ferramentas Genéticas para a Conservação de Anfíbios

Os anfíbios são encontrados em todos os continentes exceto na Antártica, apresentando mais de 6.638 espécies reconhecidas. De acordo com o último levantamento realizado pela Sociedade Brasileira de Herpetologia em 2010, o Brasil possui 847 espécies de anuros, 1 espécie de caudata e 27 espécies de gymnophionas totalizando 875 espécies de anfíbios (Silvano; Segalla, 2005; SBH, 2011). Contudo, anfíbios brasileiros são pouco estudados, principalmente a respeito de sua distribuição geográfica, ecologia e história natural.

Registros de declínios em populações de anfíbios se tornaram comuns a partir da década de 1980. Como principais fatores responsáveis por este declínio estão a destruição dos habitats e a ocorrência de doenças infecciosas no grupo. Outras causas também podem ser apontadas como fator de contribuição para o declínio da população de anfíbios como poluição

rodução de espécies invasoras e tráfico de animais
(*et al.*, 2004).

Estudos sobre as causas responsáveis pela redução das populações de anfíbios brasileiros são raros e pouco compreendidos. A falta de monitoramento das populações de anfíbios em longo prazo agregado ao pouco conhecimento da biologia das espécies dificulta a compreensão dos motivos que levam ao declínio destes animais (Silvano; Segalla, 2005). Extinções de espécies ocorrem pela simples inexistência de políticas de conservação efetivas e adequadas. Portanto, o intenso declínio dos anfíbios demonstra a necessidade da expansão de pesquisas para este grupo, especialmente em regiões aonde dados como diversidade, abundância e distribuição geográficas são escassas como no Brasil, sobretudo aos anuros da região Centro-Oeste (Young *et al.*, 2001; Bastos, 2003; Silvano; Segalla, 2005).

Dentre as várias formas de se estudar uma determinada espécie destaca-se a avaliação da diversidade genética da mesma, já que este é o principal fator de adaptação das espécies frente as mudanças ambientais. A diversidade genética é manifestada por diferenças em caracteres biológicos, sendo definida como a variedade de alelos e genótipos presentes em um grupo de população ou espécie (Frankham *et al.*, 2008).

Nesse contexto, desenvolveu-se uma área de estudos, denominada genética da conservação, cujo objetivo fundamental é avaliar a diversidade genética de um grupo, população ou espécie, a fim de preservar os mesmos como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem as variações ambientais. Assim, a genética da conservação é definida com sendo um ramo da genética que utiliza da teoria e técnicas da genética, principalmente genética de populações para compreender, avaliar e reduzir o risco de extinção das espécies (Frankham *et al.*, 2008).

Estudos de genética da conservação em grupos de anfíbios têm realizados, com destaque para a ordem Anura, tendo em vista que são o grupo mais representativo da classe dos anfíbios e que vem sofrendo graves declínios nas últimas décadas.

A intensificação agrícola tem gerado sérias ameaças aos anfíbios devido à fragmentação dos habitats naturais, aumentando o isolamento geográfico das populações. Scribner *et al.* (2001) demonstraram em estudos de genética de populações, utilizando marcadores microssatélites, que espécies do gênero *Bufo* de áreas rurais da Inglaterra possuem tamanho populacional e variabilidade genética diretamente correlacionados com os níveis de preservação dos lagos e lagoas e com o uso da terra. Assim, os dados daquele estudo indicaram que a degradação ambiental indiscriminada está resultando em perda significativa

minuição do tamanho populacional do gênero *Bufo* na

Rowe; Beebee (2003) relataram alta depreciação genética em pequenas populações isoladas da espécie *Bufo calamita* na Grã-Bretanha, acentuando-se ainda mais com a fragmentação do habitat da espécie estudada.

Burns *et al.* (2004) utilizaram quatro loci microssatélites para avaliar 21 populações da espécie *Litoria aurea* na Austrália. O objetivo daquele estudo foi compreender o alto declínio desta espécie (>80% nos últimos 40 anos), índice altamente elevado quando comparado a outros declínios populacionais. Da mesma forma, 12 loci microssatélites foram utilizados fornecendo evidências de efeito gargalo recente em oito populações da rã européia *Hyla arborea* na Dinamarca, onde esta espécie sofreu um rápido declínio nos últimos anos (Andersen *et al.*, 2004). Ambos os estudos demonstram a eficiência dos STRs como estimadores de diversidade genética, sendo portanto, ferramentas genéticas úteis que podem auxiliar construção de planos de manejo de espécies ameaçadas.

Marcadores microssatélites e AFLPs foram utilizados em conjunto para avaliar a alteração da diversidade genética da espécie de salamandra *Dicamptodon tenebrosus* em florestas que tiveram grandes áreas desmatadas na região Britânica. O estudo demonstrou que a diversidade genética em espécimes da área devastada foi muito menor do que a encontrada em matas preservadas. Estimou-se ainda que levaria pelo menos 200 anos para a reestruturação da diversidade genética da salamandra, naquela região, assumindo que ocorra uma recuperação imediata da floresta degradada (Curtis; Taylor, 2004).

Desta forma, o declínio nas populações naturais de anfíbios pode ser considerado dramático, já que os mesmos são vulneráveis à degradação de seus habitats. Assim, é necessário o desenvolvimento de ferramentas que facilite o estudo da diversidade genética dos anfíbios, já que por serem tão especializados em seus ambientes de origem, acabam se tornando espécies sentinelas para a biodiversidade geral do planeta (Alford; Richards, 1999; Storfer, 2003; Ficetola; De Bernardi, 2004; Stuart *et al.*, 2004; IUCN, 2011).

4. Materiais e Métodos

4.1 Coletas de Material Biológico

Para a caracterização dos locos microssatélites no presente trabalho, foram utilizados 8 espécimes de *Hypsiboas albopunctatus*, machos, coletados nos municípios de Nazário, Pirenópolis e Barro Alto. Os indivíduos foram coletados, com autorização do IBAMA

4.2 Extração e Isolamento de DNA genômico

O DNA para a amplificação dos locos microssatélites, foram extraídos a partir de amostras de fígado da espécie *Hypsiboas albopunctatus* que estavam embebidos em etanol absoluto e armazenados em freezer a -20°C . Para o isolamento do DNA utilizou-se o kit de extração Wizard® *Genomic DNA Purification Kit* (Promega USA), seguindo-se as instruções do fabricante.

A integridade e qualidade do DNA extraídos foram verificadas em gel de agarose 1,5%, intercalados com brometo de etídeo e fotodocumentados no sistema de vídeo-documentação Image Master® ó VDS (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). O DNA extraído foi quantificado utilizando-se um espectrofotômetro GeneQuant® (Pharmacia Biotech, Suécia).

Os *primers* para todos os locos microssatélites foram inicialmente testados em diferentes temperaturas de anelamento para verificar a transferência dos marcadores. Além da variação na temperatura de anelamento, variações nas concentrações de DNA, dos *Primers* e de MgCl_2 , também foram realizadas para otimizar a reação de amplificação.

Para a observação da amplificação dos loci STRs, após as reações de PCR, $6\mu\text{L}$ da reação contendo o possível produto amplificado foram adicionados a $3\mu\text{L}$ de tampão de amostra (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol) e foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X durante 3 horas a 10 V/cm. Para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, utilizou-se um marcador molecular de 100pb (Invitrogen, USA). Após a separação eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídeo 0,5mg/l, em banho, por 20 minutos e fotodocumentados.

4.3 *Primers* para a Amplificação dos Loci Microssatélites

Inicialmente desenvolvidos para a espécie *Hypsiboas raniceps*, 16 pares de *primers* para loci microssatélites foram testados em amostras de *Hypsiboas albopunctatus* com a intenção de verificar sua transferibilidade em espécies relacionadas geneticamente.

Os *primers* escolhidos para o teste (Tabela 2) foram desenvolvidos por Arruda *et al.* (2010) e são, até o momento, os únicos marcadores desenvolvidos especificamente para uma espécie do gênero *Hypsiboas*. Os marcadores foram originalmente construídos utilizando-se a

da apresentada por Kijas *et al.* (1994). Para o
utilizadas sondas do tipo (CA) / (GA) e (CT) / (GA).

Tabela 2. Descrição das seqüências dos *primers* testados para locos microssatélites e tamanhos dos alelos amplificados em *Hypsiboas raniceps* (Arruda *et al.*, 2010).

Loci	Seqüência (5' 3ø)	Tamanho dos alelos esperado	Nº de alelos esperado
Hraniµ1	F: GCACTCATGCAGACACA R: CTGCTGCAGGATACTAAAGGAC	261-271	3
Hraniµ2	F: GAGCGGTGCCAGGTTAGTAGT R: CAAGGTAGGCGTGTGTGTTGT	96-100	2
Hraniµ3	F: AGGTACACACACTCCATCCACATC R: GCCGCTGCCACAACACTATG	203-211	3
Hraniµ4	F: GAGCACACCATTATCACACAGAC R: CAGCTTGTCAGCATAGAGATTGTC	194-214	8
Hraniµ5	F: AGGGGTTCCCTTACAGGT R: AGGTACAATCAAGCCACAACATA	173-177	2
Hraniµ6	F: CTTGGGACTCCTTATGCTGTTG R: AGGGTGACAGAAGGTGGAATC	143-165	7
Hraniµ7	F: AGCGTGTTGAGTTTCAGGTG R: TCAGAAGGAAGTTGCAGAGG	253-291	15
Hraniµ8	F: CACACCCCATCCACATACAA R: GGCCAGGAGGTGAGACTG	192	1
Hraniµ9	F: AGGTAAGTACCGGAGCATCAGAC R: CAGGGAGTGTTCTGTGTGTGTT	142	1
Hraniµ10	F: TCCTCTCTCTTCTGTGTCTCTTTC R: GTCAGTCATGTCACAGCGTTT	239-277	12
Hraniµ11	F: GTGCCCTGCCATCATCAC R: CGCAAATCTTGGGCTGTCT	350-442	16
Hraniµ12	F: CCCTCTTGCTCTCACGTTC R: AGAGCAAGCGAGAGAGTGC	277	1
Hraniµ13	F: TCTCTGCTCTTTCTCTGGTCTC R: CACTGCTGACTCTGGAGGA	214-222	4
Hraniµ14	F: CAGAGCGGGACAGGTTAGTAGT R: AGAAGTCTATGGGAGCCGAGTA	226	1
Hraniµ15	F: ATGACAGGTCACGGCAGAA R: GTGTTAACGAGCAGTTGGACAG	125	1
Hraniµ16	F: AGTAACCTCTGTCACCCAGCAC R: CAGATATGGGGTATGCCTGGT	96-105	2

Os marcadores testados foi inferido comparando-se o tamanho do fragmento esperado. Contudo, marcadores que apresentaram ampliações com pesos moleculares superiores ou inferiores ao esperado não foram descartados, desde que, a amplificação tenha ocorrido de forma homogênea e constante em todas as amostras de todos os espécimes testados e que tenham aparecido em todas as repetições subsequentes.

A partir das ampliações positivas, confirmadas em gel de agarose, procedeu-se a corrida dos produtos da amplificação (8 μ l de amostra) em gel de poliacralamida a 8% a 10 V/cm por 8 horas. Para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador molecular de 10pb (*Invitrogen USA*). Em seguida os géis foram corados em solução de brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL e foi realizada a captura da imagem em sistema de vídeo documentação.

4.4 Caracterização dos Loci Microsatélites

A identificação do tamanho dos alelos foi realizada a partir da medição das bandas usando-se o software *GelAnalyser v. 2010a*® por comparação com o marcador de peso molecular de 10pb. Através da análise dos géis, foi construída uma matriz com as informações dos genótipos dos indivíduos para proceder às análises de polimorfismo.

A caracterização dos locos microsatélites envolveu a quantificação de número de alelos por locos (A), heterosigosidade observada (H_o), Heterosigosidade esperada (H_e). Foram calculados também o índice de exclusão de paternidade (Q) segundo Weir (1996), que indica a probabilidade de excluir os prováveis pais de um filhote usando um determinado marcador e o índice de identidade genética (I) que indica a probabilidade de encontrar dois indivíduos não relacionados com um genótipo idêntico em uma população (Paetkau, 1995). Todos os parâmetros genéticos foram estimados para cada loco através do programa ARLEQUIN® 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

Após a determinação dos *primers* transferidos com sucesso, os mesmos foram caracterizados para a determinação do número de alelos existentes por loco assim como foram estimados os valores de heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de exclusão de parentesco (Q) e o índice de identidade genética (I).

5 Resultados e Discussão

Marcadores microsatélites permitem estimar a diversidade genética com grande acurácia. Estudos genéticos baseados em marcadores microsatélites permitem também

acionadas à ecologia do organismo de estudo com um (2006; Selkoe; Toonen, 2006).

Contudo, grandes dificuldades também são encontradas ao se trabalhar com os marcadores microssatélites. A metodologia de isolamento e caracterização destes marcadores é complexa, exigindo altos recursos e tempo. E mesmo depois de isolados, os mesmos devem ser validados para a amplificação dos alelos em um indivíduo.

Nesta etapa de triagem, vários microssatélites isolados são descartados por apresentarem sequencias que não favorecem sua amplificação. Existem ainda loci que são descartados por não serem correspondentes a sequências dos genomas e derivados de artefatos da técnica que geram regiões inespecíficas. Após todos os testes, um loco que apresente seus parâmetros de amplificação definidas (concentração de *primers*, concentração de $MgCl_2$ e termociclagem) pode ainda não ser útil como um marcador molecular, havendo a possibilidade de o mesmo ser monomórfico para a espécie no qual ele foi desenvolvido (Roratto *et al.*, 2008).

O protocolo de amplificação dos locos microssatélites desenvolvidos por Arruda *et al.* (2010) não se mostraram satisfatórios para a amplificação dos oligonucleotídeos em amostras de espécimes de *Hypsiboas albopunctatus*. Contudo, após sucessivas variações nas concentrações das amostras de DNA, *Taq* DNA polimerase, $MgCl_2$ e temperatura de anelamento tornou-se possível a otimização do protocolo para as amostras de *H. albopunctatus*. As amplificações por PCR foram otimizadas para o volume final de 25 μ l com 70ng de DNA alvo. A concentração final para a otimização da reação foi realizada com tampão de PCR 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,3mM de cada DNTP (*Invitrogen, USA*), 2,5 pmol de cada primer, 1U *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen, USA*). Após a realização destes ajustes nas condições de amplificação por PCR, obteve-se uma amplificação satisfatória com o protocolo de termociclagem apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolo de termociclagem de marcadores microssatélites desenvolvidos por Arruda *et al.* (2010) otimizados para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação	94	30	
Anelamento	X	60	40
Extensão	72	60	
Extensão final	72	5 min	1
Armazenamento	4	Ô	Ô

X: temperatura de anelamento específica para cada *primer*.

desenvolvidos para a espécie *H. raniceps*, apenas os foram considerados adequados para a utilização na espécie *H. albopunctatus* devido à qualidade dos produtos apresentados (Tabela 4).

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos por Arruda *et al.* (2010) para espécie *Hypsiboas raniceps* que apresentaram transferência positiva para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*.

Locos	Primer 5' 3'	Temperatura de Anelamento	Tamanho observado dos alelos
<i>Hraniμ1</i>	F: GCACTCATGCAGACACA R: CTGCTGCAGGATACTAAAGGAC	61°C	260-280
<i>Hraniμ4</i>	F: GAGCACACCATTATCACACAGAC R: CAGCTTGTCAGCATAGAGATTGTC	64°C	360

O tamanho dos alelos amplificados pelo conjunto de *primers Hrani μ 1* esteve de acordo com o tamanho esperado, entre 260 e 280 pares de bases (Figura 2). Já para o conjunto de *primer Hrani μ 4* (Figura 3) os alelos amplificados ficaram acima do tamanho esperado, aproximadamente entre 360 pares de base. Aumento nos números de repetições de alelos microssatélites pode ser atribuído a uma possível inserção de íntrons a qual está sujeita o genoma dos organismos. Para a confirmação desta hipótese, a amostra deverá ser sequenciada.

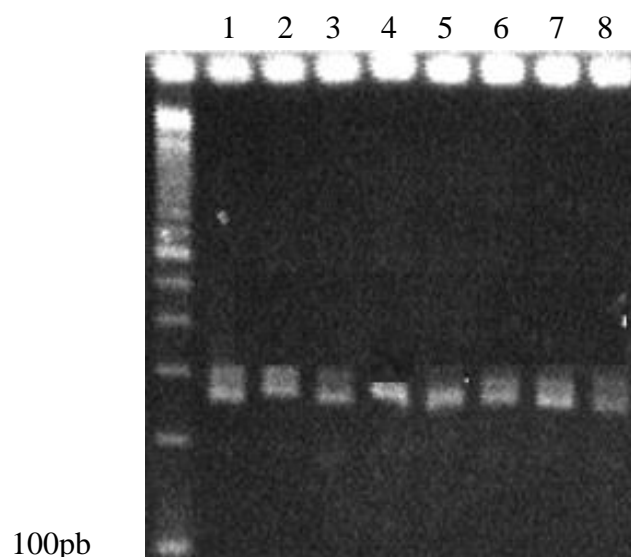


Figura 2. Gel de agarose a 2% indicando o padrão de bandas (alelos) dos produtos de PCR do loco *Hrani μ 1* transferido para espécie *Hypsiboas albopunctatus*.

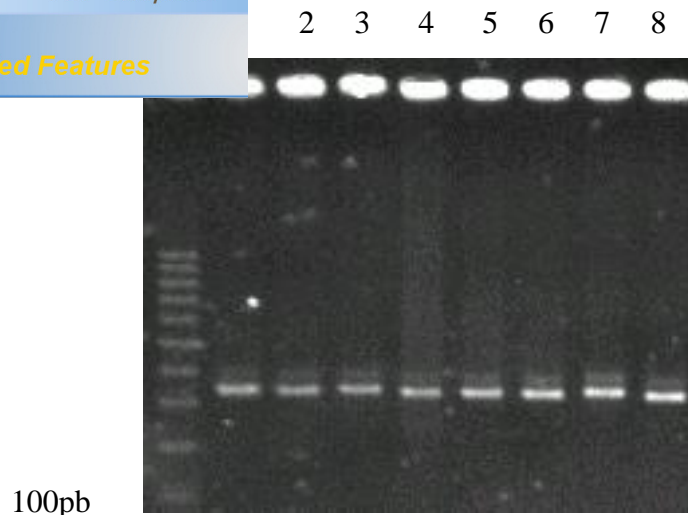


Figura 3. Gel de agarose a 2% indicando o padrão de bandas (alelos) dos produtos de PCR do loco *Hraniµ4* transferido para espécie *Hysiboas albopunctatus*.

Embora a diminuição da temperatura de anelamento no processo de PCR possa, teoricamente, resultar em maior sucesso de amplificação, temperaturas abaixo de 60 °C se mostraram insatisfatórias por não ser útil para a identificação de locos polimórficos.

Estudos demonstram que a amplificação cruzada de marcadores microssatélites declinam à medida que a distância genética entre os táxons aumenta. Portanto as relações filogenéticas entre o grupo focal e o grupo teste são de extrema importância para o sucesso da transferência dos marcadores (Primer; Merila, 2002).

Tendo em vista a relação genética do grupo focal (*Hysiboas raniceps*) e o grupo teste (*Hysiboas albopunctatus*) (Figura 4), apenas a distância genética entre os taxons não seriam suficientes para explicar a baixa taxa de amplificação, já que há grande similaridade genômica de grupos tão filogeneticamente relacionados. Contudo, estudos anteriores realizados por diversos autores com organismos distintos indicam que as taxas de sucesso de amplificação obtidas no presente estudo estão de acordo com outros apresentados na literatura (Primer Merila, 2002; Oliveira *et al.*, 2006; Selkoe; Toonen, 2006).

As amplificações de 2 locos dos 16 locos testados demonstram que os dados estão condizentes com aqueles apresentados nas literaturas, já que o percentual de sucesso de amplificação foi de aproximadamente 12,5%. Primer; Merila (2002), obtiveram 27% de amplificações positivas em estudo de transferibilidade para o grupo *Rana*, contudo, este aumento no percentual de locos transferidos podem ser relacionados a uma maior identidade genética entre as espécies do gênero.

Este estudo corrobora dados que indicam que a taxa de sucesso no grupo dos anfíbios está em desacordo com aqueles apresentados para outros grupos de vertebrados. Este fato demonstra claramente que a informação taxonômica por si só, não é um bom indicador para as perspectivas de sucesso de amplificação heteróloga, podendo constatar que o nível de homologia de sequências de locos microssatélites varia drasticamente entre as espécies (Gregory, 2001; Garner, 2002; Primer; Merila, 2002).

Embora muitas vezes a não amplificação seja resultado da falta de conservação dos sítios de anelamento dos *primers*, é improvável que este fato não afete todos os indivíduos dentro de uma espécie. Assim sugere-se que o sucesso de amplificação de locos microssatélites pelo método de PCR possa estar negativamente correlacionado com o tamanho do genoma (Gregory, 2001; Garner, 2002).

Uma característica que pode estar relacionada ao baixo número de *primers* amplificados é o fato do genoma de anfíbio ser extenso, cerca de duas vezes maior do que o tamanho médio do genoma humano e quatro vezes maior do que o genoma de aves. Nesse contexto, o tamanho do genoma poderia explicar, em parte, a pequena taxa de amplificação observada neste estudo, quando se compara com os dados descritos para mamíferos e aves (Gregory, 2001; Garner, 2002).

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

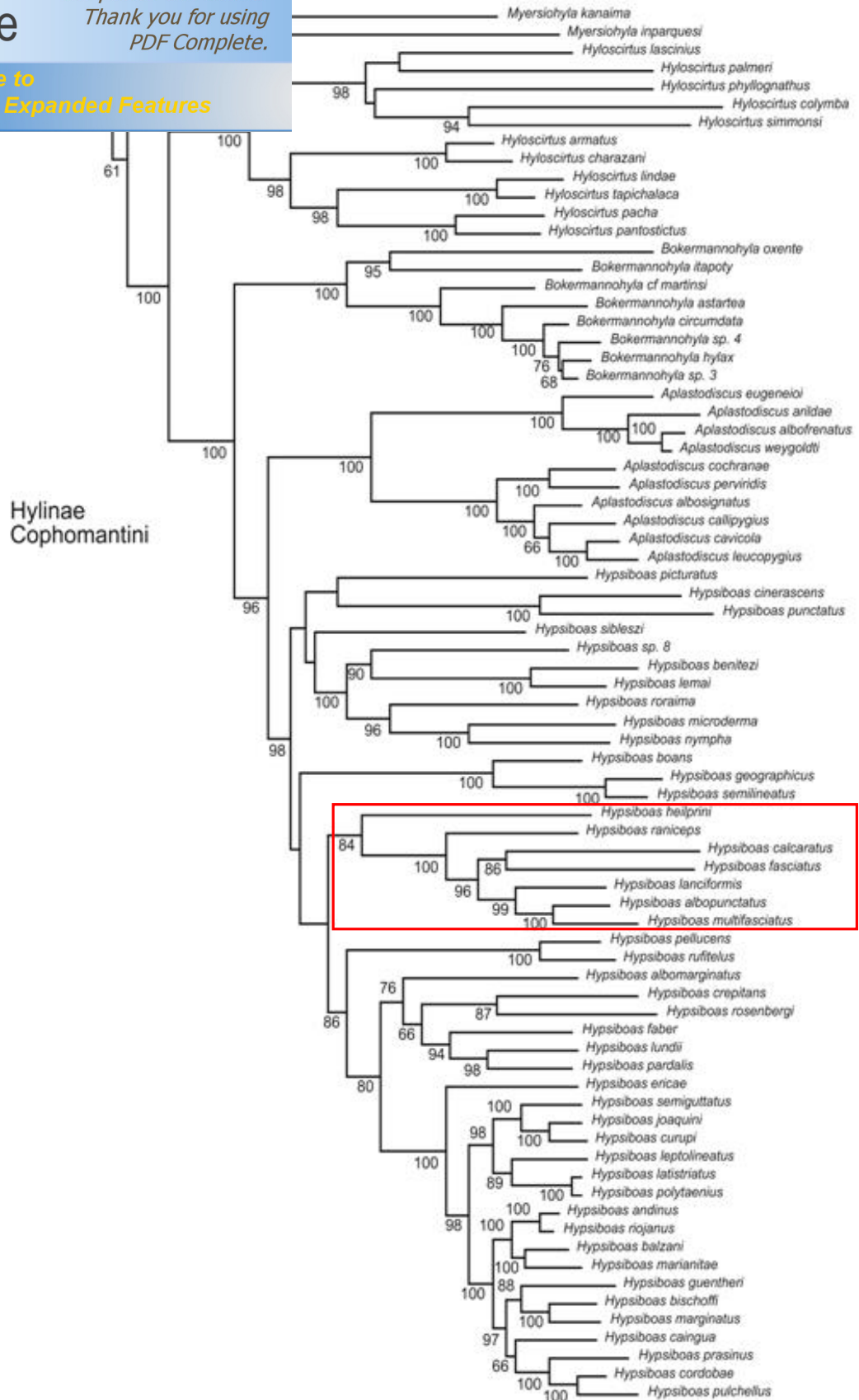


Figura 4. Relação Filogenética baseada em genes nucleares e mitocondriais para o Grupo *albopunctatus* com destaque para as espécies *Hypsiboas raniceps* e *Hypsiboas albopunctatus* utilizadas para o estudo de transferibilidade de marcadores microssatélites. Modificado de Wiens *et al.* (2010).

ossatélites em géis de poliacrilamida revelaram que o te para a espécie *Hypsiboas raniceps* demonstrou-se conservado para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*, apresentando o número e tamanho de alelos semelhantes entre as duas espécies. Os parâmetros de heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada, para este *loco*, também se apresentaram semelhantes aqueles encontrados por Arruda *et al.* (2010) para a espécie *H. raniceps*, sugerindo uma semelhança na distribuição e frequência dos alelos deste *loco* para ambas as espécies.

Os valores de heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de exclusão de parentesco (Q), índice de exclusão de parentesco (Q) e o índice de identidade genética (I) para os locos transferidos se encontram apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização dos locos transferidos com sucesso para a espécie *Hypsiboas albopunctatus*.

Locos	Repetição	Temperatura C°	Tamanho (pb)	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>					
				N	A	H_o	H_e	Q	I
<i>Hraniμ1</i>	(CA) ₆	61 C°	260-280	8	3	0.37	0.68	0.19	0.41
<i>Hraniμ4</i>	(CA) ₉	64 C°	360	8	1	-	-	-	-

(N) número de indivíduos analisados; (A) número de alelos por locos; (H_o) heterozigosidade observada; (H_e) heterozigosidade esperada; (Q) índice de exclusão de parentesco; (I) índice de identidade genética.

O índice de exclusão de parentesco (Q), utilizado para determinar a probabilidade de se excluir um possível pai para um filhote foi de 0,19, demonstrando que este *loco* isoladamente não é um bom marcador para se estimar o grau de relacionamento genético entre indivíduos. O baixo valor de Q é consequência do direto número de alelos por *loco*, que apresentarem frequências alélicas similares.

O valor do índice de identidade genética (I) encontrado para o locos *Hraniμ1* foi de 0,41. O índice mostrou a probabilidade de se encontrar um genótipo idêntico entre dois indivíduos em uma amostragem aleatória, utilizando este marcador. Como o valor encontrado de I foi elevado, isto demonstra que este marcador sozinho, não pode ser utilizado para estudos de estruturação gênica em diferentes populações.

O locos *Hraniμ4* também foi transferido com sucesso, contudo, pode-se concluir que este *loco* apresenta apenas um único alelo no tamanho aproximado de 360 pares de base, caracterizando-se, portanto como um *loco* monomórfico e assim, não apresentando utilidade em estudos de genética populacional.

es, foi possível amplificar regiões microssatélites na espécie *Hypsiboas albopunctatus* com o uso de *primers* descritos para *Hypsiboas raniceps*.

Apenas 12,5% dos marcadores microssatélites testados apresentaram amplificação positiva. Assim, a taxa de amplificação se justifica tanto pela diferença genética em sítios de anelamentos dos *primers*, quanto pelo o extenso tamanho do genoma de anfíbios que interfere no sucesso da amplificação.

Apesar da conservação de regiões que flanqueiam os microssatélites em espécies relacionadas permitirem a transferência de alguns marcadores entre espécies geneticamente próximas, o que reduz o tempo e custo destes, a descrição de marcadores específicos para cada espécie em estudo deve ser estimulada. Há dificuldades inerentes ao método de PCR para se observar sequências entre espécies, usando-se *primers* e a amplificação inespecífica. Ambos os casos ocorreram no presente estudo que não permitiram o uso de todos os marcadores descritos.

Dos 2 marcadores transferidos com sucesso, apenas o loco *Hrani μ 1* se apresentou polimórfico. Os parâmetros genéticos Q e I obtidos para este marcador indicam que ele, isoladamente, não pode ser utilizado em estudos populacionais de *Hypsiboas albopunctatus*. Contudo, em conjunto com outros marcadores descritos posteriormente, pode se tornar um recurso adequado para estudos genéticos de populações de *Hypsiboas albopunctatus*.

A conservação apenas do loco *Hrani μ 1* entre os 16 testados indica que apesar das espécies *Hypsiboas raniceps* e *H. albopunctatus* serem filogeneticamente relacionadas, há mudanças significativas em seus genomas que interferem no processo de transferibilidade dos marcadores microssatélites o que impossibilita a utilização dos *primer* heterólogos, necessitando o desenvolvimento de marcadores específicos para a espécie de interesse.

AGUIAR JUNIOR, O. et al. Cytogenetic analysis of four dart-poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura, Dendrobatidae). **Herpetologica**, v. 58, n. 3, p. 293-303, 2002.

AGUIAR JUNIOR, O. et al. Phylogenetic relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics**, v. 23, n. 5, p. 455-463, 2007.

ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. **Annual Review Ecology, Evolution and Systematics**, v. 30, p. 133-165, 1999.

AMARO-GHILARDI, R. C.; RODRIGUES, M. T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal studies after differential staining and fluorescence *in situ* hybridization using telomeric probe in three *Leptodactylus* species (Leptodactylidae, Anura). **Caryologia**, v. 57, n. 1, p. 53-65, 2004.

ANDERSEN, L. W.; FOG, K.; DAMGAARD, C. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). **Proceedings of Royal Society London B**, v. 271, n. 1, p. 1293-1302, 2004.

ANDERSON, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. In: D.M. Green and S.K. Sessions (Org.). **Amphibian cytogenetics and evolution**. New York: Academic Press. 1991. p. 299-331.

ANGRIZANI, R. C. **Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores de DNA microssatélites para *Aniba Rosaedora Ducke* (Lauraceae): Uma espécie florestal Amazônica Ameaçada**. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em genética, conservação e biologia evolutiva) - Instituto nacional de pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

AQUINO, L. et al. *Hypsiboas albopunctatus*. In: IUCN (Org.). **IUCN Red List of Threatened Species, 2008**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/55378>>. Acesso em: 21 Marc. 2011.

PERI, A.; HOLMES, R. M. Ecological aspects of the (Bufonidae) in central Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 2(3), p.165-169, 2007.

ARMOUR, J. A. L. et al. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: Goldstein, D. B.; Schöltterer, C. (ed.) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford, 1999.

ARRUDA, M. P. et al. Development of eleven polymorphic microsatellite markers for the Chaco Treefrog, *Hypsiboas raniceps*. **Conservation Genetics Resources**, v. 2, n.1, p. 93-96, 2010.

AZEVEDO-RAMOS, C. et al. 2004. *Hypsiboas multifasciatus*. In: IUCN 2008. **IUCN Red List of Threatened Species**. <<http://www.iucnredlist.org/details/55571>>. Acesso: 21 de Março. 2011.

BALDISSERA JR., F. A.; BATISTIC, R. F. Estudos citogenéticos em banda C e RON de algumas espécies de anuros brasileiros. In: **X Congresso latino americano de genética e XXXVIII congresso brasileiro de genética**, Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Genética, v. 15, p. 78, 1992.

BALDISSERA JUNIOR., F. A.; BATISTIC, R. F.; HADDAD, C. F. B. Cytotaxonomic considerations with the description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo* (Anura: Bufonidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 20, n. 4, p. 413-420, 1999.

BALDISSERA JR., F. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 335-345, 1993.

BARBARÁ, T. et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular ecology**, v.16, n. 18, p. 3759-3767, 2007.

BARBOSA, A. S. **Sistema biogeográfico do cerrado. Alguns elementos para sua caracterização**. 2º ed. Instituto do trópico subúmido. Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, 2006.

o. In L. B. Nascimento & M. E. Oliveira. (Ed.).
ia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo
Horizonte, MG. p. 354. 2005.

BASTOS, R. P. et al. **Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás**. Stylo Gráfica e Editora, Goiânia. p. 82, 2003.

BATISTIC, R. F. **Aspectos Citogenéticos da Evolução de *Phylomedusa* (Anura, Amphibia)**. 1989. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil, 1989.

BECAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**, v. 21, p. 191- 208, 1968.

BEÇAK, M. L.; DENARO, L.; BEÇAK, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. **Cytogenetics**, v. 9, p. 225-238, 1970.

BLOUIN, M. S.; BROWN, S. T. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. **Oecologia**, v. 125, p. 358- 361, 2000.

BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. In: J. L. Vial, eds., **Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary Research on Major Problems**. University of Missouri Press, Columbia, p. 337-349, 1973.

BRANDÃO, R. A.; ARAÚJO, A. F. B. A herpetofauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas. In: Marinho-Filho, J.; Rodriguez, F. H. G. & Guimarães, M. M. (orgs.). **A fauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas. História natural e ecológica em um fragmento de Cerrado do Brasil Central**. Brasília, GDF/IEMA/IBAMA, p. 9-21, 1998.

BRANDÃO, R. A. et al. Observations on the ecology of *Pseudis bolbodactyla* (Anura, Pseudidae) in central Brazil. **Phyllomedusa**, v. 2, n.1, p. 3-8, 2003.

BRASILEIRO, C. A. et al. Amphibians of an open cerrado fragment in southeastern Brazil. **Biota Neotropical**, v. 5, n. 2, p. 1617, 2005.

rosatellite evolution: polarity of substitutions within
ances. **Proceedings of the Royal society of London**, v.
266, p.825-833, 1999.

BURNS, E. L.; ELDRIDGE, M. D. B.; HOULDEN, B. A. Microsatellite variation and population structure in a declining Australian hylid *Litoria aurea*. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1745-1757, 2004.

BUSIN, C. S. **Estudo citogenética de espécies dos gêneros *Pseudis* e *Lysapsus* (Anura, Hylidae)**. 2005. 98 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Estadual de Campinas, 2005.

BUSIN, C. S. et al. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. **Genetica**, v. 133, N.2, p. 119-127, 2008.

BUYS, C. H. C. M ; OSINGA, J. Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs, **Chromosoma**, v. 89, p. 387-396, 1984.

CAMPOS, J. R. C. et al. Karyotypic similarity among *Barycholos ternetzi* and five species of the genus *Eleutherodactylus* from southeastern Brazil (Anura, Brachycephalidae). **Micron**. v.39, p. 151-159, 2008.

CARDOSO, A. J. **Utilização de recursos para reprodução em comunidade de anuros do sudeste do Brasil**. 1968, 216 f. Tese (Doutorado em Ecologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1968.

CARVALHO, K. A.; GARCIA, P. C. A.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). **Genetics and Molecular Research**, v.8, n.4, p. 1498-1508, 2009.

CASTELLANO, S.; GIACOMA, C.; DUJSEBAYEVA, T. Morphometrical and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. **Biological Journal of Linnean Society of London**, v. 70, p. 341-360, 2000.

Cytogenetic Data on Species of the family Hylidae
ctives. **Publicações UEPG. Saúde, Ponta Grossa**, v.

15, n.1, p. 67-86, 2009.

CATROLI, G. F. **Cariótipo de seis espécies de *Bokermannohyla* dos grupos de *B. circumdata* e *B. pseudopseudis* (Anura, Hylidae)**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, 2008.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126, p. 455-476, 2000.

COLLI, G. R.; BASTOS, R. P.; ARAÚJO, A. F. B. The character and dynamics of the Cerrado herpetofauna. *In*: Olivera, P. S. & Marquis, R. J. eds. **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**, New York, Columbia University. 223-241p, 2002.

CONTE, M. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for the natural populations of Barker frog *Physalaemus cuvieri*. **Conservation Genetics**, v.10, n.6, p. 1849-1852, 2009.

CURTIS, J. M. R.; TAYLOR, E. B. The genetic structure of coastal giant salamanders (*Dicamptodon tenebrosus*) in a managed forest. **Biological Conservation**, v.115, p. 45654, 2004.

DIAS, B. F. S. Cerrado: uma caracterização. *In* Dias, B. F. de S. **Alternativa de desenvolvimento dos Cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. Ibama. Brasília-DF. 197 f. p.11-25, 1992.

DUELLMAN, W. E. **Hylid frogs of Middle America**. Monografia (Historia Natural) University of Kansas Museum of Natural History. N° 1, 1970.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Review Genetics**, v. 5, p. 4356445, 2004.

ETEROVICK, P. C.; SAZIMA, I. **Anfíbios da Cerra do Cipó**. Ed. Puc-minas. Belo Horizonte, MG. 150 p, 2004.

EIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software analysis. **Evolution. Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-

50, 2005.

FAIVOVICH, J. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura, Hylidae). **Cladistics**, v.18, n.4, p. 367-393, 2002.

FAIVOVICH, J. et al. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 294, p. 1-240, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220 pp, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN. Brasília - DF. 220 pp, 1995.

FICETOLA, G. F.; DE BERNARDI, F. Amphibians in a human dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. **Biological Conservation**, v.119, p. 219-230, 2004.

FORESTI, F. **Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia- Anura)**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade de São Paulo, 1972.

FRANKHAM, R.; BALOOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Riberão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética). Editora SBG. 280p, 2008.

FROST, D. R. **Amphibia Species of the World: an online reference. Version 5.3**. Disponível em <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/references>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acesso em: 06 Abr. 2011. 2011.

GAITÁN-SOLÍS, E. et al. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**. v. 42, n.6, p. 2128-2136, 2002.

comparative genetics after 10 years. **Science**, v. 282,

GARNER, T. W. J. Genome size and microsatellites: The effect of nuclear size on amplification potential. **Genome**, v. 45, p. 2126-215, 2002.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press. New York. p.352, 1999.

GREGORY, T. R. **The animal genome size database**. Disponível em: <http://www.genomesize.com>. Acesso em: 12 Abr. 2011. 2001.

GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n = 24$ to $2n = 22$ in the genus. **Genetica**. v. 130, p. 2816-291, 2007.

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Ed. Guanabara Koogan. p.141, 1988.

GUIMARÃES, L. D. **Ecologia reprodutiva de *Hyla raniceps* (Anura: Hylidae) na região de Pontalina, Sul do estado de Goiás**. 2001. 78 f. Dissertação (Mestrado em biologia, Ecologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Goiás, 2001.

HALVERSON, J.; BASTEN, C. A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. **Journal Forensic Sciences**, v. 50, n. 2, p.352-363, 2005.

HEDRICK, P. W. **Genetics of Populations**, 3rd ed., Jones and Bartlett, Boston, p.737, 2005.

HERNANDEZ-VERDUN, D.; ROUSSEL, P.; GAUTIER, T. Nucleolar proteins during mitosis, In: Sumner, A. T.; Chandley, A. C., eds. **Chromosomes Today**. Chapman and Hall Ed. London, vol. 11, p. 79-90, 1993.

HOGLUND, J. **Evolutionary conservation genetics**. Oxford University Press, 2009.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.

IUCN. **International Union for Conservation of Nature. Red List of Threatened Species.**

Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 07 Dez. 2011.

IZECKSOHN, E.; DE CARVALHO-E-SILVA, S. P. **Anfíbios do município do Rio de Janeiro.** Editora Universidade Federal do Rio de Janeiro. p.147, 2001.

JOURDAN-PINEAU, H. et al. Development of eight microsatellite markers in the parsleyfrog (*Pelodytes punctatus*). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 2616263, 2009.

KAISER, H. et al. Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. **Genetica**, v. 98, p. 956102, 1996.

KASAHARA, S.; SILVA, A. P. Z.; GRUBER, S. L. Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 471-467, 1998

KASAHARA, S.; SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia - Bufonidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 19, n.2, p. 237-242, 1996.

KASAHARA, S. et al. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 103, p.155-162, 2003.

KASHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de Vertebrados.** 1º ed. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética, 2009.

KIJAS, J. M. H. et al. 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **Biotechniques**, v. 16, p. 656662.

KING, M. **Animal Cytogenetics.** Amphibia, 4. Chordata 2. Berlin, John B. p.241, 1990.

some numbers of anuran Amphibians. *Bulletin of*
Amphibia-Reptilia, n.3, p. 83-127, 1990.

KWET, A.; DI-BERNADO, M. Pró-Mata ó **Anfíbios, Amphiben, Amphibians**. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil. p.107, 1999.

KWET, A. The genus *Pseudis* (Anura: Pseudidae) in Rio Grande do Sul, southern Brazil, with description of a new species. **Amphibia- Reptilia**, v. 21, p. 39655, 2000.

LA MARCA, E. et al. *Hypsiboas raniceps*. **In: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species**. <<http://www.iucnredlist.org/details/55622>>. Acesso: 21 Marc. 2011. 2004.

LEME, D. M. et al. Avaliação dos padrões cariotípicos no gênero *Scinax* (Hylidae, Anura), baseada na análise de nove espécies. **In: XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, Brasília. Revista Brasileira de Zoologia**. p. 203, 2004.

LI, Y. C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 2453-2465, 2002

LIMA, L. P.; BASTOS, R. P.; GIARETTA, A. A. A New *Scinax* Wangle, 1830 of the *S. rostratus* group from Central Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arquivo do Museu Nacional**, v. 4, n. 62, p. 505-512, 2004.

LIMA, A. P. et al. **Guia de sapos da reserva Adolpho Ducke**. Amazônia Central. Ed. Attema. Manaus, AM, 2006.

LOPES, R. et al. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapl, e Aflp). **Biocnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 56-60, 2002.

LOURENÇO, L. B.; GARCIA, P. C. A.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetics of a new species of *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura: Leptodactylidae), with the description of an apparent case of pericentric inversion. **Amphibia-Reptilia**, v. 24, p.47- 55, 2003.

LOURENÇO, L. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; CARDOSO, A. J. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura,

staining and Fluorescence in situ hybridization. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 2, p. 128-132, 1998.

LUCCA, E. J.; JIM, J.; FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia**, v. 27, p. 183-92, 1974.

MARRIS, E. The forgotten ecosystem. **Nature**, v. 437, n. 13, p. 944-945, 2005.

MEDEIROS, L. R.; ROSSA-FERES, D. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromosomal Differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) With a Description of NOR Polymorphism in *H. nana*. **Journal of Heredity**, v. 94, n. 2, p. 149-154, 2003.

MELLINK, C. H. M.; BOSMA, A. A.; DE HANN, N. A. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA in situ hybridization signals in six breeds of domestic pig. **Hereditas**, v. 120, p. 141-149, 1994.

MENOTTI-RAYMOND, M. A.; DAVID, V. A.; WACHTER, L. L.; BUTLER, J. M.; O'BRIEN, S. J. An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. **Journal of Forensic Science**, v. 50, n. 5, p. 1061-1070, 2005.

MILLER, O. L. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. **The Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 3, p. 15-17, 1981.

MIURA, I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). **Chromosoma**, v.103, p. 567-74, 1995.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 24, p. 853-858, 2000.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, Evolution and Genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p. 294-307, 2006.

PAETKAU, D. et al. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 347-354, 1995.

PEDRALLI, G.; NETO, A. S. G.; TEIXEIRA, M. C. B. Diversidade de anfíbios na região de Ouro Preto. **Ciência hoje**, v.30, p.70-73, 2001.

PRIMMER, C. R.; MERILLA, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation genetics**, v. 3, p. 445-449, 2002.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, L. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 8, n. 8, p. 285-288, 1993.

RABELLO, M. N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, v. 23, p. 456-49, 1970.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 2ª Edição. Lavras: Editora UFLA, 2000.

RICO, C.; RICO, I.; HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. Proceedings of the royal society. **Biological sciences**, v. 263, n. 1370, p. 549-557, 1996.

RODRIGUES, M. T.; TELLES, A. M. *Scinax similis*. In: IUCN 2008. **2008 IUCN Red List of Threatened Species**. <<http://www.iucnredlist.org/details/55995>>. Acesso em: 21 Marc. 2009. 2004.

RORATTO, P. A. et al. PCR-mediated recombination in development of microsatellite markers: mechanism and implications. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 58-63, 2008.

ROWE, G.; BEEBEE, T. J. C. Population on the verge of a mutational meltdown? Fitness costs of genetic load for an amphibian in the wild. **Evolution**, v. 57, p. 1776-1811, 2003.

SBH. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Brazilian amphibians ó List of species. **Lista de espécies de anfíbios do Brasil**. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>>. Acesso em: 11 Out. 2011. 2011.

SCHAWAZACHER, H. G.; WACHTLER, F. Nucleolus. **Anatomy and Embryology**, v. 188, p. 515-536, 1993.

es really simple sequences? **Current Biology**, v.8, p.

SCHIMID, M. et al. Chromosome banding in Amphibia XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). **Chromosoma**, v. 99, p. 413-423, 1990.

SCRIBNER, K. T. et al. Environmental correlates of toad abundance and population genetic diversity. **Biology Conservation**, v. 98, p. 2016-210, 2001.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615-629, 2006.

SILVA, A. P. Z. et al. Karyotypes and nucleolus organizer regions of the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). **Iheringia Serie Zoologia**, v. 88, p. 159-164, 2000.

SILVA, A. P. Z. et al. Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. **Amphibia-Reptilia**, v. 25, p. 185-196, 2004.

SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. **Hereditas**, v. 131, p. 135-141, 1999.

SILVA, A. P. Z. et al. Multiple nucleolus organizer regions in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analyses. **Genetica**, v. 127, p. 35-44, 2006.

SILVA, T. O. **Amplificação cruzada de locos de Microssatélites em Crustácea Decapoda**. 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em biodiversidade animal) - Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

Silvano, D. L.; Segalla, M. V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p.79-86, 2005.

er, R. E.; Nelson, R. J. Discrimination coho salmon within the Fraser River, British Columbia, using microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 141-155, 1998.

Smith, S. A. et al. A phylogenetic perspective on elevational species richness patterns in Middle American Treefrogs: Why so few species in lowland tropical rainforests? **Evolution**, v. 61, p. 1188-1207. 2007.

STORFER, A. Amphibian declines: Future directions. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 151-163, 2003.

STUART, S. *Scinax constrictus*. In: IUCN 2008. **2008 IUCN Red List of Threatened Species**. <<http://www.iucnredlist.org/details/61793>>. Acesso em: 21 Marc. 2011. 2006.

STUART, S. N. et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783-1786, 2004.

SUMMER, A. T. C-banding and related methods. In: **Chromosome Banding**. Unwin Hyman Ed. London. p. 39-90, 1990.

SUZUKI, H. et al. Variation in the distribution of the silver staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wild mouse *Mus musculus*. **Molecular Biology**, v. 7, p. 271-282, 1990.

TANG, J. F. et al. Z. Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize. **Euphytica**, v. 151, n. 1, p. 87-93, 2006.

TRUEB, L. Systematic relationships of neotropical horned frogs, genus *Hemiphractus* (Anura: Hylidae). **Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas**, v. 29, p. 1-60, 1974.

VEIGA-MENONCELLO, A. C.; LIMA, A. P.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetics of two central, Amazonian species of *Colostethus* (Anura, Dendrobatidae) with nidicolous tadpoles. **Caryologia**, v. 56, p. 253-260, 2003.

Phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and
mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 55, p. 871-882,

2010.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data.** Sinauer Associates. Sunderland, MA. 1996.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of populations, volume 4. Variability within and among natural populations.** Univ. Chicago Press, Chicago, Illinois, 1978.

YOSIDA, T. H. Sex chromosomes of the tree frog, *Hyla arborea japonica*. **Journal of the Faculty of Science**, Hokkaido University Series, ser. VI, v.13, p. 352-358, 1957.

YOUNG, B. E. et al. Disappearing jewels: The status of NewWorld amphibians. **Nature Serve**, Arlington, EUA. 2004.

YOUNG, B. et al. Population declines and priorities for Amphibian conservation in Latin America. **Conservation Biology**, v. 15, p. 1213-1223, 2001.

ZUCCHI, M. I. et al. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus spp.* to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 512-514, 2002.