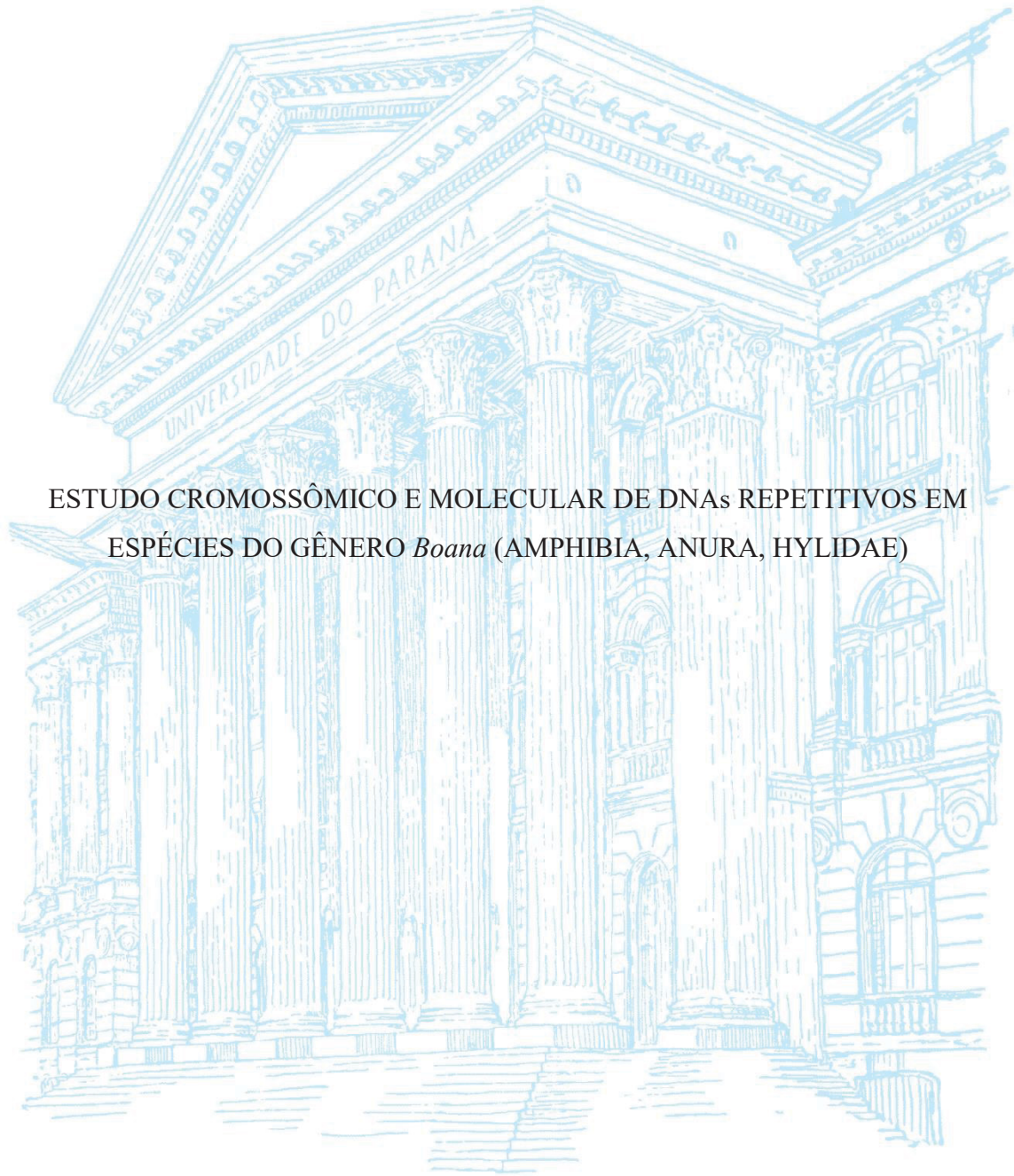


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SEBASTIÃO VENANCIO NETO



ESTUDO CROMOSSÔMICO E MOLECULAR DE DNAs REPETITIVOS EM
ESPÉCIES DO GÊNERO *Boana* (AMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE)

CURITIBA

2023

SEBASTIÃO VENANCIO NETO

ESTUDO CROMOSSÔMICO E MOLECULAR DE DNAs REPETITIVOS EM
ESPÉCIES DO GÊNERO *Boana* (AMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE)

CHROMOSOMAL AND MOLECULAR STUDY OF REPETITIVE DNAs IN
SPECIES OF THE GENUS *Boana* (AMPHIBIA, ANURA)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Bueno Noleto

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Venancio Neto, Sebastião.

Estudo cromossômico e molecular de DNAs repetitivos em espécies do gênero *Boana* (Amphibia, Anura, Hylidae). / Sebastião Venancio Neto. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Bueno Noleto.

1. Amphibia anura. 2. Genética. 3. DNA. 4. Cariótipo. 5. Anfíbio – Evolução. 6. Hylidae.
I. Vicari, Marcelo Ricardo. II. Noleto, Rafael Bueno. III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SEBASTIÃO VENANCIO NETO** intitulada: **Estudo cromossômico e molecular de DNAs repetitivos em espécies do gênero *Boana* (Amphibia, Anura, Hylidae)**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica
06/04/2023 11:13:00.0
MARCELO RICARDO VICARI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
28/04/2023 07:42:23.0
MARIA CLAUDIA GROSS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO
LATINO-AMERICANA - FOZ DO IGUAÇU)

Assinatura Eletrônica
24/04/2023 08:32:01.0
IRIS HASS
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
27/06/2023 11:54:00.0
VIVIANE DEMETRIO DO NASCIMENTO
Avaliador Externo (COLÉGIO ESTADUAL GENERAL OSÓRIO)

Assinatura Eletrônica
08/04/2023 21:46:54.0
RAFAEL BUENO NOLETO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ)

Dedico esse trabalho aos meus amigos
Ernani Miguel Cecchin, Heron Diego Madureira
e Kathleen Evelyn de Marchi
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente ao meu pai João, minha mãe Salete e minha irmã Fabiula, por todo o apoio emocional e estrutural que foram fundamentais para o desenvolvimento não só deste trabalho, mas o meu como pessoa. Eu amo vocês, família.

Agradeço imensamente ao meu orientar Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari e à Profª. Draª. Viviane Nogaroto Vicari por abrirem as portas e sempre me darem o suporte necessário para conclusão do trabalho. Por serem mais que professores, estarem sempre dispostos a ajudar e por todas as contribuições científicas e pessoais. Muito obrigado por todos os ensinamentos, conselhos e por acreditarem em mim, vida longa!

Ao meu mentor, coorientador e amigo Prof. Dr. Rafel Bueno Noletto, não posso dizer pela paciência, mas sim persistência em acreditar em mim (até quando eu mesmo não acreditava). Agradeço não só por possibilitar a realização do meu sonho de continuar na academia, mas também por ser admiração e inspiração em todos os momentos. Pela parceria dessa jornada de 10 anos que se encerra agora, pelo menos por enquanto. Aqui fica meu, singelo e carregado de lembranças, muito obrigado!

Agradeço à banca de acompanhamento Profª. Draª Michelle Orane e Profª. Drª. Iris Hass por todo o aprendizado e sugestões durante todo o desenvolvimento da tese, foram fundamentais e deixo aqui registrado a minha gratidão.

Agradeço também ao Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi e à Dra Camilla Borges Gazolla pelo auxílio no desenvolvimento da tese durante a pandemia de COVID-19, disponibilidade do espaço físico do laboratório, sondas microssatélites e acompanhamento metodológico foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

Agradeço a todos meus colegas que a vida em laboratório me proporcionou, especialmente à Michelle (por além de amiga ser minha banca de acompanhamento e estar sempre presente), ao Matheus (por ser fundamental no desenvolvimento do projeto e por me ensinar a importância de ser rigoroso durante as técnicas), à Viviane (por todo o apoio incondicional que me ofertou nos últimos anos), ao Lucas (pelas inúmeras risadas que sempre deixaram o percurso mais leve), à Larissa (por sempre estar disposta a ajudar e pelos vários e longos papos sobre crossfit), à Geize (minha veterana da graduação que me recebeu com carinho e de braços abertos no lab), ao Enzo (por estar presente há pouco tempo mas por todas as aventuras já vividas) e à Carol (por sempre aguentar meus surtos e estar ali para dizer que passaria, com jeito doce de prezar pelo bem estar de todos e ser tão parecida comigo, com certeza um dos maiores presentes que a pós me trouxe). Agradeço a todos pelos momentos, por toda a paciência e disposição em me esclarecer as dúvidas, que não foram poucas.

Agradeço aos meus verdadeiros amigos que perceberam e ainda continuam comigo mesmo após os vários surtos e sequelas que a pós me trouxe.

Agradeço aos meus eternos amigos Ernani Miguel Cecchin, Heron Diego Madureira e Kathleen Evelyn de Marchi que fizeram a passagem cedo demais e levaram um pedaço de mim. Vocês serão lembrados eternamente e dedico este trabalho exclusivamente a vocês. A saudade é contínua, o amor também.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa; à Universidade Estadual do Paraná, *campus* União da Vitória e à Universidade Federal do Paraná por toda a estrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR e todo seu corpo docente.

A CAPES pelo fomento do projeto.

A todos que colaboraram direta e indiretamente, meu muito obrigado!

Esse é um pedaço do meu sonho, mano.

E ele é do tamanho do mundo.

ConeCrewDiretoria

Sempre fui sonhador e é isso que me mantém vivo!

Mano Brown

RESUMO

A ordem Anura, composta pelos popularmente conhecidos sapos, rãs e pererecas, vem sofrendo uma forte ameaça à sua conservação, com relatos de extinções recentes. Hylidae é a mais diversa família da ordem, composta por três subfamílias: Hylinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae. A tribo Cophomantini (uma das tribos de Hylinae) é um clado diverso de anuros neotropicais composta por cinco gêneros. *Boana* foi retirado inicialmente da sinonímia de *Hyla* e posteriormente chamado de *Hypsiboas*, mudanças estas que refletem as intensas reorganizações filogenéticas sofridas pelo gênero. Sabendo da vasta diversidade do grupo, estudos de taxonomia integrativa têm sido importantes para compreender a evolução e relações do clado. Diante da importância ecológica do grupo, estudos citogenéticos têm sido usados para enriquecer o cenário evolutivo e auxiliar na resolução de incertezas taxonômicas e sistemáticas. Logo, o objetivo deste trabalho foi contribuir para o enriquecimento dos estudos cromossômicos em hilídeos a partir da utilização de marcadores de citogenética clássica, mapeamento cromossômico *in situ* e sequenciamento de DNAs repetitivos, em três espécies do gênero *Boana*, alocadas em três grupos taxonômicos diferentes, todas provenientes da Mata Atlântica paranaense. Os cariótipos estudados apresentaram diferença entre si, sendo que *B. faber* e *B. prasina* apresentaram $2n = 24$ cromossomos invariavelmente, enquanto *B. albopunctata* apresentou $2n = 22$ cromossomos com eventual presença de um cromossomo B. O cariótipo com $2n = 24$ cromossomos é uma característica frequente do gênero *Boana*, cuja origem estaria no cariótipo com $2n = 26$ cromossomos que, a partir de fusões cromossômicas, inversões pericêntricas ou ainda reposicionamentos centroméricos, podem vir a explicar a variação na estrutura cariotípica entre hilídeos. Bandas heterocromáticas foram encontradas predominantemente em regiões pericentroméricas em todas as espécies, embora bandas C adicionais sobre regiões teloméricas e/ou intersticiais se mostraram parcialmente espécie específicas. As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram localizadas em apenas um pequeno par dos cariótipos, cuja localização é comum em Hylinae e sugere uma homeologia envolvendo os cromossomos portadores de RONs. O mapeamento cromossômico de sequências microssatélites juntamente com rDNA 5S, 18S e sonda telomérica vêm como fatores a enriquecer no entendimento de sequências repetitivas do DNA e sua relação com a modelagem dos cariótipos estudados. O elemento transponível (TE) *Tc1/Mariner* apresentou marcações dispersas em todos os cromossomos das três espécies estudadas. A estrutura e a origem de sequências repetitivas podem explicar a organização atual dos genomas. As sequências do TE *Tc1/Mariner* isoladas neste estudo apresentaram alta integridade e com todos os domínios funcionais, sugerindo que estes transposons estão em fase recente de invasão e ativos nos genomas de *Boana*. O mapeamento *in situ* das sequências repetitivas apresentadas aqui são inéditas para a família Hylidae, sendo mais uma ferramenta a questionar a ideia de cariótipo conservado em anuros, diante das variações aqui apresentadas.

Palavras chave: Anfíbios; DNAs repetitivos; Evolução cariotípica; FISH.

ABSTRACT

The order Anura, composed of the popularly known toads, frogs and tree frogs, has been suffering a strong threat to its conservation, with reports of recent extinctions. Hylidae is the most diverse family of the order, comprising three subfamilies: Hylinae, Pelodyadinae and Phyllomedusinae. Tribe Cophomantini (one of the tribes of Hylinae) is a diverse clade of Neotropical anurans comprising five genera. *Boana* was initially withdrawn from the synonymy of *Hyla* and later called *Hypsiboas*, changes that reflect the intense phylogenetic reorganizations undergone by the genus. Knowing the vast diversity of the group, integrative taxonomy studies have been important to understand the evolution and relationships of the clade. Given the ecological importance of the group, cytogenetic studies have been used to enrich the evolutionary scenario and help resolve taxonomic and systematic uncertainties. Therefore, the objective of this work was to contribute to the enrichment of chromosomal studies in hylids from the use of classical cytogenetic markers, *in situ* chromosomal mapping and repetitive DNA sequencing, in three species of the genus *Boana*, allocated in three different taxonomic groups, all from the Atlantic Forest of Paraná. The karyotypes studied showed differences between themselves, with *B. faber* and *B. prasina* invariably presenting $2n = 24$ chromosomes, while *B. albopunctata* presented $2n = 22$ chromosomes with the occasional presence of a B chromosome. The karyotype with $2n = 24$ chromosomes is a frequent characteristic of the genus *Boana*, whose origin would be in the karyotype with $2n = 26$ chromosomes that, from chromosomal fusions, pericentric inversions or even centromeric repositioning, may explain the variation in the karyotypic structure between hylids. Heterochromatic bands were found predominantly in pericentromeric regions in all species, although additional C bands over telomeric and/or interstitial regions were partially species specific. Nucleolus organizer regions (NORs) were located in only a small pair of karyotypes, whose location is common in Hylinae and suggests a homeology involving NOR-bearing chromosomes. The chromosomal mapping of microsatellite sequences together with 5S, 18S rDNA and telomeric probes come as factors to enrich the understanding of repetitive DNA sequences and their relationship with the modeling of the studied karyotypes. The transposable element (TE) *Tc1/Mariner* showed scattered markings in all chromosomes of the three studied species. The structure and origin of repetitive sequences can explain the current organization of genomes. The TE *Tc1/Mariner* sequences isolated in this study showed high integrity and all functional domains, suggesting that these transposons are in a recent invasion phase and active in *Boana* genomes. The *in situ* mapping of the repetitive sequences presented here is unprecedented for the Hylidae family, being yet another tool to question the idea of a conserved karyotype in anurans, given the variations presented here.

Keywords: Amphibian; Repetitive DNAs; Karyotype evolution; FISH

LISTA DE FIGURAS

Introdução

[Figura 1](#) – Esquema demonstrando os diferentes grupos de espécies do gênero *Boana* bem como em qual grupo consta as espécies estudadas no presente trabalho.

Material e Métodos

[Figura 2](#) - Espécies do genero *Boana* analisadas no presente estudo. (A) *B. albopunctata* (Fonte: LEITE; PEZZUTI; GARCIA, 2019); (B) *B. faber* (Fonte: LEITE; PEZZUTI; GARCIA, 2019); (C) *B. prasina* (Fonte: KURZ, 2017).

Capítulo I

[Figure 1](#). Karyotypes arranged from Giemsa stained and C-banding, respectively: (A, B) *B. albopunctata* with $2n = 22$ chromosomes and presence of one B chromosome; (C, D) *B. faber* and (E, F) *B. prasina*, both with $2n = 24$ chromosomes. Above the respective pairs, the NOR-bearing chromosome pairs revealed by silver impregnation (arrows). Bar = 10 μm .

[Figure 2](#). Karyotype of *B. albopunctata* submitted to fluorescence *in situ* hybridization with: (A) telomeric probe; (B) ribosomal probes and (C-I) microsallite sequences. Bar = 10 μm .

[Figure 3](#). Karyotype of *B. faber* submitted to fluorescence *in situ* hybridization with: (A) telomeric probe; (B) ribosomal probes and (C-I) microsallite sequences. Bar = 10 μm .

[Figure 4](#). Karyotype of *B. prasina* submitted to fluorescence *in situ* hybridization with: (A) telomeric probe; (B) ribosomal probes and (C-I) microsallite sequences. Bar = 10 μm .

Capítulo II

[Figure 1](#). Karyotypes submitted to FISH using TE *Tc1/Mariner* probe: (A) *B. albopunctata*, (B) *B. faber* and (C) *B. prasina*. Bar = 10 μm .

[Figure 2](#). Sequences of TIRs and ORFs of the *Tc1/mariner* superfamily isolated from *albopunctata*, *B. faber* and *B. prasina*.

[Figure 3](#). Secondary structures of transposases indicating DNA-binding of two HTH motifs, NLS, the GRPR-like sequence and the DDE catalytic domain of the *Tc1/mariner* superfamily isolated from *B. albopunctata*, *B. faber* and *B. prasina*.

LISTA DE TABELAS

Material e Métodos

[Tabela 1](#) – Relação de *primers* para amplificação das sequências repetitivas isoladas neste estudo.

Capítulo I

[Table 1](#). Cytogenetic data on species belonging to six different taxonomic groups of *Boana*. NORs = nucleolus organizer regions; Ref = references; m = metacentric; sm = submetacentric; st = subtelocentric; a = acrocentric; NI = Not Informed.

[Table 2](#). Frequency of the B chromosome in four *B. albopunctata* analyzed specimens.

Capítulo II

[Table 1](#). Sequences of the *Tc1/Mariner* superfamily isolated from *B. albopunctata*, *B. faber* and *B. prasina* subjected to identity and similarity analysis using the BLASTn algorithm, the Dfam database and the Censor software.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius;

uL – microlitro;

μM – micrômetro;

11-dUTP - Digoxigenin -11-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate tetralithium salt;

16-dUTP - Biotin-16-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate;

18S rDNA - Ácido desoxirribonucleico ribossômico 18S;

18S rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico 18S;

2n – Número diploide;

45S rDNA - Ácido desoxirribonucleico ribossômico 45S;

45S rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico 45S;

5S rDNA - Ácido desoxirribonucleico ribossômico 5S;

5S rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico 5S;

Ag – Prata;

Ba(OH)₂ – Hidróxido de bário;

Bd – *Batrachochytrium dendrobatidis*;

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*;

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio;

CEUA – *Comissão de Ética do Uso de Animal*;

CTAB – *Cetyltrimethylammonium Bromide*;

Cy5 – Cianina 5;

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*;

DD – *Data Deficient*;

DNA - Ácido Desoxirribonucleico;

dATP – Desoxinucleotídeo Adenina;

dCTP – Desoxinucleotídeo Citosina;

dGTP – Desoxinucleotídeo Guanina;

dTTP – Desoxinucleotídeo Timina;

dUTP – Desoxinucleotídeo Uracila;

DNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos;

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético;

FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*;

FN – *Fundamental Number*;

gr – Gramas;

HCl – Ácido clorídrico;
INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais;
ITS – *Interstitial Telomeric Sequences*;
IUCN - *International Union for Conservation of Nature*;
Km – Quilômetro;
Km² - Quilometro Quadrado;
KCl – Cloreto de Potássio;
m – Metacêntricos;
M – Molar;
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio;
min – Minutos;
ml – mililitros;
MMA – Ministério do Meio Ambiente;
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*;
NOR – *Nucleolus organizer regions*;
NF – Número Fundamental;
ng – Nanograma;
pb - Pares de base;
PBS – Tampão Fosfato-Aalino;
PCR – *Polymerase Chain Reaction*;
PR – Paraná;
RNA - Ácido Ribonucleico;
RNAr – Ácido Ribonucleico ribossômico;
RON – Região Organizadora de Nucléolo;
RPM – Rotação Por Minuto;
s – Segundo;
S – Sul;
SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia;
SM – Submetacêntricos;
SSC – Citrato de Sódio Salino;
SSR - *Simple Sequence Repeats*;
st – Subtelocêntricos;
Taq - *Thermus aquaticus*;
TE – *Transposable Element*;

TIRs – *Terminal Inverted Repeats*;

UV-B – Radiação Ultravioleta B;

W – Oeste.

SUMÁRIO

1 Introdução	17
1.1 Revisão Bibliográfica	18
1.1.1 Anfíbios anuros	18
1.1.2 Família Hylidae e o gênero <i>Boana</i>	20
1.1.3 Citogenética do grupo.....	23
1.1.4 DNAs repetitivos	25
1.1.5 Área de Estudo	27
2 Objetivos	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 Material e Métodos	30
3.1 Material Biológico.....	30
3.2 Preparações Citogenéticas e Isolamento dos DNAs Repetitivos.....	30
3.3 Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH - <i>fluorescence in situ hybridization</i>)	32
3.4 Análise das Sequências.....	32
4 Resultados	33
4.1 Comparative cytogenetics among <i>Boana</i> species (Anura, Hylidae): focus on evolutionary variability of repetitive DNA	34
4.2 Molecular characterization and chromosomal distribution of the <i>Tc1/Mariner</i> transposon in <i>Boana</i> species (Anura, Hylidae)	65
Considerações finais	82
Referências	84
Anexos	96

1 Introdução

A classe Amphibia apresenta uma distribuição cosmopolita, exceto nas latitudes extremas ao Norte, na Antártida e em grande parte das ilhas oceânicas. A classe é representada por 8530 espécies, agrupadas em 3 ordens distintas: Gymnophiona com 215 sp., Caudata com 792 sp. e, a mais expressiva, Anura com 7521 sp. (FROST, 2022). Na ordem Anura, a família Hylidae, com 1036 representantes, apresenta o maior número de espécies. A família tem passado por uma progressiva reorganização filogenética nas últimas décadas, sendo que atualmente está organizada em três subfamílias: Hyalinae, Pelodyadinae e Phyllomedusinae (FROST, 2022).

Com relação às descrições cariotípicas disponíveis para o gênero *Boana* (Hyalinae, Hylidae), o número diploide varia de 22 a 24 cromossomos, com os cariótipos apresentando pouca variação no número fundamental (NF) (VENANCIO NETO *et al.*, 2022). A maioria das espécies de Phyllomedusinae e Pelodyadinae, táxons irmãos de Hyalinae, compartilham $2n=26$ cromossomos, enquanto o $2n=24$ cromossomos é considerado uma suposta sinapomorfia para Hyalinae (DUELLMAN, 2001; FAIVOVICH *et al.*, 2005, 2021; FERRO *et al.*, 2018).

Em eucariotos, uma considerável porção do genoma é constituída por sequências de DNA de múltiplas cópias, também referidos como “DNAs repetitivos” (SUMNER, 2003). Estes geralmente são classificados como repetições *in tandem* e repetições dispersas, sendo essas últimas compostas por elementos transponíveis (TEs) (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994).

As repetições *in tandem* são compostas por sequências repetitivas organizadas em *clusters*, localizadas frequentemente em regiões teloméricas ou pericentroméricas. Tais sequências são classificadas em satélites (DNA satélite, minissatélite e microssatélite) ou em famílias gênicas (genes de histonas, *small nuclear ribonucleoprotein particles* – snRNPs, RNA ribossômico - RNAr, entre outras) (HARDMAN, 1986; SHAPIRO; STERNBERG, 2005; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015). O processo de acúmulo de genes duplicados, especialmente via erro de recombinação homóloga, duplicações genômicas e a divergência evolutiva entre as cópias podem vir a explicar a origem de famílias multigênicas (WENDEL, 2000; BENNETZEN, 2002; KELLIS *et al.*, 2004). Estas sequências podem estar localizadas em um único cromossomo ou situadas em inúmeros locus no conjunto cariotípico (EIRÍN-LÓPEZ *et al.*, 2004).

Já os TEs são sequências repetitivas dispersas e são reconhecidos como elementos genéticos móveis no genoma. Esses elementos podem ser identificados de acordo com sua organização estrutural e quanto seu mecanismo de transposição em DNA transposons e retrotransposons, constituindo uma das principais fontes de mutação nos genomas (BÖHNE *et al.*, 2008).

Sabendo que constantes reorganizações filogenéticas são propostas para a família Hylidae (FROST, 2022), abordagens envolvendo espécies de hílideos e o mapeamento de DNAs repetitivos fornecem subsídios para construir um cenário mais rico da evolução cromossômica do táxon. Assim, a utilização de marcadores cromossômicos é uma ferramenta promissora, permitindo hipóteses em relação às interpretações sobre a evolução cromossômica em um contexto taxonômico. Desta forma, tendo em vista os escassos estudos de citogenética molecular no grupo, o objetivo deste trabalho é melhor compreender a distribuição cromossômica de classes de DNAs repetitivos a partir da caracterização das sequências bem como a localização *in situ* em espécies do gênero *Boana*.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 *Anfibios anuros*

A ordem Anura, pertencente à classe dos anfíbios, apresenta uma diversidade de 7521 espécies descritas alocadas em 50 famílias distribuídas por quase todos os continentes, exceto na Antártida (FROST, 2022). As alterações na classificação deste grupo são constantes, como por exemplo, após análises moleculares realizadas por Faivovich *et al.* (2005), algumas espécies do gênero *Hyla* foram então realocadas para o gênero *Hypsiboas*, atualmente chamado de *Boana* (DUBOIS, 2017).

No Brasil, é registrada a ocorrência de 1144 espécies de anuros divididos em 20 famílias e 107 gêneros, segundo a lista de anfíbios brasileiros divulgada pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2022). Segundo Gazoni (2011), estes números vêm aumentando nas últimas décadas e este fato, associado à grande similaridade morfológica que os anuros apresentam, faz com que sejam necessários mais estudos a fim de se esclarecer a taxonomia e sistemática do grupo. Representantes deste grupo são popularmente denominados como sapos, rãs e pererecas, sendo em geral diferenciados por meio das especializações morfológicas do seu sistema de locomoção (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Os anfíbios constituem um grupo animal de alta importância ecológica, seja por sua posição central em redes tróficas, por serem caracterizados como um grupo de ligação entre sistemas, i.e. aquático e terrestre, ou até mesmo por sua vasta diversidade, abrangendo uma ampla gama de microhábitats dulcícolas e terrestres (GARCIA *et al.*, 2009). Apesar disto, os anuros vêm enfrentando uma pungente ameaça à sua conservação, já que as populações estão sofrendo declínio elevado. É considerado o grupo animal mais ameaçado, com aproximadamente 40% das espécies ameaçadas de extinção (GRANDINETTI; JACOBI, 2005; MONASTERSKY, 2014; ANDRADRE *et al.*, 2022). Adicionalmente, é também o grupo com mais espécies sem informação, classificados na categoria de dados insuficientes ou *Data Deficient* (DD) na plataforma online da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (FODEN *et al.*, 2013; IUCN, 2022). Vários fatores têm sido apontados como causas para esse declínio, tais como a introdução de espécies exóticas, a poluição, a alteração do equilíbrio entre predador e presa, o aumento da radiação ultravioleta B (UV-B), a exploração de espécies, as chuvas ácidas e principalmente a perda e fragmentação de hábitats, que ganha lugar de destaque no declínio das populações de anfíbios (BLAUSTEIN; KATS, 2003; COLLINS; STORFER, 2003).

Outro fator alarmante relacionado a esse declínio é a dispersão de doenças, com destaque para a quitridiomiose (DASZAK *et al.*, 2004), uma doença infecciosa emergente causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) (BERGER *et al.*, 2005; BECKER; ZAMUDIO, 2011). Essa doença vem sendo disseminada pelo mundo dizimando populações, e já foi mencionada como “a pior doença infecciosa já documentada entre os vertebrados em termos de número de espécies impactadas e sua propensão em levá-las à extinção” (FISHER; GARNER; WALKER, 2009). O fungo *Bd* encontra-se amplamente distribuído, sendo documentado em todos continentes, tendo sido registrado em no mínimo 71 países, em 50% das espécies de anfíbios analisadas e contribuiu para o declínio de aproximadamente 6,5% das populações de anuros (incluindo 90 extinções presumidas), representando assim a maior perda de biodiversidade de vertebrados atribuída a um patógeno (OLSON; RONNENBERG, 2014; SCHEELE *et al.*, 2019; HOLLANDERS; 2022).

O declínio de anfíbios, associado à quitridiomiose, tem sido essencialmente observado em áreas de reserva de florestas primárias ou pouco alteradas em locais montanhosos da região neotropical (LIPS *et al.*, 2008; POUNDS *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2022).

1.1.2 Família Hylidae e o gênero *Boana*

A família Hylidae está entre os mais bem-sucedidos e diversificados grupos de anuros, com relatos de sua presença em áreas da Europa, norte da África e da Ásia, América do Sul e Central, oeste da Índia, Austrália e Nova Guiné. Atualmente é a maior família da ordem Anura, com 1036 espécies (FROST, 2022). De hábito arborícola, os hílideos apresentam uma grande diversidade de modos reprodutivos bem como postura de ovos (OLIVEIRA, 2012). Seus representantes estão agrupados nas subfamílias Hylinae (composta pelas tribos Cophomantini, Dendropsophini, Hylini e Lophyohylini), Pelodryadinae e Phyllomedusinae (FAIVOVICH *et al.*, 2005, 2021; FROST, 2022).

Em geral, os hílideos apresentam cabeça e olhos grandes, cintura frequentemente afinada, membros alongados, tamanhos corporais distintos, apresentando indivíduos que podem medir apenas 1,7 cm e outros que podem chegar até 14 cm de comprimento (OLIVEIRA, 2012). Os hílideos apresentam diversas outras variáveis morfológicas, porém não muito resolutivas filogeneticamente, entretanto, a presença de discos adesivos arredondados nas pontas dos dedos é uma característica comum descrita na maioria das espécies, o que pode, eventualmente, diferenciá-los facilmente das demais famílias (LIMA *et al.*, 2006). Suas espécies apresentam uma grande diversidade de modos reprodutivos, sendo a maioria restritos a Mata Atlântica (HADDAD; SAWAYA, 2000). Esta diversidade está relacionada com o microhabitat de oviposição, pois os ovos podem ser depositados diretamente na água, em ninhos de espuma em câmaras subterrâneas ou sobre rochas, em folhas suspensas na vegetação sobre a água ou mesmo carregados pelo adulto (DUELLMAN; TRUEB, 1994; HADDAD; PRADO, 2005; WELLS, 2007; SILVA *et al.*, 2019).

Os estudos apresentam um consenso em relação à filogenia de Hylidae apesar da larga distribuição geográfica e a diversidade das subfamílias, tais dados gerados têm grande importância na investigação do monofiletismo das espécies que constituem o táxon (WIENS *et al.*, 2005; DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016). A tribo Cophomantini (Hylidae, Hylinae) é um clado diverso de anuros neotropicais composto pelos gêneros *Aplastodiscus*, *Boana*, *Bokermannohyla*, *Hyloscirtus* e *Myersiohyla* (FERRO *et al.*, 2018; FROST, 2022). Essa tribo vem acompanhando as reorganizações que aconteceram na família, já que foi elevada a subfamília (como Cophomantinae) por Duellman, Marion e Hedges (2016), e recentemente retornou a nível de tribo após

discordâncias encontradas por Caviedes-Solis, Kim e Leaché (2020) corroboradas por Ferro *et al.* (2018) e Frost (2022).

Enfatizando a dinâmica destas reorganizações temos o gênero *Hyla* Laurenti, 1768 o qual, durante mais de 150 anos, alocou a maioria das espécies de hílideos da Eurásia, Américas e da região Australo-Papua (FAIVOVICH *et al.*, 2005; DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016; FROST, 2022). Após estudos que integraram marcadores morfológicos, moleculares e citogenéticos, seus exemplares foram realocados em 10 novos gêneros, dentre eles o gênero *Hypsiboas* atualmente denominado gênero *Boana* Gray, 1825 (FAIVOVICH *et al.*, 2005; DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016; FROST, 2022).

Desde a revisão inicial feita por Faivovich *et al.* (2005), o conhecimento taxonômico e as hipóteses filogenéticas disponíveis sobre os gêneros dentro de Cophomantini aumentaram bastante. Conforme Faivovich *et al.* (2005), o gênero *Boana* contém sete grupos de espécies de acordo com dados genéticos, morfológicos, comportamentais e ecológicos ([Figura 1](#)): *B. albopunctata*, *B. benitezi*, *B. faber*, *B. pulchella*, *B. pellucens*, *B. punctata* e *B. semilineata*, para os quais, 22 novas espécies foram descritas após a análise. As relações desses grupos de espécies foram abordadas por amostragem de táxons distintos, com foco no grupo de *B. pulchella* (KÖHLER *et al.*, 2010; DUELLMAN; MARION; HEDGES, 2016; FAIVOVICH *et al.*, 2005, 2021), no grupo de *B. albopunctata* (CAMINER; RON, 2014) e no grupo de *B. semilineata* (FOUQUET *et al.*, 2016).

Considerando todas as mudanças taxonômicas dos últimos anos, atualmente o gênero *Boana* agrupa 99 espécies (FROST, 2022). De acordo com Ribeiro, Egito e Haddad (2005), o gênero abrange as espécies popularmente conhecidas como rãs-gладиadoras, devido às disputas corporais que ocorrem quando um macho invade o território de outro. Sabendo que o gênero *Boana* é dividido em sete grupos taxonômicos diferentes, e tais agrupamentos são suportados por sinapomorfias morfológicas que são úteis para definir unidades monofiléticas, ainda, há algumas espécies que possuem caracteres que dificultam sua alocação em qualquer um dos grupos atualmente reconhecidos (FAIVOVICH *et al.*, 2005, 2021).

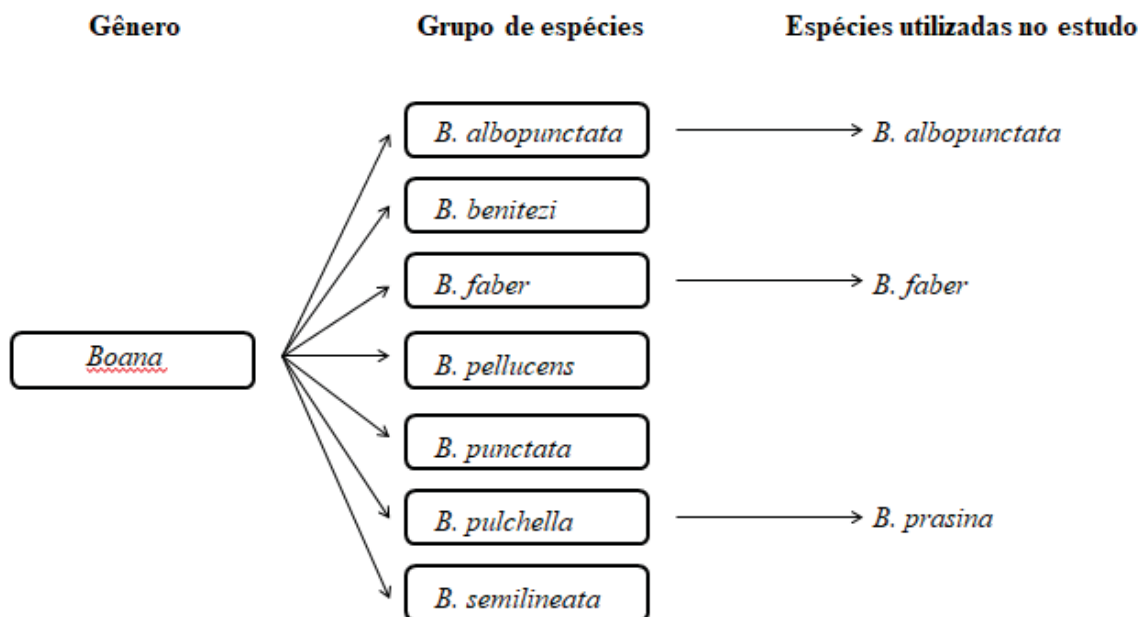


Figura 1 – Esquema demonstrando os diferentes grupos de espécies do gênero *Boana* bem como em qual grupo consta as espécies estudadas no presente trabalho.

As espécies do gênero apresentam dois modos reprodutivos: desova depositada diretamente na água e larvas aquáticas exotróficas e, ovos depositados em bacias naturais ou construídas e girinos exotróficos, em ambiente lântico ou lótico (HADDAD; PRADO, 2005). No entanto, casais de *Boana pardalis* já foram observados desovando em bromélias terrestres, se assemelhando ao modo reprodutivo no qual ovos são depositados em plantas aéreas (MOURA; MOTTA; FEIO, 2011). Este fato demonstra que as espécies de *Boana* podem exibir modos alternativos, ou até mesmo modos de reprodução ainda não descritos (TOLEDO *et al.*, 2012).

De acordo com a vasta diversidade de todo o grupo dos anuros e conseqüentemente dos hilídeos, o estabelecimento das relações filogenéticas baseadas apenas em informações morfo-anatômicas se torna difícil, já que, por mais que o grupo apresente um grande número de espécies e diversidade de habitats, ainda sim detém relativamente poucas variações morfológicas significativas (POUGH; JANIS; HEISER, 2008), fazendo necessária a utilização de marcadores mais resolutivos.

Já que constantes reorganizações filogenéticas são realizadas em Hylidae (FROST, 2022), abordagens envolvendo um grande número de espécies e o mapeamento de DNAs repetitivos darão subsídios para construir um cenário mais rico na evolução cromossômica do grupo. Assim, a utilização de marcadores cromossômicos

se torna uma ferramenta para o melhor entendimento da evolução cromossômica e estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies de hílideos.

1.1.3 *Citogenética do grupo*

A partir dos inúmeros questionamentos taxonômicos sobre *Boana*, estudos têm sido realizados a partir da distribuição geográfica, ecologia, características morfológicas externas, bioacústica, osteologia, considerando também dados de sequenciamento de DNA nuclear e mitocondrial, além de outros marcadores moleculares (GAZONI, 2011; FERRO *et al.*, 2018; SUÁREZ *et al.*, 2020; FAIVOVICH *et al.*, 2021; VENANCIO NETO *et al.*, 2022).

A observação dos cromossomos dos anuros teve início por volta de 1930, com utilização da técnica de esmagamento dos testículos, o que possibilitava análises de fases meióticas e, esporadicamente, de metáfases espermatogoniais (MORESCALCHI; CHIARELLI; CAPANNA, 1973; KING; CONTRERAS; HONEYCUTT, 1990; KURAMOTO, 1990; GREEN; SESSION, 1991). Foi em 1960 que a citogenética deu seu grande salto, graças ao desenvolvimento de técnicas e métodos de obtenção cromossômica, utilizando-se inibidores mitóticos e tratamentos hipotônicos, além dos avanços nos equipamentos para as análises e identificação cromossômica (SCHMID *et al.*, 1990; GREEN; SESSIONS, 1991; SCHMID; BOGART; HEDGES, 2010).

Os dados cromossômicos pioneiros da anurofauna brasileira foram obtidos com a utilização de coloração convencional de cromossomos meióticos e mitóticos, resultando em informações relevantes sobre a constituição cariotípica do grupo (BEÇAK, 1968; RABELLO *et al.*, 1971; DENARO, 1972; FORESTI, 1972; BOGART, 1973; LUCCA *et al.*, 1974). Tais trabalhos já indicavam que os mecanismos capazes de explicar a evolução cromossômica no grupo estavam associados a eventos de poliploidia e fusão/fissão cêntricas.

Apesar dos esforços contínuos para esclarecer a sistemática de Hylidae, dados cariotípicos do grupo são poucos quando comparados aos de peixes e mamíferos. Por muitos anos, os anfíbios têm sido rotulados como um grupo de vertebrado caracterizado por cariótipos altamente conservados. No entanto, com a aplicação de métodos de bandamento cromossômico e citogenética molecular, uma notável variabilidade na microestrutura cromossômica tem sido revelada, o que permitiu melhor identificar espécies e suas variantes geográficas, servindo assim como uma ferramenta por vezes

confiável para estudos taxonômicos (KASAHARA *et al.*, 2003; SIQUEIRA; ANANIAS; RECCO-PIMENTEL, 2004).

Os dados sobre a citogenética dos hílideos fazem com que seja um dos grupos mais estudados entre os anuros (CATROLI; KASAHARA, 2009; PAIVA *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2016; FERRO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020; SUÁREZ *et al.*, 2020). Cromossomos sexuais são considerados raros em Hylidae, restritos exclusivamente a subfamília Hylinae. Eles foram descritos citogeneticamente em *Hyla femoralis*, *H. immaculata* (como *H. suweonensis*), *H. japonica*, *H. squirella* (YU; LEE, 1990; ANDERSON, 1991) e em *Pseudis tocantins* (GATTO; BUSIN; LOURENÇO, 2016).

Os dados citogenéticos disponíveis em Hylidae ainda são restritos a poucas espécies. O cariótipo com $2n = 24$ cromossomos representa uma das principais sinapomorfias dentro do gênero *Boana*, devido ao fato de gêneros distintos dentro do táxon apresentarem cariótipos muito similares (DUELLMAN, 2001; FAIVOVICH *et al.* 2005, 2021). Este cariótipo teria surgido a partir da diferenciação do número cromossômico original de $2n = 26$ cromossomos, presente predominantemente na família Leptodactylidae, a partir de fusões cromossômicas (BOGART, 1973). Portanto, suas espécies representam um promissor objeto de estudo para o entendimento das forças que modelaram seus respectivos cariótipos até então.

Os cariótipos de Hylidae consistem principalmente de cromossomos com dois braços (KING; CONTRERAS; HONEYCUTT, 1990; VENANCIO NETO *et al.*, 2022), e variações no $2n = 24$ cromossomos têm sido consideradas como apomorfias (CATROLI, 2008). Os dados citogenéticos pioneiros disponíveis para *Boana* foram descritos com base em apenas coloração cromossômica convencional, o que tornou subexploradas algumas inferências sobre a evolução cromossômica no grupo (RABER *et al.*, 2004; ANANIAS *et al.*, 2004; GRUBER; HADDAD; KASAHARA, 2007; NUNES; FAGUNDES, 2008; CARVALHO; GARCIA; RECCO-PIMENTEL, 2009). Entretanto, trabalhos contemporâneos vêm a elucidar lacunas presentes no grupo através de abordagens mais amplas conciliando dados comportamentais, filogenéticos e moleculares (FAIVOVICH *et al.*, 2021).

Revisões consistentes, baseadas principalmente em dados moleculares, foram desenvolvidas desde 2005 como as realizadas por Faivovich *et al.* (2005), Frost *et al.* (2006), Grant *et al.* (2006) e Hedges, Duellman e Heinicke (2008), as quais tiveram como consequência, significativas alterações na sistemática e na taxonomia de toda a

classe Amphibia, entretanto, na maioria destes trabalhos não foram considerados dados cromossômicos. É importante destacar ainda que estudos de dados cariotípicos, associados às informações de sequenciamento de DNA, têm obtido sucesso com resultados relevantes em relação à classificação filogenética de grupos de anuros (AGUIAR JR. *et al.*, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2008; TARGUETA *et al.*, 2010; FERRO *et al.*, 2018), demonstrando que a citogenética colabora no esclarecimento de questões sobre a sistemática e taxonomia, efetivamente.

1.1.4 DNAs repetitivos

Sequências de DNA de múltiplas cópias, também referidos como “DNAs repetitivos” representam grande parte do genoma dos eucariotos (SUMNER, 2003). Estes geralmente são divididos em dois grupos principais: *i*) repetições em *tandem*, e, *ii*) repetições dispersas, compostas por TEs (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015).

As unidades de repetições *in tandem* são geralmente organizadas em *clusters*, localizadas frequentemente em regiões teloméricas ou pericentroméricas, presentes em um ou em vários pares cromossômicos. As sequências repetidas em *tandem* podem ser satélites (DNA satélite, minissatélite e microsatélite) ou famílias gênicas (genes de histonas, *small nuclear ribonucleoprotein particles* – snRNPs e RNA ribossômico - RNAr, por exemplo) (HARDMAN, 1986; SHAPIRO; STERNBERG, 2005; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015). Em eucariotos uma considerável porção do genoma é constituída por heterocromatina, a qual, na maioria das vezes, tem como componente principal o DNA satélite (JOHN, 1988; CHAVES; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2004). Sequências de DNA satélite podem ser usadas como marcadores em estudos de diversificação genômica e relações filogenéticas. Considerando a evolução extremamente dinâmica destas sequências, elas podem fornecer informações úteis tanto para estudos microevolutivos, como nos casos de DNA satélite espécies-específico ou cromossomo-específicos (UGARKOVIC; PLOHL, 2002; VENANCIO NETO *et al.*, 2022), ou em abordagens filogenéticas, onde um DNA satélite é compartilhado por espécies em um determinado grupo (PONS; GILLESPIE, 2003; KANTEK *et al.*, 2009).

O termo família multigênica compreende cópias gênicas originadas por duplicação e variação de algum gene ancestral. Estes genes podem estar agrupados e localizados em um único cromossomo, ou situados em inúmeros sítios no cariótipo

(EIRÍN-LÓPEZ *et al.*, 2004). Em função da aparente localização compartilhada dos sítios de DNAs ribossômicos entre grupos de organismos relacionados, tais sequências representam ferramentas resolutivas em estudos citotaxonômicos e de carioevolução. Os genes ribossômicos compreendem duas famílias gênicas distintas, compostas por repetições organizadas *in tandem*. O rDNA maior (rDNA 45S) é a região responsável pela organização do nucléolo e engloba os genes que codificam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, os quais são sintetizados, processados e parcialmente montados para formar as subunidades ribossômicas no nucléolo sendo transcritos pela RNA polimerase I (LONG; DAWID, 1980). O rDNA menor é composto pela família gênica codificante do rRNA 5S, o qual é sintetizado pela RNA polimerase III em outro lugar do genoma e entra no nucléolo para participar da montagem da subunidade ribossômica maior (LONG; DAWID, 1980).

As repetições em sequência também são classificadas como elementos móveis, que consistem em sequências que saltam no genoma, chamados de TEs. Tais elementos são categorizados com base no mecanismo que utilizam durante o processo de transposição, que pode ser RNA (classe I ou retrotransposon) ou DNA (classe II ou transposon) (WICKER *et al.*, 2007). Os retrotransposons deslocam-se pelo genoma através do mecanismo conhecido como "*copy and paste*", no qual, a cada ciclo de transposição, ocorre a duplicação da sequência original seguida de sua inserção em uma nova região do genoma, aumentando, portanto, sua quantidade no genoma do hospedeiro. A classificação desses elementos inclui cinco ordens distintas: elementos similares a Penelope (PLEs), retrotransposons LTR (*long terminal repeats*), LINEs (*long interspersed nuclear elements*), elementos similares a DIRS e SINEs (*short interspersed nuclear elements*) (WICKER *et al.*, 2007). Os transposons, por outro lado, normalmente se deslocam através do mecanismo conhecido como "*cut and paste*", no qual, a cada ciclo de transposição, a sequência original é recortada, removida de seu local de origem e inserida em uma nova região do genoma do hospedeiro. Dessa forma, o aumento no número de cópias dessas sequências só ocorre se o transposon sair de uma região do DNA que já foi duplicada durante a replicação e se instalar em uma região adiante da forquilha de replicação. A classificação dos transposons começa com a subdivisão em duas subclasses, com a classificação posterior tornando-se mais extensa e conhecida pelo trabalho desenvolvido por WICKER *et al* (2007).

As sequências dispersas repetitivas são frequentemente associadas à reorganização do genoma, agindo como uma fonte significativa de mudanças evolutivas

através da recombinação homóloga de regiões após eventos de transposição de elementos repetitivos entre cromátides irmãs ou cromossomos homólogos, como observado em células diploides de leveduras (ARGUESO *et al.*, 2008). Além disso, Finnegan (1989) destacou que os TEs são responsáveis principalmente por grandes rearranjos cromossômicos, resultantes da recombinação entre cópias desses elementos dispersos pelo genoma. Os TEs também estão relacionados ao surgimento de sistemas de regulação gênica transcricional e pós-transcricional, servindo como uma fonte extremamente rica de matéria-prima para a formação de complexas redes regulatórias. (FESCHOTTE, 2008).

A superfamília Tc1-Mariner é encontrada em diversos táxons e pertence aos TEs de Classe II. Esses elementos são classificados devido à presença de repetições terminais invertidas (TIRs - *terminal inverted repeats*) e uma extensão que varia entre 1000 e 5000 pb em seus genomas (PLASTERK; IZSVÁK; IVICS, 1999). No entanto, através de um processo intenso de degradação, esses elementos podem se tornar pequenos e não autônomos, com repetições invertidas, conhecidos como TEs miniaturas ou MITEs (*miniature transposable elements*). Isso não é incomum, pois esses elementos são descritos em vários grupos taxonômicos e estão presentes em grandes quantidades nos genomas (FERNÁNDEZ-MEDINA *et al.*, 2012).

1.1.5 Área de Estudo

Mata Atlântica é o nome popular dado à floresta tropical que ocupa a faixa da costa brasileira, banhada pelo oceano Atlântico, por bacias litorâneas e, em sua região sul-sudeste, por grande parte da bacia do Paraná (PEREIRA, 2009). Quando se fala em Mata Atlântica é necessário lembrar que estamos falando de um conjunto de formações florestais, além de campos naturais, restingas, manguezais e outros tipos de vegetação, formando diversos cenários (MMA, 2022). É a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, que originalmente estendia-se de forma homogênea ao longo da costa brasileira (TABARELLI *et al.*, 2005). Antigamente, cobria mais de 1,5 milhão de km², abrangendo uma porção de 92% da costa brasileira (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2019). A ação antrópica devastou quase que completamente este bioma e a Mata Atlântica corresponde a menos de 12,4% de sua extensão original, a qual estende-se desde o Ceará até o Rio Grande do Sul (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2019). A Mata Atlântica apresenta uma variedade de formações florestais, entre elas: ombrófila mista,

ombrófila densa, ombrófila aberta, estacional semidecidual, estacional decidual e estepe (MMA, 2022).

Embora a alta devastação que vem sofrendo, a Mata Atlântica é considerado o maior bioma em diversidade de anfíbios anuros do mundo (SEGALLA *et al.*, 2016; IUCN, 2022), abrigando cerca de 50% das espécies descritas para o país é considerado um dos ecossistemas mais ameaçados mundialmente (DUELLMAN, 1999; MORELLATO; HADDAD, 2000). O alto grau de devastação desta floresta pode influenciar na riqueza e diversidade da anurofauna, uma vez que os integrantes do grupo são considerados bons bioindicadores de qualidade ambiental e integridade de ecossistemas. As características de história de vida dos anuros são influenciadas e associadas ao ambiente e por conta disso demonstram sinais de condições adequadas de habitats. Geralmente, estão relacionados ao meio aquático e apresentam alta sensibilidade às variações na qualidade da água (GASCON, 1991), além disso, a maioria das espécies se relacionam intensamente com a vegetação das proximidades dos corpos d'água, onde a manutenção das populações é dependente da qualidade da estrutura da paisagem (PARRIS, 2004).

O município de União da Vitória (26°13'48"S e 51°05'09"W) está localizado na Mata Atlântica sul paranaense, a 237 km da capital Curitiba e possui 731,72 km². O clima é subtropical úmido e mesotérmico, sempre com alta umidade relativa do ar, sendo a temperatura média anual de 23,3°C (MAACK, 1981; HORT, 1990).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O estudo cromossômico de anfíbios se faz relevante principalmente por sua importância ecológica, já que se posicionam centralmente em cadeias tróficas e é o grupo vertebrado mais ameaçado da atualidade. Como já descrito anteriormente, as informações acerca dos aspectos citogenéticos ainda são escassos, as quais poderiam contribuir para o entendimento das relações evolutivas no grupo. Assim, o objetivo principal deste estudo foi investigar cariótipos de espécies do gênero *Boana*, fornecendo dados para inferências sobre evolução cromossômica baseado em DNAs repetitivos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar cariótipos de espécies pertencentes ao gênero *Boana* que ocorrem na Mata Atlântica da região centro-sul paranaense para possíveis inferências comparativas sobre evolução cromossômica e o papel de DNAs repetitivos neste contexto;
- b) Utilizar sequências de DNAs repetitivos em hibridização *in situ* para estudar a história evolutiva dos cariótipos realizando seu mapeamento cromossômico;
- c) Obter, sequenciar e caracterizar DNAs repetitivos encontrados nos genomas das espécies estudadas.

3 Material e Métodos

3.1 Material Biológico

Foram estudados exemplares da família Hylidae (gênero *Boana*), coletados na Mata Atlântica paranaense (localidade de União da Vitória – PR): *Boana albopunctata*, *Boana faber* e *Boana prasina*. A partir da localização visual e/ou auditiva, os indivíduos foram capturados manualmente, ou com auxílio de puçás, e armazenados em recipientes adequados. Em laboratório, os espécimes foram submetidos à overdose anestésica com Xilocaína 5%. Imediatamente, os espécimes foram protocolados com número e procedência, sendo então tombados na coleção herpetológica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Francisco Beltrão (RLUTF1265-1267). O presente estudo é respaldado pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Paraná (Processo CEUA 001/2021) ([Anexo 1](#)).



Figura 2 - Espécies do gênero *Boana* analisadas no presente estudo. (A) *B. albopunctata* (Fonte: LEITE; PEZZUTI; GARCIA, 2019); (B) *B. faber* (Fonte: LEITE; PEZZUTI; GARCIA, 2019); (C) *B. prasina* (Fonte: KURZ, 2017).

3.2 Preparações Citogenéticas, isolamento dos DNAs Repetitivos e geração de sondas

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de medula óssea, utilizando-se o método de Baldissera Jr.; Oliveira e Kasahara (1993) ([Anexo 2](#)). O material foi corado com giemsa 5% ([Anexo 3](#)) e para a detecção da heterocromatina constitutiva foi aplicada a técnica de bandeamento C, segundo Sumner (1972) ([Anexo 4](#)). A localização das Regiões Organizadores de Nucléolo (RONs) foi realizada a partir da impregnação por nitrato de prata (Ag), de acordo com o protocolo descrito por Howell e Black (1980) ([Anexo 5](#)), com modificações.

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio óptico comum. As contagens cromossômicas e observações mais detalhadas foram capturadas em

microscópio de campo claro e epifluorescência Carl Zeiss AxioLab A1 acoplado à câmera CCD AxioCam ICc 1 de 1,4 megapixel capturadas através do software ZEN. Os cromossomos provenientes das imagens capturadas foram recortados, emparelhados e organizados em ordem decrescente de tamanho. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com o critério de relação de braços, segundo Green e Sessions (1991). Para cálculo do número fundamental (NF) foram considerados como portadores de dois braços os cromossomos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelo-cêntricos (st). Para a determinação da fórmula cariotípica foram analisados tanto os cromossomos submetidos à coloração convencional, quanto os submetidos ao tratamento com hidróxido de bário para a detecção da heterocromatina.

Porções de tecido muscular foram armazenadas e utilizadas para extração de DNA genômico, utilizando-se o método *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (MURRAY; THOMPSON, 1980) ([Anexo 6](#)). Após verificada a integridade do DNA por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, o mesmo foi utilizado como molde para as reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), quando foram utilizados oligonucleotídeos específicos para amplificação de DNAs repetitivos, tais como rDNAs e o TE *Tc1/Mariner* ([Tabela 1](#)).

Tabela 1 – Relação de *primers* para amplificação das sequências repetitivas isoladas neste estudo.

DNA	Primer Forward/Reverse	Referência
5S	5' -TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' 5' -TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA-3'	Pendás <i>et al.</i> (1994)
18S	5' -CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3' 5' -CCGAGGACCTCACTAAACCA-3'	Gross <i>et al.</i> (2010)
Tc1 – Mariner	5' -CACTCACCGGCCACTTTATTA-3'	Schemberger <i>et al.</i> (2016)
Telomérica	(5' -TTAGGG-3') ₆ (3' -CCCTAA-5') ₆	Ijdo <i>et al.</i> (1991)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 50 uL compostas por 100 ng de DNA genômico, 2 mM de MgCl₂, tampão de reação 1x (200 mM de Tris, pH 8,4, 500 mM de KCl), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM dos *primers* e 1,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). O termociclador (Eppendorf) foi programado da seguinte maneira: 7 min 95 °C; 35 ciclos: 95 °C 30 s, (temperatura de anelamento variável, de acordo com cada oligonucleotídeo – [Tabela 1](#)) 45 s, 72 °C 1 min e 20 s; extensão final a 72 °C 5 min.

As sondas foram marcadas por PCR ou com o *Kit Nick Translation System* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, com as mesmas condições

respectivas citadas anteriormente. Nas reações de marcação de sondas não foi utilizado o mix de dNTPs, mas sim nucleotídeos separados nas concentrações de 0,05 mM de dATP, dCTP e dGTP, 0,035 mM de dTTP e 0,03 mM de dUTP, acoplado a molécula digoxigenina-11-dUTP ou biotina-16-dUTP (Jena Bioscience, Dortmund, Germany).

Os microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAG)₁₀, (CGC)₁₀, (GAA)₁₀, (GACA)₈ e (GATA)₈ foram marcadas diretamente com Cy3-fluorocromo (Sigma-Aldrich) na extremidade 5' durante a síntese.

Os fragmentos corretamente amplificados foram isolados e ligados em vetores plasmidiais comerciais, e, em seguida, transformados em cepas de *Escherichia coli* DH5α CaCl₂ competentes. Os clones recombinantes foram então submetidos ao sequenciamento nucleotídico para caracterização das sequências e, posteriormente, utilizados como sondas em hibridização *in situ* fluorescente.

3.3 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH - *fluorescence in situ hybridization*)

As lâminas contendo preparações cromossômicas foram submetidas à técnica de FISH, de acordo com o procedimento geral descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986) ([Anexo 7](#)), com modificações. Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos streptavidina conjugada com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche *Applied Science*). Os cromossomos foram contracorados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole – 0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados utilizando-se o software ZEN de captura digital de imagens acoplado ao microscópio Carl Zeiss AxioLab A1.

3.4 Análise das Sequências

As sequências nucleotídicas obtidas ([Anexo 8](#)) foram analisadas e editadas com o auxílio do software *Geneious* 8.1.9 (KEARSE *et al.*, 2012) e, posteriormente submetidas a uma análise de identidade utilizando os bancos de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), presente no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4 Resultados

Os resultados, discussão e conclusão para atingir cada objetivo específico foram estruturados na forma de artigos e estão apresentados em capítulos:

Capítulo I: [Venancio Neto, S., Noletto, R.B., Azambuja, M., Gazolla, C.B., Santos, B.R., Nogaroto, V., Vicari, M.R. Comparative cytogenetics among *Boana* species \(Anura, Hylidae\): focus on evolutionary variability of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**, 45, 4, e20220203 \(2022\).](#)

Capítulo II: [Molecular characterization and chromosomal distribution of the *Tc1/Mariner* transposon in *Boana* species \(Anura, Hylidae\)](#)

4.1 Comparative cytogenetics among *Boana* species (Anura, Hylidae): focus on evolutionary variability of repetitive DNA

Comparative cytogenetics among *Boana* species (Anura, Hylidae): focus on evolutionary variability of repetitive DNA

Sebastião Venancio Neto¹, Rafael Bueno Noletto², Matheus Azambuja¹, Camilla Borges Gazolla¹, Bianca Rocha Santos², Viviane Nogaroto³ and Marcelo Ricardo Vicari^{1,3}

¹*Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100, 81530-000, Curitiba, PR, Brazil.*

²*Universidade Estadual do Paraná, Departamento de Biologia, Pç. Cel. Amazonas, 84600-185, União da Vitória, PR, Brazil.*

³*Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil.*

Abstract

Boana comprises a diverse genus of Neotropical treefrogs, currently rearranged into seven taxonomic species groups. Although cytogenetic studies have demonstrated diversity in its representatives, the chromosomal mapping of repetitive DNA sequences is still scarce. In this study, *Boana albopunctata*, *Boana faber*, and *Boana prasina* were subjected to *in situ* localization of different repetitive DNA units to evaluate trends of chromosomal evolution in this genus. *Boana faber* and *B. prasina* had $2n=24$ chromosomes, while *B. albopunctata* has $2n=22$ and an intra-individual variation related to the presence/absence of one B chromosome. The location of 45S rDNA sites was different in the analyzed karyotypes, corroborating with what was found in the distinct phylogenetic groups of *Boana*. We presented the first description of 5S rDNA in a *Boana* species, which showed markings resulting from transposition/translocation mechanisms. *In situ* localization of microsatellite loci proved to be a helpful marker for karyotype comparison in *Boana*, commonly with cis accumulation in the

heterochromatin. On the other hand, genomic dispersion of microsatellites may be associated with hitchhiking effects during the spreading of transposable elements. The obtained results corroborated the independent diversification of these lineages of species from three distinct phylogenetic groups of *Boana*.

Keywords: Karyotype evolution, microsatellite, Neotropical treefrogs, rDNA.

Introduction

Hylidae is a monophyletic group of treefrogs with 1,033 recognized species, which have undergone a progressive phylogenetic reorganization and are currently grouped into three subfamilies: Hylinae (747 sp.), Pelodryadinae (222 sp.), and Phyllomedusinae (67 sp.) (Frost, 2022). In addition, changes in the genera have been constant, e.g., some species of the genus *Hyla* were relocated to the genus *Boana* (senior synonym of *Hypsiboas*) (Faivovich *et al.*, 2005; Dubois, 2017). *Boana* (Hylinae) currently includes 99 species (Frost, 2022) rearranged into seven taxonomic species groups: *B. albopunctata*, *B. benitezi*, *B. faber*, *B. pellucens*, *B. pulchella*, *B. punctata*, and *B. semilineata* (Faivovich *et al.*, 2005, 2021; Wiens *et al.*, 2005, 2010; Pyron and Wiens, 2011; Pyron, 2014). Based on shared morphological and molecular characteristics, these groups differ in the number of species and the arrangement of internal clades. *Boana albopunctata* and *B. faber* are members of the *B. albopunctata* and *B. faber* groups, respectively, while *B. prasina* is a member of the *B. pulchella* group with the largest number of species (Faivovich *et al.*, 2005, 2021).

Considering the cytogenetic descriptions available for *Boana*, the diploid number ($2n$) varies from 22 to 24, with karyotypes presenting a small variation in the fundamental number (FN) (see [Table 1](#)). Most species of Phyllomedusinae and Pelodryadinae, recovered as the sister taxa of Hylinae, and share $2n=26$ chromosomes, while a $2n=24$ is considered a putative synapomorphy for Hylinae (Duellman, 2001; Faivovich *et al.*, 2005, 2021; Ferro *et al.*, 2018).

Despite the frequent $2n=24$ chromosomes found in *Boana* spp., the karyotypic organization of the species cannot be considered conserved ([Table 1](#)). Most species share the nucleolus organizer regions (NORs) on small-sized chromosomes. However, the variation in this character has provided valuable phylogenetic evidence in some groups, like *B. albopunctata*, *B. pulchella*, and *B. semilineata* (Ferro *et al.*, 2018). In addition, an intra- and inter-individual variation of the 0–1 B chromosome is observed in some *B. albopunctata* and *B. leucocheila* populations ([Table 1](#)).

In situ location of repetitive DNAs is considered an excellent chromosomal marker for genomic comparison (Machado *et al.*, 2020; Azambuja *et al.*, 2022; Deon *et al.*, 2022). Eukaryotic genomes contain a large portion of repetitive DNA sequences (Sumner, 2003). These sequences are presented as repetitive copies that could be arranged *in tandem* (gene families and satellite DNAs) or dispersed on the

chromosomes (transposable elements-TEs) (Sumner, 2003; Meštrović *et al.*, 2015). The 45S and 5S rDNA gene families are commonly used in chromosomal diversification studies (Ferro *et al.*, 2018; Deon *et al.*, 2022).

Tandem satellite-type repeats are categorized based on the size of their repetitive units and are usually grouped into satellite DNA (100-1000 bp), minisatellites (10-100 bp), and microsatellites (SSR - Simple Sequence Repeats - 1-6 bp) (Tautz, 1993; Li *et al.*, 2002). However, this classification is not static since some authors point out that SSRs can integrate satellite sequences when arranged in chromosomes in arrays of thousands to millions of copies (Garrido-Ramos, 2015, 2017). Satellite DNAs are the main component of heterochromatin (John, 1988; Chaves *et al.*, 2004).

Boana is assumed to be arranged in seven phylogenetic species groups. Comparative cytogenetic data within and between groups based on *in situ* localization of repetitive DNAs are still lacking, making it difficult to understand the main mechanisms of chromosome evolution. Here, we performed a comparative analysis among *B. albopunctata*, *B. faber*, and *B. prasina*, sampled in the Atlantic Forest from southern Brazil, based on conventional cytogenetic markers and *in situ* localizations using telomere sequence, rDNA gene families, and microsatellite motifs. Thus, the study goals were to infer mechanisms of chromosomal reorganization and dispersion processes of repetitive DNAs among these three species belonging to three different species groups of *Boana*.

Materials and methods

Sampled species and cytogenetic preparations

Four male individuals of each of the following species of *Boana* were collected in União da Vitória, Paraná, Brazil (26°13'48" S and 51°05'09" W): *B. albopunctata*, *B. faber*, and *B. prasina*. Voucher specimens were collected under license ICMBio/SISBIO 63336-1, and deposited in the Herpetological collection at Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Francisco Beltrão (RLUTF 1265–1267). This study was authorized by the Ethics Committee of Animal Usage of the Universidade Estadual do Paraná (Process CEUA 2021/0001), and Biosafety Certification according to Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio (CQB No. 0063/98).

Mitotic chromosomes were obtained from bone marrow using the method of Baldissera Jr. *et al.* (1993), and the slides were stained with 5% Giemsa diluted in

phosphate buffer pH 6.8. C-banding was performed using barium hydroxide (5% Ba(OH)₂ at 25 °C for 3 min), subsequent incubation in salt solution (2×SSC at 60 °C for 30 min), and 5% Giemsa staining (Sumner, 1972). The silver staining consisted of 2 min and 30 s at 60 °C of two parts of a 50% solution of silver nitrate and one part of 2% gelatin/ 1% formic acid solution (Howell and Black, 1980).

Obtaining the repetitive sequences and probes

The genomic DNA was extracted from *B. faber* muscle tissue using the Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson, 1980) and was used as template in Polymerase Chain Reactions (PCR). The 5S rDNA sequence was amplified with the primers 5SA_Fw (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') and 5SB_Rv (5'CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (Martins and Galetti, 1999), and the 18S rDNA sequence was amplified using 18S_Fw (5'-CCGCTTTGGTGACTCTTGAT-3') and 18S_Rv (5'-CCGAGGACCTCACTAAACCA-3') (Gross *et al.*, 2010). In general, the amplification reactions were performed as follows: 40 ng genomic DNA, 0.2 μM forward primer, 0.2 μM reverse primer, 0.16 mM dNTPs, 1U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA), and 1.5 mM MgCl₂ in 1x reaction buffer (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). The amplification program was as follows: 5 min - 95 °C / 30 cycles (30 s - 95 °C, 45 s - 56 °C, 2 min - 72 °C) / 7 min - 72 °C. PCR products were purified using the GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), and cloned using pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA). The clones obtained were sequenced using the ABI-PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The sequences were analyzed in the Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (Altschul *et al.*, 1990) and Rfam databases (Kalvari *et al.*, 2018).

The general telomeric sequence of vertebrates (TTAGGG)_n was generated by PCR in two amplification conditions, using the primers set (TTAGGG)₅/(CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.*, 1991). The first amplification was performed with low stringency: 4 min - 94 °C / 12 cycles (1 min - 94 °C, 45 s - 52 °C, 1 min 30 s - 72 °C); followed by 35 cycles of high stringency: 1 min - 94 °C, 1 min 30 s - 60 °C, 1 min 30 s - 72 °C. The repetitive sequences were labeled in PCR reactions to generate probes. The 5S rDNA was labeled using digoxigenin-11-dUTP (Jena Bioscience, Dortmund, Germany), and 18S rDNA was labeled using biotin-16-dUTP (Jena Bioscience), while for the telomeric sequence, it was used the aminoalyl-dUTP-Cy5 nucleotide (Jena Bioscience). The amplification

reactions were performed with the specific primers and the mixtures contained 20 ng DNA, 1 μ M of each primer, 40 mM dATP/ dGTP/ dCTP, 28 mM dTTP, 12 mM labeled nucleotide, 1U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2 mM MgCl₂ and 1x reaction buffer. The amplification program: 5 min - 95 °C / 30 cycles (30 s - 95 °C, 45 s - 56 °C, 2 min - 72 °C) / 7 min - 72 °C.

The microsatellites motifs (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAG)₁₀, (CGC)₁₀, (GAA)₁₀, (GACA)₈, and (GATA)₈ were directly labeled with Cy3-fluorochrome (Sigma-Aldrich) at the end 5' during synthesis.

In situ localization

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed under stringency conditions close to 77% (200 ng of each probe, 50% formamide, 10% dextran sulfate, 2xSSC - saline-sodium citrate; 16 h of hybridization at 37 °C), according to Pinkel *et al.* (1986). Fluorescence signals detection was performed using the antibodies streptavidin conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (18S rDNA recognition) and anti-digoxigenin conjugated with rhodamine (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) (5S rDNA recognition). Chromosomes were counterstained with 0.2 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and analyzed using ZEN digital image capture software coupled to a Carl Zeiss AxioLab A1 microscope. Approximately 30 metaphase cells were analyzed for each probe/specimen. The chromosomal morphology was determined according to the arms relationship criterion proposed by Green and Sessions (1991) (Supplementary material – [Table S1](#)), and arranged into karyotypes.

Results

Karyotypes description

Chromosomal analysis in *B. albopunctata* showed two distinct cytotypes (2n=22 and 22 + 1B), resulting in intra- and inter-individual variations 0–1 B chromosome ([Figure 1A](#) and [Table 1](#)). *Boana albopunctata* karyotype was arranged in metacentric (m) pairs 1, 2, and 11, submetacentric (sm) pairs 3, 5, 7–10, and subtelocentric (st) pairs 4 and 6, FN=44 ([Figure 1A](#)). The extra chromosome (small m B-chromosome) was present in three of the four analyzed specimens, 61.54% on average of the analyzed cells ([Table 2](#)). C-banding showed the heterochromatin distributed preferentially on the centromeric regions, besides additional blocks in the terminal regions of the

chromosome 1q, interstitial markers in the 1p and in the q arm of chromosome pairs 2 to 7, as well as a conspicuous heterochromatic block in the pericentromeric region of the pair 8 (Figure 1B). Furthermore, constitutive heterochromatin was located on the pericentromeric region of the B chromosome (Figure 1B). *Boana albopunctata* karyotype showed NOR in the terminal region of 8p (Figure 1B).

Boana faber showed $2n=24$ chromosomes, and the karyotype was arranged in m pairs 1, 2, 8, 10, and 12, sm pairs 3–5, 9, and 11, and subtelocentric (st) pairs 6 and 7, $NF=48$ (Figure 1C). The heterochromatin was distributed in centromeric bands in all chromosomes of the karyotype, besides interstitial bands on chromosome pairs 2, 3, 5, 6, and 7 (Figure 1D). The NOR site was located on the pair 11q (Figure 1D).

The karyotype of *B. prasina* showed $2n=24$ chromosomes, arranged in m pairs 1, 8–12, sm pairs 2, 3, 5, and 6, and st pairs 4 and 7, $NF=48$ (Figure 1E). The C-banding showed conspicuous terminal chromosome bands on the q arm of pair 1, large pericentromeric blocks of chromosome pairs 4, 7, and 10, and interstitial bands in the p arms of pair 1 and q arm of the chromosome pairs 3 to 5 (Figure 1F). Additionally, pair 11q presented a conspicuous interstitial heterochromatic block (Figure 1F). *Boana prasina* karyotype showed NOR on the terminal region of the 12q (Figure 1F).

Chromosomal mapping of repetitive sequences

In *B. albopunctata*, the *in situ* location of the telomeric sequence was restricted to the terminal regions of all chromosomes (Figure 2A). Double FISH using rDNA probes showed interstitial 5S rDNA sites on both arms of chromosome 2, and the 18S rDNA cluster in the terminal region of the 8p (Figure 2B). The microsatellite repeats $(CA)_n$, $(GA)_n$, $(CAG)_n$, $(CGC)_n$, $(GAA)_n$, $(GACA)_n$, and $(GATA)_n$ showed hybridization signals on the *B. albopunctata* karyotype (Figure 2 C-I, respectively). Conspicuous markings of all microsatellites were detected in the interstitial position of one homologous of pair 1 and the terminal region of the 8p (Figure 2 C-I). In addition, $(CA)_n$ motifs were evidenced in interstitial region of 9q (Figure 1C). The $(GA)_n$ signals were detected in the terminal region of most chromosomes, at the proximal region of the q arm in pairs 4 and 5, in the interstitial region of the q arms of pairs 7 and 8, and the terminal region of 8q (Figure 2D). The microsatellite $(CAG)_n$ was located in the terminal regions of the chromosomes, including the B chromosome, which also presented accumulation in its pericentromeric region (Figure 2E). $(GAA)_n$ motifs were detected in the interstitial region of the pair 6p, in addition to dispersed signals along the

chromosomes 2, 3, 4, and 9 (Figure 2F). The location of the (CGC)_n repeat also coincided with the heterochromatin in the pericentromeric region of B chromosome (Figure 2G). The (GACA)_n tetranucleotide was mapped in the terminal regions of all chromosome pairs, the interstitial region of the pair 9q, and the pericentromeric region of B chromosome (Figure 2H). The (GATA)_n sequence showed hybridization signals in the terminal region of the p arm of the B chromosome and dispersed markings in pairs 3, 4, 6, 7, and 11 (Figure 2I).

In *B. faber*, the (TTAGGG)_n probe was located in the telomeric region, in addition to accumulations in the pericentromeric region of all chromosomes (Figure 3A). Double FISH with the rDNA probes detected the 5S rDNA cluster in an interstitial position in pair 2p, while the 18S rDNA was located in the terminal region of the q arm of pair 11 (Figure 3B). *In situ* localization of the (CA)_n, (GA)_n, (CAG)_n, (CGC)_n, (GAA)_n and (GACA)_n microsatellites revealed signals preferentially located at the terminal regions, besides signals scattered along the chromosomes (Figure 3C-I, respectively). Except for the centromeric and proximal regions, the microsatellite (GAA)_n showed a dispersed pattern distribution along the chromosome arms (Figure 3F). (GATA)_n motifs were *in situ* located preferentially on the terminal regions of chromosome pairs 1, 2, 3, 4, 5, and 10 (Figure 3I).

The (TTAGGG)_n sequence was detected in the terminal regions of all chromosomes of *B. prasina* (Figure 4A). Double FISH detected the 5S rDNA cluster on the centromeric region of pair 2 and in the terminal region of the 5q, while the 18S rDNA probe hybridized in the terminal region of the q arm of pair 12 and only one homologous of pair 9 (Figure 4B). All the microsatellite repeats analyzed (CA, GA, CAG, CGC, GAA, GACA, and GATA) hybridized exclusively to the q arm of pair 11 (Figure 4 C-I, respectively).

Analysis of rDNA sequences

The *B. faber* 5S rDNA sequence comprises 219 bp, 85.22% identity with 5S rRNA from *Rana temporaria* (XR_005742848.1), and E-value of 2e-24 with the 5S ribosomal RNA in Rfam. The non-transcribed region (NTS) corresponds from nucleotide 1 to 97 and the transcribed region from 98 to 219. The partial sequence of *B. faber* 18S rDNA comprises 989 bp, 95.49% identity with *Boana boans* 18S rDNA (EF376085.1), and E-value of 9.5e-224 with eukaryotic small subunit ribosomal RNA

in Rfam. The sequences were deposited in GenBank (IDs: ON809568 and ON809569, respectively).

Discussion

Numerical chromosome changes in Boana

Boana genus is organized into seven phylogenetic species groups (Faivovich *et al.*, 2005). Except for the members of the *B. benitezi* group, which do not present cytogenetic data so far, the species already karyotyped from the *B. faber*, *B. pellucens*, *B. pulchella*, *B. punctata*, and *B. semilineata* groups, presented $2n=24$ chromosomes, including *B. faber* and *B. prasina* described in this study ([Table 1](#)). Despite $2n$ conservation among these species, morphological chromosome alterations changing the karyotypic formulas occurred independently in each species group lineage ([Table 1](#)).

On the other hand, *B. albopunctata*, *Boana* cf. *alfaroi*, *B. leucocheila*, and *B. multifasciata* have $2n=22$ (Ferro *et al.*, 2018, and references therein). End-to-end chromosome fusion, or reciprocal translocation involving the smallest pairs (NOR-bearing), has been proposed to explain the numerical chromosomal reduction observed in *B. albopunctata* species group, considering $2n=24$ as a putative plesiomorphic condition in *Boana* (Bogart, 1973; Gruber *et al.*, 2007). Based on this assumption, the NOR site is repositioned from chromosome 11 to 8 in species with $2n=24$ and $2n=22$, respectively.

According to previous assumptions, the origin of a small B metacentric in *B. albopunctata* appears as a subproduct of this numeric chromosomal reorganization (Bogart, 1973; Gruber *et al.*, 2007). Although the NOR location on pair 8 is conserved in species with $2n=22$ and on pair 11 or 12 in species with $2n=24$ in the group *B. albopunctata*, the NORs showed chromosomal repositioning in other groups of *Boana*, without changing the $2n$ (see [Table 1](#)). Also, pairs 11 and 12 in karyotypes with $2n=24$ of the *B. albopunctata* species group are usually m or sm chromosomes, indicating a more complex mechanism for chromosome number reduction. Thus, although the fusion between pairs 11 and 12 proposed by Gruber *et al.* (2007) may be parsimonious in explaining the origin of $2n=22$, the breakpoints and mechanisms related are not fully understood. Besides that, no ITS vestiges were observed in the analyzed *B. albopunctata* karyotype, suggesting the occurrence of double-strand breaks in the origin of chromosomal fusion.

Only some populations of *B. leucocheila* and *B. albopunctata* carry B chromosomes ([Table 1](#)), similar in size and metacentric morphology (Gruber *et al.*, 2007; Ferro *et al.*, 2018). In *B. albopunctata*, when the B chromosomes are present, in all cases are metacentric small-sized but with distinct levels of heterochromatinization (Gruber *et al.*, 2007; Ferro *et al.*, 2012). These findings, as observed in *B. albopunctata* analyzed, indicate a population differentiation of the B chromosome by progressive DNA repeats accumulation.

Using a chromosome probe obtained from the microdissection of a B chromosome of *B. albopunctata*, Gruber *et al.* (2014) observed hybridization signals just on the supernumerary. Based on the B chromosome painting data, Gruber *et al.* (2014) suggested a composition enriched with repetitive DNA and an interspecific origin of the B. In the present study, FISH experiments with microsatellite probes showed that the pericentromeric region of the B chromosome is enriched with CGC and GACA repeats, and in the terminal regions, there are CAG and GATA accumulations. These microsatellites are also accumulated in pair 8. Based on this evidence, we suggest that the B chromosome could have originated from an A set chromosome, microsatellite enriched, such as the pair 8. However, future genomic studies allied to chromosome painting and repetitive DNA probes from B are required to elucidate the mechanism of origin of the B chromosome in these species.

Chromosome mapping

In Hyalinae, NORs located on a small-sized chromosome are common in their representatives, suggesting a homeology involving the NOR-bearing chromosomes (Cardozo *et al.*, 2011; Catroli *et al.*, 2011). Most species of *Boana* share the putative NOR plesiomorphic condition (on pair 11), although in some species of the *B. albopunctata*, *B. pulchella*, and *B. semilineata* groups, the locus occurs in a higher size chromosome (see [Table 1](#)). Multiple NORs, i.e., on two chromosome pairs, were detected only in *B. atlantica* and *B. prasina* karyotypes (Baldissera *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2014). The chromosomal dynamics of NOR location in anurans may be the result of intra and inter-chromosomal rearrangements, like inversions, fusions, and translocations, by TE-mediated transpositions events or reinsertion of errors during amplification events (Schmid *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1996; Lourenço *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008; Cazaux *et al.*, 2011; Ferro *et al.*, 2018; Deon *et al.*, 2022). In the three *Boana* species analyzed, the NORs were located in usual chromosome positions

for each species, previous corroborating studies (Gruber *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2014; Schmid and Steinlein, 2016a). *Boana prasina* presented an additional 45S rDNA site on the karyotype, as also observed by Baldissera *et al.* (1993), but a non-active nucleolus. A detailed explanation of silent NOR was described in *Arabidopsis* genome, where NOR silencing appears to be controlled by sequences outside the rDNA array (McStay, 2016). This finding indicates that a rDNA unit transposition not carrying their transcription regulators could imply non-activation.

Here we report, for the first time, the physical mapping of 5S rDNA loci in species of *Boana*. In other anurans, the location of the 5S rDNA tends to be conserved in the karyotypes of the species (Vitelli *et al.*, 1982; Rodrigues *et al.*, 2012). The three *Boana* species analyzed shared the chromosome location of 5S rDNA cluster. Furthermore, *B. albopunctata* and *B. prasina* showed additional 5S rDNA sites. The 5S rDNA clusters were considered unstable genomic regions in some groups, subjected to double-strand breaks and chromosomal rearrangements, promoting karyotypic remodeling (Glugoski *et al.*, 2018; Deon *et al.*, 2020, 2022). These additional sites in *Boana* suggest that the 5S rDNA family was also subjected to transposition or translocation events of repetitive sequences in these karyotypes.

The distribution of heterochromatic bands tends to be quite diverse among the karyotypes into the distinct species groups of *Boana* (Baldissera *et al.*, 1993; Gruber *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009, 2014; Ferro *et al.*, 2018). Heterochromatin features, such as position, amount, and DNA repeat units, were efficient chromosome markers to evaluate the karyotype diversification in the *Boana* studied species. The extensive heterochromatic blocks presented in some chromosome pairs indicate repeat unit amplification, reinforcing the role of the repetitive DNAs in chromosome evolution in *Boana*.

The telomeric sequence distribution on *B. faber* karyotype illustrates the repetitive DNAs potential in minor changes in *Boana* karyotypes. Given the maintenance of $2n=24$, chromosomal fusions cannot explain the origin of the ITS observed in the *B. faber* karyotypes (Schmid and Steinlein, 2016b). In some vertebrates, telomeric-like sequences may be found in satellite DNA (Meyne *et al.*, 1990; Garrido-Ramos *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 2014; Schmid and Steinlein, 2016b). Moreover, according to Schmid and Steinlein (2016b), the high intensity of $(TTAGGG)_n$ sequences in the heterochromatic pericentromeric area of *B. faber* shows that these repeats are part of centromeric satellite DNA. So, the intense accumulation of pericentromeric

(TTAGGG)_n sequences in *B. faber* karyotype is an apomorphic feature due to repetitive DNA units' diversification.

Ferro *et al.* (2018), characterizing AT/CG-rich regions, demonstrated the dynamic of heterochromatic domains in *Boana*, and reinforced the need for repeat unit localization to compare heterochromatic blocks in chromosome diversification. In this study, the comparative *in situ* localization of seven microsatellites in *B. albopunctata*, *B. faber*, and *B. prasina* karyotypes revealed genomic differences in the composition of heterochromatin blocks. Despite these species belong to different taxonomic groups of *Boana*, this finding reinforces a significant diversification in their repetitive DNA content.

Some studies have reported that microsatellite sequences are not randomly distributed in eukaryotic genomes, and closely related species tend to have the same chromosomal locations (Cuadrado and Jouve, 2007; Ruiz-Ruano *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016; Utsunomia *et al.*, 2018). On the other hand, different patterns in the location of microsatellite repeats may indicate karyotypic diversification in specific lineages, which is occasionally linked to chromosomal rearrangements (Farré *et al.*, 2012; Glugoski *et al.*, 2022). As the species studied here belong to different *Boana* groups (Faivovich *et al.*, 2005), the distribution of microsatellites in the karyotypes confirms distinct chromosomal organizations.

Significant microsatellite sequence accumulations in euchromatic regions, such as those found in *B. albopunctata*, are uncommon. In this species, the seven microsatellites revealed specific sites in the euchromatic segment in only one homologous member of pair 1. Specific accumulations of microsatellites are usual in heteromorphic sex chromosomes due to the emergence of the non-recombinant region (Schemberger *et al.*, 2019). Thus, the association of this heteromorphic region as polymorphic or associated with sex should be further investigated in *B. albopunctata*. However, this pattern of microsatellite organization in the euchromatin was also observed in the karyotypes of other vertebrates, non-related to the sex, as in Cheloniidae (Machado *et al.*, 2020) and Cycloramphidae species (Bueno *et al.*, 2021). Still, the absence of available genomic information does not allow us to understand the structure and functions of these regions. In addition, the colocalization of microsatellites with the NOR can be explained by the presence of repetitive DNAs in the intergenic spacer (IGS) regions (Ruiz-Ruano *et al.*, 2015; Ernetti *et al.*, 2019).

In *B. faber* karyotype, the GAA motif showed a dispersed and interspaced pattern. The distribution of microsatellite sequences throughout genomes has been associated with the activity of TEs, which may contain microsatellite repeats in its sequences, thus contributing to units spread during transposition events (Akagi *et al.*, 2001; Coates *et al.*, 2010; Pucci *et al.*, 2016). In this way, the GAA expansion could be disseminated into *B. faber* genome as part of a TE. On the other hand, all microsatellite motifs mapped in *B. prasina* showed hybridization signals exclusive and coincident with a heterochromatic block in the long arm of the pair 11. According to Ferro *et al.* (2018), this heterochromatic block probably represents a synapomorphy within the *B. pulchella* group, which currently includes *B. prasina* and 37 other species (Faivovich *et al.*, 2021). These data suggest extensive actuation of repetitive DNAs in minor chromosomal changes promoting independent diversification in the distinct phylogenetic groups of *Boana*.

Conclusion

The obtained comparative chromosome analysis revealed that the karyotypes of *B. albopunctata*, *B. faber*, and *B. prasina* presented intrinsic differences, mainly related to the presence of the B chromosome, the location and number of rDNA sites, and the dispersion pattern, and location of microsatellite units. These findings revealed karyological diversification among the species belonging to *Boana* taxonomic groups, which may be associated with the dispersion of repetitive DNAs, promoting changes in morphology and composition of the chromosomes.

Acknowledgments

This work was supported by funding from the Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, grant number: 9/2017), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Finance Code 001), and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number: 305142/2019-4).

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Author Contributions

SVN, RBN, VN, and MRV conceived the project ideas; SVN, RBN, MA, CBG, BRS, VN and MRV performed experiments, analyzed data, and wrote the paper.

References

- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Mori K and Fujimura T (2001) *Micron*, a microsatellite-targeting transposable element in the rice genome. *Mol Genet Genomics* 266:471–480.
- Ananias F, Garcia PCA and Recco-Pimentel SM (2004) Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Brain* 140:42–48.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Anderson K, Green D and Session SK (1991) Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, San Diego, pp 299–331.
- Azambuja M, Marcondes DS, Nogaroto V, Moreira-Filho O and Vicari MR (2022) Population structuration and chromosomal features homogeneity in *Parodon nasus* (Characiformes: Parodontidae): A comparison between Lower and Upper Paraná River representatives. *Neotrop Ichthyol* 20:e210162.
- Baldissera Jr FA, Oliveira PSL and Kasahara S (1993) Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with supernumerary chromosomes. *Rev Bras Genet* 16:335–345.
- Baraquet M, Salas NE and Martino AL (2013) C-banding patterns and meiotic behavior in *Hypsiboas pulchellus* and *H. Cordobae* (anura, hylidae). *J Basic Appl Genet* 24:32–39.
- Beçak ML (1968) Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia* 21:191–208.
- Bogart JP (1973) Evolution of anuran karyotypes. *Evolutionary Biology of Anurans*. Mizzou Press 3:337–349.
- Bogart JP and Bogart JE (1971) Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. *Herpetologica* 27:229–235.
- Bueno GDP, Gatto KP, Gazolla CB, Leivas PT, Struett MM, Moura M and Bruschi DP (2021) Cytogenetic characterization and mapping of the repetitive DNAs in *Cycloramphus bolitoglossus* (Werner, 1897): More clues for the chromosome evolution in the genus *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). *PloS one* 16:e0245128.

- Cardozo D, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad C *et al.*, (2011) Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation. *Copeia* 2:251-263.
- Carvalho KA, Garcia PC and Recco-Pimentel SM (2009) Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Genet Mol Res* 8:1498-1508.
- Carvalho MA, Rodrigues MT, Siqueira S and Garcia C (2014) Dynamics of chromosomal Evolution in the genus *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Genet Mol Res* 13:7826-7838.
- Catroli GF, Faivovich J, Haddad CFB and Kasahara, S (2011) Conserved karyotypes in Cophomantini: cytogenetic analysis of 12 species from 3 species groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). *J Herpetol* 45:120-128.
- Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJ and Britton-Davidian J (2011) Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol* 11:1-14.
- Chaves R, Santos S and Guedes-Pinto H (2004) Comparative analysis (Hippotragini versus caprini, Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by *in situ* restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. *Genetica* 121:315-325.
- Coates BS, Sumerford DV, Hellmich RL and Lewis LC (2010) A *Helitron*-like transposon superfamily from Lepidoptera disrupts (GAAA)_n microsatellites and is responsible for flanking sequence similarity within a microsatellite family. *J Mol Evol* 70:275–288.
- Cuadrado A and Jouve N (2007) The nonrandom distribution of long clusters of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. *Chromosome Res* 15:711-720.
- Deon GA, Glugoski L, Vicari MR, Nogaroto V, Sassi FDMC, Cioffi MDB, Liehr T, Bertollo LA and Moreira-Filho O (2020) Highly rearranged karyotypes and multiple sex chromosome systems in armored catfishes from the genus *Harttia* (Teleostei, Siluriformes). *Genes* 11:1366.
- Deon GA, Glugoski L, Hatanaka T, Sassi FDMC, Nogaroto V, Bertollo LA, Liehr T, Al-Rikabi A, Moreira-Filho O, Cioffi MDB *et al.* (2022) Evolutionary breakpoint regions and chromosomal remodeling in *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae) species diversification. *Genet Mol Biol* 45:e20210170.
- Dubois A (2017) The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature

- and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Bionomina* 11:1–48.
- Duellman WE (1967) Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Syst Zool* 16:38–43.
- Duellman WE (2001) The hylid frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Ithaca 1:1159.
- Duellman WE and Cole CJ (1965) Studies of Chromosomes of Some Anuran Amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Syst Zoo* 14:139–143.
- Duellman WE, De la Riva I and Wild ER (1997) Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* group in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean group of *Hyla*. *Sci Pap Univ Kansas Nat Hist Mus* 3:1–41.
- Ernetti JR, Gazolla CB, Recco-Pimentel SM, Lucas EM and Bruschi DP (2019) Non-random distribution of microsatellite motifs and (TTAGGG) n repeats in the monkey frog *Pithecopus rusticus* (Anura, Phyllomedusidae) karyotype. *Genet Mol Biol* 42: e20190151.
- Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA and Wheeler WC (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull Am Mus Nat Hist* 29:1-240.
- Faivovich J, Pinheiro PD, Lyra ML, Pereyra MO, Baldo D, Munoz A, Reichle S, Brandão RA, Giaretta AA, Thomé MT *et al.* (2021) Phylogenetic relationships of the *Boana pulchella* group (Anura: Hylidae). *Mol Phylogenetics Evol* 155:106981.
- Farré A, Cuadrado A, Lacasa-Benito I, Cistué L, Schubert I, Comadran J, Jansen J and Romagosa I (2012) Genetic characterization of a reciprocal translocation present in a widely grown barley variety. *Mol Breed* 30:1109-1119.
- Ferro JM, Marti DA, Bidau CJ, Suárez P, Nagamachi CY, Pieczarka JC and Baldo DB (2012) Chromosomes in the Tree Frog *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae). *BioOne* 68:482-490.
- Ferro JM, Cardozo DE, Suárez P, Boeris J, Blasco-Zúñiga A, Barbero G, Gomes A, Gazoni T, Costa W, Nagamachi CY *et al.* (2018) Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hyliinae). *Plos One* 13:1-29.
- Frost, D. R. Amphibian Species of the World: on online Reference. Version 6.1. American Museum of Natural History, <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/> (November 16, 2022).

- Garrido-Ramos MA (2015) Satellite DNA in plants: more than just rubbish. *Cytogenet Genome Res* 146:153-170.
- Garrido-Ramos MA (2017) Satellite DNA: an evolving topic. *Genes* 8:230.
- Garrido-Ramos MA, De La Herrán R, Rejón CR and Rejón MR (1998) A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet Genome Res* 83:3-9.
- Glugoski L, Giuliano-Caetano L, Moreira-Filho O, Vicari MR and Nogaroto V (2018) Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. *Gene* 650:49-54.
- Glugoski L, Nogaroto V, Deon GA, Azambuja M, Moreira-Filho O, Vicari MR (2022) Enriched tandemly repeats in chromosomal fusion points of *Rineloricaria latirostris* (Boulenger, 1900) (Siluriformes: Loricariidae). *Genome* 65:479-489.
- Green DM and Sessions SK (1991) *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, San Diego, pp 431-432.
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Martins C and Feldberg E (2010) Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *J Fish Biol* 76:1117-1127.
- Gruber SL, Haddad CF and Kasahara S (2007) 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* 130:281-291.
- Gruber SL, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Foresti F, Haddad CF and Kasahara S (2014) Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridization. *Comp Cytogenet* 8:185-197.
- Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015.
- Huang J, Ma L, Yang F, Fei SZ and Li L (2008) 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. *PLoS One* 3:e2167.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A and Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG) $_n$ generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19:4780.
- John B (1988) The biology of heterochromatin In: Verma RS (1988) *Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects*. Camb Univ Press 1:15-23.

- Kaiser H, Mais C, Bolaños F, Steinlein C, Feichtinger W and Schmid M (1996) Chromosomal investigation of three Costa Rica frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. *Genetica* 98:95-102.
- Kalvari I, Nawrocki EP, Argasinska J, Quinones-Olvera N, Finn RD, Bateman A and Petrov AI (2018) Non-coding RNA analysis using the Rfam database. *Curr Protoc Bioinformatics* 62:51.
- León PE (1970) Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. *Rev Biol Trop* 17:119–124.
- Lourenço LB, Garcia PCA and Recco-Pimentel SH (2000) Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae), with phylogenetic comments. *Hereditas* 133:201–209.
- Li Y, Korol AB, Fahima T, Beiles A and Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453-2465.
- Machado CRD, Domit C, Pucci M, Gazolla CB, Glugoski L, Nogaroto V and Vicari MR (2020) Heterochromatin and microsatellites detection in karyotypes of four sea turtle species: Interspecific chromosomal differences. *Genet Mol Biol* 43:e20200213.
- McStay B (2016) Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes Dev* 30(14):1598-1610.
- Martins C and Galetti PM (1999) Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res* 7:363-367.
- Mattos TL, Coelho A, Schneider C, Telles DO, Menin M and Gross M (2014) Karyotypic diversity in seven Amazonian anurans in the genus *Hypsiboas* (family Hylidae). *BMC Genetics* 15:1-13.
- Meštrović N, Mravinac B, Pavlek M, Vojvoda-Zeljko T, Šatović E and Plohl M (2015) Structural and functional liaisons between transposable elements and satellite DNAs. *Chromosome Res* 23:583-596.
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL and Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3-10.
- Murray GM and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325.

- Nunes RRA and Fagundes V (2008a) Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species groups. *Genet Mol Biol* 31:982-987.
- Nunes RRA and Fagundes V (2008b) Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil *Bol. Mus. Biol. Mello Leitão* 23:21–36.
- Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2934-2938.
- Pucci MB, Barbosa P, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Moreira-Filho O and Vicari MR (2016) Chromosomal Spreading of Microsatellites and (TTAGGG)_n Sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* Genomes (Characiformes: Crenuchidae). *Cytogenet Genome Res* 149:182-190.
- Pyron RA (2014) Biogeographic analysis reveals ancient continental vicariance and recent oceanic dispersal in amphibians. *Syst Biol* 63:779-797.
- Pyron RA and Wiens JJ (2011) A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol Phylogenet Evol* 61:543-583.
- Rabello MN (1970) Chromosomal studies in Brazilian anurans. *Caryologia* 23:45–59.
- Rabello MN, Beçak ML and Beçak W (1971) Contribuição a Citotaxonomia da Família Hylidae. *Arquivos do Museu Nacional* 50:285–286.
- Raber SC, Carvalho KA, Garcia PCA, Vinciprova G and Recco-Pimentel SM (2004) Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). *Phyllomedusa* 3:43–49.
- Rodrigues DS, Rivera M and Lourenço LB (2012) Molecular organization and chromosomal localization of 5S rDNA in Amazonian *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). *BMC Genet* 13:1-13.
- Ruiz-Ruano FJ, Cuadrado Á, Montiel EE, Camacho JPM and López-León MD (2015) Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma* 124:221-234.
- Saez FA and Brum NB (1960) Chromosomes of South American Amphibians. *Nature* 185:945.
- Schemberger MO, Nascimento VD, Coan R, Ramos E, Nogaroto V, Ziemniczak K, Valente GT, Moreira-Filho O, Martins C and Vicari MR (2019) DNA transposon invasion and

- microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. *Chromosoma* 128:547–560.
- Schmid M, Feichtinger W, Weimer R, Mais C, Bolaños F and Leon P (1995) Chromosome banding in Amphibia XXI. Inversion polymorphism and nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenet Cell Genet* 69:18–26.
- Schmid M and Steinlein C (2016a) Chromosome Banding in Amphibia. XXXIII. Demonstration of 5-Methylcytosine-Rich Heterochromatin in Anura. *Cytogenet Genome Res* 148:35–43.
- Schmid M and Steinlein C (2016b) Chromosome banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal telomeric DNA sequences in Anura. *Cytogenet Genome Res* 148:211-226.
- Schmid M, Steinlein C, Feichtinger W, Haaf T, Mijares-Urrutia A, Schargel WE and Hedges SB (2014) Cytogenetic studies on *Gonatodes* (Reptilia, Squamata, Sphaerodactylidae). *Cytogenet Genome Res* 144:47-61.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304-306.
- Sumner AT (2003) *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Publishing, Oxford, 287 pp.
- Tautz D (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Eppelen JT, Jeffreys AJ (eds) *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Progress in Systems and Control Theory. Birkhäuser, Basel, pp 21-28.
- Utsunomia R, Melo S, Scacchetti PC, Oliveira C, Machado MA, Pieczarka JC, Nagamachi CY and Foresti F (2018) Particular chromosomal distribution of microsatellites in five species of the genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). *Zebrafish* 15:398-403.
- Vitelli L, Batistoni R, Andronico F, Nardi I and Barsacchi-Pilone G (1982) Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary divergent anuran amphibians. *Chromosoma* 84:475-491.
- Wiens JJ, Fetzner JW, Parkinson CL and Reeder TW (2005) Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Syst Biol* 54:716-748.
- Wiens JJ, Kuczynski CA, Hua X and Moen DS (2010) An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 55:871-882.

Zheng J, Sun C, Zhang S, Hou X and Bonnema G (2016) Cytogenetic diversity of simple sequences repeats in morphotypes of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Front Plant Sci* 7:1049.

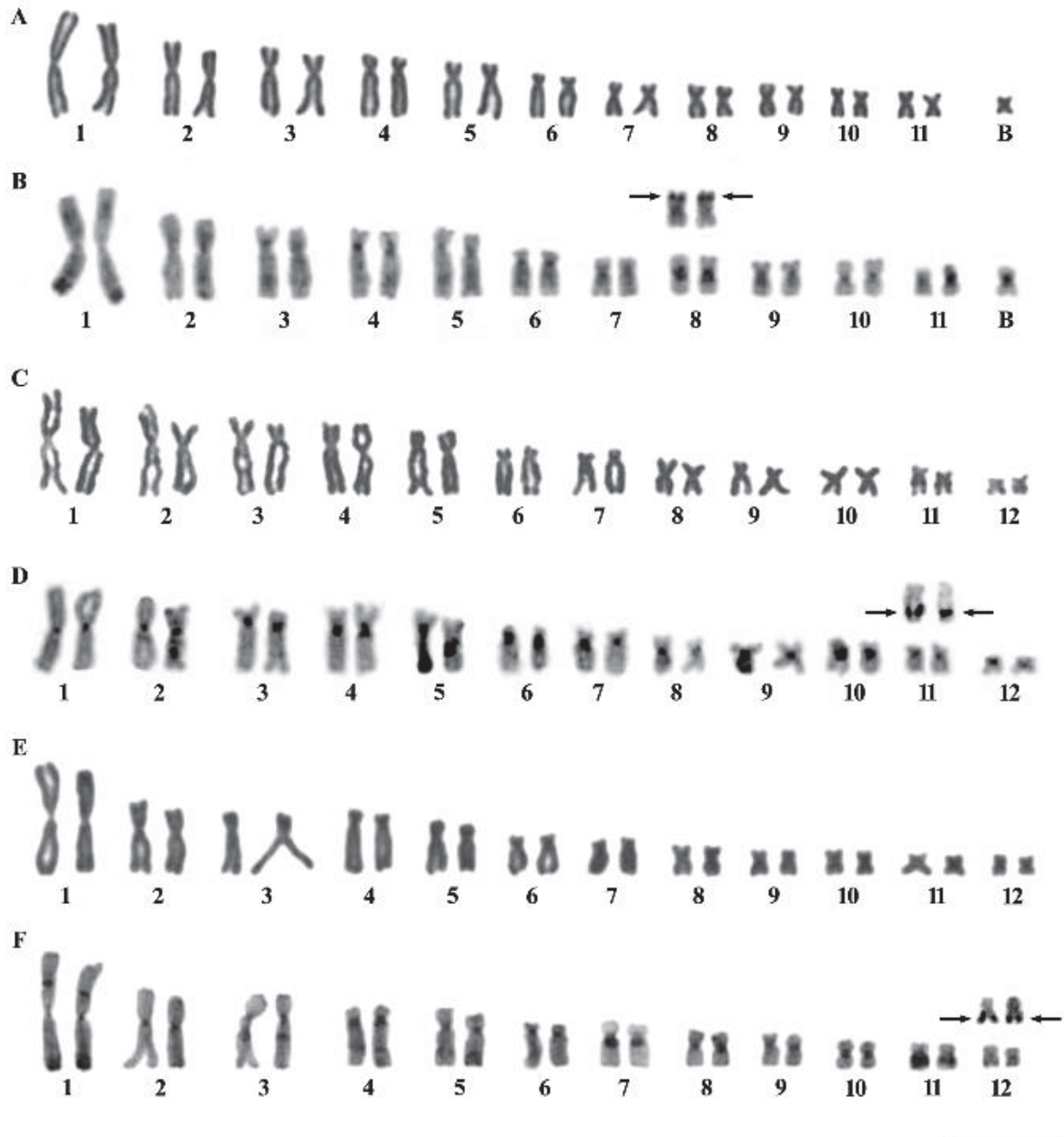


Figure 1. Karyotypes arranged from Giemsa staining and C-banding, respectively: (A, B) *B. albopunctata* with $2n = 22$ chromosomes and presence of one B chromosome, (C, D) *B. faber*, and (E, F) *B. prasina*, both with $2n = 24$ chromosomes. Above the respective pairs, the NOR-bearing chromosome pairs revealed by silver impregnation (arrows). Bar = 10 μm .

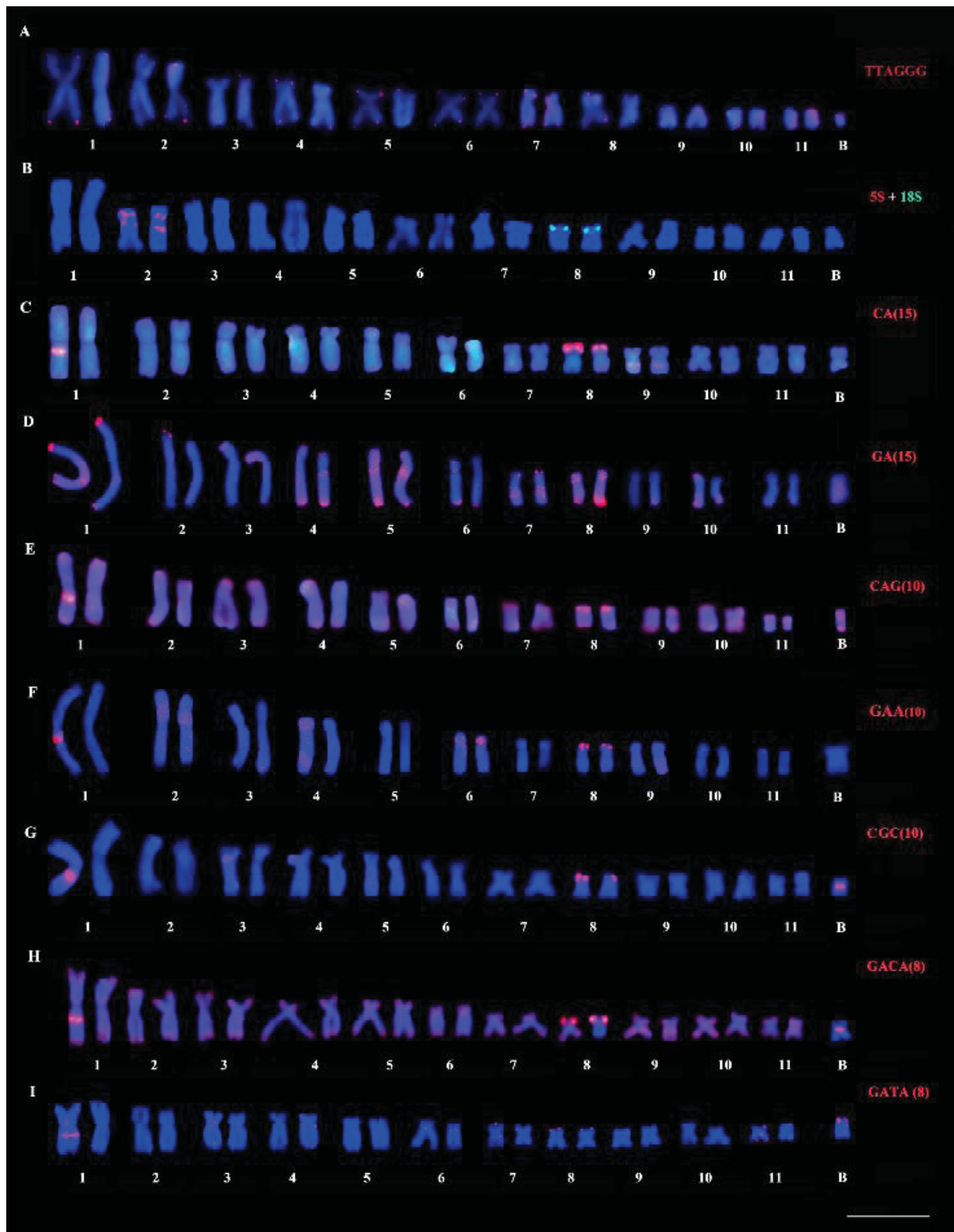


Figure 2. Karyotype of *B. albopunctata* submitted to FISH with the following repetitive sequences: (A) telomeric probe, (B) ribosomal probes, and (C-I) microsatellite sequences. Bar = 10 μ m.

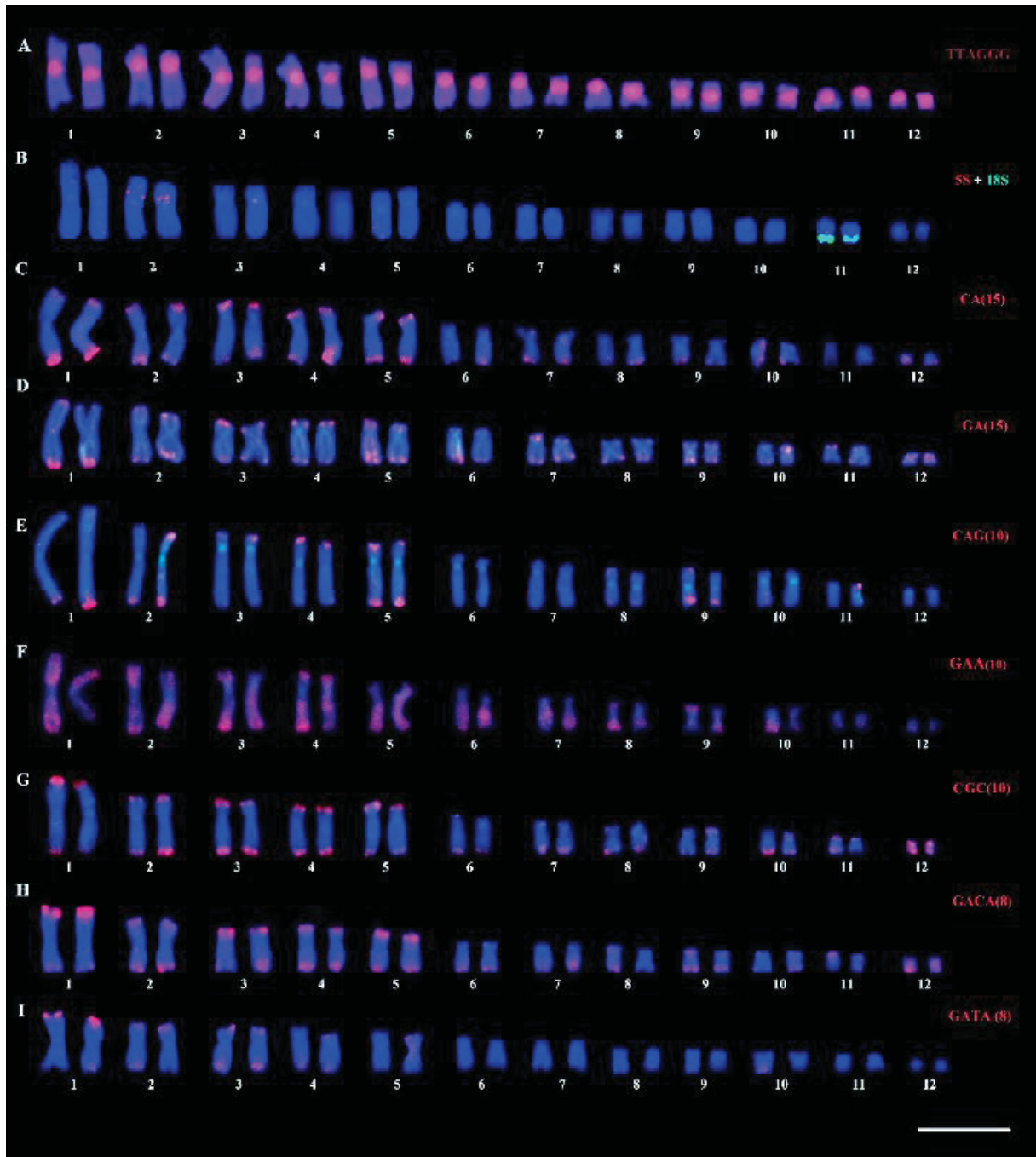


Figure 3. Karyotype of *B. faber* submitted to FISH with the following repetitive sequences: (A) telomeric probe, (B) ribosomal probes, and (C-I) microsatellite sequences. Bar = 10 μ m.

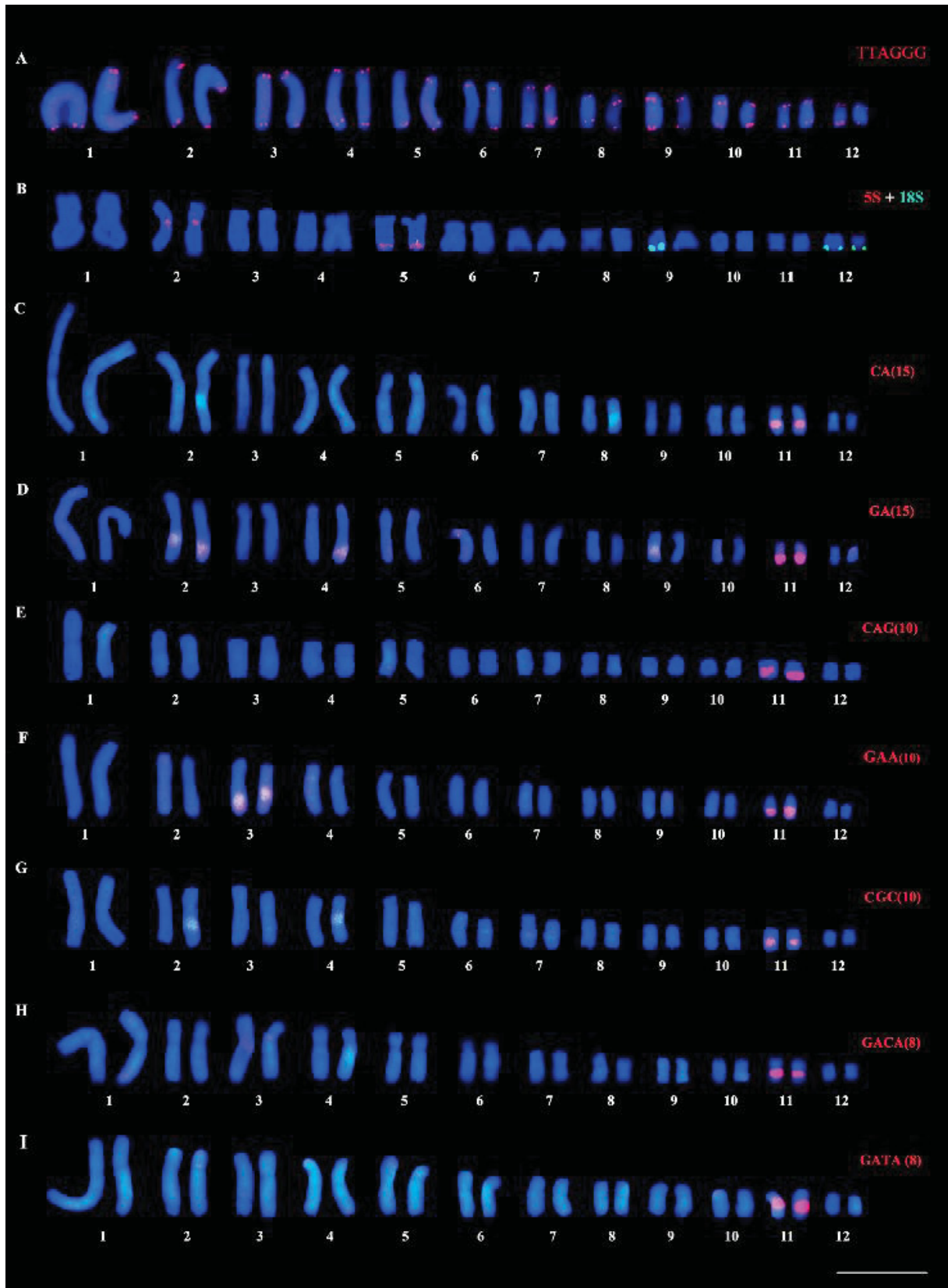


Figure 4. Karyotype of *B. prasina* submitted to FISH with the following repetitive sequences: (A) telomeric probe, (B) ribosomal probes, and (C-I) microsatellite sequences. Bar = 10 μ m.

Table 1. Cytogenetic data on species belonging to six different taxonomic groups of *Boana*.

Group	Especie	2N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	B	NORs	5S+18S	Ref.
	Locality																	
	São Paulo - Brasil	22	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	sm	m	m	sm	--	--	--	--	Beçak, 1968
	Brasil	22							NI							--	--	Bogart, 1973
	São Paulo - Brasil	22+1	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	sm	m	m	m	--	m	8	--	Gruber <i>et al.</i> , 2007
	Goiás - Brasil	22							NI							--	--	Oliveira <i>et al.</i> , 2012
	Corrientes/Misiones - Argentina	22+(1-3)	m	m	sm	st	sm	sm	m	m	m	sm	m	--	3m	8	18s - 8	Ferro <i>et al.</i> , 2012
	São Paulo - Brasil	22+1							NI							8	--	Gruber <i>et al.</i> , 2014
	Paraná - Brasil	22+1	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	sm	m	--	m	8	5s - 2 18s - 8	Present study
	Pará - Brasil	22	m	m	sm	sm	sm	sm	m	m	m	sm	m	--	--	--	18s - 8	Ferro <i>et al.</i> , 2018
	Tungurahua - Equador	24	m	m	sm	sm	sm	sm	m	m	sm	sm	sm	sm	--	12	--	Ferro <i>et al.</i> , 2018
	Pastaza - Equador	24	m	m	sm	st	sm	sm	m	m	m	m	m	m	--	--	--	Ferro <i>et al.</i> , 2018
	Huanuco - Peru	24							NI							--	--	Bogart and Bogart, 1971
	--	24	m	m	sm	sm	m	sm	m	m	sm	m	m	sm	--	11	--	Ferro <i>et al.</i> , 2018
	Amazonas - Brasil	22	m	sm	sm	st	st	st	m	m	sm	m	st	--	--	11	--	Mattos <i>et al.</i> , 2014
	Amazonas - Brasil	24	m	m	sm	st	sm	st	m	m	sm	sm	m	m	--	11	--	Ferro <i>et al.</i> , 2018
	Pará - Brasil	22+1	m	m	sm	sm	sm	sm	m	m	m	sm	m	--	m	8	18s - 8	Ferro <i>et al.</i> , 2018
	Goiás - Brasil	24							NI							--	--	Oliveira <i>et al.</i> , 2012
	Amazonas - Brasil	24	m	m	st	sm	st	st	m	st	sm	m	m	m	--	11	--	Mattos <i>et al.</i> , 2014
	Pará - Brasil	22	m	m	sm	st	sm	st	m	m	sm	m	m	--	--	8	18s - 8	Ferro <i>et al.</i> , 2018
	--	24							m + sm						--	--	--	Rabello, 1970

<i>B. marianitae</i>	Salta – Argentina	24	m	m	sm	st	sm	st	sm	st	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	11	--	Ferro <i>et al.</i> , 2018
	--	24										m + sm							--	--	Rabello, 1970	
<i>B. polytaenia</i>	--	24										NI							--	--	Rabello <i>et al.</i> , 1971	
	Brasil	24										NI							--	--	Bogart, 1973	
	Espirito Santo - Brasil	24	m	sm	sm	sm	sm	st	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	--	--	Nunes and Fagundes, 2008b
	São Paulo - Brasil	24	m	sm	sm	sm	sm	tl	sm	m	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	9	--	Beçak, 1968
<i>B. prasina</i>	São Paulo - Brasil	24										NI							12/9	--	Baldissera <i>et al.</i> , 1993	
	Paraná – Brasil	24	m	sm	sm	st	sm	st	st	m	m	m	m	m	m	m	m	m	12	18s–12/9		Present estudy
	América do Sul	24										m							--	--	Saez and Brum, 1960	
<i>B. pulchella</i>	Argentina	24										NI							--	--	Bogart, 1973	
	Córdoba - Argentina	24	m	sm	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	--	--	Baraquet, 2013
	Buenos Aires – Argentina	24	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	12	--	--	Ferro <i>et al.</i> , 2018
<i>B. riojana</i>	La Rioja – Argentina	24	m	m	sm	st	sm	st	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	11	18s - 11		Ferro <i>et al.</i> , 2018
<i>B. semiguttata</i>	Sul do Brasil	24	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	sm	m	m	m	m	m	m	m	1	--	--	Ananias <i>et al.</i> , 2004
<i>B. stellae</i>	Misiones - Argentina	24	m	m	sm	st	sm	st	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	1	18s – 1		Ferro <i>et al.</i> , 2018
<i>B. atlantica</i>	Bahia - Brasil	24	m	sm	st	sm	st	st	st	sm	m	sm	m	sm	sm	sm	sm	sm	10/12	--	--	Carvalho <i>et al.</i> , 2014
	Peru	24										NI							--	--	Bogart, 1973	
<i>B. punctata</i>	Amazonas - Brasil	24	m	sm	st	sm	sm	st	sm	m	st	sm	m	sm	m	sm	m	sm	11	--	--	Mattos <i>et al.</i> , 2014
	Tungurahua – Equador	24	m	m	sm	t	sm	st	sm	m	m	m	m	m	m	m	m	m	11	18s – 11		Ferro <i>et al.</i> , 2018
<i>B. punctata</i>	Huanuco - Peru	24										NI							--	--	--	Bogart and Bogart, 1971

Table 2. Frequency of the B chromosome in four *B. albopunctata* analyzed specimens.

Specimen ID	Metaphases N	B frequency
40	22	68,18%
44	21	90,48%
45	8	87,50%
47	18	0%
Total = 69		Average = 61,54%

Supplementary material

The following online material is available for this article:

Table S1 - Chromosome measurements of *Boana* species of the present study. Chromosome percentage relative to the haploid set. Centromeric index \pm standard deviation. m: metacentric; sm: submetacentric; st: subtelocentric.

Species	Chromosome pair												B	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<i>B. albopunctata</i>	18.67 (m) 0.49 \pm 0.04	13.02 (m) 0.40 \pm 0.02	11.79 (sm) 0.31 \pm 0.01	10.81 (st) 0.23 \pm 0.01	9.58 (sm) 0.26 \pm 0.02	7.86 (st) 0.22 \pm 0.01	5.65 (sm) 0.35 \pm 0.03	5.41 (sm) 0.36 \pm 0.01	5.41 (sm) 0.36 \pm 0.01	4.67 (sm) 0.32 \pm 0.02	4.42 (m) 0.39 \pm 0.01			2.70 (m) 0.45 \pm 0.00
<i>B. faber</i>	15.67 (m) 0.48 \pm 0.03	13.91 (m) 0.40 \pm 0.01	11.92 (sm) 0.26 \pm 0.01	10.82 (sm) 0.29 \pm 0.02	10.15 (sm) 0.33 \pm 0.01	7.73 (st) 0.23 \pm 0.02	6.84 (st) 0.23 \pm 0.00	5.52 (m) 0.44 \pm 0.02	5.08 (sm) 0.35 \pm 0.02	5.08 (m) 0.48 \pm 0.01	4.64 (sm) 0.29 \pm 0.02	2.65 (m) 0.42 \pm 0.02		
<i>B. prasina</i>	20.68 (m) 0.47 \pm 0.01	13.09 (sm) 0.36 \pm 0.04	11.26 (sm) 0.33 \pm 0.03	11.26 (st) 0.19 \pm 0.01	9.42 (sm) 0.31 \pm 0.01	6.81 (sm) 0.31 \pm 0.04	6.54 (st) 0.28 \pm 0.01	5.24 (m) 0.45 \pm 0.03	4.45 (m) 0.47 \pm 0.02	4.19 (m) 0.44 \pm 0.02	3.93 (m) 0.47 \pm 0.02	3.14 (m) 0.50 \pm 0.01		

4.2 Molecular characterization and chromosomal distribution of the *Tc1/Mariner* transposon in *Boana* species (Anura, Hylidae)

Molecular characterization and chromosomal distribution of the *Tc1/Mariner* transposon in *Boana* species (Anura, Hylidae)

Abstract

The hylid genus *Boana* comprises a diverse genus of Neotropical treefrogs, and despite the frequent $2n=24$ chromosomes found in its representatives, the karyotypic organization of the species cannot be considered conserved, given the scarcity of studies focusing on chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. DNA transposons play an important role in determining the size and structure of eukaryotic genomes. Represented by several families, the *Tc1/Mariner* transposon is widely distributed in animal and plant genomes, with its structure has been well studied. Here, the *Tc1/Mariner* element was isolated, characterized, and mapped on chromosomes of three *Boana* species in order to examine their sequence and their potential role in shaping the karyotypes of hylid anurans. The physical mapping revealed dispersed signals in euchromatins with small accumulations in some heterochromatic regions of all species analyzed. All *Tc1*-like transposons isolated in this study presented high sequence integrity and exhibited all functional domains, suggesting that these transposons had a recent invasion phase and are active in the host genomes of these anuran species. *B. albopuntata* and *B. faber* presented a DD36E motif, identical in structure to that of the DD36E/*Incomer* family, while *B. prasina* showed a DD37E motif, but with evidence that its origin is also from the DD36E/*Incomer* family. These findings improve our understanding of the diversity of *Tc1/mariner* transposons and their participation in the karyotype evolution within hylid anurans.

Key words: *Tc1*-like, transposable element, Hylinae, chromosome mapping.

Introduction

Hylidae is a monophyletic group of treefrogs with 1,035 recognized species grouped within three subfamilies (Frost, 2023). The Hylinae subfamily includes 745 species in 43 genera, including *Boana*, the senior synonym of *Hypsiboas* (Dubois, 2017), and groups 99 widespread species throughout the humid areas of Atlantic Forest, Amazon, Brazilian savannah, and Caatinga (Frost, 2023). The species of the *Boana* genus have been arranged into seven large species groups based on morphological and molecular affinities (Faivovich *et al.*, 2005; 2021; Wiens *et al.*, 2005, 2010; Pyron and Wiens, 2011; Pyron, 2014).

Eukaryotic genomes contain a large number of repetitive DNA sequences (Charlesworth *et al.*, 1994). These sequences exist as paralog copies, even arranged *in tandem*, as gene families and satellite DNAs, or spread across the chromosomes as transposable elements (TEs) (Jurka *et al.*, 2007; Metrovi *et al.*, 2015). *In situ* localization of ribosomal sites has been extensively described in anuran (Peixoto *et al.*, 2015, 2016; Dorigon *et al.*, 2016; Ernetti *et al.*, 2019; Venancio Neto *et al.*, 2022). In contrast, other repetitive DNA sequences have been poorly explored, including TEs, histones, microsatellite repeats, and small nuclear RNAs (Peixoto *et al.*, 2015, 2016; Dorigon *et al.*, 2016; Ernetti *et al.*, 2019; Venancio Neto *et al.*, 2022).

TEs are classified into two classes according to their mechanism of transposition and structural organization: RNA (class I or retrotransposons) or DNA (class II or DNA transposons) (Wicker *et al.*, 2007). The superfamily *Tc1/Mariner* is widely distributed in animal and plant genomes, belonging to the subclass cut-and-paste of DNA transposons (Wicker *et al.*, 2007). They show lengths from 1 to 5 kb, characterized by a structure with two inverted terminal repeats and an open reading frame encoding the transposase enzyme (Wallau *et al.*, 2011). TEs have been studied for their importance in

the modulation of biological events, especially evolutionary processes regarding gene expression control and chromatin organization (Feschotte, 2008; Sinzelle *et al.*, 2009). TEs could also be associated with fragile sites and evolutionary breakpoint regions that promote double-strand breaks, which are related to chromosomal rearrangements (Eichler and Sankoff, 2003; Szamalek, 2005; Wells, 2007; Glugoski *et al.*, 2018).

Considering the importance of *in situ* localization, characterization of repetitive DNAs, and the scarcity of such studies in *Boana* species, we performed a comparative analysis using *Tc1/Mariner* element in three *Boana* species. The present study aimed to determine whether there is evidence that TE *Tc1*-like transposons are active with intact copies in three species of the genus *Boana*, which could help understand the evolutionary relationships among TE and anuran karyotype. Here, the *Tc1/Mariner* element was isolated, characterized, and mapped on chromosomes of three *Boana* species in order to examine their sequence and the potential role in shaping the karyotypes of hylid anurans.

Material and methods

Sequences obtaining, analyzing and characterization

The genomic DNA was extracted from portions of *Boana albopunctata*, *Boana faber*, and *Boana prasina* muscle tissue using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson, 1980) and was used as template in Polymerase Chain Reactions (PCR). This study was authorized by the Ethics Committee for Animal Use from the Universidade Estadual do Paraná (Process CEUA 2021/0001). The *Tc1/Mariner* sequences were amplified with a single primer 5'-CACTCACCGGCCACTTTATTA-3' (Schemberger *et al.*, 2016). The PCR consisted of: 0.5 μ M of the primer, 100 ng of the genomic DNA, 0.16 mM of the deoxynucleotide

triphosphates (dNTPs), 1× reaction buffer (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 mM of the MgCl₂, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cycling conditions were performed as follows: 7 min – 95 °C/(30 s – 95 °C/45 s – 60,5 °C/1 min – 72 °C) 35x/7 min – 72 °C. The obtained amplicons were purified with Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), inserted into plasmid vector from CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific), and cloned into *DH5α Escherichia coli* competent cells. The obtained clones were sequenced using an ABI-prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Vector contaminations were identified and removed using the VecScreen tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>).

All sequences obtained were submitted to the CENSOR software online (Kohany *et al.*, 2006), Dfam (Storer *et al.* 2021) and Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (Altschul *et al.* 1990) searches at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) for similarities of the *Tc1/Mariner* element. Open Reading Frames (ORFs) and amino acid residues were obtained using Geneious v 7.1.9 (Kearse *et al.* 2012).

Terminal inverted repeats (TIRs) were identified manually in the sequences obtained in the Geneious software. Potential ORFs were obtained from the Genscan website (<http://hollywood.mit.edu/GENSCAN.html>). Secondary structures from identified transposases were predicted in the PSIPRED (McGuffin *et al.* 2000) and the motifs NLS annotated using the PSORT II Prediction available in the PSORT Internet server (<https://psort.hgc.jp/>).

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Mitotic chromosomes were obtained from bone marrow, using the method of Baldissera *et al.* (1993). FISH was performed according to Pinkel *et al.* (1986), under

high stringency conditions (~77%). *Tc1/Mariner* sequence probes were labeled with digoxigenin 11-dUTP using the “Digoxigenin NT Labeling Kit” (Jena Bioscience, Dortmund, Germany), according to the manufacturer’s instructions. For probe signal detection, it was used anti-digoxigenin rhodamine fab fragments (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Chromosomes were counterstained with 0.2 µg/mL of 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) in the VECTASHIELD mounting medium (Vector, Burlingame, CA, USA) and analyzed under an epifluorescence microscope (Zeiss Axiolab microscope equipped with a Zeiss AxioCam ICc1 CCD camera 1.4-megapixel, using the Zen 2 lite imaging software).

Results

Tc1/Mariner physical chromosome mapping

The *Tc1/Mariner* signals were dispersed throughout the chromosomes of all three species analyzed ([Figure 1](#)). In *B. albopunctata* they also appeared in small accumulations in some heterochromatic regions (for more details see Venancio Neto *et al.*, 2022), mainly on pairs 1, 3, 4, 6, and on chromosome B ([Figure 1A](#)). In *B. faber* and the signals for *Tc1/Mariner* were more concentrated on pair 1 and in *B. prasina* on pairs 1, 2, 3, 6, 8, and 12 ([Figure 1B and C](#), respectively).

Tc1/Mariner molecular characterization

The 1,219 bp-long *Tc1/Mariner* fragment obtained from *Boana albopunctata* ([Anexo 8](#)) and *Boana faber* ([Anexo 8](#)), both presented 97.87% identity with *Tc1/Mariner* of *Apareiodon* sp. (GenBank KP860118.1). On the other hand, the 1,219 bp-long *Tc1/Mariner* fragment obtained from *Boana prasina* ([Anexo 8](#)) showed 97.06% identity with Transposon *Mariner* of *Characidium zebra* (GenBank KY474353.1)

([Table 1](#)). According to Dfam, all obtained TE sequences showed absolute identity with *Tc1/Mariner* (TC1DR3) of *Danio rerio*, and the analyses of similarity using the CENSOR software revealed high similarity (> 98%) with non-autonomous *Tc1/Mariner* of *Rhinella marina* for all TE sequences ([Table 1](#)). The TIRs of these elements were 22 bp-long in *B. faber* and *B. prasina*, while in *B. albopunctata* had 28 bp. Only one ORF, related to the transposase (~346 amino acid residues), was detected in the three TE sequences ([Figure 2](#)), containing all the functional domains of *Tc1/Mariner* transposons: two helix-turn-helix (HTH) motifs, the GRPR sequence, the nuclear localization signal (NLS), and the catalytic motif DDE/D, which presented the number of amino acids between the last two residues ranging between 36 in *B. albopunctata* e *B. faber* (DD36E) and 37 in *B. prasina* (DD37E) ([Figure 3](#)).

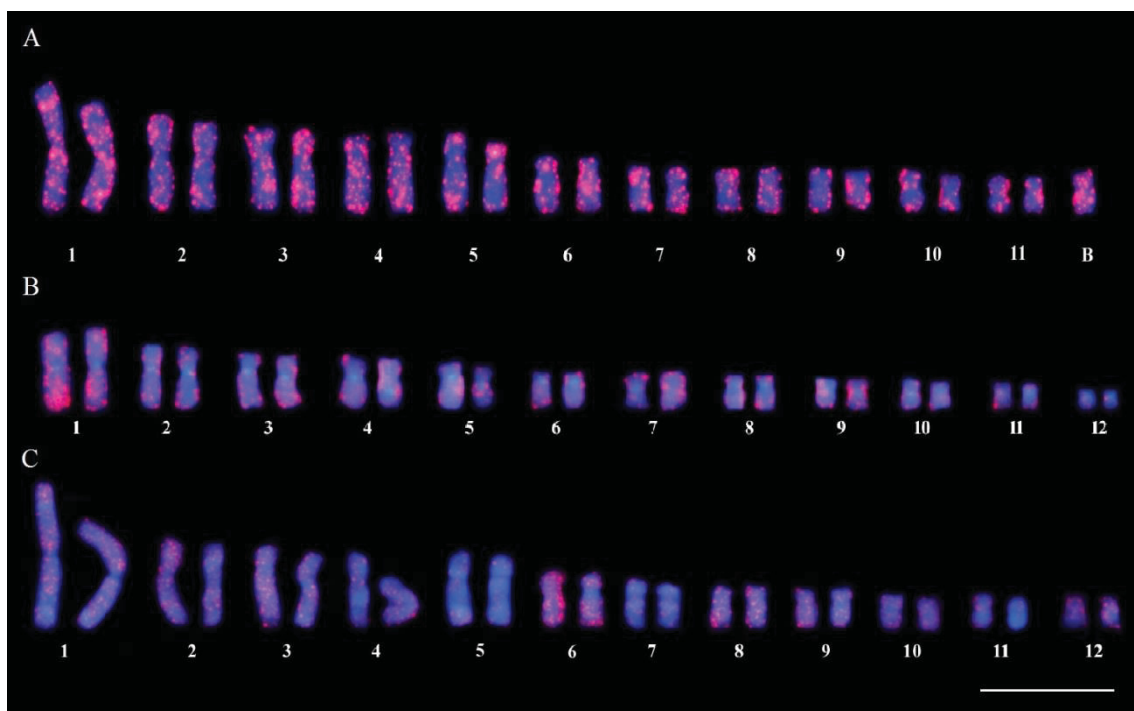


Figure 1. Karyotypes submitted to FISH using TE *Tc1/Mariner* probe: (A) *B. albopunctata*, (B) *B. faber* and (C) *B. prasina*. Bar = 10 μ m.

Table 1. *Tc1/Mariner* superfamily sequences isolated from *B. albopunctata*, *B. faber* and *B. prasina* subjected to identity and similarity analysis using the BLASTn algorithm, the Dfam database, and the Censor software.

Species	Size (bp)	BLASTn (Identity)	Dfam (E-value)	Censor (Similarity)
<i>B. albopunctata</i>	1,219	<i>Tc1/Mariner</i> of <i>Apareiodon</i> sp. (KP860118.1) (97,87%)	Tc1DR3 – <i>Tc1/Mariner</i> of <i>Danio rerio</i> (0.00)	<i>Incomer</i> <i>Tc1/Mariner</i> of <i>Rhinella marina</i> (0.9885)
<i>B. faber</i>	1,219	<i>Tc1/Mariner</i> of <i>Apareiodon</i> sp. (KP860118.1) (97,87%)	Tc1DR3 – <i>Tc1/Mariner</i> of <i>Danio rerio</i> (0.00)	<i>Incomer</i> <i>Tc1/Mariner</i> of <i>Rhinella marina</i> (0.9893)
<i>B. prasina</i>	1,219	Transposon <i>Mariner</i> of <i>Characidium zebra</i> (KY474353.1) (97,06%)	Tc1DR3 – <i>Tc1/Mariner</i> of <i>Danio rerio</i> (0.00)	<i>Incomer</i> <i>Tc1/Mariner</i> of <i>Rhinella marina</i> (0.9860)



Figure 2. Sequences of TIRs and ORFs of the *Tc1/Mariner* superfamily isolated from *B. albopunctata*, *B. faber* and *B. prasina*.

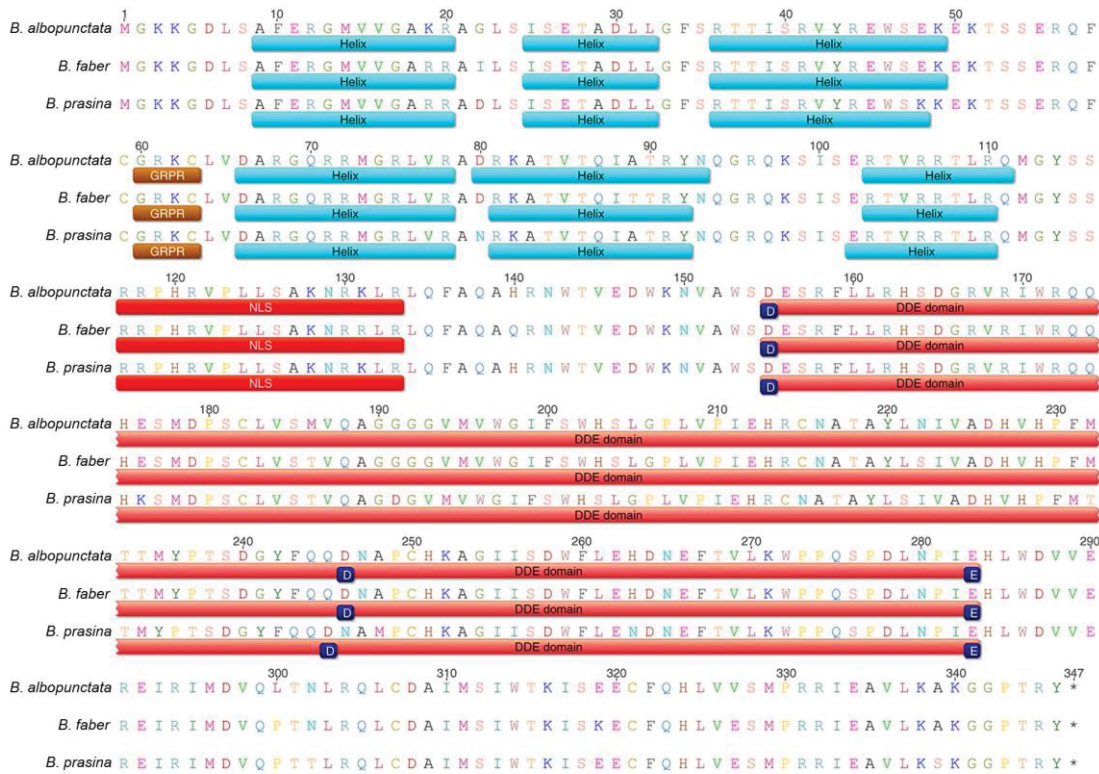


Figure 3. Secondary structures of transposases indicating DNA-binding of two HTH motifs, NLS, the GRPR-like sequence, and the DDE catalytic domain of the *Tc1/Mariner* superfamily isolated from *B. albopunctata*, *B. faber* and *B. prasina*.

Discussion

Tc1/Mariner chromosome mapping

For the *Boana* species, the diploid number ranges from 22 to 24, with the latter representing a possible synapomorphy for the hylid tribe Cophomantini (Duellman, 2001; Faivovich *et al.*, 2005; 2021; Ferro *et al.*, 2018). Diploid numbers of less than 24 chromosomes, as seen in *B. albopunctata*, have been considered apomorphies, originating from chromosomal fusion events involving the smallest chromosome pairs (FERRO *et al.* 2018 and references therein). Additionally, in some members of the *Boana* genus, an intra- and inter-individual variations associated with a B chromosome occurrence is also observed, such as *B. albopunctata* and *B. leucocheila* (Venancio Neto *et al.*, 2022).

Here we provide the *in situ* localization and the first data on the characterization of *Tc1*-like transposons in hylid species. In addition to the scattered distribution of *Tc1/Mariner* in euchromatic regions along the chromosomes of the three *Boana* species analyzed, which can be explained by the fact that recent and active TEs preferentially target euchromatic regions (Oliveira *et al.*, 2013), this TE also formed larger clusters in some regions co-localizing with heterochromatic sites (see Venancio Neto *et al.*, 2022 for more details). TE insertions nonrandomly within heterochromatic regions enjoy a lower likelihood of disrupting genes, making these regions a refuge for TEs (Charlesworth *et al.*, 1994; Blumenstiel *et al.*, 2002; Maside *et al.*, 2005). Therefore, the *Tc1/Mariner* sequences present in *Boana* species can be considered recent, due to their wide euchromatic dispersion. In addition, suggests that this TE may have participated in the dispersion and evolution of these sequences. This pattern is characteristic of this class of highly mobile elements due to their ability to increase the number of copies in the absence of natural selection (Kidwell, 2002, Wicker *et al.*, 2007; Biscotti *et al.*,

2015). Additionally, TEs can be a substrate for non-homologous recombination, which can trigger all kinds of chromosomal rearrangements (Gray, 2000), constituting the TEs a source for karyotype evolution, as commonly observed in *Boana* lineages differentiation, although the TE analysis is still poor in this anuran group.

In the present study, physical mapping of the *Tc1/Mariner* transposon indicated an abundance of this element in all chromosomes in the *Boana* species analyzed, as well as along the length of the B chromosome of *B. albopunctata*. In fact, most B chromosomes are primarily composed of repetitive sequences, especially TEs (Coan; Martins, 2018), which use these parasite elements as safe havens since a variety of the DNA sequences related to TEs have been found in B chromosomes (for review see Camacho, 2005).

Our results with *Tc1/Mariner* probe agree with previous studies in the salamander *Dicamptodon tenebrosus* (Brinkman *et al.*, 2000) and in frog *Leiopelma hochstetteri* (Green, 2004), which also revealed that B chromosomes share repetitive sequences with chromosomes of the A complement, and so in conformity with the hypothesis of an intraspecific origin of B chromosome. Our data suggest an intraspecific origin of B chromosome in *B. albopunctata*, followed by distinct molecular differentiation events occurring among populations, while other studies point to an interspecific origin (Gruber *et al.*, 2014). The presence of *Tc1/Mariner* sequences in the B chromosome could be related to an invasion phase of this superfamily of DNA transposons after the origin of the accessory chromosome, or in other way, correspond to the relict of these sequences present in A complement before the advent of the B chromosome. So, comparing the TE composition in A and B chromosomes is an interesting matter to investigate the composition, diversification and origin of B chromosomes in *Boana* genome.

***Tc1/Mariner* characterization**

The *Tc1/Mariner* superfamily are probably the most widespread DNA transposons in nature, and display the highest diversity (Munoz-Lopez and Garcia-Perez, 2010; Sang *et al.*, 2019), although in eukaryotic genomes usually are present as non-autonomous copies, generated by a degradation process (Fernández-Medina *et al.*, 2012). In contrast, all *Tc1*-like transposons isolated in this study shared high sequences integrity in the genomes of *B. albopunctata*, *B. faber*, and *B. prasina*, i.e., not harboring internal stop codons or frameshift mutations and presenting all expected functional domains, as well as intact TIRs. Therefore, it is reasonable to assume that these *Tc1/Mariner* elements had a recent invasion phase and may still be active in the host genomes of these anuran species.

Based on the variations in the catalytic domain of transposases (DDE/D signature motif) from diverse organisms, *Tc1*-like transposons comprise at least nine distinct groups (Bouuaert *et al.*, 2015; Sang *et al.*, 2019). Here, we increase the diversity of the *Tc1/Mariner* superfamily by identifying distinct evolutionary profiles. *Boana albopunctata* and *B. faber* presented a DD36E motif, very similar in structure organizations to that of the DD36E/Incomer family (Sang *et al.*, 2019), including a total length of about 1.2 kb, the existence of a transposase of about 346 amino acids in length, a DDE motif, two HTH motifs in the DNA-binding domains, and short TIRs. On the other hand, *B. prasina* showed a DD37E motif, which although it has the same catalytic signature already described (Shao and Tu, 2001; Zhang *et al.*, 2016; Puzakov *et al.*, 2018), this *Tc1* element differs considerably in structure. For example, DD37E/TRT from *Danio rerio* (*DrTRT*) described by Zhang *et al.* (2016) has 1,563 bp in length, and its transposase encodes a 338 amino acid protein, versus a total length of 1,219 bp and an ORF with 346 amino acids from *B. prasina* of the present study.

Additionally, according to Zhang *et al.* (2016) the *DrTRT* TIRs have a length of 38 bp and the HTH are separated by the motif GRKK, while the *B. prasina* TIRs have 22 bp with the HTH separated by the GRPR sequence. Furthermore, the presented sequence of *B. prasina* closely resembles that of *B. albopunctata* and *B. faber*, except for the deletion of a glycine between the two aspartic acids (DD) residues and the insertion of a methionine between the residues of aspartic acid and glutamic acid (DE), but the three sequences share the same length (1,219 bp). Therefore, despite the DD37E configuration of the *B. prasina* sequence, considering the significant differences with *DrTRT* as well as the similarities with the sequences of *B. albopunctata* and *B. faber*, taken together, our findings suggest that the DD37E from *B. prasina* might potentially originate from the DD36E/IC family.

DD36E/*Incomer* seems to have evolved from DD34E and is mainly distributed across vertebrates (jawless fish, ray-finned fish, frogs, and bats), in which multiple horizontal transfer events are believed to have played a role in its distribution (Sang *et al.*, 2019). These data suggest that the DD34E/Tc1 transposons exhibit an unexpected diversity and may evolve into many families as a common ancestor. Based on analyzes of evolutionary dynamics, this family along with DD37E/TRT (Zhang *et al.*, 2016), DD35E/TR (Zong *et al.*, 2020) and DD38E/IT (Gao *et al.*, 2020), appear to be recently evolved families with more active and intact copies found in many species across multiple lineages.

Here we presented a new *Tc1/Mariner* transposon with similar structural organization and close relationship with the known DD36E/*Incomer* family. Our results not only identify the new *Tc1* element, but also demonstrate that the active elements with DD36E and DD37E signatures have regularly appeared throughout the evolution of DD34E/Tc1 transposons.

References

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

Baldissera Jr FA, Oliveira PSL and Kasahara S (1993) Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with supernumerary chromosomes. *Rev Bras Genet* 16:335-345.

Biscotti MA, Olmo E and Heslop-Harrison JS (2015) Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res* 23:415-420.

Blumenstiel JP, Hartl DL and Lozovsky ER (2002) Patterns of insertion and deletion in contrasting chromatin domains. *Mol Biol Evol* 19:2211-2225.

Bouuaert CC and Chalmers RM (2010) Gene therapy vectors: the prospects and potentials of the cut-and-paste transposons. *Genetica* 138:473-484.

Brinkman JN, Sessions SK, Houben A and Green DM (2000) Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. *Chromosome Research* 8:477-485.

Camacho JPM (2005) B chromosomes. In *The evolution of the genome*. Academic Press :223-286.

Charlesworth B, Sniegowski P and Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.

Coan RL and Martins C (2018) Landscape of transposable elements focusing on the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genes* 9:269.

Dorigon NS, Gazoni T, Haddad CFB and Maltempi PPP (2016) Chromosomal mapping of the repetitive U2 snRNA gene in six species belonging to the neotropical genus *Leptodactylus*, (Anura, Leptodactylidae). In: *International Chromosome Conference n 21*. Foz do Iguaçu, Brazil. *Cytogenet Genome Res* 148:107.

Dubois A (2017) The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Bionomina* 11:1-48.

Duellman WE (2001) *The hylid frogs of Middle America*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Ithaca 1:1159.

Eichler EE and Sankoff D (2003) Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* 301:793-797.

Ernetti JR, Gazolla CB, Recco-Pimentel SM, Lucas EM and Bruschi DP (2019) Non-random distribution of microsatellite motifs and (TTAGGG)_n repeats in the monkey frog *Pithecopus rusticus* (Anura, Phyllomedusidae) karyotype. *Genet Mol Biol* 42:e20190151.

- Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA and Wheeler WC (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull Am Mus Nat Hist* 29:1-240.
- Faivovich J, Pinheiro PD, Lyra ML, Pereyra MO, Baldo D, Munoz A, Reichle S, Brandão RA, Giaretta AA, Thomé MT *et al.* (2021) Phylogenetic relationships of the *Boana pulchella* group (Anura: Hylidae). *Mol Phylogenetics Evol* 155:106981.
- Fernández-Medina RD, Ribeiro JM, Carareto CM, Velasque L and Struchiner CJ (2012) Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. *BMC genomics* 13:1-15.
- Ferro JM, Cardozo DE, Suárez P, Boeris J, Blasco-Zúñiga A, Barbero G, Gomes A, Gazoni T, Costa W, Nagamachi CY *et al.* (2018) Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). *Plos One* 13:1-29.
- Feschotte C (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet* 9: 397–405.
- Frost DR (2023) Amphibian Species of the World: on online Reference. Version 6. American Museum of Natural History, <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/> (Feb 8, 2023).
- Gao B, Zong W, Miskey C, Ullah N, Diaby M, Chen C, Wang X, Ivics Z and Song C (2020) Intruder (DD38E), a recently evolved sibling family of DD34E/Tc1 transposons in animals. *Mobile DNA* 11:1-15.
- Glugoski L, Giuliano-Caetano L, Moreira-Filho O, Vicari MR and Nogaroto V (2018) Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. *Gene* 650:49-54.
- Gray YHM (2000) It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* 16:461-468.
- Green DM (2004) Structure and evolution of B chromosomes in amphibians. *Cytogenetic and Genome Research* 106:235-242.
- Gruber SL, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Foresti F, Haddad CF and Kasahara S (2014) Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridization. *Comp Cytogenet* 8:185-197.
- Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O and Jurka MV (2007) Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8:241-259.
- Kidwell MG (2002) Transposable Elements and the Evolution of Genome Size in Eukaryotes. *Genetica* 115:49-63.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P and Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649.

Kohany O, Gentles AJ, Hankus L and Jurka J (2006) Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics* 7:1-7.

Maside X, Assimacopoulos S and Charlesworth B (2005) Fixation of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genet Res* 85:195-203.

McGuffin LJ, Bryson K and Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16:404-405.

Muñoz-López M and García-Pérez JL (2010) DNA transposons: nature and applications in genomics. *Current genomics* 11:115-128.

Murray GM and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325.

Oliveira SG, Cabral-de-Mello DC, Moura RC and Martins C (2013) Chromosomal organization and evolutionary history of Mariner transposable elements in Scarabaeinae coleopterans. *Molecular Cytogenetics* 6:1-9.

Peixoto MAA, Lacerda JVA, Coelho-Augusto C, Feio RN and Dergam JA (2015) The karyotypes of five species of the *Scinax perpusillus* group (Amphibia, Anura, Hylidae) of southeastern Brazil show high levels of chromosomal stabilization in this taxon. *Genetica* 143:729-739.

Peixoto MAA, Oliveira MPC, Feio RN and Dergam JA (2016) Karyological study of *Oloolygon tripui* (Lourenço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. *Comp Cytogenet* 10:505.

Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *PNAS* 83:2934-2938.

Puzakov MV, Puzakova LV and Cheresiz SV (2018) An analysis of IS630/*Tc1*/*Mariner* transposons in the genome of a Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Molecular Evolution* 86:566-580.

Pyron RA (2014) Biogeographic analysis reveals ancient continental vicariance and recent oceanic dispersal in amphibians. *Syst Biol* 63:779-797.

Pyron RA and Wiens JJ (2011) A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol Phylogenet Evol* 61:543-583.

Sang Y, Gao B, Diaby M, Zong W, Chen C, Shen D, Dan S, Wang S, Wang Y, Ivics Z and Song C (2019) Incomer, a DD36E family of *Tc1*/*Mariner* transposons newly discovered in animals. *Mobile DNA* 10:1-12.

Schemberger MO, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Valente GT, Martins C, Moreira-Filho O, Cestari MM and Vicari MR (2016) Sequence analyses and chromosomal distribution of the *Tc1*/*Mariner* element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). *Gene* 593:308-314.

Shao H, Tu Z (2001) Expanding the diversity of the IS630–*Tc1*–mariner superfamily: discovery of a unique DD37E transposon and reclassification of the DD37D and DD39D transposons. *Genetics* 159:1103–1115.

Sinzelle L, Izsvak Z and Ivics Z (2009) Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. *Cell Mol Life Sci* 66:1073–1093.

Storer J, Hubley R, Rosen J, Wheeler TJ and Smit AF (2021) The Dfam community resource of transposable element families, sequence models, and genome annotations. *Mobile DNA* 12:1–14.

Venancio Neto S, Noletto RB, Azambuja M, Gazolla CB, Santos BR, Nogaroto V, Vicari MR (2022) Comparative cytogenetics among *Boana* species (Anura, Hylidae): focus on evolutionary variability of repetitive DNA. *Genet Mol Biol* 45(4):e20220203.

Wallau GL, Hua-van A, Capy P and Loreto EL (2011) The evolutionary history of mariner-like elements in Neotropical drosophilids. *Genetica* 139:327–338.

Wicker T, Sabot F, Hua-van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B and Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973–982.

Wiens JJ, Fetzner JW, Parkinson CL and Reeder TW (2005) Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Syst Biol* 54:716–748.

Wiens JJ, Kuczynski CA, Hua X and Moen DS (2010) An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 55:871–882.

Zhang HH, Li GY, Xiong XM, Han MJ, Zhang XG and Dai FY (2016) TRT, a vertebrate and protozoan *Tc1*-like transposon: current activity and horizontal transfer. *Genome Biology and Evolution* 8:2994–3005.

Zong W, Gao B, Diaby M, Shen D, Wang S, Wang Y, Sang Y, Chen C, Wang X and Song C (2020) Traveler, a new DD35E family of *Tc1/Mariner* transposons, invaded vertebrates very recently. *Genome Biol Evol* 12:66–76.

Considerações finais

Estudos demonstraram que alguns grupos de espécies apresentam uma variabilidade cromossômica considerável, tanto estrutural ou microestrutural, quanto numérica, mesmo que essas espécies sejam intimamente relacionadas. Entretanto, em anfíbios anuros, há uma crença de cariótipo conservado entre espécies. O presente estudo obteve e aplicou uma série de marcadores cromossômicos que demonstraram diversificação cromossômica em três espécies do gênero *Boana*, sendo *B. albopunctata*, *B. faber* e *B. prasina*. Embora essas espécies pertençam a grupos taxonômicos diferentes de *Boana*, as análises aplicadas nesse estudo estabeleceram características cromossômicas compartilhadas e outras diversificadas na história evolutiva desses hilídeos. O mapeamento de sequências repetitivas de DNA pode ser útil para explorar uma diversidade oculta, especialmente entre grupos que parecem compartilhar uma macroestrutura cariotípica preservada.

Apresentamos de maneira inédita para *Boana*, o mapeamento *in situ* de sequências repetitivas microssatélites e do transposon de DNA *Tc1/Mariner*. Esses mapeamentos forneceram dados para inferências sobre a evolução genômica e cromossômica do grupo, colaborando para diminuição da escassez no cenário de estudos citogenéticos em anfíbios. A importância de estudos como este se dá pelo fato de anfíbios terem grande parte de suas espécies ainda sem nenhuma análise cromossômica frente a pungente ameaça que o grupo vem sofrendo, sendo caracterizado como o grupo vertebrado mais ameaçado da atualidade. A comparação da sequência do *Tc1/Mariner* entre *B. albopunctata*, *B. faber* e *B. prasina* gerou dados que sugerem uma invasão recente desse elemento no genoma dessas espécies ao demonstrar uma alta integridade de todas as partes do transposon, além da presença de transposase.

Os cariótipos dos representantes do gênero *Boana* oferecem um rico cenário para investigações genômicas acerca de questões que ainda são incógnitas como, por exemplo, origem e função de cromossomos supranumerários em algumas espécies. Com base em tais estudos novos padrões citogenéticos tendem a emergir, principalmente quando relacionando diferentes localidades e populações, integrando dados, i.e. morfológicos e comportamentais, em conjunto com novas evidências genômicas para inferências inéditas a respeito da evolução do grupo.

Abordagens complementares com um maior número de espécies ou populações e a análise do mapeamento *in situ* de diferentes classes de sequências repetitivas,

representam respostas para lacunas existentes mudando a perspectiva e constroem novos cenários em relação à evolução dos cariótipos deste grupo.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-JR, O.; BACCI-JR, M.; LIMA, A. P.; ROSSA-FERES, D. C.; HADDAD, C. F. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Phylogenetic Relationships of *Pseudis* and *Lysapsus* (Anura, Hylidae, Hylinae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Cladistics**, v. 23, p. 455-463, 2007.
- ANANIAS, F.; GARCIA, P. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). **Hereditas**, v. 140, p. 42-48, 2004.
- ANDERSON, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* treefrogs. In: GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. Amphibian Cytogenetics and Evolution. San Diego, **Academic Press.**, p. 299-331, 1991.
- ANDRADE, B. F.; CARVAJAL, M. V.; PUNINA, J. S.; DOMÍNGUEZ-GAIBOR, I. Posibles efectos del Cambio Climático en los anfibios de la Amazonía Ecuatoriana. **Green World Journal**, v. 5, p; 1-25, 2022.
- ARGUESO, J. L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P. A; GAWEL, M.; PETES, T. D.; RESNICK, M. A. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11845-11850, 2008.
- BALDISSERA Jr., F. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with supernumerary chromosomes. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 335-345, 1993.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**, v. 21, p. 191-208, 1968.
- BECKER, C. G.; ZAMUDIO, K. R. Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 24, p. 9893-9898, 2011.
- BENNETZEN, J. The rice genome. Opening the door to comparative plant biology. **Science**, v. 296, p. 60-63, 2002.
- BERGER, L., MARANTELLI, G., SKERRATT, L. F.; SPEARE, R. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, p. 47-50, 2005.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, p. 415-420, 2015.

- BLAUSTEIN, A. R.; KATS, L. B. Amphibians in a very bad light. **Bioscience**, v. 11, p. 1028-1029, 2013.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. *Evolutionary Biology of Anurans. University of Missouri Press*, v. 3, p. 337-349, 1973.
- BÖHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C.; VOLFF, J. N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**, v. 16, p. 203-215, 2008.
- CAMINER, M. A.; RON, S. R. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. **Zookeys**, v. 370, p. 1-68, 2014.
- CARVALHO, K. A.; GARCIA, P. C.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). **Genetic Molecular Research**, v. 8, p. 1498-1508, 2009.
- CATROLI, G. F. **Cariótipo de seis espécies de *Bokermannohyla* dos grupos de *B. circumdata* e *B. pseudopseudis* (Anura, Hylidae)**. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.
- CATROLI, G. F.; KASAHARA, S. Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. Publication UEPG: **Biological and Health Science Ponta Grossa**, v. 15, p. 67–86, 2009.
- CAVIEDES-SOLIS, I. W.; KIM, N.; LEACHÉ, A. D. Species IUCN threat status level increases with elevation: a phylogenetic approach for Neotropical tree frog conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, p. 2515-2537, 2020.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.
- CHAVES, R.; SANTOS, S.; GUEDES-PINTO, H. Comparative analysis (Hippotragini versus caprini, Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by *in situ* restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. **Genetica**, v. 121, p. 315-325, 2004.
- COLLINS, J. P., STORFER, A. A global amphibian declines: sorting the hypothesis. **Diversity and distributions**, v. 9, p. 89-98, 2003.
- DASZAK, P., STRIEBY, A., CUNNINGHAM, A. A., LONGCORE, J. E., BROWN, C. C.; PORTER, D. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a

- potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. **Herpetological Journal**, v. 14, p. 201-207, 2004.
- DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. **Journal of Herpetology**, v. 6, p. 71-74, 1972.
- DUBOIS, A. The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. **Bionomina**, v. 11, p. 1–48, 2017.
- DUPELLMAN, W. E. Global distribution of amphibians: patterns, conservation and future challenges. In: DUPELLMAN, W.E. (Ed.). Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. **Baltimore: Johns Hopkins University Press**, v. 1, p. 1-30, 1999.
- DUPELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**, v. 4140, p. 001-109, 2016.
- DUPELLMAN, W. E. The hylid frogs of Middle America. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. **Ithaca**, v. 1, p. 1159, 2001.
- DUPELLMAN, W. E.; TRUEB, L. Biology of Amphibians. **New York: McGrawHill**, 1994.
- EIRÍN-LÓPEZ, J. M.; RUIZ, M. F.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A. M.; MARTÍNEZ, A.; SÁNCHEZ, L.; MÉNDEZ, J. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphan” features. **Journal of Molecular Evolution**, v. 58, p. 131-144, 2004.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. 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. 29, n. 294, p. 1-240, 2005.
- FAIVOVICH, J.; PINHEIRO P. D.; LYRA, M. L.; PEREYRA, M. O.; BALDO, D.; MUNOZ, A.; REICHLER, S.; BRANDÃO, R. A.; GIARETTA, A. A.; THOMÉ, M. T.; CHAPARRO, J. C.; BAËTA, D.; WIDHOLZER, R. L.; BALDO, J.; LEHR, E.; WHEELER, W. C.; GARCIA, P. C. A.; HADDAD, C. F. B. Phylogenetic relationships of the *Boana pulchella* group (Anura: Hylidae). **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 155, p.106981, 2021.

- FERNÁNDEZ-MEDINA, R. D.; RIBEIRO, J. M. C.; CARARETO, C. M. A.; VELASQUE, L.; STRUCHINER C. J. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. **BioMed Central Genomics**, v. 13, p. 272, 2012.
- FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 397-405, 2008.
- FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genoma evolution. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 103-107, 1989.
- FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J.; WALKER, S. F. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 291–310, 2009.
- FERRO, J. M.; CARDOZO, D. E.; SUÁREZ, P.; BOERIS, J.; BLASCO-ZUÑIGA, A.; BARBERO, G.; GOMES, A.; GAZONI, T.; COSTA, W.; NAGAMACHI, C. Y.; RIVERA, M.; PARISE-MALTEMPI, P. P.; WILEY, J. E.; PIECZARKA, J. C.; HADDAD, C. F. B.; FAIVOVICH, J.; BALDO, D. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). **Plos One**, v. 13, p.1-29, 2018.
- FODEN, W. B.; BUTCHART, S. H. M.; STUART, S. N.; VIÉ, J-C.; AKÇAKAYA, H. R.; ANGULO, A.; VANTIER, L. M. D.; GUTSCHE, A.; TURAK, E.; CAO, L.; DONNER, S. D.; KATARIYA, V.; BERNARD, R.; HOLLAND, R. A.; HUGHES, A. F.; O'HANLON, S. E.; GARNETT, S. T.; ŞEKERCIOĞLU, Ç. H.; MACE G. M.; Identifying the world's most climate change vulnerable species: A systematic trait-based assessment os all birds, amphibians and corals. **Plos One**, v. 8, p. 1371-1379, 2013.
- FORESTI, F. **Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura)**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.
- FOUQUET, A.; MARTINEZ, Q.; ZEIDLER, L.; COURTOIS, E. A.; GAUCHER, P.; BLANC, M. Cryptic diversity in the *Hypsiboas semilineatus* species group (Amphibia, Anura) qitch the description of a new species form the eastern Guiana Shield. **Zootaxa**, v. 4084, p. 79-104, 2016.
- FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: on online Reference**. Version 6. American Museum of Natural History, New York, USA, 2017. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>>. Acesso em: 24 nov. 2022.

- FROST, D. R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F. B.; DE SÁ, R. O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S. C.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPBELL, J. A.; BLOTTO, B. L.; MOLER, P.; DREWES, R. C.; NUSSBAUM, R. A.; LYNCH, J. D.; GREEN, D. M.; WHEELER, W. C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 22, p. 1-370, 2006.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados**. Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo. 2019.
- GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Atlantic forest hotspots status. The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. **Center for Applied Biodiversity Science e Island Press**, v. 29, p. 3-11, 2003.
- GARCIA, P. C. A.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, I. A.; BRASILEIRO, C. A.; VERDADE, V. K.; JIM, J.; SEGALLA, M. V.; MARTINS, M.; ROSSA-FERES, D. C.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A.; BERNECK, B. M.; ARAÚJO, O. G. S. Anfíbios. **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. 2009.
- GATTO, K. P.; BUSIN, C. S.; LOURENÇO, L. B. Unraveling the Sex Chromosome Heteromorphism of the Paradoxical Frog *Pseudis tocantins*. **PLoS ONE**, v. 11, p. 67-121, 2016.
- GASCON, C. Population and community level analyses of species occurrences of central Amazonian rainforest tadpoles. **Ecology**, v. 72, p. 1731-1746, 1991.
- GAZONI, T. **Marcadores Citológicos no Cariótipo de Espécies de *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) Analisado com Técnicas de Citogenética Clássica e Molecular**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, 2011.
- GRANDINETTI, L.; JACOBI, C. M. Distribuição estacional e espacial de uma taxocenose de anuros (amphibia) em uma área antropizada em Rio Acima – MG. **Lundiana**, v. 6, p. 21-28, 2005.
- GRANT, T.; FROST, D. R.; CALDWELL, J. P.; GAGLIARDO, R.; HADDAD, C. F. B.; KOK, P. J. R.; MEANS, D. B.; NOONAN, B. P.; SCHARGEL, W. E.; WHEELER, W. Phylogenetic systematic of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia:

- Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 269, p. 1-262, 2006.
- GREEN, D. M.; SESSIONS, S. K. Amphibian Cytogenetics and Evolution. **Academic Press**, v. 1, p. 431-432, 1991.
- GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among Symphysodon fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, n.76, p. 1117-1127, 2010.
- GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F.; 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. 281-291, 2007.
- HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **Bioscience Journal**, v. 55, p. 207-217, 2005.
- HADDAD, C. F. B.; SAWAYA, R. J. Reproductive modes of Atlantic Forest Hylid frogs: A general overview and the description of a new mode. **Biotropica**, v. 32, p. 862-871, 2000.
- HARDMAN, N. Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 234, p. 1-11, 1986.
- HEDGES, S. B.; DUELLMAN, W. E.; HEINICKE, M. P. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. **Zootaxa**, v. 1737, p. 1-182, 2008.
- HOLLANDERS, M.; GROGAN, L. F.; NOCK, C. J.; MCCALLUM, H. I.; NEWELL, D. A. Recovered frog populations coexist with endemic *Batrachochytrium dendrobatidis* despite load-dependent mortality. **Ecological Applications**, p. e2724, 2022.
- HORT, J. Geografia do município de União da Vitória. **FAFI e UNIPORTO**, União da Vitória, Brasil, v. único, p. 51, 1990.
- 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, n. 8, p. 1014-1015, 1980.
- IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://iucnredlist.org>>. Acesso em: 08 dez. 2022.
- JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R. S. Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects. **Cambridge University Press**, v. 1, p. 15-23 1988.
- KANTEK, D. L. Z.; VICARI, M. R.; PERES, W. A.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location and distribution of As51satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**, v. 75, p. 408–421, 2009.
- KASAHARA, S.; ZAMPIERI SILVA, A. P.; GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. **Cytogenetic Genome Research**, v. 103, p. 155-162, 2003.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1647-1649, 2012.
- KELLIS, M.; BIRREN, B. W.; LANDER, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 428, p. 617-624, 2004.
- KING, M.; CONTRERAS, S. N.; HONEYCUTT, R. L. Variation within and between nucleolar organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. **Genetica**, v. 80, p. 17– 29, 1990.
- KÖHLER, J.; KOSCINSKI, D.; PADIAL, J. M.; CHAPARRO, J. C.; HANDFORD, P.; LOUGHEED, S. C.; De la RIVA, I. Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). **Zoologica Scripta**, v. 39, p. 572-590, 2010.
- KURAMOTO, M. A list of chromosome number of anuran amphibians. **Bulletin of Fukuoka University of Education**, v. 39, p. 83–127, 1990.
- KURZ, R. Bring Nature Closer. 2017. Disponível em <<https://www.biofaces.com/specie/11376/Boana-prasina/>>. Acesso em: 08 dez. 2022.
- LEITE, F.S.F., PEZZUTI, T.L., GARCIA, P.C.A. 2019. Anfíbios anuros do Quadrilátero Ferrífero - Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, Minas Gerais, Brasil. Disponível em: <<http://saglab.ufv.br/aqf/>>. Acesso em: 08 dez. 2022.

- LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMANN, L. K.; RORIGUES, D. J.; KELLER, C.; HÖDL, W. Guia de sapos da reserva Adolpho Ducke. Amazônia Central. **Edição Attema**, v. 1, p. 1-14, 2006.
- LIPS, K. R.; DIFFENDORFER, J.; MENDELSON, J. R.; SEARS M. W. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian decline. **PLoS Biology**, v. 6, p. 441-454, 2008.
- LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v 49, p. 727-764. 1980.
- LOURENÇO, L. B.; BACCI-JR, M.; MARTINS, V. G.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; HADDAD, C. F. B. Molecular Phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). **Genetica**, v. 132, p. 255-266, 2008.
- LUCCA, E.J.; JIM, J.; FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. **Caryologia**, v.27, p. 183-192, 1974.
- MAACK, R. Geografia Física do Paraná. **Olympio**, Rio de Janeiro, Brasil, v. único, p.442, 1981.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). **Subprograma do PPG7 para a Mata Atlântica**. Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília, Brasil. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/pnf/n2respla.html>>. Acesso em: 27 de novembro de 2022.
- MONASTERSKY, R. Life – a status report. **Nature**, v. 516, p. 158-161, 2014.
- MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic forest. **Biotropica**, v. 32, p. 786-792, 2000.
- MORESCALCHI, A.; CHIARELLI, A. B.; CAPANNA, E. Cytotaxonomy and vertebrate evolution. **Academic Press**, v. 32, p. 233-248, 1973.
- MOURA, M. R.; MOTTA, A. P.; FEIO, R. N. An unusual reproductive mode in *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). **Zoologia**, v. 28, p. 142-144, 2011.
- MURRAY, G. M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.
- NUNES, R. R. A.; FAGUNDES, V. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species group. **Genetic Molecular Biology**, v. 31, p. 982-987, 2008.
- OLSON, D. H.; RONNENBERG, K. L. Global *Bd* mapping project: 2014 update. **FrogLog**, v. 111, p. 17-21, 2014.

- OLIVEIRA, H. P. **Diversidade genética de híldeos do Brasil Central**. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- PAIVA, C. R.; NASCIMENTO, J.; SILVA, A. P. Z.; BERNARDE, P. S.; ANANIAS F. Karyotypes and Ag-NORs in *Phyllomedusa camba* De La Riva, 1999 and *P. rhodei* Mertens, 1926 (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae): cytotaxonomic considerations. **Italian Journal of Zoology**, v. 77, p.116–121, 2010.
- PARRIS, K. M. Environmental and spatial variables influence the composition of frog assemblages in sub-tropical eastern Australia. **Ecography**, v. 27, p. 392-400, 2004.
- PENDÁS, A. M.; MORAN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 31–36, 1994.
- PEREIRA, A. B. Mata atlântica: Uma abordagem geográfica. **Nucleus**, v. 1, p. 27-53, 2009.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of national Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938. 1986.
- PLASTERK, R. H.; IZSVÁK, Z.; IVICS, Z. Resident aliens: the Tc1/Mariner superfamily of transposable elements. **Trends in genetics**, v. 15, p. 26-332, 1999.
- PONS, J.; GILLESPIE, R. G. Common origin of the satellite DNAs of Hawaiian spiders of the genus *Tetragnatha*: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. **Gene**, v. 313, p. 169–177, 2003.
- POUNDS, J. A.; BUSTAMANTE, M. R.; COLOMA, L. A.; CONSUEGRA, J. A.; FOGDEN, M. P. L. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature**, v. 439, p.161-167, 2006.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M; HEISER, J. B. Salamandras, Anuros e Cecílias. A vida dos vertebrados. **Atheneu Editora**, v. 8, p. 220-263, 2008.
- RABELLO, M.N.; BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W. Contribuição à citotaxonomia da família Hylidae. **Arquivos do Museu Nacional**, v.54, p. 285-286, 1971.
- RABER, S. C.; CARVALHO, K. A.; GARCIA, P. C; VINCIPROVA, G.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Chromossomal characterization of *Hyla bischoffi* and *hyla guentheri* (Anura, Hylidae). **Phyllomedusa**, v. 3, p. 43-49, 2004.

- RIBEIRO, R. S.; EGITO, G. T. B. T.; HADDAD, C. F. B. Chave de Identificação: Anfíbios Anuros da Vertente de Jundiáí da Serra do Japi, Estado de São Paulo - **Biota Neotropica**, v. 5, p. 1-36, 2005.
- SBH. Brazilian amphibians – **List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2017. Disponível em: <[www. http://sbhepatologia.org.br/](http://sbhepatologia.org.br/)>. Acesso em: 24 de novembro de 2022.
- SCHEELE, B. C.; PASMANS, F.; SKERRATT, L.; BERGER, L.; MARTEL, A.; BEUKEMA, W.; ACEVEDO, A. A.; BURROWES, P. A.; CARVALHO, T.; CATENAZZI, A.; RIVA, I. D. L.; FISHER, M. C.; FLECHAS, S. V.; FOSTER, C. N.; FRÍAS-ÁLVAREZ, P.; GARNER, T. W. J.; GRATWICKE, B.; GUAYASAMIN, J. M.; HIRSCHFELD, M.; KOLBY, J. E.; KOSH, T. A.; MARCA, E. L.; LINDENMAYER, D. B.; LIPS, K. R.; LONGO, A. V.; MANEYRO, R.; MCDONALD, C. A.; MENDELSON III, J.; PALACIOS-RODRIGUEZ, P.; PARRA-OLEA, G.; RICHARDS-ZAWACKI, C.; RÖDEL, M. O.; ROVITO, S. M.; SOTO-AZAT, C.; TOLEDO, L. F.; VOYLES, J.; WELDON, C.; WHITFIELD, S. M.; WILKINSON, M.; ZAMUDIO, K. R.; CANESSA, S. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, p. 1459–1463, 2019.
- SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; NANDA, I.; EPPLIN, J. T. Chromosome banding in Amphibia. Birkhauser Verlag. **Cytogenetics of Amphibians and Reptiles**, v. 101, p. 21-45, 1990.
- SCHMID, M.; BOGART, J. P.; HEDGES, S. B. The chromosomes of Terraranan frogs: Insights into vertebrate cytogenetics. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 1, p. 130-131, 2010.
- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; BERNECK, B. V. M.; LANGONE, J. Brazilian amphibians – List of species. **Herpetologia Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 34-46, 2016.
- SHAPIRO, J.A.; STERNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological Reviews**, v. 80, p. 227-250, 2005.
- SCHEMBERGER, M. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; MOREIRA-FILHO, O.; CESTARI, M. M.; VICARI, M. R.. Sequence analyses and chromosomal distribution of the *Tc1/Mariner* element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). **Gene**, v. 593, p. 308-314, 2016.

- SILVA, N. R.; NETO, J. A.; PRADO, C. P. A.; MOTT, T. Reproductive biology of *Dendropsophus haddadi* (Bastos and Pombal, 1994), a small treefrog of the Atlantic forest. **Herpetology Notes**, v. 12, p. 319-325, 2019.
- SIQUEIRA, S.; ANANIAS, F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic analysis of three species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) from southeastern Brazil. **Genetic Molecular Biology**, v. 27, p. 363-372, 2004.
- SOUZA, K. L.; PEIXOTO, M. A.; BARRETO, C. A.; FEIO, R. N.; DERGAM, J. A. Cytogenetics of Four Species of the Green Clade *Aplastodiscus* Lutz, 1950 (Anura: Cophomantinae): New Insights into the Chromosomal Evolution of the Genus. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, p. 704-710, 2020.
- SUÁREZ, P., FERRO, J. M., NAGAMACHI, C. Y., CARDOZO, D. E., BLASCO-ZÚÑIGA, A., SILVA, J. B., MARCIANO-JR, E.; COSTA, M. A.; ORRICO, V. G. D.; SOLÉ, M.; ROBERTO, I. J.; RIVERA, M.; WILLEY, J. E.; FAIVOVICH, J.; BALDO, D.; PIECZARKA, J. C. Chromosome evolution in lophyohylini (amphibia, anura, hylinae). **PloS one**, v. 15, p. e0234331, 2020.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUMNER, A. T. Chromosomes: organization and function. **Blackwell Publishing**, v. 1, p. 304, 2003.
- TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, p. 132-138, 2005.
- TARGUETA, C. P.; RIVERA, M.; SOUZA, M. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M.; LOURENÇO, L. B. Cytogenetic contributions for the study of the Amazonian *Engystomops* (Anura; Leiuperidae) assessed in the light of phylogenetic relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 709-725, 2010.
- TEIXEIRA, L. S. R.; SEGER, K. R.; TARGUETA, C. P.; ORRICO, V. G. D.; LOURENÇO, L. B. Comparative cytogenetics of tree frogs of the *Dendropsophus marmoratus* (Laurenti, 1768) group: conserved karyotypes and interstitial telomeric sequences. **Comparative Cytogenetics**, v. 10, p. 753-767, 2016.
- TOLEDO; L. F.; GAREY, M. V.; COSTA, T. R. N.; LOURENÇO-DEMORAES, R.; HARTMANN, M. T.; HADDAD, C. F. B. Alternative reproductive modes of Atlantic forest frogs. **Journal of Ethology**, v. 30, p. 331-336, 2012.

- UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. **EMBO Journal**, v. 21, p. 5955–5959, 2002.
- VENANCIO NETO, S.; NOLETO, R. B.; AZAMBUJA, M.; GAZOLLA, C. B.; SANTOS, B. R.; NOGAROTO, V.; VICARI, M. R. (2022). Comparative cytogenetics among *Boana* species (Anura, Hylidae): focus on evolutionary variability of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v. 45, p. e20220203.
- WELLS, K. D. The ecology and behavior of amphibians. **The University of Chicago Press**, v. 1, p. 26-102, 2007.
- WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 225-249, 2000.
- WIENS, J. J.; FETZNER, J. W.; PARKINSON, C. L.; REEDER, T. W. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. **Systematic Biology**, v. 54, p. 716-748, 2005.
- YU, S. L.; LEE, H.Y. Comparative karyological analysis of the Korean tree frogs, *Hyla japonica* and *Hyla suweonensis* (Anura, Hylidae). **Korean Journal of Zoology**, v. 33, p. 1-5, 1990.

Anexos

Anexo 1: Carta de aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ
 COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE
 ANIMAIS DA UNESPAR - CEUAS
 REGISTRO CIAEP: 01.0614.2020
 PORTARIA N.º 067/2020 - REITORIA/UNESPAR
<http://unespar.edu.br>



Autorização

Certificamos que a proposta intitulada “Contribuição à citogenética de anfíbios anuros da mata atlântica no estado do Paraná”, processo CEUA nº 2021 001 e protocolo UNEPAR nº 17.464.725-9, sob a responsabilidade de Rafael Bueno Noleto e colaboração de Marcelo Ricardo Vicari, Sebastião Venâncio Neto e Sabrina Chelegel - que envolve manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). A proposta foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Paraná (CEUA UNESPAR) em reunião de 25/02/2021.

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/02/2021 – 25/02/2025
Espécie/Linhagem	Anfíbios anuros
Nº de animais	30
Peso/Idade	-
Sexo	-
Origem	Fauna silvestre

Paranaguá, 22 de março de 2020.

Assinado por:

Cassiana Baptista Metri

Chefe da Divisão do Comitê de Ética em Pesquisa-Animal (CEUA) – UNESPAR-PRPPG

Portaria Nº 731/2020

Anexo 2: Obtenção de metáfases mitóticas, segundo Baldissera, Oliveira e Kasahara (1993), com adaptações.

- Injeção abdominal intraperitoneal de solução aquosa de fermento biológico e dextrose na proporção 1:2;
- Após 48 h, injeção abdominal intraperitoneal de solução de colchicina 0,1 % (0,1 mL / 10g de massa corporal);
- Após 4 h, anestésiar o espécime com lidocaína 5 % e extrair a medula óssea;
- Tratar com solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075 M;
- Desagregar o tecido até a obtenção de uma solução homogênea e deixar descansar por 40 min na solução de KCl a 37°C;
- Pingar três gotas de fixador (metanol e ácido acético na proporção 3:1) e deixar em descanso por 10 min;
- Centrifugar por 10 min à 6000 rpm (rotações por minuto) e descartar o sobrenadante;
- Completar com solução de fixador, re-suspender o material;
- Centrifugar por 10 min a 6000 rpm, descartar o sobrenadante
- Completar com solução de fixador, re-suspender o material;
- Repetir esse processo mais duas vezes e armazenar 2 mL do material no congelador.

Anexo 3: Coloração convencional com Giemsa.

- Pingar duas gotas da solução em lâmina limpa sobre vapor de banho-maria a 50°C, aguardando até a completa secagem do material;
- Corar com solução de Giemsa 5 % em tampão fosfato com pH 6,8, durante 10 min;
- Retirar o excesso de corante com água destilada e aguardar a completa secagem antes de analisar.

Anexo 4: Técnica de Bandamento C para detecção de heterocromatina constitutiva, descrita por Sumner (1972), com modificações.

- Após a montagem as lâminas envelheceram por 1 dia à 45°C e então foram mergulhadas em de solução 0,2 M de ácido clorídrico (HCl) durante 15 min à 25°C e depois lavadas com água destilada;
- Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de hidróxido de bário Ba(OH)_2 5 % à 25°C, permanecendo por 3 min e 10 s;
- Após esse tempo o material foi lavado em solução de HCl 1 M e em seguida em água destilada;
- As lâminas seguiram então para mergulho em solução salina 2 x SSC à 50°C, durante 25 min;
- Finalmente foram então lavadas com água destilada e coradas com Giemsa 5 % por 10 min para posterior análise.

Anexo 5: Detecção de região organizadora de nucléolo por Ag-RON, descrita por Howell e Black (1980), com modificações.

- Após o preparo das lâminas, pingar uma gota solução de gelatina incolor e duas gotas de nitrato de prata (AgNO_3) à 50 %;
- Cobrir cuidadosamente com lamínula e levar para incubar em câmara úmida à 60 °C por 3 min ou até a solução adquirir coloração castanho-dourado;
- Lavar com água destilada e deixar secar naturalmente.

Anexo 6: Extração de DNA segundo o método CTAB, descrito por Murray e Thompson (1980), com modificações.

- Adicionar em um tubo de 1,5 mL ~ 0,2 g de tecido muscular juntamente com 240 µl de tampão CTAB (concentração final: 5 % de CTAB; 5 M de NaCl; 0,5 M EDTA; 1 M TrisHCl pH8), 13 µl de proteinase K (10 mg/mL) e 5 µl de β-mercaptoetanol;
- Incubar à 60 °C em banho-maria, 16 h ou até o tecido ser totalmente digerido;
- Em seguida adicionar 600 µl de clorofórmio e homogeneizar suavemente durante 5 min;
- Centrifugar por 5 min à 8000 rpm, retirar o sobrenadante e transferir para um tubo novo;
- Adicionar 600 µL de etanol absoluto e deixar a -20 °C por 1 h;
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 min e descartar o sobrenadante;
- Lavar o *pellet* com 500 µl de etanol 70 % e centrifugar novamente a 14000 rpm por 2 min, retirar o sobrenadante e deixar o tubo com o DNA secando na estufa a 37 °C;
- Resuspender o *pellet* com 15µL de H₂O, adicionar 5 µL de RNase e deixar 2 h à 37 °C;
- Por fim, deixar 15 min à 65°C.

Anexo 7: Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986), com modificações.

Preparação das Lâminas e Hibridação

- Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min., em temperatura ambiente;
- Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada;
- Incubar as lâminas em 100 µl de RNase (0,4 % RNase/2xSSC) a 37°C por 1 h em câmara úmida com água milli-Q;
- Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC;
- Lavar durante 5 min em PBS 1x;
- Incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10 mM HCl), a 37°C ;
- Lavar em PBS 1x durante 5 min (shaker) em temperatura ambiente;
- Fixar em paraformaldeído 4% durante 10 min em temperatura ambiente;
- Lavar em PBS 1x por 5 min;
- Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70,85, 100 %) por 5 min cada, voltar cada álcool em seu frasco;
- Simultaneamente a desidratação em série alcoólica, desnaturar a solução de hibridação à 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo;
- Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC, a 70°C por 4 min;
- Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada;
- Preparar a câmara úmida a 37°C ;
- Montar cada lâmina com 40 µl de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar overnight a 37°C;

Lavagens

- Lavar 4 vezes em formamida 15 %/0,2xSSC pH 7.0 à 42 °C durante 5 min cada;
- Lavar durante 5 min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, temperatura ambiente;

Detecção e amplificação do Sinal

- Incubar as lâminas em tampão 5% NFDm/4xSSC por 15 min;
- Lavar 2 x 5 min com Tween 0,5%/4xSSC, em temperatura ambiente;
- Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1 µl FITC/100 µl NFDm) durante 30 min em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;
- Lavar 3 x 5 min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
- Incubar com 90 µl de antidigoxigenina conjugada com rodamina (0,5 µl /100 µl de NFDm) durante 1 h em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;
- Lavar 3 x 5 min com Tween 0,5%/4xSSC em temperatura ambiente;
- Desidratar em álcool 70 (descartar), 85 e 100%, 5 min. cada;

Montagem da Lâmina

- Misturar 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI - 4'-6 diamidino - 2 - phenilindole (50 µg/ml);
- Colocar a solução e cobrir com lamínula;
- Guardar no escuro.

Anexo 8: Sequências nucleotídicas de DNAs repetitivos obtidas no presente estudo.rDNA 5S de *Boana faber*

>CATGCTGCAAATTGATTTCTTGATTTCAAAGTTCAAGAATGTAAAATTTTA
 AAGGTGCTCTGGAGGCAGTATAAGGAGGCCACCTGCCAGCAAACGCTTA
 CGGCCATACCAGCCTGATACGCCCGATCTCGTCCGATCTCAGAAGCCAAGC
 AAGGTCGGGCCTGGTCAGTACCTGGATGGGAGACTGCCTGGGACTCCCAGG
 TGCTGTAAGCCTTTT

rDNA 18S de *Boana faber*

>CCAGCTCCAGTAGCGTATATTGAACTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT
 GGATCTTGGGATCGAGCTGGCGGTCCGCCGCGAGGCGAGCTACTGCCTGTC
 CCAGCCCCTGCCTCTCGGCACCTCCCCAATGCTCTTGACTGAGTGTCCCGGG
 GGCCCGAAGCGTTTACTTTGAAAAAGTTAGAGTGTTCAAAGCAAGCCGGTC
 GCCTGAATACTCCAGCTAGGAATAATGTAATAGGACTCCGGTTCTATTTTGA
 TGGTTTTTCGGAAGTGGGGCCATGATTAAGAGGGACGGCGGGGGGCATCCGT
 GGTGTGCCGCTAGAGGTGAAATTCTTGACCGGCCAGACCAACCAAAGCGA
 AAGCCTTTTCCAAGAATGTTTTTCATCAGTCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTC
 GAAGACGATCAGATACCGTTGTAGTTCGGACCATAAACGATGCCAACTGGC
 GATCCGGCGGGCATTATCCCATGATCCGCCGAGCAGCTTCCGGGAAACCAA
 AGTCTTTGGGTTCGGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAA
 TTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCTGCGGCTTAATTTGACTCAAC
 ACGGGAAACCTCACCCGGCCCGGACACGGAAAGGATTGACAGATTGATAGC
 TCTTTCTCGATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGT
 GATCAGTCTGGATCAATTGTCATCACTAACGAGACTCCTCCATGGTAAATAG
 TTACGCGACCCCCGGCGGTCCGCGTCCAACCTTCTTAGAGGGACAAGTGGCG
 TTCAGCCACACGAGATCGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
 CGGGGCTGCACGCGCGCTACACTGAACGGATCAGCGTGTGTCTACCCCTCTC
 CGACAGGTGCGGGTAACCCGCTGAACCCCGTTCGTGATGGGGCTCGGGGAT
 CCAATTATTCCCCA

TcI/Mariner de Boana albopunctata

>ACTCACCGGCCACTTTATTAGGTACACCTGTCCAACCTGCTTGTTAACTT
AATTTCTAATTAGCCAATCACATGGTGGCAACTCAGTGCATTTAGGCATGTA
CACATGGTCAAGACAATCTCCTGCAGTTCAAACCGAGCATCAGTATGGGGA
AGAAAGGTGATTTGAGTGCCTTTGAACGTGGCATGGTTGTTGGTGCCAAAA
GGGCTGGTCTGAGTATTTACAGAACTGCTGATCTACTGGGATTTTCACGCAC
AACCATCTCTAGGGTTTACAGAGAATGGTCCGAAAAAGAAAAACATCCAG
TGAGCGGCAGTTCTGTGGGCGGAAATGCCTTGTTGATGCCAGAGGTCAGAG
GAGAATGGGCAGACTGGTTCGAGCTGATAGAAAGGCAACAGTGAATCAAAT
CGCCACCCGTTACAACCAAGGTAGGCAGAAGAGCATCTCTGAACGCACAGT
ACGTCGAACTTTGAGGCAGATGGGCTACAGCAGCAGAAGACCACACCGGGT
ACCACTCCTTTACAGCTAAGAACAGGAACTGAGGCTACAATTTGCACAAGC
TCATCGAAATTGGACAGTAGAAGATTGGAAAAACGTTGCCTGGTCTGATGA
GTCTCGATTTCTGCTGCGACATTCGGATGGTAGGGTCAGAATTTGGCGCCAA
CAACATGAAAGCATGGATCCATCCTGCCTTGATCAATGGTTCAGGCTGGTG
GTGGTGGTGTGATGGTGTGGGGAATATTTTCTTGGCACTCTTTGGGCCCTT
GGTACCAATTGAGCATCGTTGCAACGCCACAGCCTACCTGAATATTGTTGCT
GACCATGTCCATCCCTTTATGACCACAATGTACCCAACATCTGATGGCTACT
TTCAGCAGGATAATGCGCCATGTCATAAAGCTGGAATCATCTCAGACTGGTT
TCTTGAACATGACAATGAGTTCAGTACTCAAATGGCCTCCACAGTCACCA
GATCTCAATCCAATAGAGCATCTTTGGGATGTGGTGGAAACGGGAGATTCGC
ATCATGGATGTGCAGCTGACAAATCTGCGGCAACTGTGTGATGCCATCATGT
CAATATGGACCAAATCTCTGAGGAGTGCTTCCAGCACCTTGTTGTATCTAT
GCCACGAAGAATTGAGGCAGTTCTGAAGGCAAAAGGGGGTCCAACCCGTTA
CTAGCATGGTGTACCTAATAAAGTGGCCGGTGAGT

TcI/Mariner de Boana faber

>ACTCACCGGCCACTTTATTAGGGACACCTGTCCAACCTGCTCATTAACTT
AATTTCTAATCAGCCAATCACATGGCGGCAACTCAGTGCATTTAGGCATGTA
GACATGGTCAAGACAATCTCCTGCAGTTCAAACCGAGCATCAGTATGGGGA
AGAAAGGTGATTTGAGTGCCTTTGAACGTGGCATGGTTGTTGGTGCCAGAA
GGGCTATTCTGAGTATTTACAGAACTGCTGATCTACTGGGATTTTCACGCAC

AACCATCTCTAGGGTTTACAGAGAATGGTCCGAAAAAGAAAAACATCCAG
 TGAGCGGCAGTTCTGTGGGCGGAAATGCCTTGTTGATGCCAGGGGTCAGAG
 GAGAATGGGCAGACTGGTTCGAGCTGATAGAAAGGCAACAGTGA CTCAAAT
 AACACCCGTTACAACCAAGGTAGGCAGAAGAGCATCTCTGAACGCACAGT
 TCGTCGAACTTTGAGGCAGATGGGCTACAGCAGCAGAAGACCCACCGGGT
 GCCACTCCTTTCAGCTAAGAACAGGAGACTGAGGCTACAATTTGCACAAGC
 TCAGCGAAATTGGACAGTAGAAGATTGGAAAAACGTTGCCTGGTCTGATGA
 GTCTCGATTTCTGCTGCGACATTCGGATGGTAGGGTCAGAATTTGGCGTCAA
 CAACATGAAAGCATGGATCCATCCTGCCTTGATCAACGGTTCAAGCTGGTG
 GTGGTGGTGTGTCATGGTGTGGGGAATATTTTCTTGGCACTCTTTGGGCCCTT
 GGTACCAATTGAGCATCGTTGCAACGCCACAGCCTACCTGAGTATTGTTGCT
 GACCATGTCCATCCCTTTATGACCACAATGTACCCAACATCTGATGGCTACT
 TTCAGCAGGATAATGCGCCATGTCATAAAGCTGGAATCATCTCAGACTGGTT
 TCTTGAACATGACAATGAGTTCACTGTACTCAAATGGCCTCCACAGTCACCA
 GATCTCAATCCAATAGAGCATCTTTGGGATGTGGTGGAAACGGGAGATTCGC
 ATCATGGATGTGCAGCCGACAAATCTGCGGCAACTGTGTGATGCCATCATG
 TCAATATGGACCAAAATCTCTAAGGAATGCTTCCAGCACCTTGTTGAATCTA
 TGCCACGAAGAATTGAGGCAGTTCTGAAGGCAAAAGGGGGTCCAACCCGTT
 ACTAGCATGGTTTACCTAATAAAGTGGCCGGTGAGT

Tc1/Mariner de Boana prasina

>ACTCACCGGCCACTTTATTAGGAACAATTGTCCAACCTGCTCGTTAACACTT
 AATTTCTAATCAGCCAATCACATGGCGGCAACTCAGTGCATTTAGGCATGTA
 GACATGGTCAAGACAATCTCCTGCAGTTCAAACCGGGCATCAGTATGGGGA
 AGAAAGGTGATTTGAGTGCCTTTGAACGTGGCATGGTTGTTGGTGCCAGAA
 GGGCTGATCTGAGCATTTTCAGAACTGCTGATCTACTGGGATTTTCACGCAC
 AACCATCTCTAGGGTTTACAGAGAATGGTCCAAAAAAGAAAAACATCCAG
 TGAGCGGCAGTTCTGTGGGCGGAAATGCCTTGTTGATGCCAGAGGTCAGAG
 GAGAATGGGCAGACTGGTTCGAGCTAATAGAAAGGCAACAGTGA CTCAAAT
 TGCCACCCGTTACAACCAAGGTAGGCAGAAGAGCATCTCTGAACGCACAGT
 ACGTCGAACTTTGAGGCAGATGGGCTACAGCAGCAGAAGACCACACCGGGT
 GCCACTCCTTTCAGCTAAGAACAGGAACTGAGGCTACAATTTGCACAAGC
 TCATCGAAATTGGACAGTAGAAGATTGGAAAAACGTTGCCTGGTCTGATGA

GTCTCGATTTCTGCTGCGACATTCGGATGGTAGGGTCAGAATTTGGCGTCAA
CAACATAAAAGCATGGATCCATCCTGCCTTGTATCAACGGTTCAAGCTGGTG
ATGGTGTTCATGGTGTGGGGAATATTTTCTTGGCACTCTTTGGGCCCTTGGT
ACCAATTGAGCATCGTTGCAACGCCACAGCCTACCTGAGTATTGTTGCTGAC
CATGTCCATCCCTTTATGACCACAATGTACCCAACATCAGATGGCTACTTTC
AGCAGGATAATGCGATGCCATGTCATAAAGCTGGAATCATCTCAGACTGGT
TTCTTGAAAATGACAATGAGTTCCTGTACTCAAATGGCCTCCACAGTCACC
AGATCTCAATCCAATAGAGCATCTTTGGGATGTGGTGGAACGGGAGATTCG
CATCATGGATGTGCAGCCGACAACCTTTGCGGCAACTGTGTGATGCCATCATG
TCAATATGGACCAAAATCTCTGAGGAATGCTTCCAGCACCTTGTTGAATCTA
TGCCACGAAGAATTGAGGCAGTTCTGAAGTCAAAGGGGGTCCAACCCGTT
ACTAGCATGGTGTACCTAATAAAGTGGCCGGTGAGT