

**CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE *Phyllomedusa tetraploidea*  
(ANURA, HYLIDAE), PROVENIENTE DA MATA ATLÂNTICA  
PARANAENSE**

Laura Winkelmann<sup>1</sup>

Rafael Bueno Noleto<sup>2</sup>

**Resumo:** No hemisfério Sul, o Brasil ocupa o primeiro lugar em relação à riqueza de espécies de anfíbios, e estes apresentam alta diversidade e endemismo na Mata Atlântica, que por sua vez é um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo. A espécie *Phyllomedusa tetraploidea* caracteriza-se pelo fato de cada célula somática dessa espécie abrigar quatro cópias de cada cromossomo. Preparações cromossômicas foram realizadas a partir de espécimes coletados em um fragmento de Mata Atlântica do Estado do Paraná. Metodologias convencionais como coloração com Giemsa e bandamento C foram realizadas com objetivo de conhecer a estrutura cromossômica dessa espécie. Com relação à macroestrutura cariotípica, foi encontrado  $2n = 4x = 52$  cromossomos distribuídos em metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntrico com Número Fundamental (NF=104). O bandamento C evidenciou heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de alguns quartetos de cromossomos, e em grande parte deles as bandas C não foram idênticas entre os cromossomos homólogos, o que pode indicar um processo de diploidização. É muito importante e imprescindível que a técnica de banda C seja realizada em um maior número de indivíduos e em outros representantes do gênero *Phyllomedusa*, para se avaliar a hipótese da diploidização dos tetraploides. No Brasil *P. tetraploidea* é encontrada em simpatria com outras espécies do gênero, onde animais triploides também ocorrem como consequência de hibridização natural. Assim além de descrever pela primeira vez o cariótipo dessa espécie para o estado do Paraná, buscamos contribuir com dados sobre a origem da poliploidia nesse grupo.

**Palavras-chave:** Anura, Bandas C, Cariótipo, Poliploidia.

**KARYOTYPE CHARACTERIZATION OF *Phyllomedusa tetraploidea*  
(ANURA, HYLIDAE), FROM OF ATLANTIC FOREST (PARANÁ  
STATE)**

**Abstract:** In the southern hemisphere, Brazil ranks first in relation to amphibians species richness, and these have high diversity and endemism in the Atlantic Forest, which in turn is one of the most endangered ecosystems in the world. The species *Phyllomedusa tetraploidea*

---

<sup>1</sup> Graduada em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Paraná, campus União da Vitória. E-mail: [laura\\_winkelmann@hotmail.com](mailto:laura_winkelmann@hotmail.com)

<sup>2</sup> Professor da Universidade Estadual do Paraná, campus de União da Vitória. União da Vitória. Caixa Postal 241. CEP 846000-00. E-mail: [rafanoletto@yahoo.com.br](mailto:rafanoletto@yahoo.com.br)

characterized by the fact that each somatic cell of this kind has four copies of each chromosome. Chromosome preparations were performed from specimens collected in an Atlantic Forest fragment from Paraná state. Conventional staining with Giemsa and C-banding were performed in order to know the chromosomal structure of this species. Related to karyotype macrostructure, was found  $2n = 4x = 52$  chromosomes distributed in metacentric, submetacentric and subtelocentric Fundamental Number (FN=104). The C-banding revealed constitutive heterochromatin in pericentromeric regions of chromosomes of some quartets, and in most of them the C-bands were not identical between homologous chromosomes, which may indicate a diploidization process. It is very important and essential that C-band technique is performed on a larger number of individuals and in other representatives of the genus *Phyllomedusa*, to evaluate the hypothesis of diploidization of tetraploid. In Brazil *P. tetraploidea* is found in sympatry with other species of the genus, where triploid animals also occur as a result of natural hybridization. So besides to describe for the first time the karyotype of this species for the Paraná state, we seek to contribute data about the origin of polyploidy in this group.

**Key-words:** Anura, C-bands, Karyotype, Polyploidy.

## INTRODUÇÃO

Dentre as ordens que compõem a classe Amphibia, os grupos dos sapos, rãs e pererecas compreendem aproximadamente 88% do total das espécies, sendo que no Brasil há registro aproximado de 1026 espécies (SEGALLA et al., 2014). A degradação ambiental causada por ações antrópicas é considerada como um dos principais fatores responsáveis por declínios populacionais de anfíbios, devido à perda de habitats os quais exploram. Este referido cenário é o encontrado atualmente nos cerca de 7% restantes de cobertura original da Mata Atlântica, a qual abriga praticamente todas as espécies de anuros ameaçadas de extinção no Brasil (SILVANO e SEGALLA, 2005).

Geralmente chamados de pererecas, os hilídeos possuem a presença de ventosas nas pontas dos dedos, as quais são essenciais para a adesão do animal aos ramos de vegetação (DUELLMAN e TRUEB, 1994). A família Hylidae, uma das maiores em número de espécies, tem passado nos últimos 10 anos por uma progressiva reorganização filogenética, se resumindo a três subfamílias: Hyalinae, Pelodryadinae e Phyllomedusinae, possuindo cerca de 950 espécies (FAIVOVICH et al., 2005; FROST, 2014). Phyllomedusinae com sete gêneros tem *Phyllomedusa* atualmente com 30 espécies, das quais 26 estão alocadas em quatro grupos taxonômicos conforme caracteres morfológicos (FAIVOVICH et al., 2010). Possui representantes que se

distribuem por vários países do leste dos Andes à América do Sul, e no Brasil, ocorre em todas as regiões com 22 espécies registradas (SEGALLA et al., 2014). *Phyllomedusa tetraploidea* tem seu registro na Argentina, Paraguai e, no Brasil é encontrada nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (FISCH e PORT, 2013). Esta espécie é caracterizada pelo porte robusto e tamanho mediano, discos adesivos desenvolvidos, faces laterais da coxa com riscos azuis escuros sobre fundo laranja (POMBAL e HADDAD, 1992). Os ovos são depositados em ninhos de folhas acima de piscinas permanentes em florestas (KWET et al., 2004).

No gênero *Phyllomedusa*, poucas espécies possuem seus cariótipos descritos, sendo o  $2n = 26$  cromossomos metacêntricos/submetacêntricos o mais frequente. *Phyllomedusa tetraploidea* possui esse nome devido a uma característica rara entre animais vertebrados: cada célula somática dessa espécie abriga quatro cópias de cada cromossomo. A poliploidia natural tem desempenhado um papel importante durante a especiação e evolução dos vertebrados. As espécies do grupo *Phyllomedusa burmeisteri* são caracterizadas por possuir  $2n = 26$  cromossomos, mas o cariótipo com  $2n = 4x = 52$  cromossomos já foi descrito para algumas espécies. No Brasil *P. tetraploidea* é encontrada em simpatria com outras espécies do gênero, onde animais triploides também ocorrem, como consequência de hibridização natural. Assim além de descrever pela primeira vez o cariótipo dessa espécie para o estado do Paraná, buscamos contribuir com dados sobre a origem da poliploidia nesse grupo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados dois espécimes machos de *Phyllomedusa tetraploidea* coletados em um fragmento de Mata Atlântica paranaense, próximo ao município de União da Vitória (26°13'49''S, 51°05'11''W). Os procedimentos utilizados estão de acordo com o Comitê de Ética in Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa (processo No. 04741/08).

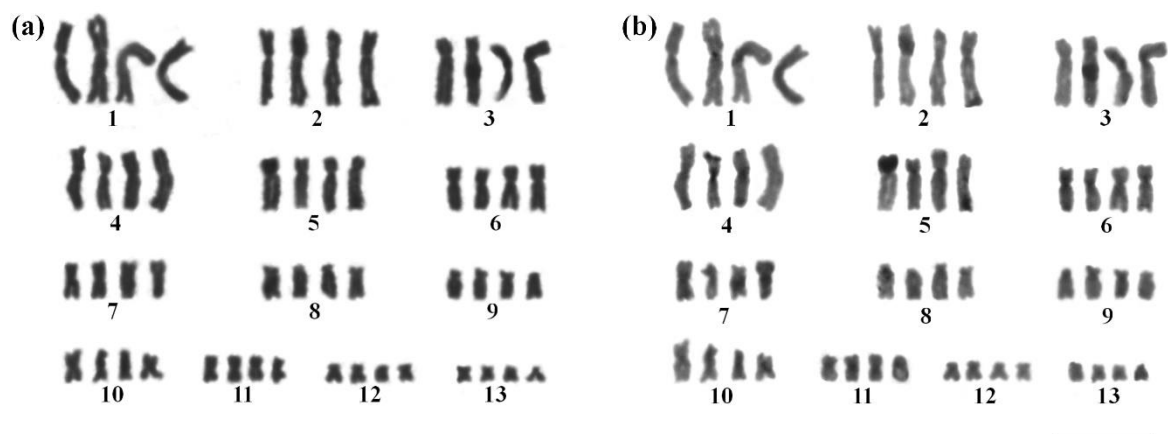
Preparações mitóticas foram obtidas por preparação direta conforme Baldissera et al. (1993), e para a detecção da heterocromatina constitutiva (Bandas C) foi seguido o

protocolo de Sumner (1972) com modificações. Os cromossomos foram organizados por tamanho e morfologia de acordo com Green e Sessions (1991), e agrupados dentro das categorias metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos. O número fundamental (NF), que reflete o número total de braços cromossômicos do cariótipo, foi determinado considerando que cromossomos metacêntricos e submetacêntricos são portadores de dois braços.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Cariótipo

A análise cariotípica de *P. tetraploidea* evidenciou  $2n = 4x = 52$  cromossomos, composto por 6 quartetos metacêntricos (1, 4, 7, 10, 11 e 13), 5 quartetos submetacêntricos (2, 3, 5, 6 e 12) e 2 quartetos subtlocêntricos (8 e 9) (Figura 1a). Esta estrutura cariotípica se comparada ao encontrada por Gruber et al. (2013) para populações de *P. tetraploidea* do Estado de São Paulo, se mostra bastantes estável, embora com pequenas distinções no número de pares metacêntricos e submetacêntricos. As inversões pericêntricas têm sido observadas com frequência entre os anuros, responsáveis por modelar os cariótipos sem alterar o número diploide.



**Figura 1.** Coloração com Giemsa (a) e sequencial bandamento C (b) sobre o cariótipo tetraploide de *P. tetraploidea*. Barra = 10µm.

Dentre os anuros da região Neotropical, há registro de espécimes tetraploides em *Odontophrynus americanus* ( $2n = 4x = 44$  cromossomos) (SCHMID et al., 1985) e *Chiasmocleis leucosticte* ( $2n = 4x = 48$ ) (KASAHARA e HADDAD, 1997), além de octaploides ( $2n = 8x = 104$ ) como no gênero *Ceratophrys* (SCHMID et al., 1985; MERCADAL, 1986; VIEIRA et al., 2006). Das 30 espécies de *Phyllomedusa* apenas 12 apresentam seu cariótipo descrito (Tabela 1), e dentro da família Hylidae, além de *Phyllomedusa tetraploidea* ( $2n = 4x = 52$ ), a poliploidia é encontrada em *Hyla versicolor* ( $2n = 4x = 48$ ) (WILEY e LITTLE, 2000).

**Tabela 1.** Cariótipos de anfíbios hílídeos do gênero *Phyllomedusa*. (2n) número diploide; (NF) Número Fundamental (nº de braços autossômicos).

Espécie	2n	NF	Referência
<i>P. bahiana</i>	26 (2x)	52	Barth et al. (2013); Bruschi et al. (2014b)
<i>P. burmeisteri</i>	26 (2x)	52	Beçak et al. (1970)
<i>P. camba</i>	26 (2x)	46	Paiva et al. (2010)
<i>P. distincta</i>	26 (2x)	52	Pombal e Haddad (1992); Gruber et al. (2013); Bruschi et al. (2014b)
<i>P. exilis</i>	26 (2x)	52	Nunes e Fagundes (2008)
<i>P. nordestina</i>	26 (2x)	52	Bruschi et al. (2013); Bruschi et al. (2012); Barth et al. (2013)
<i>P. palliata</i>	26 (2x)	52	Bogart (1973)
<i>P. rohdei</i>	40 (2x)	80	Nunes e Fagundes (2008)
<i>P. rohdei</i>	26 (2x)	52	Barth et al. (2009); Paiva et al. (2010); Bruschi et al. (2012)
<i>P. rustica</i>	26 (2x)	52	Bruschi et al. (2014a)
<i>P. tarsius</i>	26 (2x)	52	Bogart (1973)
<i>P. tarsius</i>	26 (2x)	46	Bruschi et al. (2014b)
<i>P. tetraploidea</i>	52 (4x)	104	Beçak et al. (1970); Pombal e Haddad (1992); Gruber et al. (2013); Presente estudo
<i>P. triploide híbrida</i>	39 (3x)	78	Haddad et al. (1994); Gruber et al. (2013)
<i>P. vaillantii</i>	26 (2x)	52	Bruschi et al. (2014b)

A poliploidia natural desempenhou um papel importante na diversificação, especiação e evolução das espécies do grupo *Phyllomedusa*. Sabe-se que seus

representantes podem se intercruzar com exemplares de *P. distincta* ( $2n = 2x = 26$ ), de modo que triploides naturais com  $2n = 3x = 39$  são encontrados na região onde as espécies ocorrem em simpatria (zona de hibridação). Fato interessante, é que o canto dos machos diploides, triploides e tetraploides é indistinguível, e sem esta barreira pré-zigótica, o cruzamento entre os cariótipos é possível. Os triploides não são completamente estéreis como mostram os dados meióticos, embora os gametas tenham constituição cromossômica não equilibrada, o que pode resultar em cariótipos aneuploides ao se cruzar com espécimes diploides ou tetraploides (KASAHARA, 2009).

Batistic (1989) tenta explicar a origem das espécies tetraploides por origem alo- ou autopoliploide com *Phyllomedusa pailona*. Esta hipótese parece ser plausível, uma vez que apenas *P. pailona* e *P. tetraploidea* apresenta Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) no par cromossômico número 8. Como *P. pailona* é diploide, poderia estar na linha da ancestralidade ou até mesmo poderia ser a espécie ancestral da *P. tetraploidea* (BARRIO, 1976). No presente estudo não obtivemos resultados satisfatórios para detectar o número e a localização das RONs.

Do ponto de vista bioacústico e ecológico Pombal e Haddad (1992) sugerem autoploidia a partir de *P. distincta* ou *P. iheringii* para explicar a origem de *P. tetraploidea*, mas a possibilidade de aloploidia pelo cruzamento de *P. distincta* com *P. iheringii* não pode ser descartada. Haddad et al. (1994) relatou um caso de híbridos naturais ( $2n = 3x = 39$ ) entre *P. tetraploidea* ( $2n = 4x = 52$ ,  $n = 26$ ) e *P. distincta* ( $2n = 2x = 26$ ,  $n = 13$ ) coletados em uma área de simpatria com as formas parentais, no Estado de São Paulo. Gruber et al. (2013) também encontrou este mesmo resultado em outras duas localidades do mesmo Estado. Análises de sequenciamento tanto de DNA nuclear quanto de mitocondrial mostraram que as hipóteses acima referidas são viáveis, mas na filogenia molecular *P. distincta* e *P. tetraploidea* são grupos irmãos, enquanto que *P. iheringii* aparece em um clado separado (BRUNES et al., 2010).

### **Heterocromatina Constitutiva**

O bandamento C evidenciou regiões centroméricas nos quartetos 1, 4, 5, 6, 9 e 11, mas alguns cromossomos exibiram pouca ou quase nenhuma banda C. Em contrapartida alguns outros cromossomos apresentam grandes blocos pericentroméricos (Figura 1b). Em grande parte dos quartetos as bandas C não eram idênticas entre os cromossomos homólogos, resultado similar ao obtido por Gruber et al. (2013) com uma população da mesma espécie. Condensação diferencial da cromatina ou uma variável resposta ao tratamento das bandas, também podem justificar tal diferença entre homólogos (BATISTIC, 1989).

Os resultados de Gruber et al. (2013) e Bruschi et al. (2013) para o padrão de bandas C em espécies de *Phyllomedusa* diferem moderadamente aos do presente estudo, embora tais diferenças na distribuição de blocos de heterocromatina seja comum em anuros (FORMAS e CUEVAS, 2000; ROSA et al., 2003). Pequenas diferenças interespecíficas e interpopulacionais podem ser resultado de processos de heterocromatinização de segmentos eucromáticos ou amplificação de sequências de DNA repetitivo (UGARKOVIC e PLOHL, 2002), podendo ser úteis para a caracterização e diferenciação de táxons (DONNELLAN e MAHONY, 2004; BUSIN et al., 2006; NOLETO et al., 2011).

Análises adicionais de bandas C em um número maior de *P. tetraploidea* são essenciais para não descartar a hipótese de que a evolução em direção a uma constituição diploide também pode estar em andamento. Gruber et al. (2013) baseado no padrão de bandamento C, subdividiram alguns quartetos em dois pares, o que sugere que eles nem sempre se segreguem como pares homólogos, evidenciando assim um processo de diploidização. É imprescindível que a técnica de bandamento C seja realizada a um maior número de representantes do gênero *Phyllomedusa*, para se avaliar a relevância citotaxonômica desse marcador. Espécies dos mais diversos gêneros compartilham similaridades morfológicas e números cromossômicos, porém podem mostrar grandes variações na distribuição e quantidade de DNA repetitivo (MATSUI et al., 1985; SCHMID et al., 1990).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A poliploidia tem grande importância evolutiva, devido ao seu potencial de promover rápida especiação sem a ocorrência de formas de transição. A duplicação genômica pode fornecer uma vantagem adaptativa ao criar novos *loci*, e isso é fundamental para o estabelecimento e sucesso da nova linhagem poliploide. Neste contexto a poliploidização do genoma de *P. tetraploidea* pode realmente representar uma vantagem, permitindo a ocupação de novos ambientes em áreas de planalto, onde os animais são submetidos a maior sazonalidade em comparação com espécies não poliploides do grupo *P. burmeisteri*, que estão distribuídos em regiões costeiras (HADDAD et al., 1994). Nossos dados não podem esclarecer a definitiva origem da poliploidia em *P. tetraploidea*. Novas abordagens citogenéticas, sobretudo com hibridização *in situ* com sondas de DNA satélite e principalmente genômicas (GISH) são necessárias para esclarecer a origem da tetraploidia em *Phyllomedusa* e, neste caso, as análises deverão incluir outras espécies do gênero.

## REFERÊNCIAS

- BALDISSERA Jr., F.A.; OLIVEIRA, P.S.L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Brazilian Journal of Genetics** v.16, p.335-345, 1993.
- BARRIO, A. Estudio cariotipico y analisis audioespectrografico de los cantos de las especies de *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae) que habitan en la Argentina. **Physis** v.35, p.65-74, 1976.
- BARTH, A.; SOLÉ, M.; COSTA, M.A. Chromosome polymorphism in *Phyllomedusa rohdei* populations (Anura: Hylidae). **Journal of Herpetology** v.43, p.676-679, 2009.
- BARTH, A.; SOUZA, V.A.; SOLÉ, M.; COSTA, M.A. Molecular cytogenetics of nucleolar organizer regions in *Phyllomedusa* and *Phasmahyla* species (Hylidae, Phyllomedusinae): a cytotaxonomic contribution. **Genetics and Molecular Research** v.12(3), p.2400-2408, 2013.
- BATISTIC, R.F. **Aspectos citogenéticos da evolução em *Phyllomedusa* (Anura - Amphibia)**. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto, Brasil: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - USP, 1989.



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

BOGART, J.P. **Evolution of anuran karyotypes. In Evolutionary Biology of Anurans.** Edited by Vial JL. Columbia: University of Missouri Press, p.337-349, 1973.

BRUNES, T.O.; SEQUEIRA, F.; HADDAD, C.F.B.; ALEXANDRINO, J. Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v.57, p.1120-1133, 2010.

BRUSCHI, D.P.; BUSIN, C.S.; SIQUEIRA, S.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic analysis of two species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* group (Anura, Hylidae). **Hereditas** v.149, p.34-40, 2012.

BRUSCHI, D.P.; BUSIN, C.S.; TOLEDO, L.F.; VASCONCELLOS, G.A.; STRUSSMANN, C.; WEBER, L.N.; LIMA, A.P.; LIMA, J.D.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. **BMC Genetics** v.14, n.70, 2013.

BRUSCHI, D.P.; LUCAS, E.M.; GARCIA, P.C.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Molecular and Morphological Evidence Reveals a New Species in the *Phyllomedusa hypochondrialis* Group (Hylidae, Phyllomedusinae) from the Atlantic Forest of the Highlands of Southern Brazil. **PLOS ONE** v.9(8), 2014a.

BRUSCHI, D.P.; RIVERA, M.; LIMA, A.P.; ZÚÑIGA, A.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (*Phyllomedusa*, Hylidae, Anura). **Molecular Cytogenetics** v.7(22), 2014b.

BUSIN, C.S.; LIMA, A.P.; PRADO, C.P.A.; STRUSSMANN, C.; SIQUEIRA Jr., S.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). **Micron** v.37, p.355-362, 2006.

DUELLMAN, W.; TRUEB, L. **Biology of amphibians.** McGraw-Hill Book Company, Toronto, 1994.

DONNELLAN, S.C.; MAHONY, M.J. Alloenzyme, chromosomal and morphological variability in the *Litoria lesueuri* species group (Anura: Hylidae), including a description of a new species. **Australian Journal of Zoology** v.52, p.1-28, 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: a phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History** v.294, p.1-240, 2005.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B.; BAÊTA, D.; JUNGFER, K.H.; ÁLVARES, G.F.R.A.; BRANDÃO, R.A.; SHEIL, C.; BARRIENTOS, L.S.; BARRIO-AMÓS, C.L.; CRUZ, C.A.G.; WHEELER, W.C. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). **Cladistics** v.26, p.227-61, 2010.

FISCH, F.; PORT, D. Localidades de ocorrência de *Phyllomedusa tetraploidea* Pombal & Haddad, 1992 (Anura: Hylidae: Phyllomedusinae) e novo registro para Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão** v.32, p.13-28, 2013.

FORMAS, J.R.; CUEVAS, C.C. Comparative cytogenetics analysis of the Chilean leptodactylid frog genus *Telmatobufo*, with the description of the chromosome of *T. venustus*. **Proceedings of the Biological Society of Washington** v.113, p.890-899, 2000.

FROST, D.R. Hylidae Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA, 2014.

GREEN, D.M.; SESSIONS, S.K. **Nomenclature for chromosomes**. In: Green, D.M., Sessions, S.K. (Eds.), Amphibian Cytogenetics and Evolution. Academic Press, San Diego, p.431-432, 1991.

GRUBER, S.L.; SILVA, A.P.Z.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Cytogenetic analysis of *Phyllomedusa distincta* Lutz, 1950 ( $2n = 2x = 26$ ), *P. tetraploidea* Pombal and Haddad, 1992 ( $2n = 4x = 52$ ), and their natural triploid hybrids ( $2n = 3x = 39$ ) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) **BMC Genetics** v.14 (75), 2013.

HADDAD, C.F.B.; POMBAL Jr., J.P.; BATISTIC, R.F. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). **Journal of Herpetology** v.28, p.425-430, 1994.

KASAHARA, S.; HADDAD, C.F.B. Karyotypes of two Brazilian microhylid frogs of the genus *Chiasmocleis*, including a new case of polyploidy. **Journal of Herpetology** v.31, p.139-142, 1997.

KASAHARA, S. **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brasil, 2009.

KWET, A.; AQUINO, L.; FAIVOVICH, J.; BALDO, D. *Phyllomedusa tetraploidea*: IUCN Red List of Threatened Species, 2004.

MATSUI, M.; SETO, T.; KOHSAKA, Y.; BORKIN, L. Bearing of chromosome Cbanding patterns on the classification of Eurasian toads of the *Bufo* complex. **Amphibia-Reptilia** v.6, p.23-33, 1985.

MERCADAL, I.T. *Ceratophrys joazeirensis* sp. n. (Ceratophryidae, Anura) del noreste de Brazil. **Amphibia-Reptilia** v.7, p.313-334, 1986.

NOLETO, R.B.; AMARO, R.C.; VERDADE, V.K.; CAMPOS, J.R.C.; GALLEGOS, L.F.K.; de LIMA, A.M.X.; CESTARI, M.M.; KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M.T.; TOLEDO, L.F. Comparative cytogenetics of eight species of *Cycloramphus* (Anura, Cycloramphidae). **Zoologischer Anzeiger** v.250, p.205-214, 2011.

NUNES, R.R.A.; FAGUNDES, V. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão** v.23, p.21-36, 2008.

PAIVA, C.R.; NASCIMENTO, J.; SILVA, A.P.Z.; BERNARDE, O.S.; ANANIAS, F. Karyotypes and Ag-NORs in *Phyllomedusa camba* De La Riva, 1999 and *P. rohdei* Mertens, 1926 (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae): cytotaxonomic considerations. **Italian Journal of Zoology** v.77(1), p.116-121, 2010.

POMBAL, J.P.; HADDAD, C.F.B. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo burmeisteri do Brasil oriental, com descrição de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). **Revista Brasileira de Biologia** v.52, p.217-229, 1992.

ROSA, C.; AGUIAR Jr.,O.; GIARETTA, A.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Karyotypic variation in the genus *Megaelasia* (Anura, Leptodactylidae) with the first description of a B chromosome in leptodactylid frogs. **Copeia** v.1, p.166-174, 2003.

SEGALLA, M.V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C.A.G., GRANT, T.; HADDAD, C.F.B.; LANGONE, J.A.; GARCIA P.C.A. Brazilian amphibians: list of species. **Herpetologia Brasileira** v.3, p.37-48, 2014.

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

SCHMID, M.; HAAF, T.; SCHEMPP, W. Chromosome banding in Amphibia IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma** v.91, p.172-184, 1985.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; NANDA, I.; EPPLER, J.T. Chromosome banding in Amphibia. In: E. Olmo ed. Cytogenetics of Amphibians and Reptiles. **Birkhauser Verlag, Basel**, p.21-45, 1990.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromatization. **Experimental Cell Research** v.75, p.304-306, 1972.

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles - Causes and effects. **The EMBO Journal** v.21, p.5955-5959, 2002.

VIEIRA, K.S.; SILVA, A.P.Z.; ARZABE, C. Cranial morphology and karyotypic analysis of *Ceratophrys joazeirensis* (Anura: Ceratophryidae, Ceratophryinae): taxonomic considerations. **Zootaxa** v.1320, p.57-68, 2006.

WILEY, J.E.; LITTLE, M.L. Replication banding patterns of the diploid-tetraploid treefrogs *Hyla chrysoscelis* and *H. versicolor*. **Cytogenetics and Cell Genetics** v.88, p.11-14, 2000.