

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**GABRIELA ISABELA GOMES DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE  
*SCINAX* PERTENCENTES AOS CLADOS DE *S.*  
*CATHARINAE* E *S. RUBER*, COM O USO DE  
TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E  
MOLECULAR**

GABRIELA ISABELA GOMES DE OLIVEIRA

ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE *SCINAX* PERTENCENTES  
AOS CLADOS DE *S. CATHARINAE* E *S. RUBER*, COM O USO DE  
TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR

Orientadora: Sanae Kasahara

Co-orientadora: Simone Lilian Gruber

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau  
de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2015

591.55  
O48a      Oliveira, Gabriela Isabela Gomes de  
            Análise citogenética em espécies de Scinax pertencentes aos clados de  
            S. catharinae e S. ruber, com o uso de técnicas de citogenética clássica e  
            molecular / Gabriela Isabela Gomes de Oliveira. - Rio Claro, 2015  
            55 f. : il., figs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Sanae Kasahara  
Coorientador: Simone Lilian Gruber

1. Genética animal. 2. Hylidae. 3. Cromossomo. 4. Bandas de  
replicação. 5. FISH. 6. Fluorocromos. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

Dedico este trabalho aos meus pais  
Luiz Henrique e Cleuza (*in memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Sanae Kasahara por ter aceitado ser minha orientadora, pelos ensinamentos e conselhos.

À minha co-orientadora Dra. Simone Lilian Gruber pela paciência em me ensinar e por ter contribuído em muito para a realização deste TCC. Este trabalho é tão meu quanto dela.

Ao Prof. Dr. Célio F. B. Haddad pelo apoio durante a realização desse trabalho, provendo suprimentos e animais vivos, e também aos pesquisadores, Hideki Narimatsu e Juliana Zina que contribuíram coletando, identificando e disponibilizando exemplares para a obtenção de cromossomos;

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) e o Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento Biologia por permitir o desenvolvimento da pesquisa no Laboratório de Citogenética Animal.

Aos vários colegas que passaram pelo PET nesses quatro anos e ao tutor do programa Prof. Dr. Flavio Henrique Caetano.

Ao Ministério da Educação pelos quatro anos de bolsa no Programa de Educação Tutorial (PET).

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, que contribuíram em muito para a minha formação acadêmica.

Às minhas amigas Daiane, Maria, Mariana por esses quatro anos.

Às meninas que moraram comigo nestes últimos quatro anos, Lanark, Bruna, Mayara, Érica, Danielle e Letícia, pela convivência agradável.

À proprietária da residência onde morei, a senhora Maria, por ter compartilhado de sua vida comigo.

Às minhas tias Benedicta e Alice por estarem presentes na minha vida desde sempre.

Ao meu irmão gêmeo Frederico e a minha irmã Janaina pelas longas conversas e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais Luiz Henrique e Cleuza por terem investido na educação de seus filhos e por sempre acreditarem neles.

## RESUMO

O gênero *Scinax*, que está distribuído no continente americano desde o México até a Argentina e Uruguai, inclui animais de tamanho pequeno conhecidos como pererecas. Do ponto de vista da taxonomia, o gênero pertence à tribo Dendropsophini, subfamília Hylinae, família Hylidae e, de acordo com as extensas revisões na filogenia da família, seus representantes estão atualmente distribuídos nos dois grandes clados de *S. catharinae* e *S. ruber*. As espécies de *Scinax* que tiveram seus cromossomos analisados apresentaram  $2n=24$ , mas padrões cariotípicos distintos são observados para cada clado, de acordo com a morfologia dos dois primeiros pares, posição da Ag-RON e quantidade de heterocromatina identificada por bandamento C. No presente trabalho, são apresentados dados citogenéticos de 11 espécies de *Scinax*, três delas analisadas pela primeira vez, totalizando cinco representantes do clado de *S. catharinae* (*S. albicans*, *S. argyreornatus*, *S. hiemalis*, *S. littoralis* e *Scinax* sp. gr. *catharinae*) e seis do clado de *S. ruber* (*S. caldarum*, *S. crospedospilus*, *S. eurydice*, *S. fuscovarius*, *S. hayii* e *S. similis*). O objetivo da análise foi encontrar novos marcadores cromossômicos para melhor caracterizar ambos os clados. Os resultados de coloração convencional e Ag-RON confirmaram os padrões observados anteriormente para cada clado. As bandas de replicação obtidas no presente trabalho para as espécies *S. hiemalis*, *S. littoralis*, *S. crospedospilus* e *S. eurydice* foram comparadas àquelas já obtidas anteriormente em nosso laboratório para as espécies *S. similis* e *S. fuscovarius*, possibilitando confirmar que as diferenças observadas em coloração convencional entre as espécies de clados distintos parecem ser decorrentes de deleções nos braços curtos dos cromossomos dos pares 1 e 2. Os demais cromossomos especialmente aqueles de tamanho grande mostraram correspondência nos padrões de bandas. A técnica de banda C revelou nos dois clados bandas pequenas e de marcação sutil, que apenas em *S. crospedospilus*, *S. hayii*, e *S. littoralis* apareceram marcadas com o CMA<sub>3</sub>. Esse fluorocromo que identifica as regiões ricas em bases GC marcou as RONS em todas as espécies. O fluorocromo DAPI não revelou qualquer região rica em bases AT nos cromossomos das espécies analisadas. As sondas teloméricas hibridaram apenas nas regiões terminais dos cromossomos nas cinco espécies testadas, sem qualquer evidência de marcação intersticial, indicativa da presença de resquícios de telômeros ou de sequências repetitivas semelhantes à (TTAGGG)<sub>n</sub>. A análise da meiose realizada apenas em machos, quando disponíveis na amostra, mostrou 12 bivalentes nas células em metáfase I e 12 cromossomos nas células em metáfase II. As espécies do clado de *S. ruber* possuem o mesmo cariótipo conservado e compartilhado pela maioria dos Hylinae, sendo esse um caráter ancestral. As espécies do clado de *S. catharinae*, têm uma constituição derivada, e sua origem pode estar relacionada com a reorganização de regiões repetitivas. Os resultados do presente trabalho trazem uma importante contribuição para a citogenética de *Scinax* porque permitiram avançar na compreensão da diferenciação cariotípica entre os clados de *S. catharinae* e *S. ruber*, dando suporte a divisão de *Scinax* em dois gêneros. **Palavras-chave:** Hylidae, cromossomos, bandas de replicação, FISH, fluorocromos.

## ABSTRACT

The *Scinax* genus, which is distributed throughout the American continent from Mexico to Argentina and Uruguay, includes small sized animals known as tree frogs. From the taxonomy point of view, the genus belongs to the Dendropsophini tribe, Hylinae subfamily, Hylidae family and, according to extensive revisions in the family phylogeny, their representatives are currently distributed in two major clades of *S. catharinae* and *S. ruber*. The *Scinax* representatives which had their chromosomes analyzed so far showed  $2n = 24$ , but different karyotypic patterns are observed for each clade, according to the morphology of the first two pairs, Ag-NOR position and the amount of C banded heterochromatin. In this study, we are presenting the cytogenetic data of 11 species of *Scinax*, three of them analyzed for the first time, five from the clade of *S. catharinae* (*S. albicans*, *S. argyreornatus*, *S. hiemalis*, *S. littoralis* and *Scinax* sp. gr. *catharinae*) and six from the clade of *S. ruber* (*S. caldarum*, *S. crospedospilus*, *S. eurydice*, *S. fuscovarius*, *S. hayii* and *S. similis*). The aim was to find new chromosome markers to better characterize both clades. The results of Giemsa staining and Ag-NOR confirmed the the previous observed patterns for each clade. Replication bands obtained in this work for the species *S. hiemalis*, *S. littoralis*, *S. crospedospilus*, and *S. eurydice* were compared to those previously obtained in our laboratory for the species *S. fuscovarius* and *S. similis*, allowing to confirm that the observed differences with the use of conventional staining among species of distinct clades seem to be due to deletions on the short arms of chromosomes from pairs 1 and 2. The remaining chromosomes especially those of large size showed equivalent banding patterns. The C banding technique revealed on both clades subtle small bands, which only in *S. crospedospilus*, *S. hayii*, and *S. littoralis* appeared marked with the CMA<sub>3</sub>. This fluorochrome that identifies the GC-rich regions marked the NORs in all species. The DAPI fluorochrome revealed no AT-rich region in the chromosomes of the studied species. The telomeric probes identified only the terminal regions of the chromosomes in the five tested species, with no evidence of interstitial hybridization indicating the presence of telomere vestiges or telomere-like repetitive sequences. The analysis of meiotic cells was performed only in males, when available in the sample, and showed 12 bivalents in metaphase I cells and 12 chromosomes in metaphase II cells. Species of the *S. ruber* clade have the same conservative karyotype shared by most Hylinae, and this is an ancestral character. Species of the *S. catharinae* clade have a derived constitution, and its origin can be related to the reorganization of repetitive regions. The results of this study represent an important contribution to the cytogenetics of *Scinax* because they allowed elucidate unequivocally the mechanism of karyotype differentiation between the clades of *S. catharinae* and *S. ruber*, supporting the division of *Scinax* into two genera. **Key-words:** Hylidae, chromosomes, replication bands, FISH, fluorochrome

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2 O GÊNERO <i>Scinax</i></b> .....	<b>9</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 MATERIAL .....	18
4.2 MÉTODOS E TÉCNICAS.....	21
4.2.1 OBTENÇÃO DAS PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	21
Preparação direta.....	22
4.2.2 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO .....	23
Coloração convencional.....	24
Marcação de regiões organizadoras de nucléolo.....	24
Bandamento C .....	25
Coloração com fluorocromos CMA <sub>3</sub> e DAPI .....	25
Coloração FPG .....	26
FISH com sonda de DNAr .....	27
FISH com sonda telomérica .....	28
4.3 ANÁLISES CROMOSSÔMICAS .....	29
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

Os anfíbios compõem uma Ordem muito diversificada, com aproximadamente 7200 espécies descritas até o momento (FROST, 2014). O gênero *Scinax* inclui animais de tamanho pequeno, conhecidos como pererecas, e está distribuído no continente americano desde o México até a Argentina e Uruguai. No Brasil, seus representantes são abundantes na Mata Atlântica que é uma área de grande diversidade e endemismo de anuros, sendo considerada atualmente um dos 25 *hot spots* mundiais de biodiversidade, mesmo contando com apenas 8% de sua área original (MORAES et al., 2007). É interessante notar que o referido trabalho mostra diferença na proporção de espécies entre as áreas preservadas e áreas alteradas, ou seja, nos locais que sofreram alterações antrópicas, existe uma menor diversidade de espécies endêmicas e um aumento na presença de espécies generalistas, o que levou os autores à presunção de que muitas espécies poderiam ter se extinguido antes mesmo de serem descritas.

O gênero *Scinax* pertence à tribo Dendropsophini, subfamília Hylinae, família Hylidae e, de acordo com os extensos trabalhos de revisão sobre a filogenia da família, as espécies estão distribuídas em dois grandes clados, S.

*catharinae* e *S. ruber*. Segundo Pombal Jr. et al. (1995), o grande número de espécies incluídas em *Scinax* e as diferenças morfológicas e de bioacústica sugerem que podem existir dois gêneros sob a mesma denominação. A dicotomia observada nas filogenias moleculares de Faivovich et al. (2005), Wiens et al. (2010) e Pyron e Wiens (2011) é um fator adicional que corrobora essa hipótese.

Do ponto de vista citogenético, cerca de 36% das espécies do gênero tiveram seus cromossomos estudados e a maioria dos trabalhos incluiu somente a determinação do número diploide baseada na observação de células meióticas e a constituição do cariótipo, quando existente, baseada apenas em análises com coloração convencional. Portanto, é relevante o presente trabalho no qual foram analisadas 10 espécies de *Scinax*, nove delas endêmicas da região de Mata Atlântica e uma espécie generalista (*S. fuscovarius*), pois marcadores cromossômicos que ajudem a caracterizar melhor as espécies pertencentes aos clados de *S. catharinae* e de *S. ruber*, bem como avaliar a extensão das diferenças cariotípicas existentes entre os dois clados poderão futuramente contribuir com a taxonomia e filogenia do gênero.

## 2 O GÊNERO *SCINAX*: ASPECTOS DA TAXONOMIA, FILOGENIA E CITOGENÉTICA

---

A família Hylidae conta atualmente com 946 espécies descritas, que estão distribuídas nas subfamílias Hylinae, Pelodyandinae e Phyllomedusinae (FROST, 2014). O gênero *Scinax*, que é o segundo maior da subfamília Hylinae, tem cerca de 110 espécies (FROST, 2014), um número que reflete as dificuldades que a taxonomia enfrenta, devido à grande semelhança morfológica entre os indivíduos (POMBAL Jr. et al., 1995). Os problemas taxonômicos de *Scinax* ficam mais evidentes quando se observa as diversas alterações de nomenclatura do gênero ocorridas ao longo do tempo. O primeiro nome genérico que incluía todas as espécies de pererecas neotropicais foi *Hyla* Laurenti, 1768 (LAURENTI, 1768) e somente em 1830 o nome *Scinax* foi utilizado pela primeira vez por Wagler (WAGLER, 1830). Esse autor listou várias espécies pertencentes ao gênero, sem, no entanto, designar uma espécie-tipo, um hábito comum no século 19 (DUELLMAN e WIENS, 1992).

Fouquette e Delahoussaye (1977) revalidaram o gênero *Ololygon* (FITZINGER, 1843) para designar os híldeos pertencentes ao grupo de *Hyla rubra*. Combinando características morfológicas externas dos indivíduos, bem como a morfologia de seus espermatozoides, o gênero *Ololygon* foi dividido em

quatro subgrupos, *O. rubra*, *O. catharinae*, *O. rostrata* e *O. staufferi* (revisão em FAIVOVICH et al., 2005), mas tal classificação não foi amplamente aceita devido à fragilidade das características consideradas.

Ambas as denominações *Scinax* e *Ololygon* caíram em desuso porque os caracteres taxonômicos empregados para identificação das espécies eram muito semelhantes aos estabelecidos para o gênero *Hyla* e, conseqüentemente, todos os representantes de *Scinax* e *Ololygon* continuaram a ser identificados como *Hyla*. Mais recentemente, Duellman e Wiens (1992) propuseram o retorno do nome *Scinax* que, por ser um termo mais antigo, tem prioridade sobre *Ololygon*. Adicionalmente, sugeriram que o gênero *Scarthyla* é grupo-irmão de *Scinax* e que os dois juntos formam o grupo-irmão de *Sphaenorhynchus*. No mesmo artigo, Duellman e Wiens (1992) reconheceram no gênero *Scinax* os grupos de *S. catharinae*, *S. perpusillus*, *S. rizibilis*, *S. ruber*, *S. rostratus*, *S. staufferi* e *S. x-signatus*. Pombal Jr et al. (1995), verificando que os representantes dos grupos de *S. ruber* e *S. x-signatus* apresentam semelhanças morfológicas e que a classificação do grupo de *S. x-signatus* era confusa, sugeriram a inclusão das espécies em um único grupo, o de *S. ruber*.

Em 2002, Faivovich realizou uma análise filogenética em *Scinax* utilizando caracteres morfológicos de osteologia, miologia, morfologia externa da larva e do adulto, biologia reprodutiva e os dados citogenéticos disponíveis (Figura 1). Foram incluídas 36 espécies do gênero sendo 10 representantes do grupo de *S. catharinae*, um do grupo *S. perpusillus*, 13 do grupo de *S. ruber*, cinco do grupo de *S. rostratus*, cinco do grupo de *S. staufferi* e duas espécies morfolologicamente não identificadas. A árvore filogenética resultante de tal análise mostrou as espécies agrupadas em dois grandes ramos: o clado de *Scinax catharinae* (incluindo os grupos de *S. perpusillus* e *S. catharinae*) e o clado de *Scinax ruber* (incluindo os grupos de *S. ruber* e *S. rostratus* e *S. staufferi*). A filogenia de Faivovich (2002) também permitiu visualizar que dos cinco grupos fenéticos existentes foram comprovados monofiléticos apenas aqueles de *S. catharinae* (considerando a inclusão das espécies *S. agilis* e *S. berthae*) e de *S. rostratus*. A monofilia do grupo de *S. perpusillus* não pode ser testada porque apenas uma espécie do grupo foi incluída no trabalho. Com relação aos dois grupos restantes (*S. ruber* e *S. staufferi*), o autor sugeriu que



A sistemática filogenética sofreu uma grande transformação quando as informações de sequências gênicas puderam ser utilizadas como caracteres na construção das filogenias. Esse foi o caso da família Hylidae que passou por uma grande reformulação proposta por Faivovich et al. (2005) após a construção de uma filogenia baseada em dados de sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares. No gênero *Scinax* foram recuperados os dois grandes clados, *S. catharinae* e *S. ruber*, mesmo que apenas duas espécies do clado de *S. catharinae* tivessem sido incluídas na análise. Com a reformulação, o gênero *Scinax* passou a incluir o antigo grupo de *Hyla uruguayana* e foram mantidos apenas os grupos fenéticos com monofilia comprovada, ou seja, os grupos de *S. catharinae*, *S. perpusillus* e *S. rostratus*, já demonstrados por Faivovich (2002), e o novo grupo de *S. uruguayus*. Os grupos de *S. ruber* e de *S. staufferi* que deixaram de ser considerados válidos por Faivovich (2002) permaneceram nessa condição e as espécies neles incluídas são consideradas como sem grupo.

Trabalhos subsequentes, como os de Wiens et al. (2010) e Pyron e Wiens (2011), abrangeram um número maior de espécies e a construção das filogenias recuperaram os dois grandes clados de *Scinax*. Entretanto, ainda não foi possível resolver os conflitos internos de cada clado e a organização dos grupos fenéticos permaneceu a mesma sugerida por Faivovich et al. (2005) e é a utilizada correntemente.

As primeiras publicações contendo informações citogenéticas de *Scinax* datam das décadas de 1960 e 1970 e empregaram apenas a coloração convencional para análise de cromossomos mitóticos ou meióticos. Tais análises feitas em cerca de uma dezena de espécies (Tabela 1) permitiram a determinação do número diploide de  $2n = 24$ , a observação da morfologia dos cromossomos (sempre dos tipos metacêntrico e submetacêntrico) e, em alguns casos, a observação de constrições secundárias. Relatos de número diploide de  $2n=22$  em *S. constrictus* foram publicados em resumos de Congresso (PEREIRA et al., 2009; AGUIAR et al., 2010), sem menção de sua constituição cariotípica.

As espécies estudadas a partir da década de 1980 tiveram suas análises ampliadas pela utilização de técnicas como a impregnação pelo nitrato de prata (Ag-RON) e o bandamento C. Nesses trabalhos foi observado que apenas um

par cromossômico pequeno ou médio era portador de regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) e que bandas C positivas estavam geralmente presentes na região centromérica dos cromossomos, as quais apareciam como marcações discretas ou como grandes blocos, dependendo da espécie, além de poucas bandas intersticiais ou teloméricas.

Apenas as espécies *S. fuscovarius* (KASAHARA et al., 2003), *Scinax aff. alter*, *S. catharinae*, *S. perereca*, *S. rizibilis* (OLIVEIRA, 2011) e *S. tripui* (OLIVEIRA, 2013) tiveram seus cromossomos também submetidos a tratamento com fluorocromos base-específicos, hibridação *in situ* (FISH) e incorporação de 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) para obtenção de bandas de replicação. O FISH com sonda DNAr permitiu a localização cromossômica precisa dos cístrons ribossômicos, bem como uma avaliação da quantidade de cópias, e a coloração com os fluorocromos base-específicos DAPI e CMA<sub>3</sub> complementou a caracterização das regiões repetitivas pela indicação da riqueza de bases AT e GC, respectivamente. As sondas teloméricas mostraram hibridação fora da região terminal em *Scinax aff. alter*. A obtenção do padrão de bandas de replicação foi particularmente útil para a verificação de extensa homeologia entre os cromossomos de *S. fuscovarius* e de outros representantes da família Hylidae (KASAHARA et al., 2003).

Um trabalho que cabe aqui destacar é o de Cardozo et al. (2011) por incluir dados cromossômicos de uma grande amostra (28 representantes) e porque, pela primeira vez, os resultados foram analisados sob o ponto de vista evolutivo, baseado nas filogenias disponíveis para o gênero. Os autores comprovaram que existia, de fato, uma diferenciação cariotípica entre as espécies dos diferentes clados, isto é, nas do clado de *S. catharinae* os pares 1 e 2 são submetacêntricos com pouca diferença de tamanho entre eles, a Ag-RON está localizada preferencialmente no par 6 e marcações evidentes de banda C centromérica ocorrem em todos os cromossomos, enquanto nas do clado de *S. ruber* os pares 1 e 2 são metacêntricos com uma diferença marcante de tamanho entre eles, a Ag-RON está localizada no par 11 e os blocos de banda C centromérica são, em geral, de tamanho pequeno. Adicionalmente, a análise combinada com a filogenia possibilitou associar aos caracteres cariotípicos observados o status de plesiomorfia ou apomorfia de acordo com a condição ancestral ou derivada do caráter. Por exemplo, a

característica de um único par pequeno marcador de Ag-RONs, como nas espécies do clado de *S. ruber* foi considerada plesiomórfica, portanto, a marcação de Ag-RON no par 6, como acontece nas espécies do clado de *S. catharinae*, é uma condição derivada.

**Tabela 1** - Atualização da citogenética do gênero *Scinax* baseada em Catroli e Kasahara (2009).

Clado de <i>Scinax catharinae</i>			
Espécie	2n	Técnica	Referências
<i>S. albicans</i>	24	Conv; Ag; BC; Flu	Cardozo et al. (2011); presente trabalho
<i>S. argyreornatus</i>	24	Conv; Ag; BC; Flu	Nunes e Fagundes (2008); Cardozo et al. (2011); presente trabalho
<i>S. ariadne</i>	24	Conv; Ag; BC	Cardozo et al. (2011)
<i>S. aromothyella</i>	24	Conv; Ag; BC	Cardozo et al. (2011)
<i>S. berthae</i>	24	Conv; Ag; BC	Leme et al. (2004b); Cardozo et al. (2011)
<i>S. boulengeri</i>	24	Conv	Duellman (1967)
<i>S. brieni</i>	24	Conv	Bogart (1973)
<i>S. canastrensis</i>	24	Conv; Ag; BC	Cardozo et al. (2011)
<i>S. catharinae</i>	24	Conv; Ag; Flu; DNAr; Tel	Bogart (1973); Oliveira (2011)
<i>S. centralis</i>	24	Conv; Ag	Ribeiro et al. (2006); Pereira et al. (2009)
<i>S. garbei</i>	24	Conv	Bogart e Bogart (1971)
<i>Scinax</i> sp. gr. <i>Catharinae</i>	24	Conv; Ag; BC; Flu; DNAr; Tel; BrdU	presente trabalho
<i>S. hiemalis</i>	24	Conv; Ag; BC; Flu; Tel; BrdU	Cardozo et al. (2011); presente trabalho
<i>S. littoralis</i>	24	Conv; Ag; BC; Flu; Tel	Leme et al. (2004a); Cardozo et al. (2011); presente trabalho
<i>S. longilineus</i>	24	Conv; Ag; BC	Cardozo et al. (2011)
<i>S. obtriangulatus</i>	24	Conv; Ag; BC	Cardozo et al. (2011)
<i>S. perpusillus</i>	24	Conv	Bogart (1973)
<i>S. rizibilis</i>	24	Conv; Ag; BC, Flu, DNAr, Tel	Leme et al. (2004a); Cardozo et al. (2011), Oliveira (2011)
<i>S. rostratus</i>	24	Conv	Bogart (1973)
<i>S. trapicheiroi</i>	24	Conv; Ag	Leme et al. (2004a); Cardozo et al. (2011)
<i>S. tripui</i>	24	Conv; Ag, DNAr	Oliveira (2013)
Clado de <i>Scinax ruber</i>			
Espécie	2n	Técnicas	Referências

<i>S. alter</i>	24	Conv; Ag	Leme et al. (2004a); Nunes e Fagundes (2008)
<i>S. aff. Alter</i>	24	Conv; Ag, Flu, DNar, Tel	Oliveira (2011)
<i>S. acuminatus</i>	24	Conv; Ag; BC	Cardozo e Baldo (2006); Cardozo et al.(2011)
<i>S. caldarum</i>	24	Conv; Ag-RON	presente trabalho
<i>S. crospedospilus</i>	24	Conv; Ag-RON; BC; Flu; Tel; BrdU	presente trabalho
<i>S. constrictus</i>	22	Conv; Ag	Pereira et al. (2009); Aguiar et al. (2010)
<i>S. curicica</i>	24	Conv; Ag, BC	Cardozo et al. (2011)
<i>S. cuspidatus</i>	24	Conv	Foresti (1972)
<i>S. duartei</i>	24	Conv; Ag, BC	Foresti (1972); Cardozo et al. (2011)
<i>S. elaeochrous</i>	24	Conv; Ag; BC	Duellman (1967); Anderson (1991)
<i>S. eurydice</i>	24	Conv; Ag; BC; Flu; BrdU	Leme et al. (2004a); Cardozo et al. (2011); presente trabalho
<i>S. funereus</i>	24	Conv	Bogart e Bogart (1971)
<i>S. fuscomarginatus</i>	24	Conv; Ag	Rabello (1970); Rabello et al.(1971); Cardozo e Baldo (2006);Cardozo et al. (2011)
<i>S. fuscovarius</i>	24	Conv; Ag; BC;Flu; DNAr; BrdU	Anderson (1991); Baldissera Jr. e Batistic (1992); Leme et al. (2004a); Baldissera Jr. et al. (1993); Kasahara et al. (2003); Cardozo e Baldo (2006); Trentin et al. (2007); Neri et al. (2009); Cardozo et al. (2011); presente trabalho
<i>S. granulatus</i>	24	Conv; Ag; BC	Cardozo e Baldo (2006), Cardozo et al. (2011)
<i>S. hayii</i>	24	Conv; Ag; BC; Flu; Tel	Beçak (1968); Baldissera Jr et al.(1993); Leme et al., (2004a), Bortoleto et al.(2004), Cardozo et al. (2011); presente trabalho
<i>S. kautskyi</i>	24	Conv; Ag; BC	Neri et al. (2009)
<i>S. nasicus</i>	24	Conv; Ag; BC	Cardozo e Baldo (2006); Cardozo et al. (2011)
<i>S. pachycrus</i>	24	Conv	Foresti (1972)
<i>S. perereca</i>	24	Conv; Ag; BC, Flu, DNar, Tel	Leme et al. (2004a); Cardozo e Baldo (2006); Cardozo et al. (2011), Oliveira (2011)
<i>S. similis</i>	24	Conv; Ag; BC	Leme et al. (2004b); Cardozo et al. (2011)
<i>S. squalirostris</i>	24	Conv; Ag; BC	Barrio e Pistol de Rubel (1970); Foresti (1972); Leme et al. (2004b); Trentin et al. (2007); Cardozo et al. (2011)
<i>S. staufferi</i>	24	Conv; Ag; BC	Duellman (1967); Anderson (1991)

<i>S. uruguayus</i>	24	Conv; Ag	Cardozo et al. (2011)
<i>S. x-signatus</i>	24	Conv; Ag	Neri et al. (2009)

**Abreviações:** **Ag:** Ag-RON; **BC:** banda C; **BrdU:** bandas de replicação após incorporação por 5-Bromodeoxiuridina, seguida pela técnica *Fluorochrome plus Giemsa*; **Conv:** coloração convencional com Giemsa; **Flu:** coloração com fluorocromos DAPI/CMA<sub>3</sub>; **DNAr:** Hibridação *in situ* com sonda de DNA ribossômico; **Tel:** Hibridação *in situ* com sonda telomérica.

### 3 OBJETIVOS

---

Considerando as diversas questões envolvendo o gênero *Scinax*, como por exemplo, as dificuldades taxonômicas, o grande número de espécies, a possibilidade de divisão do gênero e o pequeno número de representantes estudados do ponto de vista citogenético, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de ampliar o número de espécies analisadas e utilizar novos marcadores e técnicas citogenéticas que permitissem entender as diferenças cariotípicas entre as espécies de *Scinax* pertencentes aos clados de *S. catharinae* e de *S. ruber*, e, com isso, contribuir para o esclarecimento das relações filogenéticas nos dois clados.

Para atingir tal objetivo foram utilizadas técnicas de citogenética clássica, tais como Ag-RON e o bandamento-C, que identificam, respectivamente, as regiões organizadoras de nucléolo e a heterocromatina constitutiva, de coloração com fluorocromos base-específicos DAPI/CMA<sub>3</sub>, que coram sequências repetitivas ricas em AT ou GC, bandas de replicação, que diferenciam os cromossomos longitudinalmente facilitando seu correto emparelhamento e de citogenética molecular como a hibridação *in situ* com sonda de DNAr que identifica as regiões ribossômicas e sondas (TTAGGG)<sub>n</sub> que identifica as sequências teloméricas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 MATERIAL

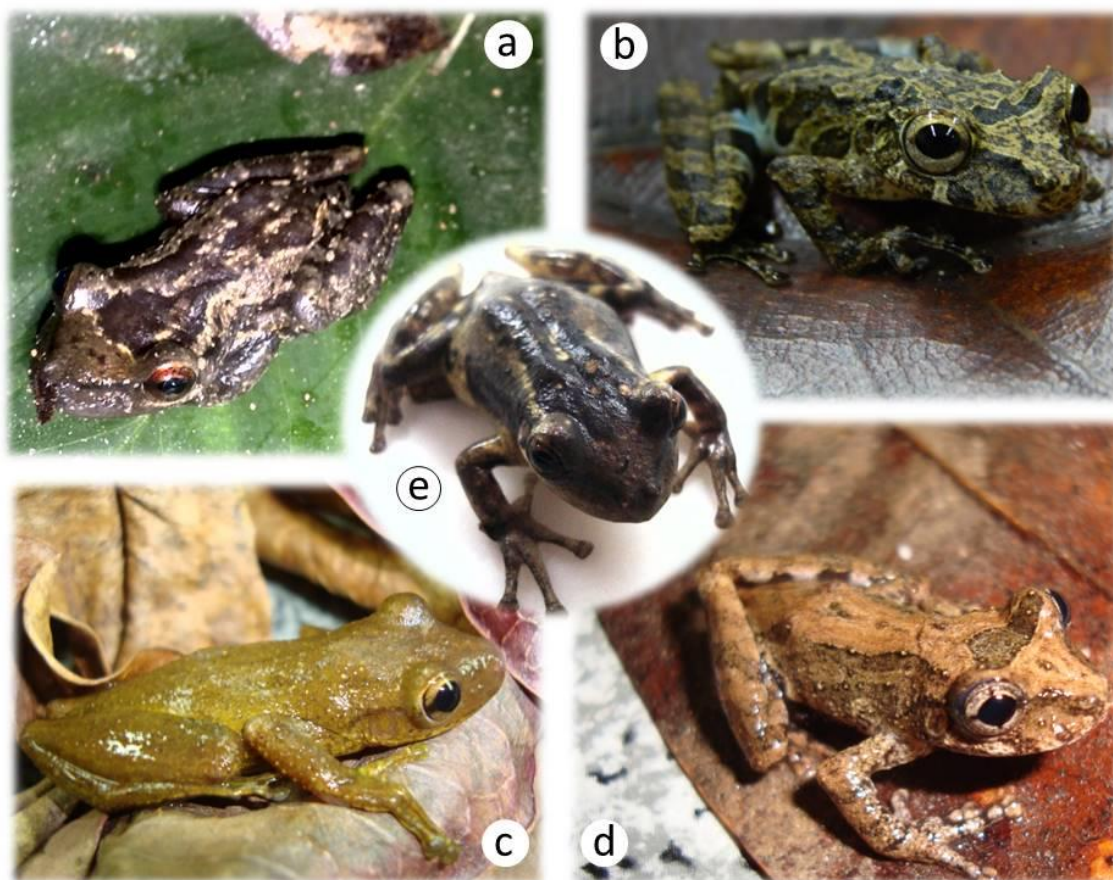
Os exemplares de *Scinax* foram coletados nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, com a permissão de coleta 38827-2 ICMBio (Tabela 2 e Figura 2). Nessa Tabela, estão listados exemplares de *S. albicans* (A839) e *S. argyreornatus* (A975 e A976), cujos dados com coloração convencional, Ag-RON e banda C foram publicados em Cardozo et al. (2011) porém, os animais foram incluídos no presente trabalho, pois seus cromossomos foram analisados com técnicas não utilizadas anteriormente. Igualmente, incluímos na Tabela 2, o exemplar A443 que fez parte da amostra de *S. fuscovarius* do trabalho de Kasahara et al. (2003) os exemplares A 373 e A374 de *S. similis*, pois, embora os resultados de bandas de replicação constassem do Trabalho de Conclusão de Curso de Leme (2005), não foram ainda publicados, como ocorreu com os dados de coloração convencional, Ag-RON e banda C (CARDOZO et al. 2011). É importante mencionar também que rerepresentamos os resultados de bandas de replicação do exemplar A443 que fez parte da amostra de *S. fuscovarius* do trabalho de Kasahara et al. (2003),

pois a alta resolução das bandas se mostrou mais adequada para a análise comparativa das espécies.

As espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. Célio F. B. Haddad e equipe, do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP. Os animais estudados foram fixados em formol (10%), preservado em álcool 70% e depositado na coleção zoológica de anfíbios CFBH do referido Departamento de Zoologia.

**Tabela 2** - Relação de espécies analisadas por clado, identificação, número de exemplares, sexo e local de coleta.

	Espécie	Identificação	Número de exemplares	Sexo	Local de coleta
<b>Clado de <i>S. catharinae</i></b>	<i>Scinax albicans</i>	A839	1	macho	Petrópolis, RJ 22°30'17"S; 43°10'56"W
	<i>Scinax argyreornatus</i>	A975, A976	2	machos	Ilha do Cardozo, SP 25°07'31"S; 47°58'06"W
	<i>Scinax hiemalis</i>	A772	1	macho	Serra do Japi, SP 37°25'818"S; 122°05'36"W
		A1270, A1319, A1321	3	machos	Mogi Guaçu, SP 22°21'37"S; 57°07'07"W
	<i>Scinax littoralis</i>	A904, A905 A906	3	machos	Ubatuba, SP 23°26'19"S; 45°05'25"W
		A1346	1	macho	Bertioga, SP 23°56'27"S; 45°19'48"W
	<i>Scinax</i> sp. gr. <i>catharinae</i>	A1254	1	fêmea	Biritiba Mirim, SP 23°34'17"S; 46°02'15"W
<b>Clado de <i>S. ruber</i></b>	<i>Scinax caldarum</i>	A999	1	macho	Poços de Caldas, MG 21°47'18"S; 46°33'45"W
	<i>Scinax crospeospilus</i>	A1287, A1288	2	machos	Mogi das Cruzes, SP 23°31'29"S; 46°11'14"W
	<i>Scinax eurydice</i>	A734	1	macho	Serra do Japi, SP 37°25'818"S; 122°05'36"W
	<i>Scinax fuscovarius</i>	A1132	1	fêmea	Biritiba Mirim, SP 23°34'17"S; 46°02'15"W
		A443	1	macho	Socorro, SP 22°35'29"S; 46°31'44"O
	<i>Scinax hayii</i>	A679	1	fêmea	Camanducaia, MG 22° 45'19"S; 46°8'44"W
		A1195	1	macho	Biritiba Mirim, SP 23°34'17"S; 46°02'15"W
			A1261	1	macho
	<i>Scinax similis</i>	A373, A374	2	fêmeas	Três Marias, MG 18°12'43.3"S; 45°13'19"W



**Figura 2.** Fotos de representantes de *Scinax* do clado de *S. catharinae* (a, b, c) e do clado de *S. ruber* (d, e): a. *Scinax* sp. gr. *catharinae*; b. *S. littoralis*; c. *S. hiemalis*; d. *S. hayii*, e. *S. crospeospilus* (Fotos de Gruber, SL).

## 4.2 MÉTODOS E TÉCNICAS

O presente trabalho foi desenvolvido utilizando os procedimentos usualmente empregados pelo grupo de pesquisa em citogenética de anfíbios anuros, Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências UNESP, Campus de Rio Claro, conforme descrito em Gruber (2013) e detalhado a seguir.

### 4.2.1 OBTENÇÃO DAS PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Preparações citológicas diretas de medula óssea, fígado, baço e testículos, no caso dos exemplares machos, foram obtidas seguindo os procedimentos descritos em Baldissera Jr. et al. (1993) e Silva et al. (2000). De alguns animais, foram feitas preparações citológicas do epitélio intestinal, segundo a técnica de Schmid (1978), com modificações. Para a preparação direta os animais receberam injeção prévia de fitohemaglutinina na proporção de 0,05mL para cada 5g de peso do animal, ou de 0,05mL como dose mínima para animais que pesam menos de 5g, entre 48 e 72h antes do sacrifício, como estimulante de divisão celular. O tratamento com colchicina teve duração de 4 horas quando a solução utilizada é a de concentração 1%, ou foi estendido *overnight* quando utilizada a concentração de 0,01%.

Com frequência realizamos também tratamento *in vivo* com análogos de base do DNA, para obtenção de bandas de replicação. Nesse caso, a solução contendo BrdU+FudR (10 mg de BrdU e 0,5 mg de FudR em 2mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%) foi injetada no animal na proporção de 0,05mL para cada 5g de peso do animal, ou de 0,05mL como dose mínima para animais que pesam menos de 5g, entre 16 e 18h antes do sacrifício.

## Preparação direta

**a.** após o sacrifício do animal com lidocaína 5%, foram retirados os ossos dos membros posteriores, fígado, baço, intestino e testículos, quando do sexo masculino. Cada material foi colocado em placa de Petri contendo solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075M e, em seguida, processado de diferentes maneiras:

- após a retirada da musculatura existente em torno dos ossos, as epífises foram cortadas e a medula óssea liberada por meio de lavagens sucessivas com solução hipotônica, feitas com auxílio de uma seringa;

- a liberação das células do fígado e do baço foi feita de modo semelhante, com injeções repetidas de solução hipotônica e com fragmentação mecânica com o auxílio de agulha e de uma pinça, até que todo o tecido tenha sido dissociado;

- os túbulos seminíferos foram dissociados na solução hipotônica e as células foram liberadas no decorrer da manipulação desse material;

- o fragmento de intestino foi cortado longitudinalmente e hipotonizado inteiro à temperatura ambiente e, somente após a pré-fixação, a mucosa intestinal foi raspada para a liberação das células.

**b.** a suspensão celular foi, então, transferida para um tubo de centrifuga e incubada a 37°C por 45 minutos. A duração do tratamento hipotônico do fragmento do intestino foi de 30 minutos.

**c.** decorrido o tempo da hipotonização, foi feita a pré-fixação, com a adição de 6 gotas de fixador (para aproximadamente 3mL de solução hipotônica), contendo 3 partes de álcool metílico e 1 parte de ácido acético (preparado na hora do uso). Após 5 minutos, mais 0,5mL de fixador foi adicionado à suspensão. A duração da segunda etapa de pré-fixação foi, também, de 5 minutos.

**d.** a suspensão foi, em seguida, centrifugada a 1200 rpm, durante 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o sedimento foi desmanchado com pipeta Pasteur

e novo fixador foi adicionado, vagarosamente. A suspensão foi pipetada várias vezes para lavar bem as células.

e. o procedimento do item anterior foi repetido, realizando-se, pelo menos, mais duas lavagens de fixador.

f. após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado o fixador na quantidade suficiente para o preparo das lâminas. Para guardar a suspensão, o material foi transferido para um tubo plástico que foi completado com fixador e então guardado no freezer.

g. sobre uma lâmina limpa e seca, mantida, horizontalmente, sobre um suporte em banho-maria a 60°C, pingou-se de uma a duas gotas da suspensão. A lâmina foi, logo em seguida, retirada do banho-maria e posta a secar ao ar.

Antes da preparação das lâminas, utilizamos o *Cytoclear* (ProCell Reagents) que é uma mistura de detergentes e age removendo o citoplasma que ainda persistir após a fixação. A lavagem com o *Cytoclear* foi feita após a última etapa da fixação quando, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e, aproximadamente 1mL de fixador contendo *Cytoclear* na proporção de 5µL por mL, foi adicionado em cada tubo, pipetamos e deixamos agir por 5 minutos. O material foi novamente centrifugado e, após o descarte da solução de *Cytoclear*, adicionamos novo fixador na quantidade necessária para o preparo das lâminas.

#### 4.2.2 TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

As preparações mitóticas e meióticas foram coradas com Giemsa. As de cromossomos mitóticos foram, também, submetidas às técnicas de bandamento C (SUMNER, 1972) e de marcação de RON pelo nitrato de prata (HOWELL e BLACK, 1980), bem como à coloração com fluorocromos GC-específico CMA<sub>3</sub> (cromomicina A<sub>3</sub>) e AT-específico DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) segundo Christian et al. (1998). A diferenciação das bandas de replicação nos cromossomos, após incorporação de BrdU, foi feita pela coloração FPG (*Fluorochrome Plus Giemsa*), segundo Dutrillaux e Couturier

(1981). A técnica de FISH seguiu o protocolo de Pinkel et al. (1986), utilizando sondas de DNAr HM123 (MEUNIER-ROTIVAL et al., 1979). Quando utilizadas a sondas teloméricas, foram seguidas as instruções do fabricante da sonda (DAKO *Cytomation Denmark A/S* Kit). A seguir são descritas as diferentes técnicas, com algumas modificações adotadas em nosso laboratório.

#### Coloração convencional

- a. a lâmina foi incubada em solução 1N de HCl a 60°C, por 5 minutos, e lavada em água destilada;
- b. em seguida, foi corada com solução de Giemsa (1mL da solução comercial Merck diluído em 29mL de tampão fosfato pH 6,8), por 7 minutos, lavada em água destilada e seca à temperatura ambiente.

#### Marcação regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RON) (HOWELL e BLACK, 1980)

- a. a lâmina foi incubada em solução de HCl 1N a 60°C, por 3 minutos, e seca ao ar;
- b. pingou-se na lâmina uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina em 50mL de água destilada + 0,5mL de ácido fórmico), duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% e cobriu-se com lamínula;
- c. em seguida, a lâmina foi incubada em câmara úmida a 60°C, por 3 minutos;
- d. após a incubação, a lâmina foi lavada em água destilada e corada em solução de Giemsa, a mesma utilizada para coloração convencional, por 30 segundos, lavada em água destilada e seca à temperatura ambiente.

Quando a técnica de marcação de Ag-RON foi aplicada sequencialmente em lâmina já corada com Giemsa, foi necessário retirar todo o óleo de imersão com o uso de xilol, a hidrólise com HCl foi reduzida ou evitada e o tempo de incubação na câmara úmida foi reduzido para aproximadamente 2 minutos.

### Bandamento C (SUMNER, 1972)

- a. incubou-se a lâmina em solução de HCl 0,2N à temperatura ambiente, por 45 minutos e, em seguida, foi lavada em água destilada;
- b. incubou-se a lâmina em solução de 2xSSC, a 60°C, por 10 a 15 minutos e, em seguida, foi lavada em água destilada;
- c. em seguida, incubou-se a lâmina em solução de hidróxido de bário octahidratado a 5% a 30°C, durante 30 a 40 segundos, e, em seguida, lavada com água destilada;
- d. a lâmina foi passada rapidamente em solução de HCl 1N a 60°C e lavada em água destilada;
- e. incubou-se a lâmina em solução de 2xSSC a 60°C, por 30 minutos e, em seguida, foi lavada em água destilada;
- f. a lâmina foi corada com solução de Giemsa (2mL da solução comercial diluídos em 28mL de tampão fosfato, pH 6,8), por 20 minutos, lavada em água destilada e seca à temperatura ambiente.

### Coloração com fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI (CHRISTIAN et al. 1998)

- a. a lâmina foi incubada em solução de formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 2 minutos;
- b. em seguida, incubou-se a lâmina 2x em 2xSSC por 2 minutos;
- c. desidratou-se as lâminas em série alcoólica gelada 70%, 90% e 100% por 2 minutos cada;
- d. a lâmina foi seca ao ar;
- e. colocou-se 50µl da solução CMA<sub>3</sub> (20µg/ml em 32 mM de Cl<sub>2</sub>Mg) cobriu-se com lamínula e, em seguida, foi deixada por 30 minutos em uma caixa escura;

- f. incubou-se a lâmina 2x em solução de PBS 1x por 2 minutos;
- g. incubou-se a lâmina em solução de DAPI 1,25 $\mu$ L/mL por 10 minutos no escuro;
- h. sem que a lâmina estivesse completamente seca foi feita a montagem com *antifading* (Vectashield) e lamínula.

Coloração FPG (*Fluorochrome Plus Giemsa*) após incorporação de 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) (DUTRILLAUX E COUTURIER, 1981)

- a. a lâmina foi corada com solução de Hoechst 33258 na concentração de 10  $\mu$ g/mL, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e lavada com água destilada;
- b. em seguida, foi lavada rapidamente em solução de 2xSSC;
- c. pingou-se duas a três gotas de 2xSSC e a lâmina foi coberta com lamínula;
- d. a lâmina foi incubada em câmara úmida sob luz negra por 2 horas;
- e. após esse tempo, a lâmina foi lavada com água destilada retirando-se a lamínula;
- f. em seguida, foi incubada em solução de 2xSSC a 60°C, por 20 minutos, e lavada em água destilada;
- g. por fim a lâmina foi corada com solução de Giemsa, a mesma utilizada para coloração convencional, por 7 minutos, e lavada, em seguida, em água destilada.

Uma variante da técnica de FPG, é baseada em Matsuda e Chapman (1995) na qual, após a coloração com solução de Hoechst 33258 (10  $\mu$ g/mL) durante 20 minutos e montagem com 2xSSC e lamínula, a lâmina foi colocada diretamente sobre uma placa metálica mantida em estufa a 65°C, por 4 minutos e, em seguida, foi exposta à luz negra, durante 10 minutos. Os demais passos são os mesmos descritos acima.

Hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr (PINKEL et al., 1986)

- a. as lâminas foram incubadas em 100 $\mu$ L de RNase (0,4 % RNase/2xSSC) a 37° C por 1h em câmara úmida;
- b. as lâminas foram lavadas 3x em solução de 2xSSC à temperatura ambiente, por cinco minutos cada;
- c. as lâminas foram lavadas durante 5 min em Triton 1x (agitar);
- d. as lâminas foram desidratadas em série alcoólica 70%, 90% e 100% por 5 minutos cada e, em seguida, foram secas;
- e. o DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC a 70° por 2 minutos (o tempo variou de acordo com o material);
- g. desidratou-se as lâminas em série alcoólica gelada 70%, 90% e 100% por 5 min cada e, em seguida, foram secas;
- h. a solução de hibridação foi preparada em um microtubo onde foram adicionados 3 $\mu$ L da sonda marcada e 10 $\mu$ L de tampão de hibridação (*Hybuffer*) para cada lâmina;
- i. a solução de hibridação foi desnaturada em termociclador a 95°C por 10 minutos. A temperatura de manutenção foi de 37°C;
- j. montou-se cada lâmina com 13 $\mu$ L de solução de hibridação, cobriu-se com lamínula, e foram mantidas overnight a 37° C em câmara úmida;
- k. retirou-se as lamínulas com cuidado e enxaguou-se as lâminas em 0,4xSSC + 0,3% Triton a 70°C por exatos 2 minutos (*shaker*);
- l. as lâminas foram enxaguadas em 2xSSC + 0,1% Triton à temperatura ambiente por 2 minutos (agitar);
- m. sobre cada lâmina, foi colocado aproximadamente 30 $\mu$ L de tampão de bloqueio, e cobertas com lamínula ou parafilm, em seguida, foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e enxaguadas brevemente em 2xSSC a temperatura ambiente;

- n. sobre cada lâmina colocou-se com 4 $\mu$ L de anti digoxigenina rodamina (solução mãe 100 $\mu$ g/mL) e 26 $\mu$ L de tampão de bloqueio e incubou-se durante 1h em câmara escura, a temperatura ambiente;
- o. as lâminas foram lavadas por 2xSSC a 43°C 2 minutos com (agitar);
- p. em seguida foram lavadas 2x com 2xSSC + 0,1% Triton a 43°C por 2 minutos (agitar);
- q. as lâminas foram desidratadas em série alcoólica 70%, 90% e 100% por 5 min cada e, em seguida, foram secas;
- r. foi colocado sobre cada lâmina aproximadamente 15 $\mu$ L de solução de DAPI+*antifading* (Vectashield) e, em seguida, foram cobertas com lamínula, guardadas em geladeira protegidas da luz.

Hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica conforme as instruções do fabricante do Kit K5325 da marca DAKO

- a. a lâmina foi incubada em solução TBS 1 por 2 minutos;
- b. incubou-se a lâmina em solução de formaldeído 3,7% diluído em TBS por exatamente 2 minutos;
- c. a lâmina foi incubada em solução TBS\* 1 e 2 por 5 minutos cada banho;
- d. incubou-se a lâmina em solução de pré tratamento\* diluída em TBS por 10 minutos;
- e. incubou-se a lâmina em solução TBS 3 e 4 por 5 minutos cada banho;
- f. incubou-se a lâmina em álcool 70%, 85% e 95% gelado por 2 minutos cada banho e a lâmina foi seca ao ar;
- g. colocou-se 10 $\mu$ L da solução da sonda\*, cobriu-se com lamínula e incubou-se a 80°C por 5 minutos;

- h.** a lâmina foi colocada em caixa escura por 30 minutos à temperatura ambiente;
- i.** passou-se rapidamente a lâmina pela solução de enxágue\*, para remover a lamínula;
- j.** a lâmina foi incubada em solução de lavagem\* pré aquecida a 65°C por 5 minutos;
- k.** incubou-se a lâmina em álcool 70%, 85% e 95% gelado por 2 minutos cada banho;
- l.** a lâmina foi incubada em solução de DAPI 1,25µL/mL por 10 minutos no escuro;
- m.** sem que a lâmina estivesse completamente seca foi feita a montagem com *antifading* (Vectashield) e lamínula.

\* soluções fornecidas pelo Kit.

#### 4.3. ANÁLISES CROMOSSÔMICAS

As preparações cromossômicas submetidas aos diferentes procedimentos de coloração e de marcação cromossômica foram analisadas ao microscópio de luz comum e luz UV. As melhores metáfases mitóticas e fases meióticas foram fotografadas utilizando-se o microscópio Olympus BX51 equipado com sistema de captura digital de imagens DP71. As cópias do material foram obtidas no computador. A montagem dos kariogramas foi feita de acordo com a morfologia dos cromossomos e em ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos de dois braços foram chamados de metacêntricos, submetacêntricos ou subtelocêntricos (GREEN e SESSIONS, 1991, 2007).

## 5 RESULTADOS

---

Em todas as espécies estudadas, a análise dos cromossomos confirmou o número diploide de  $2n=24$ , sendo seis pares de cromossomos grandes e seis pares de cromossomos pequenos. Nos representantes do clado de *Scinax catharinae*, *S. albicans*, *S. argyreornatus*, *S. hiemalis*, *S. littoralis* e *Scinax* sp. gr. *catharinae* (Figura 3), os pares 1 a 5 e 7 são submetacêntricos, o par 6 é subteloentrico e os demais, de 8 a 12 são metacêntricos, sendo que a diferença de tamanho entre os pares decresce gradualmente a partir do primeiro até o último, enquanto nas espécies do clado de *S. ruber*, *S. caldarum*, *S. crospedospilus*, *S. eurydice* e *S. fuscovarius* (Figura 4), os pares 1, 2 e de 7 a 12 são metacêntricos, e os demais de 3 a 6 são submetacêntricos, sendo que a diferença de tamanho entre os pares decresce gradualmente a partir do segundo até o último par porque o par 1 é bem maior que o par 2. Condições secundárias estão presentes na região proximal dos braços curtos dos cromossomos do par 6 em todas as espécies do clado de *S. catharinae*, embora nem sempre visualizadas em todas as metáfases analisadas, enquanto nas espécies do clado de *S. ruber* as condições secundárias estão presentes nos cromossomos do par 11, na região terminal dos braços longos em *S. eurydice* e *S. hayii* e na região intersticial dos braços longos em *S.*

*crospedospilus* e *S. fuscovarius*. Em *S. fuscovarius* um dos cromossomos do par 12 apresenta adicionalmente uma constrição secundária, enquanto em *S. caldarum* constrições não foram observadas.

A técnica de impregnação pela prata mostrou que os organizadores nucleolares estão localizados nas regiões correspondentes a das constrições secundárias (Figuras 3 e 4), isto é, nos cromossomos do par 6 nas espécies do clado de *S. catharinae* e nos cromossomos do par 11 nas espécies do clado de *S. ruber* e no sítio adicional de um dos cromossomos do par 12 em *S. fuscovarius*. Em *S. caldarum*, que não apresentou constrições secundárias, as RONS estão localizadas na região intersticial dos braços curtos dos cromossomos do par 11. Resultado de hibridação com sonda de DNAr (HM123) foi obtido apenas nos cromossomos de *Scinax* sp. gr. *catharinae* e mostrou marcação na mesma região previamente identificada pela impregnação da prata (Figura 3e). A técnica de FISH utilizando sondas de DNAr foi aplicada no material de diversas espécies, mas sem obtenção de resultado.

Bandas de replicação foram obtidas para a espécie *Scinax hiemalis* do clado de *S. catharinae*, e para *S. crospedospilus* e *S. eurydice* do clado de *S. ruber* (Figuras 5 e 6). Nas referidas figuras são apresentados também os padrões de bandas de replicação já obtidos anteriormente em nosso laboratório para os cromossomos de *S. fuscovarius* e *S. similis*, visando a comparação com os resultados obtidos nas espécies do presente trabalho. A montagem dos cariogramas com banda de replicação nos cromossomos de *S. littoralis* foi dificultada pela presença de muitas superposições. Por esse motivo é apresentada apenas a montagem de um conjunto haploide na Figura 6 comparativa, pois outras metáfases não exibiram padrão adequado para a análise.

Embora a resolução dos padrões de bandas seja limitada, especialmente no representante do clado de *S. catharinae*, as bandas facilitaram a identificação dos homólogos em cada uma das espécies (Figura 5) e comprovou-se que as discrepâncias observadas nos pares 3 e 4 dos dois representantes de *S. similis* é decorrente de rearranjo estrutural (Figura 5 e-g). Os cromossomos com bandas de representantes dos dois clados foram comparados e foi possível verificar correspondência dos padrões, com exceção

dos apresentados nos cromossomos dos pares 1 e 2 quando comparadas espécies do clado de *S. catharinae* com as do clado de *S. ruber* (Figura 6). Nas espécies do clado de *S. catharinae* os referidos cromossomos têm os braços curtos menores do que nas espécies do clados de *S. ruber*, enquanto os braços longos dos mesmos cromossomos apresentam correspondência de tamanho e bandas.

Hibridação com sondas teloméricas identificou apenas as regiões terminais de todos os cromossomos nas espécies *S. hiemalis*, *S. littoralis*, *Scinax* sp. gr. *catharinae*, *S. crospedospilus* e *S. hayii* (Figura 7). Não foram observadas marcações da sonda (TTAGGG)<sub>n</sub> fora dos telômeros em nenhuma das espécies.

A técnica da banda C foi aplicada nos cromossomos das espécies de *Scinax* do presente trabalho, mas foram obtidos resultados apenas para *S. albicans*, *S. argyreornatus*, *S. littoralis*, *S. crospedospilus*, *S. fuscovarius* e *S. hayii*. Marcações centroméricas pouco discriminadas e de tamanho pequeno foram observadas em todos os cromossomos (Figura 8). A coloração com o fluorocromo CMA<sub>3</sub> evidenciou marcações brilhantes na região das RONS em todas as espécies (Figuras 9 e 10) e adicionalmente em *S. crospedospilus*, *S. hayii* e *S. littoralis*, esse fluorocromo marcou, ainda que menos evidente, os centrômeros dos cromossomos. O fluorocromo DAPI não revelou nenhuma região particularmente brilhante nos cromossomos das espécies estudadas, que apareceram corados de forma homogênea (Figuras 9 e 10). Apenas *S. caldarum* não teve seus cromossomos corados com fluorocromos por falta de material citológico.

Dos exemplares machos das espécies *S. argyreornatus*, *S. hiemalis*, *S. littoralis*, *S. caldarum*, *S. crospedospilus*, *S. eurydice* e *S. hayii* foi possível realizar a análise de células meióticas obtidas da preparação dos testículos. Nas células em metáfase I foram observados 12 bivalentes e, nas células em metáfase II, foram observados 12 cromossomos (Figura 11). Não foram observados bivalentes heteromórficos que pudessem sugerir a presença de cromossomos sexuais diferenciados do tipo XY.

## 6 DISCUSSÃO

---

O número diploide  $2n=24$  e o número fundamental  $FN=48$ , usualmente observados nos representantes de *Scinax*, foram confirmados para as espécies aqui analisadas, incluindo *S. caldarum*, *S. crospedospilus* e *Scinax* sp. gr. *catharinae* que têm seus cromossomos apresentados pela primeira vez no presente trabalho. Esse número cromossômico tem sido observado nas demais espécies do gênero, embora exista relato de  $2n=22$  e  $FN=40$  em *S. constrictus* (PEREIRA et al., 2009, AGUIAR et al., 2010). Segundo Faivovich et al. (2005), a característica de cariótipos com 24 cromossomos é uma das sinapomorfias que suportam a monofilia da subfamília Hylinae e é o número prevalente entre os gêneros da tribo Dendropsophini na qual *Scinax* se inclui (SUAREZ et al., 2013) e, também, entre as espécies das demais tribos que compõe a subfamília, isto é, Cophomantini, Hylini e Lophiohyliini (CATROLI e KASAHARA, 2009, CATROLI et al., 2011, GRUBER, 2013). Dentre os Hylinae, números diploides discrepantes foram eventualmente observados em espécies de *Acris*, *Bokermannohyla*, *Hypsiboas*, *Osteopilus*, *Phyllodytes* e *Pseudis*, mas é o gênero *Dendropsophus* que chama atenção porque todas as espécies cariotipadas até o momento apresentam  $2n=30$  (CATROLI e KASAHARA, 2009).

A constituição cariotípica das espécies de nossa amostra exibiu as características descritas até então para cada clado (CARDOZO et al., 2011), isto é, pares 1 e 2 submetacêntricos com pouca diferença de tamanho entre si nas espécies do clado de *Scinax catharinae*, e pares 1 e 2 metacêntricos, o primeiro bem maior que o segundo, nas espécies do clado de *S. ruber*. Essas observações também foram válidas para os cariótipos de *S. caldarum*, *S. crospedospilus* e *Scinax* sp. gr. *catharinae*, reforçando que a distinção cariotípica entre os cladogramas é constante e válida para todas as espécies do gênero estudadas até o momento. No entanto, não se pode avaliar o caso de *S. constrictus*, pois as informações disponíveis se restringem a um breve relato sobre o número diploide reduzido, sem qualquer menção sobre a morfologia dos cromossomos (PEREIRA et al., 2009, AGUIAR et al., 2010).

Os primeiros relatos de diferenças cariotípicas entre espécies de *Scinax* foram de Bogart (1973). O autor observou que *S. albicans* e *S. brieri* (atualmente do grupo *S. catharinae* do clado de *S. catharinae*) tinham mais cromossomos submetacêntricos do que *S. rostratus* e *S. ruber* (atualmente do clado de *S. ruber*) e que *S. perpusillus* (atualmente do grupo *S. perpusillus* do clado de *S. catharinae*) teria um cariótipo intermediário entre esses dois grupos. Nossa amostra do clado de *S. catharinae* incluiu apenas espécies do grupo de *S. catharinae*, mas no trabalho de Cardozo et al. (2011) não foi constatada diferença na constituição cromossômica entre as espécies dos grupos de *S. catharinae* e *S. perpusillus*.

Com relação ao clado de *S. ruber*, não temos em nossa amostra nenhum representante dos grupos de *S. rostratus* e de *S. uruguayus*, sendo que todas as espécies aqui analisadas estão incluídas na classificação de “sem grupo” (FAIVOVICH et al., 2005). Entretanto, no trabalho de Cardozo et al. (2011) não foram observadas diferenças na morfologia dos cromossomos entre as espécies do clado de *S. ruber*, incluídas ou não em grupos distintos. É importante enfatizar que tal constituição cariotípica é altamente similar àquela descrita para a grande maioria dos representantes de Hylinae com  $2n=24$ , mesmo que distribuídas por distintos gêneros (BOGART, 1973, CARDOZO et al., 2011, GRUBER, 2013).

Além da diferença na constituição cariotípica, a localização dos sítios de Ag-RONs nos representantes de *Scinax* já havia sido revelada como um

importante marcador adicional para diferenciar citologicamente os dois clados. Os dados de Ag-RON de nossa amostra confirmaram o que foi usualmente observado, isto é, nas espécies do clado de *S. catharinae* as Ag-RONs estão nos braços curtos dos cromossomos 6, sempre na região proximal. Apenas em *S. canastrensis* as Ag-RONs foram localizadas no par 11 e esta posição foi considerada como um exemplo de reversão (CARDOZO et al., 2011). Nas espécies do clado de *S. ruber* os sítios ribossômicos estão invariavelmente localizados nos cromossomos 11, porém, em posições distintas, isto é, na região intersticial ou terminal dos braços longos (CARDOZO et al., 2011). A marcação observada intersticialmente nos braços curtos do 11 em *S. caldarum* representa, pois, uma nova variação dentro do clado.

A presença de marcações adicionais de Ag-RON, como a do par 12 de nossa amostra de *S. fuscovarius* (clado de *S. ruber*) e a do cromossomo 11 em *S. canastrensis* (clado de *S. catharinae*), são consideradas condições derivadas.

Segundo revisão da literatura (CARDOZO et al., 2011), os sítios ribossômicos nas espécies do clado de *Scinax ruber* têm sido descritos sempre em cromossomos pequenos, porém, identificados como sendo os do par 10, 11 ou 12, provavelmente, pela dificuldade de distinção entre os cromossomos dos últimos pares que são de tamanho e morfologia semelhantes. Apesar de serem nominados de formas distintas, os cromossomos portadores das RONS podem ser considerados como equivalentes, não somente nas espécies do clado de *S. ruber*, mas também em relação a vários outros representantes de gêneros de Hyalinae com  $2n=24$ , sendo, portanto, uma característica plesiomórfica da subfamília (CARDOZO et al., 2011). Trabalho baseado na comparação dos padrões de bandas de replicação (KASAHARA et al., 2003) mostrou que existe, de fato, homeologia entre os cromossomos portadores de Ag-RONs de *S. fuscovarius* (clado de *S. ruber*), referidos como cromossomos 12, e de espécies de outros gêneros de Hyalinae com  $2n=24$ .

Bandas de replicação obtidas pela primeira vez no presente trabalho para espécies de *Scinax* do clado de *S. catharinae* representaram uma oportunidade para se comparar as duas constituições cariotípicas do gênero, trazendo novas informações sobre o mecanismo que levou à diversificação maior dos cariótipos, representada basicamente pelo tamanho distinto dos

braços curtos dos cromossomos 1 e 2, que nas espécies do clado de *S. catharinae* são bem menores nos respectivos cromossomos das espécies do clado de *S. ruber*. Possíveis mecanismos que poderiam ter originado tal diferença haviam sido aventados por Cardozo et al. (2011), como por exemplo, inversões pericêntricas ou adição/perda de regiões repetitivas. No entanto, a presente comparação dos padrões de bandas de replicação é altamente sugestiva de que, de fato, trata-se de deleção nos braços curtos dos cromossomos 1 e 2 nas espécies do clado de *S. catharinae*. Isso é bem evidente no caso do cromossomo 1, o qual tem uma extensa região intersticial de coloração mais clara nas espécies do clado de *S. ruber*, mas que está ausente no 1 das espécies do clado de *S. catharinae*. A coloração do referido segmento dá suporte à hipótese de que corresponde a uma região contendo DNA repetitivo de replicação tardia. Embora isso não seja tão evidente para os braços curtos do cromossomo 2, a explicação mais parcimoniosa para a diferenciação dos cariótipos dos diferentes clados de *Scinax* é a deleção de regiões repetitivas em ambos os cromossomos. Os braços longos dos cromossomos 1 e 2, assim como os demais elementos das duas constituições cariotípicas, parecem ser equivalentes.

Considerando que as espécies do clado de *S. ruber* têm sua constituição cariotípica semelhante àquela apresentada por outros gêneros de *Hylinae*, podemos dizer que seria a mais ancestral, enquanto a constituição apresentada pelas espécies do clado de *S. catharinae* seria derivada, e o processo de diferenciação provavelmente incluiu perda de regiões cromossômicas nos cromossomos 1 e 2. Novas abordagens utilizando técnicas de citogenética molecular serão essenciais para confirmar essa hipótese. Nossas conclusões dão suporte inequívoco para sugestão de que a denominação *Scinax* abriga dois gêneros (POMBAL Jr. et al., 1995, FAIVOVICH, 2002) e, nesse caso, o grupo mais derivado representado pelas espécies do clado de *S. catharinae* comporia o novo gênero, enquanto as espécies do clado de *S. ruber* permaneceriam com a denominação *Scinax*.

A obtenção de bandas de replicação ao longo dos cromossomos foi útil para se esclarecer o caso de heteromorfismo em dois pares de cromossomos em um dos exemplares de *Scinax similis* (LEME, 2005, CARDOZO et al., 2011). Embora mesmo com a observação do cariótipo com coloração

convencional fosse forte a sugestão de que o heteromorfismo fosse resultado de translocação recíproca, houve confirmação inequívoca pela análise das bandas. Como o rearranjo foi observado em apenas um dos exemplares da amostra de *S. similis*, este caso se trata provavelmente de um evento esporádico que pode ocorrer em populações naturais.

O presente trabalho representou um esforço de aprofundar a caracterização citogenética com uma amostra que inclui espécies ou populações de *Scinax* ainda não cariotipadas, com utilização de técnicas de coloração e bandamento que não têm sido usualmente empregadas. Esses resultados acrescentam dados sobre a variação informativa dentro do gênero.

A presença de marcações adicionais de Ag-RON, como a do par 12 de nossa amostra de *S. fuscovarius* (clado de *S. ruber*), é considerada condição derivada (CARDOZO et al., 2011). Exemplares de *S. fuscovarius* provenientes de outras localidades não apresentaram marcação adicional de Ag-RON (Tabela 1), portanto, essa deve ser uma característica da população amostrada, proveniente de Biritiba Mirim. Relatos de variação de Ag-RON simples e múltiplas haviam sido descritos em *S. canastrensis* e *S. hayii* por Cardozo et al. (2011), mas esses autores também não empregaram FISH com sonda de DNAr. Nos três casos não é possível afirmar se as marcações adicionais de Ag-RON representam sítios verdadeiros de DNAr ou se são resultado de marcação inespecífica da prata em regiões heterocromáticas (FAGUNDES, 1997, SILVA et al., 2006). No único caso da presente amostra no qual o FISH produziu resultado, a hibridação da sonda HM123 ocorreu no sítio previamente identificado pelo nitrato de prata em *Scinax* sp. gr. *catharinae*.

Em nove das espécies do presente trabalho, com exceção de *S. caldarum*, as RONS foram identificadas pelo CMA<sub>3</sub>, fato esse que ocorre comumente. Segundo Schmid (1982) e Kasahara et al. (2003), a heterocromatina que intercala os cístrons ribossômicos é rica em bases GC e pode ser identificada pela técnica da impregnação pela prata ou pela coloração com o CMA<sub>3</sub> e sequências repetitivas dessa natureza podem ocorrer de forma não associada às sequências ribossômicas (FAGUNDES, 1997, SILVA et al., 2006). É interessante notar que o sítio adicional de Ag-RON no cromossomo 12 de *S. fuscovarius* também foi identificado pelo CMA<sub>3</sub>.

Segundo Cardozo et al. (2011), a quantidade de heterocromatina evidenciada pela técnica de bandamento C, que no clado de *S. catharinae* é maior que no clado de *S. ruber*, seria outra característica que diferencia os cariótipos dos dois clados de *Scinax*. Na presente amostra, o padrão de banda C obtido em espécies de ambos os clados é equivalente, com bandas centroméricas pouco discriminadas e de tamanho pequeno. Os fluorocromos base-específicos DAPI e CMA<sub>3</sub> podem ajudar na caracterização das regiões heterocromáticas, indicando a riqueza de bases AT ou GC das sequências repetitivas. Três das espécies, *Scinax littoralis*, *S. crospeospilus* e *S. hayii*, apresentaram marcação centromérica brilhante com CMA<sub>3</sub>, sugerindo a presença de sequências repetitivas com natureza distinta daquela presente nas demais espécies de *Scinax* analisadas. Tal característica de heterocromatina centromérica rica em bases GC não é exclusiva de um dos clados, enfraquecendo a sua utilização como caráter marcador para distinção de clado, mas parece estar presente em diversas espécies do gênero, uma vez que também foi observada por Oliveira (2011) nas espécies *S. catharinae*, *Scinax* aff. *alter* e *S. perereca*. Quando corados com DAPI os cromossomos das espécies de *Scinax* analisados no presente trabalho não apresentaram nenhuma região particularmente brilhante, o mesmo resultado observado por Oliveira (2011).

Hibridação de sondas teloméricas em sítios intersticiais nos cromossomos poderia ajudar no esclarecimento da história evolutiva (evolução cromossômica) por rearranjos estruturais (FAGUNDES e YONENAGA-YASSUDA, 1998). Entretanto, nos cariótipos de *Scinax* não foram evidenciados resquícios intersticiais de telômero nas cinco espécies testadas, *S. hiemalis*, *S. littoralis*, *Scinax* sp. gr. *catharinae*, *S. crospeospilus* e *S. hayii*, nas quais as sondas teloméricas identificaram apenas as extremidades dos cromossomos. Tampouco foram identificadas regiões de DNA repetitivo semelhante à sequência (TTAGGG)<sub>n</sub>, com já observado em espécies de *Aplastodiscus* (GRUBER et al., 2012). Marcação das sondas (TTAGGG)<sub>n</sub> fora dos telômeros foi identificada na espécie *Scinax* aff. *alter* (OLIVEIRA, 2011) mas não foi comentado se esta se trata de resquícios de telômeros verdadeiros ou de sequências repetitivas semelhantes à (TTAGGG)<sub>n</sub> e tampouco avaliado o seu significado evolutivo.

A análise da meiose revelou o número esperado de 12 bivalentes nas células em metáfase I e de 12 cromossomos nas células em metáfase II. Não foi observado bivalente heteromórfico ou heteropicnótico que pudesse sugerir a presença de cromossomos sexuais diferenciados do tipo XY nos exemplares machos estudados. Cromossomos sexuais XY foram descritos em *Scinax tripui* por Oliveira (2013), que notou apenas nos machos da amostra de uma localidade presença de heteromorfismo em um par cromossômico. Embora tal achado não tenha sido confirmado pela análise da meiose ou por técnicas de citogenética molecular, trata-se da primeira descrição de cromossomos sexuais em *Scinax*.

## 7 CONCLUSÃO

---

As relações filogenéticas entre as espécies de *Scinax* não são fáceis de serem interpretadas e, apesar das dificuldades taxonômicas, os dados de biologia e filogenia, sugerem a divisão de *Scinax* em dois gêneros. Ainda que o número de espécies analisadas citogeneticamente ainda não seja grande, os dados obtidos no presente trabalho corroboram a subdivisão em grupos infragenéricos. Adicionalmente, ampliando o número de espécies estudadas e com o uso de mais marcadores de citogenética molecular, as análises cromossômicas poderão futuramente contribuir também com o esclarecimento das relações filogenéticas dentro de cada um dos clados de *Scinax*.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. C. S. et al. Análise cariotípica de 24 espécies de anfíbios anuros de áreas antropizadas do bioma cerrado do estado de Goiás. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 56., Guarujá, SP, p. 358, 2010.
- ANDERSON, K. Chromosome evolution in Holarctic *Hyla* tree frogs. In: D. M. Green e S. K. Sessions (eds.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego, Academic Press, 1991. p. 299-331.
- BALDISSERA JR., F. A.; BATISTIC, R. F. Estudos citogenéticos em banda C e RON de algumas espécies de anuros brasileiros. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP, v. 15, n. 1, p. 78, 1992.
- BALDISSERA JR.; F. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; KASAHARA, S. Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia-Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, SP, v. 16, n. 2, p. 335-345, 1993.
- BARRIO, A. e RUBEL, P. D. Características del cariotipo de los Pseudidos (Amphibia–Anura). **Physis**, Buenos Aires, Argentina, v. 79, p. 505-510, 1970.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. **Caryologia**, Florença, Itália, v. 21, p. 191-208, 1968.
- BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. **Columbia**, University of Missouri, cap. 12, 1973.

BOGART, J. P. e BOGART, J. E. Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. **Herpetologica**, Lafayette, EUA, v. 27, p. 229-235, 1971.

BORTOLETO, J. F.; KASAHARA, S.; HADDAD, C. F. B. Aspectos citogenéticos de *Scinax hayii*, com base em análises com coloração convencional e diferencial. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 16., UNESP, Ilha Solteira, SP, 2004.

CATROLI G. F. e KASAHARA, S. Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): Results and perspectives. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, PR, v. 15, n. 1, p. 67-85, 2009.

CATROLI, G. F. et al. Conserved karyotypes in Cophomantini: Cytogenetic analysis of 12 species from 3 species groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). **Journal of Herpetology**, Athens, Ohio, EUA, v. 45, p. 120-128, 2011.

CARDOZO, D. E. et al. Kariotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): Diversity and informative variation. **Copeia**, Lawrence, EUA, n. 2, p. 251-263, 2011.

CARDOZO, D. e BALDO, D. Cariologia de 5 espécies de *Scinax* Wagler, 1830 del clado *Scinax ruber*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 52., e **CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINO AMERICANA DE GENÉTICA**, 12., Foz de Iguaçu, PR, CD-ROM, p. 319, 2006.

CHRISTIAN, A. et al. A versatile image analyses approach for simultaneous chromosome identification and localization of FISH probes. **Cytogenetic and cell genetics**, Basileia, Suíça, v. 82, p.172-179, 1998.

CUNHA, A. K. et al. Citogenética comparativa de quatro espécies do gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) da Mata Atlântica-Paraná. In: **ENCONTRO PARANAENSE DE GENÉTICA**, 10., Londrina, PR, p. 19, 2010.

DUELLMAN, W. E. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. **Systematic Zoology**, Washington, EUA, v. 16, p. 38-43, 1967.

DUELLMAN, W. E.; COLE, C. Studies of chromosomes of some anuran amphibians (Hylidae and Centronelidae). **Systematic Zoology**, Washington, EUA, v. 14, p. 139-143, 1965.

DUELLMAN, W. E. e WIENS, J. The status of the Hylid frog genus *Ololygon* and the recognition of *Scinax* Wagler, 1830. **Occasional Papers of the Museum of Natural History The University of Kansas**, Lawrence, Kansas, n. 151, p. 1-23, 1992.

DUTRILLAUX, B. e COUTURIER, J. La Pratique de l'analyse chromosomique. **Masson**, Paris, 1981.

FAGUNDES, V. e YONENAGA-YASSUDA, Y. Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. **Chromosome Research**, Oxford, Inglaterra, v. 6, p. 643-648, 1998.

FAGUNDES, V., 1997. **Contribuição da citogenética molecular no entendimento da evolução cromossômica no gênero *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae)**. Tese-(doutorado)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FAIVOVICH, J. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). **Cladistics**, Westport, Connecticut, EUA, v. 18, p. 367–393, 2002.

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

FITZINGER, L. J. F. J. **Systema Reptilium**. Wien: Braunmuller and Seidel, [S.l.:s.n], v. 1, 1843.

FOUQUETTE, M. J. e DELAHOUSSEY, A. J. Sperm morphology in the *Hyla rubra* group (Amphibia, Anura, Hylidae), and its bearing on generic status. **Journal of Herpetology**, Athens, Ohio, EUA, v. 1, n. 4, p. 387-396, 1971.

FORESTI, F. **Aspectos cromossômicos da família Hylidae (Amphibia-Anura)**. 1972. 80f.Dissertação-(mestrado)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1972.

FROST, D. R. 2014. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. v. 6.0 (10, September, 2014). Electronic Database accessible at <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibian/index.html>>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acesso em 06 de jan 2015.

GREEN, D. M. e SESSIONS, S. K. Nomenclature for chromosomes. In: (\_\_\_\_\_) (eds.) **Amphibian Cytogenetics and Evolution**. San Diego, Academic Press, 1991. p. 393-430.

GREEN, D. M. e SESSIONS, S. K. Karyology and cytogenetics. In: Heatwole, H. e Tyler, M. (eds.). **Amphibian Biology**. v. 7. Chipping Norton, Surrey Beatty and Sons, Australia, 2007.p. 2756–2841.

GRUBER, S. L. et al. 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**, Dordrecht, Holanda, v. 130, p. 281-291, 2007.

GRUBER, S. L. Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylinae, Hylidae). **BMC Genetics**, United Kingdom, n. 13, v. 28, 2012.

GRUBER, S. L. **Mecanismos de evolução cromossômica e diferenciação cariotípica em espécies das subfamílias Hylinae (tribos Cophomantini e Lophiohylini) e Phyllomedusinae (Hylidae, Anura, Amphibia)**. 2013. 179 f. Tese-(doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, SP, 2013.

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

KASAHARA, S.; SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, SP, v. 2, p. 237-242, 1996.

KASAHARA, S.; SILVA, A. P. Z.; GRUBER, S. L. Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia), **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP, v. 21, p. 1-11, 1998.

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

LAURENTI, J. N.. Specimen Medicum, Exhibens Synopsin Reptilium Emendatum cum Experimentis Circa Venena et Antidota Reptilium Austriacorum. **Thom. nob. de Trattner**, Wien, Austria: Joan., 1768

LEME, D. M. et al. Avaliação dos padrões cariotípicos no gênero *Scinax* (Hylidae, Anura), baseada na análise de nove espécies. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA**, 25., Brasília, DF, Livro de Resumos, p. 203, 2004a.

LEME, D. M.; HADDAD, C.F.B.; KASAHARA, S. Análise citogenética de cinco espécies do gênero *Scinax* (Hylidae, Anura). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 50., Brasília, DF, 2004b.

LEME, D. M. **Estudos citogenéticos de anfíbios anuros da fauna brasileira**. 2005. 66f. Trabalho de conclusão de curso-(graduação)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro-SP, 2005.

MEUNIER-ROTIVAL, M. et al. Isolation and organization of calf ribosomal DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, Inglaterra, v. 6, p. 2109-2123, 1979.

MORAES, R. A.; SAWAYA, R. J.; BARRELLA, W. Composição e diversidade de anfíbios anuros em dois ambientes de Mata Atlântica no Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, SP, v. 7, p. 27-36, 2007.

- NERI, T. S. et al. Estudo citogenético de três espécies de *Scinax* (Anura, Hylidae) no município de Jequié-BA. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 55., Águas de Lindóia, SP, p. 114, 2009.
- NUNES, R. R. A. e FAGUNDES, V. Cariótipos de oito espécies de anfíbios, das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura. Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. **Boletim de Biologia do Museu de Biologia Mello Leitão**, Santa Tereza, ES, v. 23, p. 21-36, 2008.
- OLIVEIRA, A. K. C. **Estudo de comunidade de anuros e citogenética do gênero *Scinax* em área de ecótono no Paraná**. 2011. 88 f. Dissertação-(mestrado)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- OLIVEIRA, M. P. da C. **Variação Citogenética em populações de *Scinax tripui* Lourenço, Nascimento e Pires, 2009 (Anura, Hylidae): Primeira detecção de sistema de cromossomos sexuais no gênero**. 2013. 39 f. Dissertação-(mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.
- PEREIRA, R. R. et al. Estudos citogenéticos de 23 espécies de anfíbios anuros do cerrado do Estado de Goiás, Brasil. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 55., Águas de Lindóia, SP, Brasil, p. 104, 2009.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, EUA, v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- POMBAL JR., J. P.; HADDAD C. F. B.; BASTOS R. B. Vocalizações de algumas espécies do gênero *Scinax* (Anura: Hylidae sudeste do Brasil e comentários taxonômicos). **Naturalia**, São Paulo, v. 20, p. 213-225, 1995.
- PYRON, R. A. e WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revises classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, Flórida, EUA, v. 61, p. 543-583, 2011.
- RABELLO, M. N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. **Caryologia**, Florença, Itália, v. 23, p. 45-59, 1970.
- RABELLO, M. N.; BEÇAK, M. L.; BEÇAK, W. Contribuição a citotaxonomia da família Hylidae. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, RJ, v. 54, p. 285-286, 1971.
- RIBEIRO, M. S. et al. Caracterização citogenética de *Scinax centralis*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 52., Foz do Iguaçu, PR, p. 204, 2006.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizers regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, Berlim, Alemanha, v. 66, p. 361-388, 1978.

- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NOR in Anura. **Chromosoma**, Berlim, Alemanha, v. 87, p. 327-344, 1982.
- SILVA, A. P. Z.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. **Cytobios**, Cambridge, Inglaterra, v. 103, p. 25-38, 2000.
- SILVA, A. P. Z. et al. Multiple nucleolus organizer in *Leptodactylus mystacinus* (Amphibia, Anura) and comments on its systematic position in the *L. fuscus* group based on cytogenetic and molecular analysis. **Genetica**, Dordrech, Holanda, v. 127, p. 35-44, 2006.
- SOUZA, V. T. et al. Cytogenetic study of two species of the genus *Scinax* (Anura, Hylidae). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 57., Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, p. 54, 2011.
- SUÁREZ, P. et al. Chromosome evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hylinae). **Cytogenetic Genome Research**, Basileia, Suíça, v. 141, p. 295-308, 2013.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, Nova York, EUA, v. 75, p. 304-306, 1972.
- TRENTIN, L. Caracterização cromossômica de duas espécies do gênero *Scinax* do grupo *Scinax ruber* (Anura, Hylidae). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA**, 53., Águas de Lindoia, SP, Brasil, CD-ROM, p. 322, 2011.
- WAGLER, J. G. Natürliches System der Amphibien, mit Vorangehender Classification der Säugethiere und Vogel. München, **Stuttgart and Tubingen: J. G. Cotta**, [S.l.], 1830.
- WIENS, J. J. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, Flórida, EUA, v. 55, p. 871-882, 2010.

## Legendas das Figuras

**Figura 3.** Cariótipos com  $2n=24$  das espécies do clado de *Scinax catharinae* com coloração convencional. **a.** *S. albicans*, macho; **b.** *S. argyreornatus*, macho; **c.** *S. hiemalis*, macho; **d.** *S. littoralis*, macho; **e.** *Scinax* sp. gr. *catharinae*, fêmea. Notar constrições secundárias em cromossomos do par 6 (setas). Nos destaques, o par 6 com Ag-RONs. Apenas em **e** par 6 com Ag-RON (esquerda) e após FISH com sonda de DNAr (direita). Bar = 10  $\mu$ m.

**Figura 4.** Cariótipos com  $2n=24$  das espécies do clado de *Scinax ruber* com coloração convencional. **a.** *S. caldarum*, macho; **b.** *S. crospedospilus*, macho; **c.** *S. eurydice*, macho; **d.** *S. fuscovarius*, fêmea; **e.** *S. hayii*, macho. Notar constrições secundárias em cromossomos do par 11, e em um dos cromossomos do par 12 em *S. fuscovarius* (setas). Nos destaques, o par 11 com Ag-RONs. Apenas em **d** marcação de Ag-RON adicional em um cromossomo do par 12 de *S. fuscovarius*. Bar = 10  $\mu$ m.

**Figura 5.** Bandas de replicação após incorporação por BrdU em espécies de *Scinax*. **a.** Espécie do clado de *S. catharinae*: *S. hiemalis*; **b-e.** Espécies do clado de *S. ruber*: **b.** *S. crospedospilus*; **c.** *S. eurydice*; **d.** *S. fuscovarius*; **e-g.** *S. similis*; **g.** Cromossomos de *S. similis* com coloração convencional e bandas de replicação mostrando pares 3 e 4 normais e heteromórficos (setas), respectivamente. Bar = 10  $\mu$ m.

**Figura 6.** Comparativo de cromossomos de *Scinax* com Bandas de replicação após incorporação por BrdU. Espécies do clado de *S. catharinae*: **Sh.** *S. hiemalis*; **Sl.** *S. littoralis*. Espécies do clado de *S. ruber*: **Sc.** *S. crospedospilus*; **Se.** *S. eurydice*; **Sf.** *S. fuscovarius*; **Ss.** *S. similis*.

**Figura 7.** FISH com sondas teloméricas em metáfases de *Scinax*. **a-c.** Espécies do clado de *S. catharinae*: *S. hiemalis*, *S. littoralis* e *Scinax* sp. gr. *catharinae*. **d-e.** Espécies do clado de *S. ruber*: *S. crospedospilus* e *S. hayii*. Bar = 10  $\mu$ m.

**Figura 8.** Banda C em espécies de *Scinax*. **a-c.** Espécies do clado de *Scinax catharinae*: *S. albicans*, *S. argyreornatus* e *S. littoralis*. **d-f.** Espécies do clado de *S. ruber*: *S. crospedospilus*, *S. fuscovarius* e *S. hayii*. Bar = 10  $\mu$ m.

**Figura 9.** Coloração com fluorocromos DAPI (coluna da esquerda) e CMA<sub>3</sub> (coluna da direita) em metáfases de espécies do clado de *Scinax catharinae*. **a-b.** *S. albicans*; **c-d.** *S. argyreornatus*; **e-f.** *S. hiemalis*; **g-h.** *S. littoralis*; **i-j.** *Scinax* sp. gr. *catharinae*. Notar marcações com CMA<sub>3</sub> na região das Ag-RONs (setas) e nos centrômeros em *S. littoralis* (**h**). Bar = 10  $\mu$ m.

**Figura 10.** Coloração com fluorocromos DAPI (coluna da esquerda) e CMA<sub>3</sub> (coluna da direita) em metáfases de espécies do clado de *Scinax ruber*. **a-b.** *S. crospedospilus*; **c-d.** *S. eurydice*; **e-f.** *S. fuscovarius*; **g-h.** *S. hayii*. Notar marcações com CMA<sub>3</sub> na região das Ag-RONs (setas) e nos centrômeros em *S. crospedospilus* (**b**) e *S. hayii* (**h**). Bar = 10  $\mu$ m.

**Figura 11.** Células meióticas de *Scinax*. **a-f.** Espécies do clado de *S. catharinae*: *S. argyreornatus*, *S. hiemalis* e *S. littoralis*; **g-n.** Espécies do clado de *S. ruber*: *S. caldarum*, *S. crospedospilus*, *S. eurydice* e *S. hayii*. **a, c, e, g, i, k, m.** Metáfases I com 12 bivalentes; **b, d, f, h, j, l, n.** Metáfases II com 12 cromossomos. Bar = 10  $\mu$ m

Figura 3

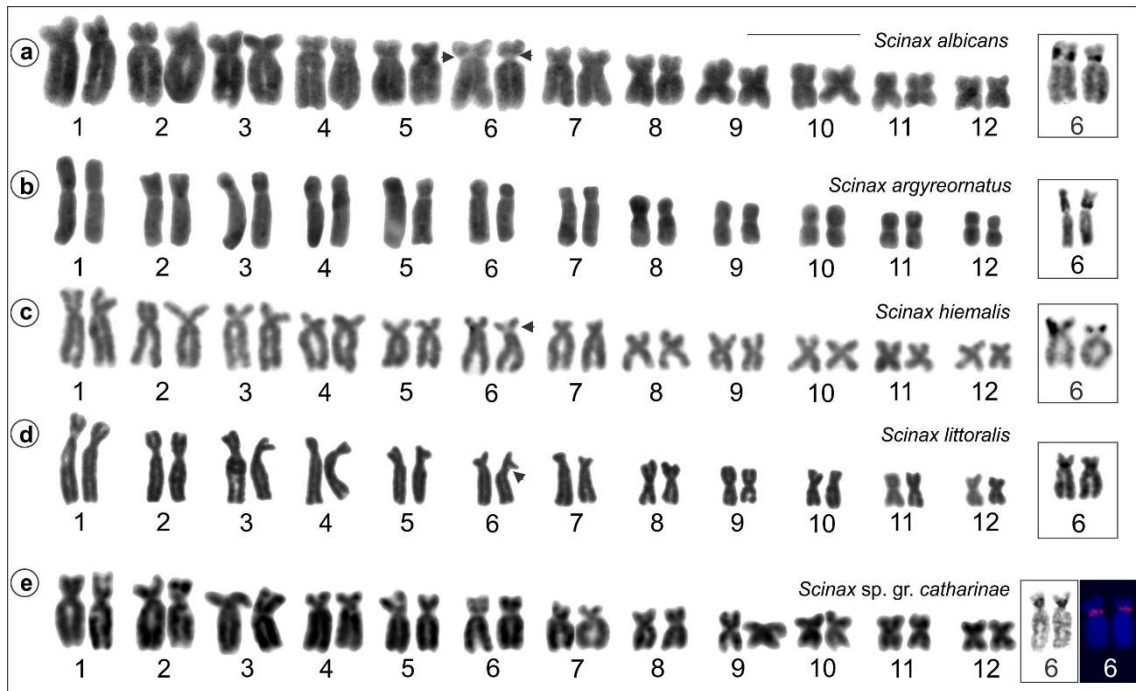


Figura 4

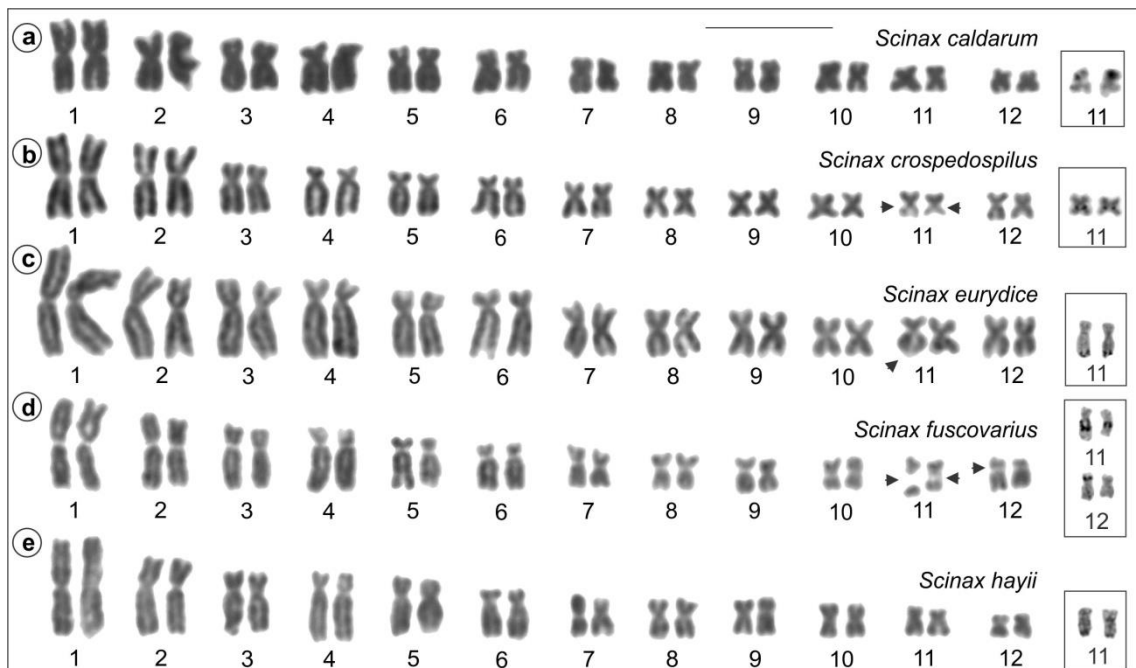


Figura 5



Figura 6

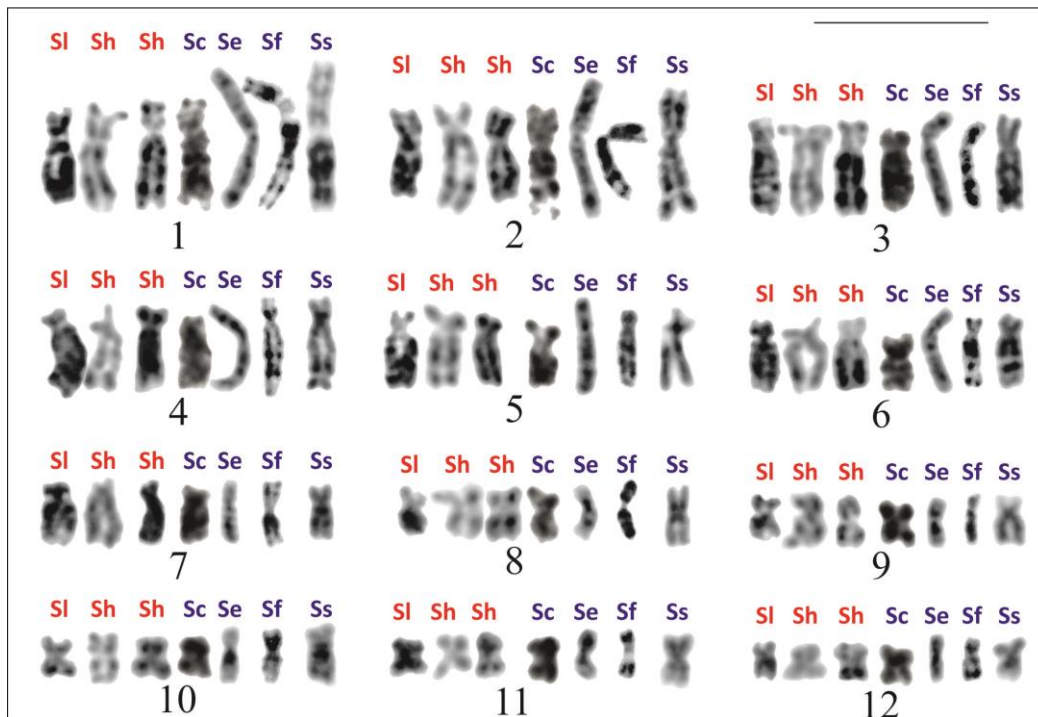


Figura 7

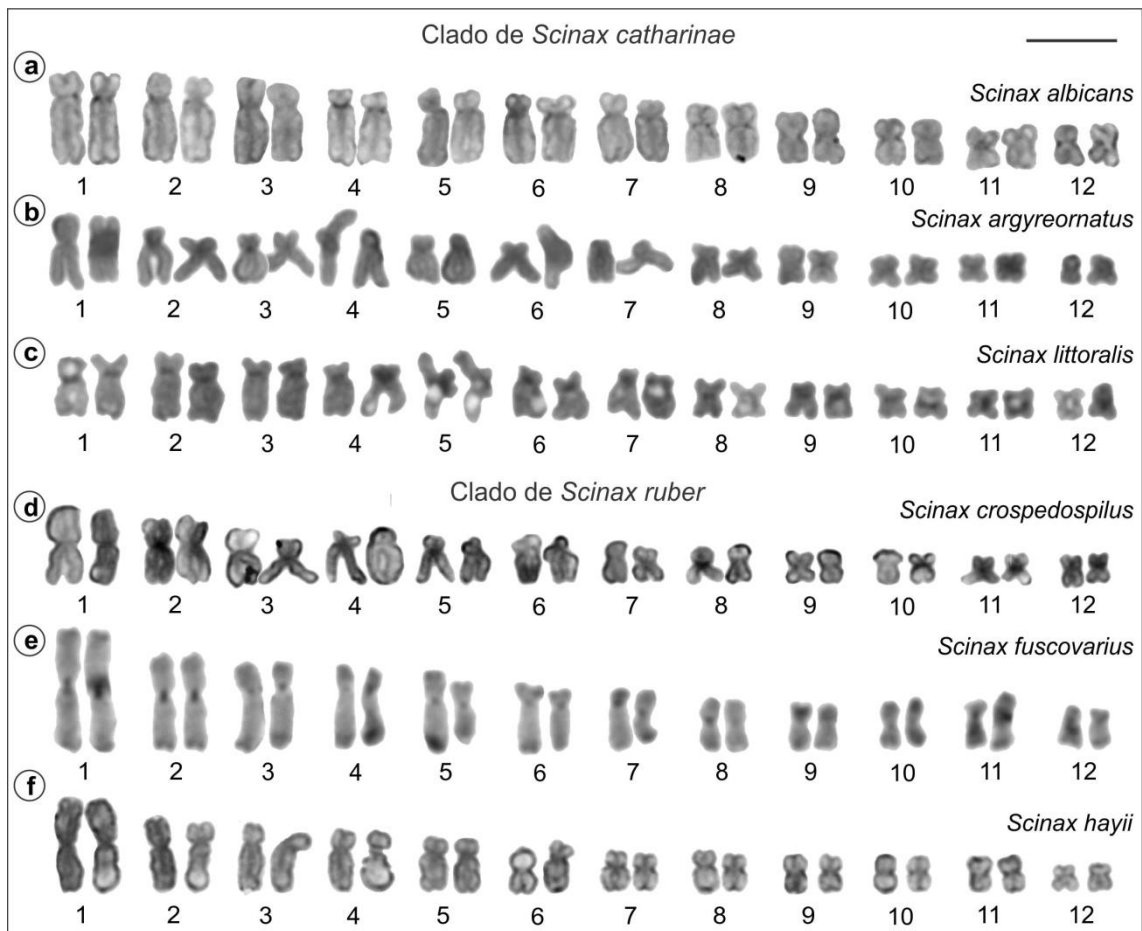


Figura 8

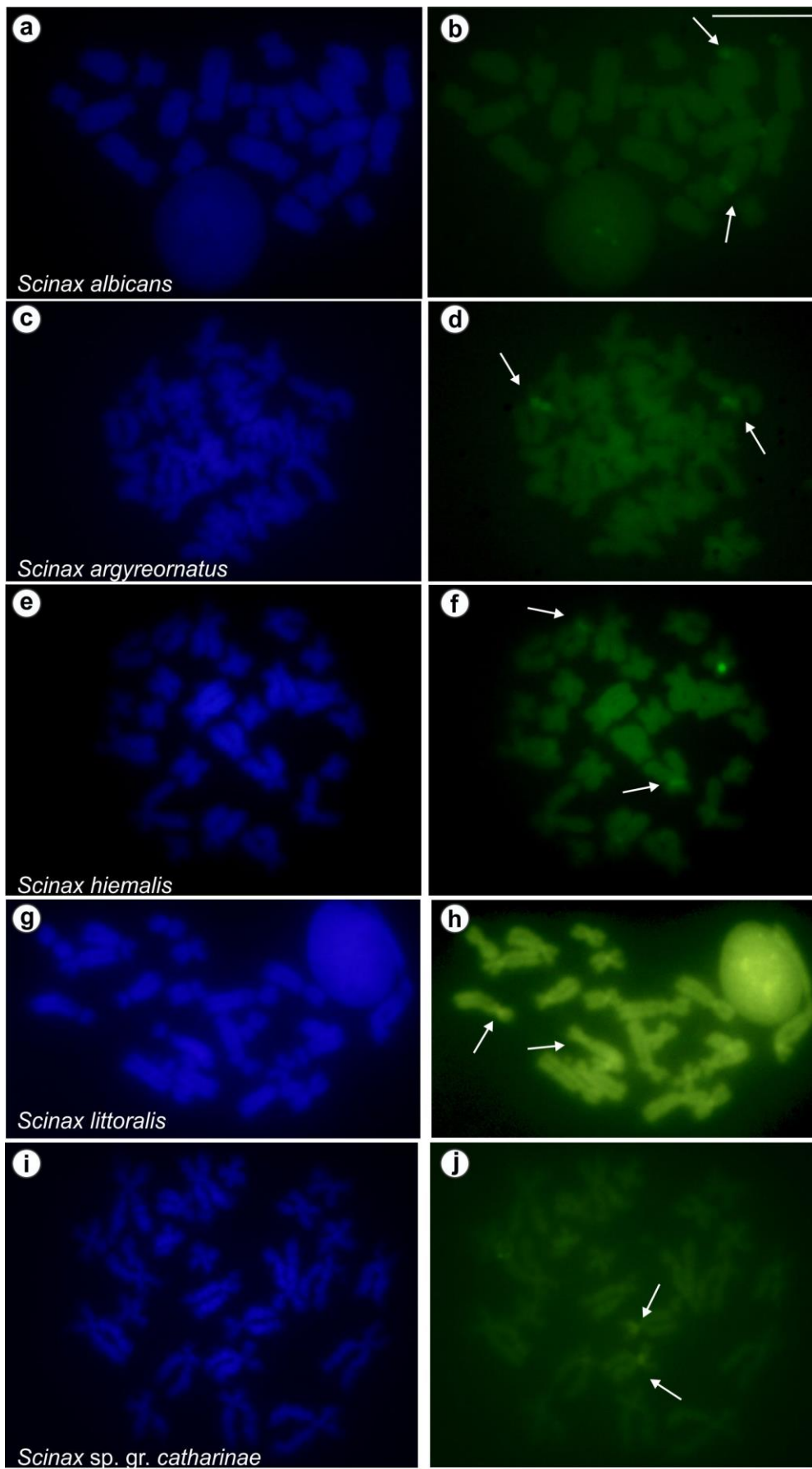


Figura 9

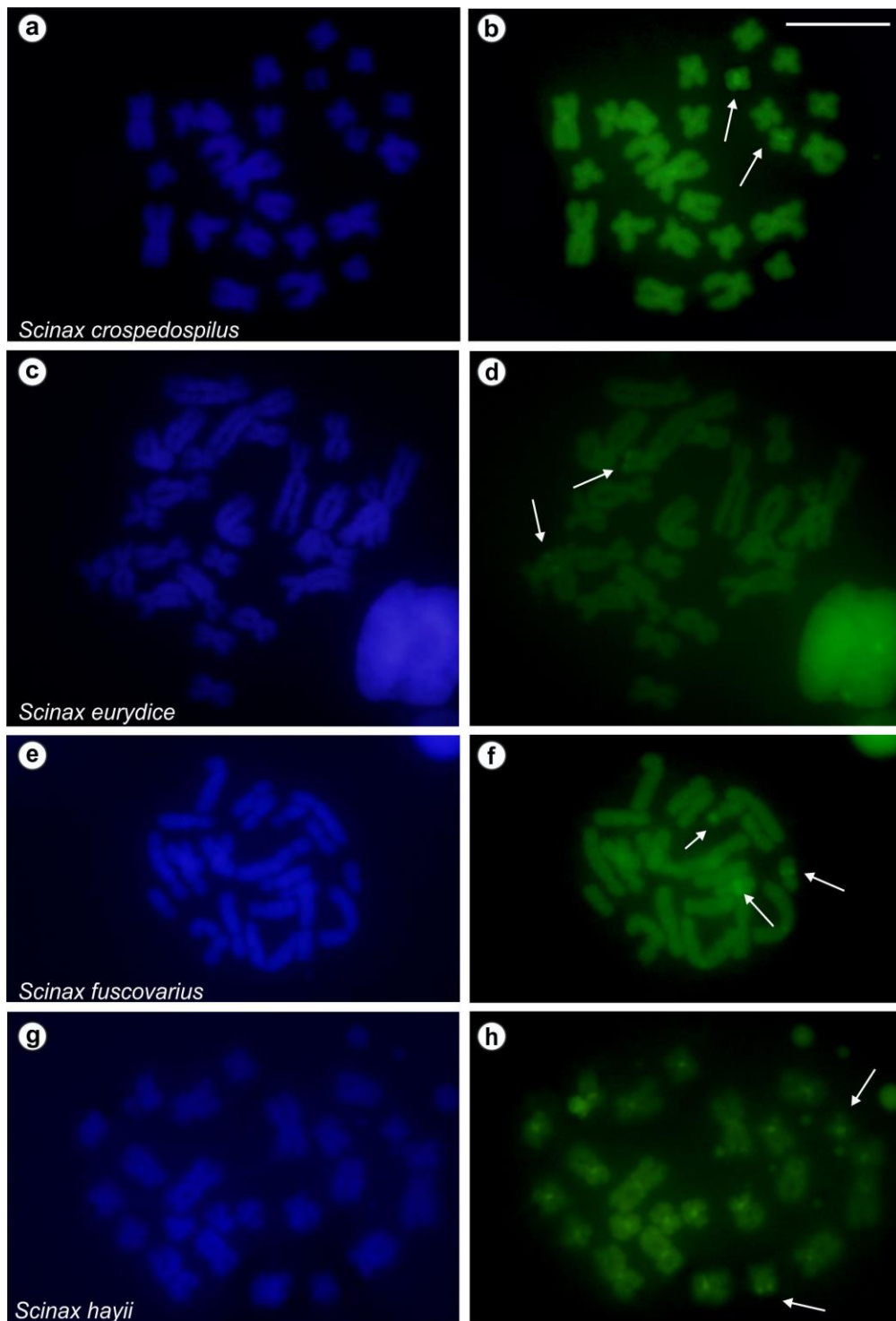


Figura 10

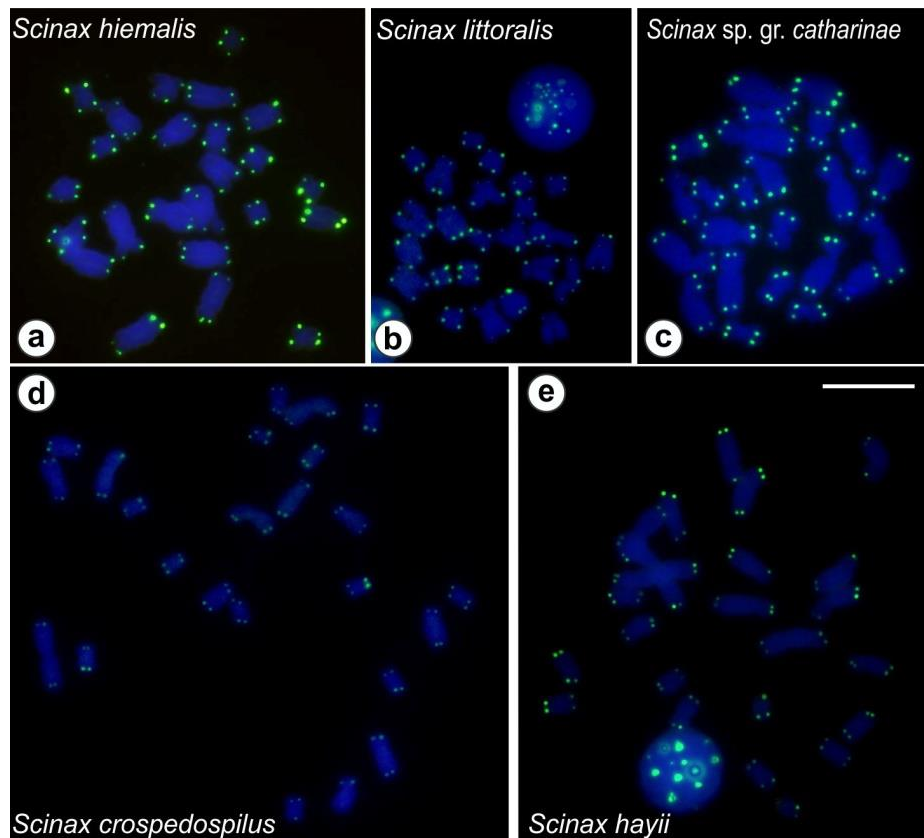
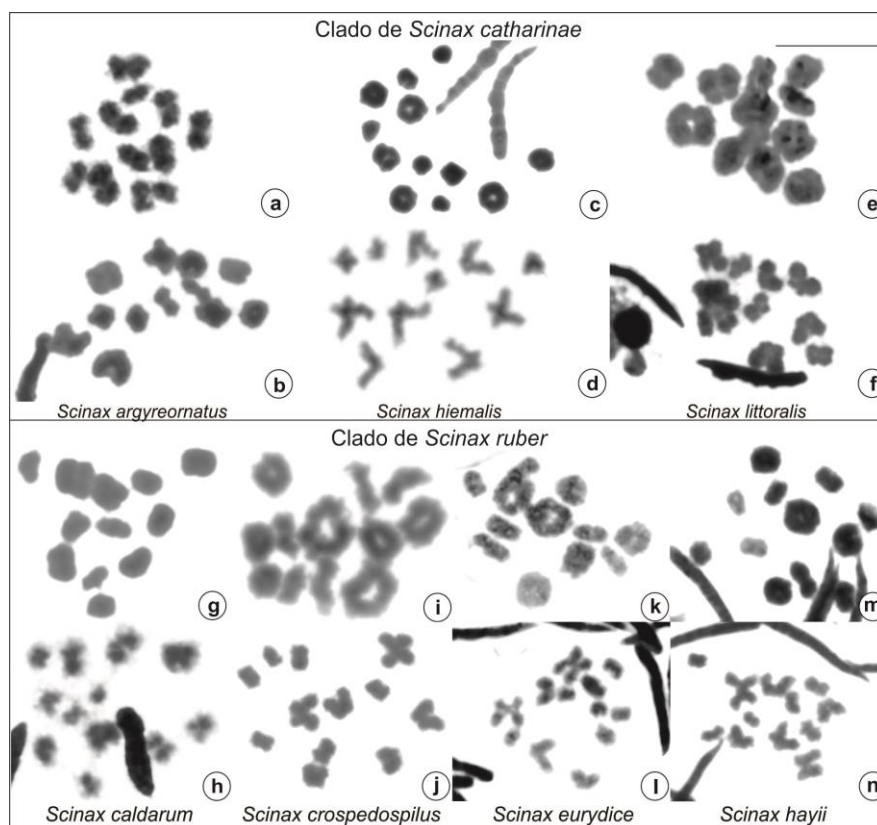


Figura 11



**ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DE *SCINAX* PERTENCENTES  
AOS CLADOS DE *S. CATHARINAE* E *S. RUBER*, COM O USO DE  
TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR**

---

Gabriela Isabela Gomes de Oliveira

---

Profa. Dra. Sanae Kasahara

---

Dra. Simone Lilian Gruber

Rio Claro, 26 de Março de 2015.